

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA GERMINAÇÃO *IN*
VITRO DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

Nádia Pita Figueiredo Vedovato
Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA GERMINAÇÃO *IN*
VITRO DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

Nádia Pita Figueiredo Vedovato

Orientador: Prof. Dr. Antônio Orlando Di Mauro

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Unêda-Trevisoli

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2011

Vedovato, Nádia Pita Figueiredo

V416o Otimização de protocolos de germinação in vitro de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) / Vedovato, Nádia Pita Figueiredo. – – Jaboticabal, 2011

xiv, 62 f. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Antônio Orlando Di Mauro

Banca examinadora: Sandra Helena Unêda-Trevisoli, Bianca Waléria Bertoni, Jesus Aparecido Ferro

Bibliografia

1. Plantas oleaginosas. 2. Micropropagação. 3. Ácido giberélico. 4. Complexo vitamínico. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:582.682.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

NÁDIA PITA FIGUEIREDO VEDOVATO – nasceu em 28 de julho de 1966 em Guará, São Paulo. Concluiu o curso de Licenciatura Plena em Biologia na Universidade de Franca (UNIFRAN) em 1990. Lato Sensu em Cultura de Tecidos de Plantas: Tecnologias e Aplicações pela Universidade de Lavras (UFLA), Minas Gerais, em 2008. Leciona no Ensino Fundamental, pela Prefeitura Municipal de Guará, São Paulo, desde 2006.

Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um
pode começar agora e fazer um novo fim.

(Xico Chavier)

Dedico às pessoas mais importantes da minha vida...

Meus filhos maravilhosos:

Uly, Yago e Yan

E a minha mãe Nadir, que sempre está ao meu lado me apoiando e
incentivando...

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus pais pela vida, proteção e orientação sempre.

A minha família, Paulo, Uly, Yago e Yan, pelo importante apoio, contribuição e paciência em todos os momentos.

As minhas irmãs queridas Michelle e Olivia, pela presença em minha vida.

A Tia Rô e ao Tio Carlinhos que tanto me apoiaram.

Aos amigos, Viviane, Aretha, Welington, Mariana, Eduardo, Roberta, Guillermo e Maria e pela ajuda e companheirismo.

Aos professores Antônio Orlando e Sandra, pelo conhecimento compartilhado, pela orientação, dedicação e por acreditarem em mim.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	X
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. Pinhão-manso: descrição morfológica e produção	16
2.2. Formas de propagação do pinhão-manso	20
2.3. A importância da cultura de tecidos no melhoramento genético.....	22
2.4. Cultivo de embriões <i>in vitro</i>	27
2.5. Germinação de sementes <i>in vitro</i>	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Experimento 1 - Cultivo <i>in vitro</i> de embriões zigóticos de pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.) na presença de complexo vitamínico	31
3.2. Experimento 2 - Germinação de sementes <i>in vitro</i> de pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.) na presença de ácido giberélico GA3	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1. Experimento 1 - Cultivo <i>in vitro</i> de embriões zigóticos de pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.) na presença de complexo vitamínico	36
4.2. Experimento 2 - Germinação de sementes <i>in vitro</i> de pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.) na presença de ácido giberélico GA3	44
5. CONCLUSÕES.....	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA GERMINAÇÃO IN VITRO DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)

RESUMO - O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma oleaginosa da família *Euphorbiaceae*, que se destaca pelo seu grande potencial sócio econômico e como uma excelente alternativa para a produção de biodiesel. O presente trabalho teve como objetivo principal a padronização e otimização de protocolos de cultivo *in vitro* para embriões e sementes com adição dos suplementos complexo vitamínico e ácido giberélico em meio MS, visando a obtenção de plântulas assépticas para a extração de explantes que serão utilizados em outros processos de cultura de tecidos e transformação genética para a produção futura de mudas comerciais padronizadas. No primeiro experimento com embriões, em meio MS com sacarose e ágar foram acrescentadas várias dosagens de um complexo vitamínico (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 ml.L^{-1}) e após duas semanas do estabelecimento, dez variáveis foram analisadas. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as variáveis significativas tiveram suas médias comparadas pelo teste Tukey (5%) e algumas pela regressão polinomial. Os resultados indicaram que a adição de vitaminas ao meio de cultura não é essencial para a germinação e crescimento inicial. No entanto, para a formação de raízes, a presença do complexo vitamínico forneceu incrementos nos resultados. A presença de folhas também respondeu positivamente com o aumento da dosagem de vitaminas. No segundo experimento com as sementes, várias dosagens de ácido giberélico GA3 (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg.L^{-1}) foram acrescentadas em meio MS com sacarose e ágar e após duas semanas dez variáveis foram analisadas. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as variáveis significativas tiveram suas médias comparadas pelo teste Tukey (5%) e algumas pela regressão polinomial, assim como no primeiro experimento. Os resultados indicaram que a adição de GA3 ao meio de cultura não é essencial para a germinação e crescimento inicial, mas foram eficientes no desenvolvimento da parte

aérea e sistema radicular. A suplementação do meio com o complexo vitamínico ou giberelina *in vitro* proporcionou o desenvolvimento de plântulas assépticas com parte aérea bem desenvolvida e presença de raízes, sendo ótimas fontes de extração de explantes.

Palavras-chave: ácido giberélico, complexo vitamínico, micropropagação, plantas oleaginosas

OPTIMIZATION OF PROTOCOLS FOR IN VITRO GERMINATION OF PHYSIC NUT (*Jatropha curcas* L.)

SUMMARY - The phisic nut (*Jatropha curcas* L.) is an oil family Euphorbiaceae, which is distinguished by its great potential economic partner and as an excellent alternative to produce biodiesel. The present work had as main objective the standardization and optimization of protocols for in vitro embryos and seeds with the addition of multivitamin supplements and gibberellic acid on MS medium, in order to obtain seedlings for the extraction of aseptic explants to be used in other processes of tissue culture and genetic transformation for the future production of standard commercial seedlings. In the first experiment with embryos in MS medium with sucrose and agar were added various doses of a vitamin complex (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 ml.l⁻¹) and after two weeks of the establishment, ten variables were analyzed. We used a completely randomized design with four replications. Data were subjected to analysis of variance, and the significant variables had their means compared by Tukey test (5%) and some by polynomial regression. The results indicated that the addition of vitamins to the culture medium is not essential for germination and early growth. However, for root formation, the presence of vitamin complex increments provided in the results. The presence of leaves also responded positively by increasing the dosage of vitamins. In the second experiment with the seeds, various doses of gibberellic acid GA3 (0.0, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 mg.L⁻¹) were added in MS medium with sucrose and agar, and after two weeks ten variables were analyzed. We used a completely randomized design with four replications. Data were subjected to analysis of variance, and the significant variables had their means compared by Tukey test (5%) and some by polynomial regression, as in the first experiment. The results indicated that the addition of GA3 to the culture medium is not essential for germination and early growth, but were efficient in the development of shoot and root system. The supplementation of medium with gibberellin or vitamin complex in vitro enabled the development of aseptic seedlings with

well developed shoots and presence of roots, being a great source of extraction of explants.

Keywords: gibberellic acid, vitamin complex, micropropagation, oilseed plants

1. INTRODUÇÃO

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) pertence à família Euphorbiaceae, sendo a mesma família da mamona (*Ricinus* sp.) e da mandioca (*Manihot* sp.). Embora existam controvérsias quanto a sua origem, a maioria dos pesquisadores diz ser uma espécie nativa da América tropical e naturalizada em regiões tropicais e subtropicais da Ásia e África (AUGUSTUS et al., 2002; ARRUDA et al., 2004). No Brasil apresenta uma distribuição geográfica ampla, devido a sua rusticidade, resistência a longas estiagens, pragas e doenças, se desenvolvendo bem nos terrenos áridos e pedregosos (ARRUDA et al., 2004; PRAMANIK, 2003), ocorrendo espontaneamente desde o nordeste até o Paraná.

Existe um grande interesse pela cultura do pinhão-manso devido ao seu potencial para a produção de biocombustível, pois o teor de óleo das suas sementes (25 a 40%) é superior ao da maioria das oleaginosas utilizadas para esta finalidade (ARRUDA et al., 2004). Apresenta uma produtividade alta (média de 5 T / ha) de sementes com a cultura estabelecida e em condições favoráveis, podendo gerar aproximadamente 1600 L / ha de óleo vegetal (TEIXEIRA, 2005). Seu óleo tem pouca variação de acidez, melhor estabilidade à oxidação que o óleo de soja, boa viscosidade se comparado ao da mamona e 83% do poder calorífico do óleo diesel (TAPANES et al., 2011).

O plantio de pinhão-manso vem crescendo, tanto em meio a agricultores, como em empresas que buscam um novo nicho de mercado, não só por seu potencial na produção de óleo combustível como também por sua rusticidade, menor exigência hídrica e nutricional, capacidade de recuperar áreas degradadas, elevado potencial de rendimento de sementes, desenvolvimento perene, não necessitando, assim, de renovação anual de plantio e principalmente por ser espécie não - alimentar, não oferecendo concorrência com culturas alimentícias.

Nesse contexto surge a necessidade de se produzir plantas com boa produtividade e genótipos superiores, que podem ser obtidas por meio do

melhoramento genético por métodos convencionais, desse modo explorando-se a variabilidade existente ou por meio de técnicas como hibridação interespecífica, indução de mutantes, variação somaclonal e transformação genética.

Assim, o uso das técnicas de cultura de tecidos pode contribuir cada vez mais para a evolução dos programas de melhoramento de plantas, acelerando, simplificando e tornando mais eficiente o processo de obtenção de genótipos promissores.

Diante do grande interesse pela cultura do pinhão-mansão, da falta de informações e da carência de trabalhos publicados, o presente trabalho vem contribuir com informações sobre a análise do desenvolvimento de embriões e germinação de sementes *in vitro* em meio de cultura com diferentes doses de suplementos, visando a otimização de um protocolo de cultivo *in vitro* para a obtenção de plântulas assépticas.

A suplementação do meio de cultura favorece a germinação *in vitro* e o desenvolvimento de plântulas com elevado potencial fisiológico para serem utilizadas como fontes de explante. Desse modo, muitas vezes é necessário testar, de forma empírica, diferentes meios de cultura com modificações, com a suplementação de vitaminas e reguladores de crescimento, para se obter um bom resultado.

Com o objetivo de otimizar a germinação e o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de pinhão-mansão, foram testadas diferentes doses de um complexo vitamínico no cultivo de embriões e de ácido giberélico (GA3) para a germinação de sementes em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com sacarose e ágar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Pinhão-manso: descrição morfológica e produção

O pinhão-manso é uma planta perene, caducifólia, de crescimento rápido, alcançando uma altura média de até 5 metros, com diâmetro do tronco de aproximadamente 20 cm; raízes curtas e pouco ramificadas. Possui caule liso, com cicatrizes produzidas pela queda das folhas na estação da seca (CORTESÃO, 1956).

A planta possui a arquitetura clássica das euforbiáceas, onde a primeira inflorescência é apical, originando a emissão de novos ramos (secundários) de onde surgem novas inflorescências que, por sua vez, impedem novamente o crescimento apical, surgindo os próximos ramos (terciários) e assim sucessivamente (Figura 1 A). Desta forma o número de brotações tende a apresentar uma progressão geométrica (EMBRAPA, 2008).

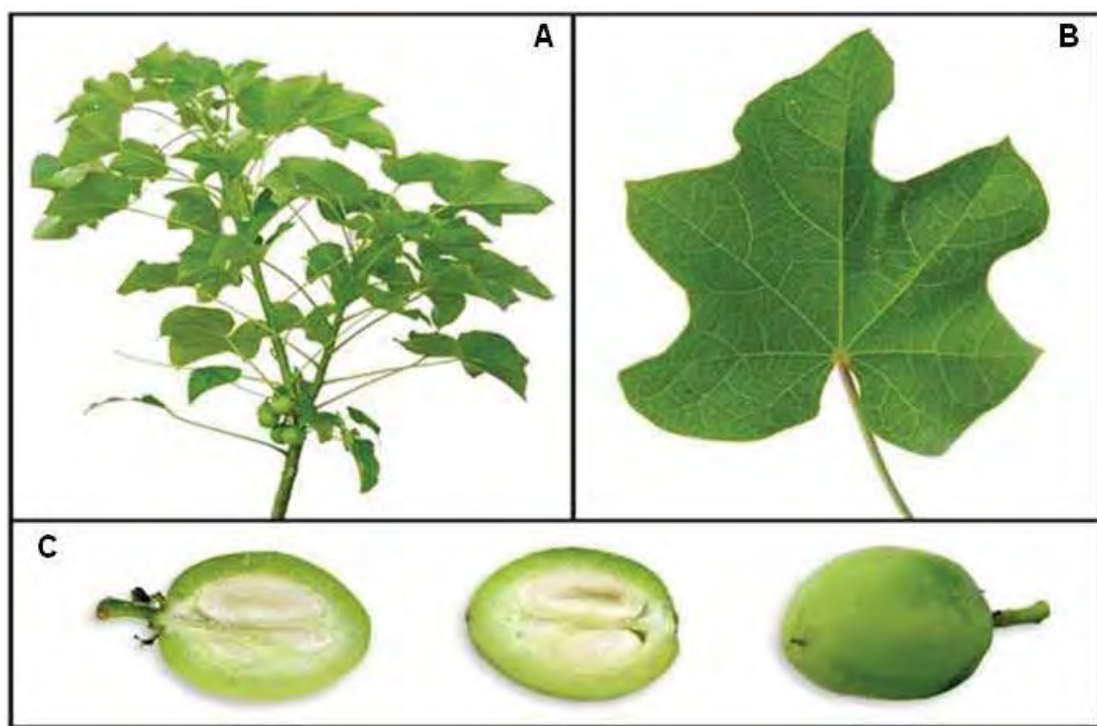


Figura 1. Aspecto geral de um galho de pinhão-mansó com frutos verdes (A), folha (B) e fruto verde, visão interna e externa (C).

As folhas do pinhão-mansó são verdes, esparsas e brilhantes, largas e alternadas, com cinco lobos, pecioladas, com nervuras salientes na face inferior (Figura 1 B). Apresenta flores monóicas pequenas, amarelo-esverdeadas (Figura 2 D). As flores masculinas são em maior número, nas extremidades das ramificações, sendo largamente pedunculadas, as femininas estão presentes nas ramificações e diferenciam-se pela ausência de pedúnculo articulado. (HELLER, 1996).

Os frutos são do tipo cápsula ovóide, com diâmetro de 1,5 a 3,0 cm, trilocular, contendo geralmente três sementes, sendo uma em cada cavidade (Figura 1 C e Figura 2 B). Formado pelo pericarpo, lenhoso e deiscente, inicialmente é verde, passando a amarelo, castanho e preto quando atinge a maturidade (Figuras 2 A e C). No interior da semente está o albúmem, branco e rico em óleo que é composto basicamente por 14,3% de ácido palmítico, 5,1% de ácido esteárico, 41,1% de ácido oléico e 38,1 % de ácido linoléico (SILVA et al., 2007)

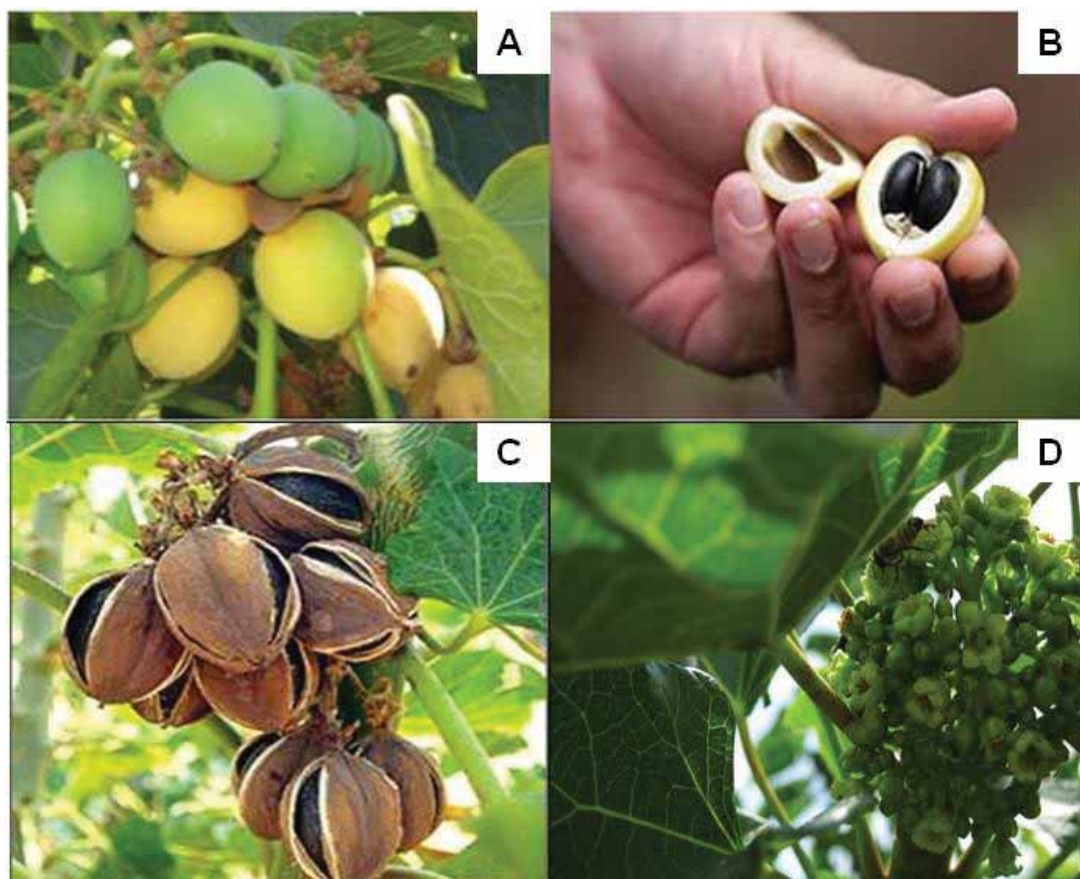


Figura 2. Frutos de pinhão-mansinho em diferentes estádios de maturação (A), aspecto interno do fruto maduro de pinhão-mansinho (B), frutos secos (C) e flores (D).

O desenvolvimento dos frutos é geralmente, desuniforme e o crescimento tardio, só começa após a maturação dos frutos “temporões”; Dessa forma, a planta apresenta com frequência, frutos em vários estágios de amadurecimento prejudicando o processo de colheita mecanizada. O método mais prático e rápido de colheita dos frutos, ao contrário do processo tradicional de catação manual, é fazendo vibrar o pé do pinhão-mansinho, a meia altura, o que provoca a queda apenas dos frutos maduros, adaptando-se uma lona sobre o solo para em seguida, os frutos serem expostos à secagem ao sol (PINHÃO MANSO, 2011b).

Em relação à produtividade, sabe-se que o rendimento por planta varia conforme as condições edafoclimáticas, regularidade pluviométrica e tratamentos durante o cultivo,

podendo frutificar por mais de 40 anos (GLOBO RURAL, 2006). O pinhão-manso inicia a produção de frutos no primeiro ano de cultivo, embora atinja o seu clímax reprodutivo no quarto ano, com potencial para produzir acima de 4.000 kg/ha de grãos (DRUMOND et al., 2009).

TOMINAGA et al. (2007) afirma que a produção média no primeiro ano é de 100 kg de sementes por hectare, passando a 500, 2.000 e 4.000 Kg no segundo, terceiro e quarto ano respectivamente, dependendo das condições climáticas e do solo da região. No Centro Experimental de Ségou, antiga África Ocidental Francesa, a produtividade da cultura alcançava índices em torno de 8.000 Kg de sementes por hectare. Quando a cultura estiver estabilizada a produção pode gerar de 2000 a 3500 litros de óleo por hectare (ALMEIDA, 2009).

A espécie ainda está em fase de domesticação e todas as informações referentes à sua produtividade, manejo de doenças e pragas, podas, espaçamento, plantio consorciado, princípios tóxicos, entre outros, são de grande importância (Figura 3).



Figura 3. Aspecto geral de um cultivo de pinhão-mansô (UNESP de Jaboticabal/SP).

2.2. Formas de propagação do pinhão-mansô

O pinhão-mansô pode ser multiplicado por via seminal e, ou, clonal. O plantio por sementes pode ser feito diretamente nas covas ou a partir da produção de mudas, sendo utilizado um espaçamento de 3 x 2 metros entre plantas, com necessidade de dois quilogramas de sementes em média, para um hectare de plantio (PURCINO & DRUMMOND, 1986).

Na propagação por sementes foram encontrados bons resultados, mas com grande índice de polinização cruzada, gerando alta variabilidade genética com desuniformidade da população, prejudicando a produtividade (NUNES, 2007 a).

A multiplicação clonal por estaquia é uma maneira mais prática e comum de propagação do pinhão-mansão. As estacas devem ser provenientes de ramos próximos da base do caule, de preferência ramos não muito grossos, retos, com entrenós curtos, casca lisa, acinzentadas e brilhantes, com 40 a 50 cm de comprimento. Os ramos utilizados devem ter de um a dois anos, isentos de pragas e doenças e as ferramentas utilizadas para o corte devem ser afiadas, evitando o esmagamento dos tecidos. Um detalhe importante é que as estacas, após o corte, devem ficar voltadas para cima para que o látex coagule em volta do corte, onde surgirão as primeiras raízes (PINHÃO MANSO, 2011).

Esse método apresenta vantagens como: simplicidade, economia, produção de sementes logo nos primeiros anos e facilidade no enraizamento, mas com a desvantagem de que as plantas são de vida mais curta e sistema radicular mais fraco, com raízes superficiais, deixando a planta sujeita ao tombamento e sensível à falta de água e nutrientes no solo (SHIVASTAVA & BANERIJEE, 2009).

O melhor método de propagação do pinhão-mansão ainda não está definido, pois vantagens e desvantagens podem ser apontadas em todas as opções existentes (SATURNINO et al., 2005).

Uma boa opção é a propagação *in vitro* de plantas (micropropagação), pois permite acesso rápido à mudas de melhor qualidade, oriundas de variedades tradicionais ou desenvolvidas por programas de melhoramento genético. Com as vantagens da produção de mudas em qualquer época do ano, com economia de tempo e espaço e principalmente por gerar mudas com desenvolvimento uniforme, permitindo uma sincronização da colheita, que no caso do pinhão-mansão é um dos objetivos para a melhoria da cultura.

A propagação *in vitro* ou cultura de tecidos é uma técnica utilizada para propagar plantas dentro de frascos ou tubos de ensaio, sob adequadas condições de assepsia, nutrição e fatores ambientais, como luz e temperatura. Essa técnica parte do princípio de que a célula é autônoma e possui potencial para originar um organismo completo, sob determinadas condições de estímulos, essa é a Teoria da Totipotencialidade, formulada por Matthias Schleiden & Theodor Schwann, em 1838 (CID, 2000).

O cultivo *in vitro* de plantas é uma parte importante da biotecnologia, atuando várias áreas como a florestal e agrícola. Pela sua polivalência permite, por exemplo: a cultura de protoplastos para hibridização de variedades diferentes, vencendo barreiras genéticas; o cultivo de anteras para a obtenção de plantas haplóides; cultura de células, embriões e meristemas na conservação de genótipos em bancos de germoplasma, indução de mutantes, obtenção de plantas livres de vírus e na produção de clones, além de fornecer suporte em trabalhos de transformação genética. No campo da aplicação básica, fornece suporte à bioquímica, fisiologia vegetal, fitopatologia e à citogenética (CID, 2000).

2.3. A importância da cultura de tecidos no melhoramento genético

Conforme mencionado anteriormente, a cultura de tecidos se baseia na Teoria da Totipotência Celular, onde os seres vivos têm capacidade de regenerar organismos inteiros, idênticos à matriz doadora, a partir de células únicas ou de tecido.

Através de dois processos distintos, pode-se realizar a cultura de tecidos *in vitro*: Organogênese e Embriogênese. A Organogênese é o processo de formação de partes aéreas ou raízes, originadas de diferentes explantes, os quais são induzidos a sofrer mudanças que levam à produção de uma estrutura unipolar, denominada primórdio vegetativo. O sistema vascular desta estrutura está freqüentemente conectado com o tecido doador do explante, resultando na formação de plântulas completas. O processo pode ocorrer diretamente a partir de células do explante original, chamado de organogênese direta, ou indiretamente, via formação de calos, massa de células pouco ou não diferenciadas, com crescimento desordenado. A embriogênese somática ou adventícia é o processo pelo qual células somáticas do explante diferenciam-se em embriões somáticos, ocorrendo a formação de estruturas bipolares, não conectadas ao explante pelo sistema vascular, dando origem a novos indivíduos. A formação de

embriões somáticos também pode ocorrer diretamente do explante, da Embriogênese Somática Direta, ou o que é mais frequente, resultar da cultura de calos, Embriogênese Somática Indireta (PERES, 2002).

Na Embriogênese Somática Indireta, os embriões somáticos se formam a partir de um tecido intermediário chamado calo, que apresenta células em diferentes estágios de diferenciação que podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos (GUERRA et al., 1999).

A cultura de tecidos é uma excelente ferramenta para clonar plantas em escala comercial e reproduzir espécies de multiplicação difícil. Também é muito utilizada em estudos de transformação genética, conservação e transporte de germoplasma, além da limpeza clonal, por meio da qual é possível a produção de mudas livres de vírus em algumas espécies como abacaxi, morango, citrus, batata e outros (FERREIRA et al., 1998).

Existem várias técnicas de culturas de tecidos utilizadas na agricultura, como: cultura de meristemas, segmentos nodais e ápices caulinares, cultura de embriões, de raízes, polinização e fertilização *in vitro*, cultura de ovários, cultura de protoplastos e indução de mutações *in vitro*.

Na cultura de tecidos podem ocorrer alguns problemas que afetam diretamente o desenvolvimento, os mais comuns são: a oxidação, o declínio no vigor, hiperhidricidade, aclimação, enraizamento e contaminação. (ALVES et al., 2011).

Para se estabelecer uma cultura *in vitro*, alguns aspectos devem ser analisados e definidos em função da espécie e do objetivo do trabalho, sendo necessária a escolha do explante, a sua assepsia, o meio de cultura, com ou sem suplementação, temperatura e fotoperíodo mais adequados para a técnica que será desenvolvida.

A assepsia do explante é uma etapa essencial, na qual podem ser utilizadas diversas substâncias de ação germicida. As mais usadas são o etanol, o hipoclorito de sódio e o de cálcio. Detergentes de cozinha, bem como o Tween 20, podem ser utilizados na solução de desinfestação com o objetivo de facilitar o contato dos agentes esterilizantes com o tecido, reduzindo a tensão superficial (WILLADINO & CÂMARA, 2009).

Em relação ao meio de cultura, são inúmeras as formulações, não existindo um meio padrão. O mais conhecido e utilizado é o meio idealizado por Murashige e Skoog, em 1962, conhecido mundialmente como meio MS.

A composição dos meios nutritivos deve abranger todos os minerais essenciais à nutrição vegetal, além de fornecer uma fonte de carbono, em geral um carboidrato, tendo em vista a reduzida capacidade, ou mesmo a total incapacidade fotossintética dos explantes. Algumas vitaminas e principalmente reguladores de crescimento, como auxinas e citocininas, também podem ser incorporados ao meio nutritivo, para induzir o desenvolvimento dos explantes.

A consistência do meio deve ser ajustada com a adição de agentes geleificantes como o ágar. Também há a opção de se utilizar um meio líquido, sendo que neste caso o meio é mantido sob agitação constante e os explantes sobre uma ponte, evitando que fiquem submersos.

Algumas plantas originadas por sucessivos ciclos de cultura *in vitro*, podem apresentar algumas características que diferem da planta original doadora do explante, resultando em alterações estáveis e transmissíveis aos descendentes, conhecido como Variação Somaclonal. Esse tipo de variação ocorre quando as culturas são estabelecidas a partir de explantes que não contém um meristema pré-organizado, ou ainda, quando ciclos sucessivos de cultivo são mantidos repetidamente como calos. A passagem de células e tecidos pela fase de calo, com alta atividade metabólica e divisão celular, pode levar à formação de células e, ou, calos com características genéticas diferentes das células iniciais.

A variação somaclonal pode ser considerada como uma desvantagem quando for necessário garantir a fidelidade clonal, como na micropropagação clonal onde a formação de calos é indesejável uma vez que a constituição cromossômica deste material é, em geral, instável, podendo originar variantes genéticas chamado variação somaclonal (LARKIN & SCOWCROFT, 1981).

No entanto, alguns programas de melhoramento de plantas estão fundamentados na variabilidade genética gerada espontaneamente, seja ela *in vivo* ou *in vitro*, para seleção de genótipos de interesse agrônomo. A seleção neste caso seria

dependente das variações induzidas através do processo de cultivo de células ou tecidos *in vitro*, se tornando uma ferramenta essencial ao desenvolvimento do programa.

Alguns trabalhos com cultura de tecidos de pinhão manso têm sido desenvolvidos, como germinação *in vitro* de sementes e embriões, métodos de assepsia, avaliação de meios de cultura e hormônios de crescimento, o que contribui para o conhecimento da cultura e ao mesmo tempo fornece subsídios para futuros trabalhos, visando o melhoramento genético da espécie e a sua propagação (NUNES et al., 2008; FARIAS, 2008, COSTA et al. , 2010; CARVALHO et al., 2010).

A planta ainda está em fase de domesticação e, portanto, todos os aspectos relacionados ao seu cultivo necessitam de estudo, como na área de propagação vegetativa, seleção de genótipos promissores, desenvolvimento e adaptação de práticas culturais, estudos sobre a fenologia da planta e aspectos relacionados com a pré e pós-colheita do fruto, entre outros. Portanto, tecnologias de propagação *in vitro* bem desenvolvidas e, ou, adaptadas são de grande importância para programas de conservação de recursos genéticos e melhoramento genético da cultura.

Desenvolver protocolos de espécies lenhosas a partir de explantes de plantas germinadas *in vitro* é mais viável do ponto de vista fisiológico e experimental, devido ao seu estágio juvenil e melhor resposta *in vitro*, possibilitando o sucesso de posteriores experimentos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

É necessária mais estudos sobre protocolos de cultivo eficientes, incluindo os testes com reguladores crescimento, tipos de explantes e sua manipulação genética, a fim de se obter indivíduos e, ou, clones superiores que apresentem bom rendimento no campo.

Para a cultura do pinhão manso, como ainda não há um domínio tecnológico que garanta rentabilidade no cultivo, é necessária a implantação de um programa de melhoramento genético visando a obtenção de cultivares com maior produtividade e qualidade de óleo, tolerantes a estresses bióticos e abióticos e com outras características de interesse agrônomo.

Outro aspecto que deve ser considerado é o fato de que para a cadeia do biodiesel ser sustentável, tanto o óleo quanto os resíduos gerados, por exemplo, a torta, deve ser utilizada.

A torta resultante da extração do óleo dos frutos de pinhão-manso constitui excelente adubo orgânico, é rica em nitrogênio, fósforo, potássio e proteínas (53-63%). No entanto, para viabilizar o uso desse co-produto para a nutrição animal é necessário que os componentes tóxicos sejam removidos (ADERIBIGBE et al., 1997; MAKKAR et al., 1998).

Existem variedades não tóxicas de pinhão manso no México que podem ser utilizadas em programas de melhoramento visando a produção de torta não tóxica como fonte de proteína para animais e até para alimentação humana (BECKER et al., 1999).

A Embrapa Agroenergia (Brasília/DF), identificou recentemente, uma variedade de pinhão-manso atóxica cuja torta pode ser usada na ração animal, o que aumenta o potencial da cultura que caminha para se tornar uma cultura sustentável. Como a produtividade dessa variedade atóxica é baixa, existem trabalhos visando o seu incremento em programas de melhoramento genético (BIODIESEL, 2011).

O melhoramento genético do pinhão-manso tem como opção os métodos convencionais através da exploração da variabilidade existente ou a obtenção de variabilidade através de técnicas como a hibridação inter-específica, indução de mutantes, variação somaclonal e transformação genética. Assim, o uso das técnicas de cultura de tecidos pode contribuir cada vez mais na evolução dos programas de melhoramento de plantas, acelerando, simplificando e tornando mais eficiente o processo de obtenção de novas cultivares superiores.

2.4. Cultivo de embriões *in vitro*

O termo 'cultura de embrião' é empregado para descrever processos de crescimento de embriões zigóticos *in vitro*, independente da idade, tamanho e estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado (RAPPAPOT, 1954).

A cultura de embriões pode ser usada para: superar dormência de sementes devido à presença de substâncias inibidoras no endosperma ou à imaturidade o embrião; estudar o desenvolvimento e aspectos nutricionais do embrião; testar viabilidade de sementes; resgatar híbridos de cruzamentos incompatíveis e na micropropagação, possibilitando a obtenção de um grande número de plantas em pouco tempo.

Em virtude de sua natureza juvenil com alto poder regenerativo, os embriões são excelentes explantes para a propagação clonal *in vitro*.

O desenvolvimento do embrião *in vitro* gera plântulas axênicas, que é uma ótima fonte de explantes para outros processos de cultura de tecidos, elimina o problema de assepsia do material adulto e oferece uma resposta morfogênica melhor devido ao estágio juvenil desses tecidos (GRIGOLETTO, 1997), garantindo assim o sucesso de experimentos posteriores.

Diversos são os fatores que afetam a eficiência e o sucesso da cultura de embriões *in vitro*, tais como a maturidade fisiológica da semente, desinfestação da semente, a remoção inadequada do embrião, a escolha do meio nutritivo adequado, os reguladores de crescimento utilizados, as substâncias fenólicas liberadas e as condições ambientais de cultivo (CARVALHO & ARAÚJO, 2007).

Embriões excisados no estágio maduro ou próximos ao mesmo devem ser germinados e crescer em meio inorgânico suplementado com uma fonte de energia, em geral sacarose. No estágio de torpedo, os embriões necessitam para o seu desenvolvimento um meio suplementado com sais minerais, sacarose e vitaminas, enquanto que no estágio cordiforme a adição de hormônios ao meio é indispensável.

Assim, o importante é definir um meio de cultura que possa sustentar o crescimento e desenvolvimento do embrião (HU & FERREIRA, 1998).

Para o desenvolvimento de embriões, diversas formulações de meios de cultura têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. Até o momento, não existe uma formulação padrão, mas para diversas espécies tem sido utilizado com sucesso o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com ou sem modificações. A suplementação do meio com carboidratos e outros aditivos, como reguladores de crescimento, vitaminas e antioxidantes é de grande importância, pois auxilia na maximização da taxa de germinação e na obtenção de plântulas com elevado potencial fisiológico para a extração de explantes. Os aditivos não exercem somente o efeito nutritivo, mas também influenciam no crescimento celular e na morfogênese por meio de propriedades osmóticas (GEORGE, 1996).

NUNES et al. (2008) avaliou o desenvolvimento de embriões zigóticos de pinhão-mansão extraídos de frutos em vários estádios de maturação em meio MS, adicionou várias doses de sacarose, água de coco e carvão ativado e constatou que estes influenciaram na germinação e desenvolvimento das plântulas.

A água de coco é comumente usada na suplementação do meio de cultura de embriões porque supostamente, supre o meio com açúcares, aminoácidos, hormônios de crescimento e outros metabólicos críticos (HU & FERREIRA, 1998).

2.5. Germinação de sementes *in vitro*

As sementes de pinhão-mansão são ortodoxas e devem ser secas até um teor de umidade entre 5 e 7 % e armazenadas em ambientes arejados. Permanecem viáveis por pelo menos um ano, mas devido ao elevado teor de óleo não é recomendado o armazenamento prolongado, pois são mais suscetíveis ao ataque de patógenos e a rancificação dos ácidos graxos que compõem a semente (JOKER & JEPSEN, 2003).

Para que a germinação ocorra é necessário que as sementes estejam viáveis, não dormentes e em condições ambientais favoráveis, como: luz, temperatura, disponibilidade de água e oxigênio (GUIMARÃES et al., 2006). Outros fatores que influenciam são o substrato e o estado de maturação dos frutos no momento da colheita. Sob déficit hídrico as sementes podem até germinar, mas não emergem (ALBUQUERQUE et al., 2008).

A germinação de sementes só ocorre dentro de determinados limites de temperatura, porém entre eles há uma temperatura ótima, na qual obtêm-se o máximo de germinação em um curto período de tempo (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000). Este processo envolve etapas como hidratação, mudanças estruturais subcelulares, respiração, síntese de macromoléculas e alongação celular. Inicia-se com a retomada das atividades paralisadas durante a maturação da semente e termina na protusão da radícula.

A germinação do pinhão-mansão é epígea, típica de dicotiledôneas, normalmente ocorre sem nenhum tratamento prévio. Desenvolve duas folhas cotiledonares fotossintetizantes, diferentes das duas folhas definitivas por possuírem formato oval (JOKER & JEPSEN, 2003).

O processo de germinação inicia-se pelo intumescimento da semente, seguido da ruptura do tegumento e o surgimento da radícula e desenvolvimento de cinco raízes, geralmente (NUNES, 2007). O desenvolvimento do hipocótilo ocorre simultaneamente à formação do sistema radicular. Por volta de sete dias após a emissão da radícula, as folhas cotiledonares estão completamente expandidas. O processo germinativo e o desenvolvimento da plântula dura entre quinze e trinta dias (ALBUQUERQUE et al., 2008).

A germinação *in vitro*, de sementes e de embriões é uma metodologia da cultura de tecidos, muito utilizada para espécies de difícil germinação ou com algum problema de recalcitrância. Essa técnica gera explantes assépticos e com a vantagem de oferecer uma melhor resposta morfogênica quando comparada com tecidos adultos, nas próximas etapas da cultura de tecidos (GRIGOLETTO, 1997).

A taxa de germinação *in vitro*, frequentemente é superior a encontrada no campo em virtude das condições serem controladas e adaptadas para suprir as necessidades de cada espécie (NOLETO & SILVEIRA, 2004).

Para acelerar e melhorar a germinação de sementes e também promover o crescimento de plantas jovens é comum o uso de reguladores de crescimento como as giberelinas, hormônios que se destacam pelo seu amplo espectro de atuação (METIVIER, 1986).

Existem vários tipos de giberelinas disponíveis comercialmente, dentre as quais a GA3 é que tem sido mais usada em sistemas biológicos (ARTECA, 1996). Na horticultura ornamental, tem demonstrado grande potencial no aumento da produtividade e facilidade do manejo cultural, embora não seja uma prática rotineira nestas culturas (RODRIGUES et al., 2004).

As giberelinas possuem efeito estimulante no processo germinativo quando aplicadas em sementes com dormência ou não. As sementes podem necessitar desses hormônios para: ativar o crescimento vegetativo do embrião, mobilizar reservas do endosperma pela ativação de enzimas hidrolíticas e para enfraquecer a camada do endosperma que circunda o embrião, favorecendo assim seu crescimento (VIEIRA, 2001; TAIZ, 2004).

A presença de giberelinas estimula quantitativamente tanto a taxa de germinação quanto a velocidade de germinação das sementes (NI & BRADFORD, 1993), influencia no alongamento e distensão celular, promovendo a crescimento das plantas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As sementes utilizadas nos experimentos foram coletadas de plantas de um cultivo localizado na cidade de Ituverava/SP, durante os meses de novembro de 2010 a fevereiro de 2011.

O ensaio de cultivo *in vitro* foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas, pertencente ao Departamento de Produção Vegetal da FCAV/UNESP Campus de Jaboticabal.

3.1. Experimento 1 - Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) na presença de complexo vitamínico

Para a retirada dos embriões, foram utilizadas 10 sementes por tratamento, com quatro repetições, totalizando 40 sementes por tratamento. As sementes foram lavadas com água e detergente neutro três vezes, sendo levadas para a câmara de fluxo laminar, onde permaneceram por cinco minutos no etanol 70% e em seguida vinte minutos no hipoclorito de sódio (2%). Após a etapa de lavagem e desinfestação, as sementes foram enxaguadas, sequencialmente, três vezes em água estéril.

Após essa primeira assepsia, o tegumento das sementes foi retirado e nova assepsia foi realizada com etanol (70%) por cinco minutos, sendo em seguida dispostas em hipoclorito de sódio (2%) por vinte minutos, sendo realizado na sequência o triplice enxague em água estéril.

As sementes permaneceram na água do último enxágüe por cerca de 20 horas para facilitar a retirada dos embriões.

Os embriões foram extraídos das sementes em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de pinça e bisturi esterilizados, sendo em seguida dispostos individualmente em

frascos de vidro, com capacidade de 100 ml, contendo 25 ml de meio de cultura e vedados com filme de polivinilcloreto (PVC).

O meio de cultura utilizado foi o MS (Sigma), acrescido de sacarose (30g/L) e ágar (6g/L), sendo adicionadas várias dosagens de um complexo de vitaminas, onde foram consideradas as denominações: tratamento controle, ou seja, sem a adição do complexo de vitaminas (T0); tratamento com adição de 0,5 mL.L⁻¹ de complexo vitamínico (TA); tratamento com adição de 1,0 mL.L⁻¹ de complexo vitamínico (TB); tratamento com adição de 2,0 mL.L⁻¹ de complexo vitamínico (TC); tratamento com adição de 3,0 mL.L⁻¹ de complexo vitamínico (TD); tratamento com adição de 4,0 mL.L⁻¹ de complexo vitamínico (TE).

O complexo vitamínico utilizado nesse trabalho foi constituído de ácido nicotínico (B3) 0,008 mM, mio-inositol 0,55 mM, tiamina (vitamina B1) 0,03 mM, piridoxina (vitamina B6) 0,0049 mM, sacarose e 58,4 mM em água; esses mesmos componentes foram sugeridos para o cultivo de embriões de coquinho-azedo (RIBEIRO et al., 2011).

O meio preparado com MS (Sigma), sacarose (30 g/L) e ágar (6 g/L) teve o pH ajustado para 5,8 e autoclavado em temperatura de 120°C por cerca de quinze minutos. Somente após o meio estar frio o complexo vitamínico foi filtrado em filtro 0,22µm (Millipore) e adicionado ao meio após seu resfriamento, cerca de 45°C.

Os embriões dispostos individualmente nos frascos e vedados com filme PVC. Permaneceram em sala de crescimento com intensidade luminosa de 30 µmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 12 horas de luz, temperatura média de 25°C e foram avaliados após quinze dias do estabelecimento.

Nas avaliações realizadas, para o critério de tamanho, adotou-se: tamanho 0 - plântulas que não cresceram; tamanho 1 - plântulas com até 1 cm; tamanho 2 - plântulas com tamanho entre 1 a 3 cm e tamanho 3 - para as plântulas com mais de 3 cm.

Dessa forma, foram avaliadas dez variáveis sendo observadas: percentagem de embriões germinados (%EG); percentagem de plântulas com o tamanho 0 (%P0); percentagem de plântulas com o tamanho 1 (%P1); percentagem de plântulas com o tamanho 2 (%P2) e percentagem de plântulas com o tamanho 3 (%P3); percentagem

de plântulas com raiz (%PR); número total de raízes (NTR); percentagem de plântulas com raiz maior que 1 cm (%PR>1); percentagem de plântulas com raiz menor que 1 cm (%PR<1) e percentagem de folhas (%F).

Para as variáveis significativas pelo Teste F, foi aplicado o teste Tukey a 5% de probabilidade e para outras, foi também utilizada a regressão polinomial. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico AgroEstat - Sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos (BARBOSA & MALDONADO, 2010).

Sendo assim, o ensaio foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições, cada repetição com 10 embriões, sendo a significância da análise verificada pelo Teste F ($\leq 5\%$). Conforme mencionado, os tratamentos consistiram de diferentes doses de vitaminas acrescidas ao meio MS, sendo avaliados os parâmetros de importância relativa para o cultivo *in vitro*.

3.2. Experimento 2 - Germinação de sementes *in vitro* de pinhão-mansó (*Jatropha curcas* L.) na presença de ácido giberélico GA3

Em cada tratamento, foram utilizadas 24 sementes, com quatro repetições, totalizando 96 sementes por tratamento.

As sementes foram lavadas com água e detergente neutro três vezes e em câmara de fluxo laminar, onde foi feita a primeira assepsia, sendo que as sementes permaneceram por cinco minutos no etanol 70%, em seguida vinte minutos no hipoclorito de sódio (2%). Depois foram enxaguadas três vezes, sequencialmente, em água estéril.

Ainda na câmara de fluxo laminar, o tegumento das sementes foi retirado com o auxílio de um pequeno alicate esterilizado. Nova assepsia foi realizada com etanol 70% por cinco minutos, hipoclorito de sódio (2%) por vinte minutos e tríplice enxague em água estéril.

O tegumento foi extraído das sementes porque se constatou, através de teste anterior, que a sua presença impedia a germinação.

O meio de cultura utilizado foi o MS (Sigma) acrescido de sacarose (30g/L) e ágar (6g/L), sendo adicionadas várias dosagens de ácido giberélico (GA3), onde foram consideradas as denominações: tratamento controle (T0), ou seja, sem a adição do GA3; TA= 1,0 mg.L⁻¹; TB=2,0 mg.L⁻¹; TC=4,0 mg.L⁻¹; TD=6,0 mg.L⁻¹; TE=8,0 mg.L⁻¹.

O meio preparado com MS (Sigma), sacarose (30 g/L) e ágar (6g/L) teve o pH ajustado para 5,8, sendo o mesmo autoclavado em temperatura de 120°C por cerca de quinze minutos.

Após o resfriamento do meio, cerca de 45°C, a solução de GA3 foi filtrada em filtro com membrana (0,22 µm) e adicionada ao meio para em seguida ser vertida nos frascos plásticos com capacidade de 350 ml e vedados com tampa plástica.

As sementes foram dispostas na quantidade de três unidades por frasco, com 75 ml de meio, permanecendo em sala de crescimento com intensidade luminosa de 30 µmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 12 horas de luz e temperatura média de 25°C.

As avaliações foram feitas após quinze dias do estabelecimento do ensaio. Para o critério de tamanho, adotou-se: tamanho 0 - plântulas que não cresceram; tamanho 1 - plântulas com até 1 cm; tamanho 2 - plântulas com tamanho entre 1 a 3 cm e tamanho 3 - para as plântulas com mais de 3 cm.

O ensaio foi conduzido utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, totalizando seis tratamentos e quatro repetições, sendo a significância da análise verificada pelo Teste F ($\leq 5\%$). Conforme mencionado, os tratamentos consistiram de diferentes doses de GA3 ao meio MS, sendo avaliados os parâmetros de importância relativa para o cultivo *in vitro*.

Os parâmetros avaliados, num total de dez variáveis, foram: percentagem de sementes germinadas (%SG); percentagem de plântulas com o tamanho 0 (%P0); percentagem de plântulas com o tamanho 1 (%P1); percentagem de plântulas com o tamanho 2 (%P2); percentagem de plântulas com o tamanho 3 (%P3); percentagem de plântulas com raiz (%PR); número total de raízes (NTR); percentagem de plântulas com

raiz maior que 1 cm (%PR>1); percentagem de plântulas com raiz menor que 1 cm (%PR<1); e percentagem de folhas (%F).

Foi aplicado o teste Tukey a 5% de probabilidade visando a distinção dos tratamentos aplicados. Algumas variáveis foram também comparadas por regressão polinomial. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico AgroEstat - Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos (BARBOSA & MALDONADO, 2010).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento 1 - Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) na presença de complexo vitamínico

De acordo com a Tabela 1, foram encontradas diferenças significativas ao nível de 1% de significância pelo Teste F para as variáveis: percentagem de embriões germinados (%EG), percentagem de plântulas com o tamanho 0 (%P0), percentagem de plântulas com tamanho 1 (%NP1), percentagem de plântulas com tamanho 3 (%P3), percentagem de plântulas com raiz (%PR), número total de plântulas com raiz (NTR) e ao nível de 5% de significância para as variáveis: percentagem de plântulas com tamanho 2 (%P2) e percentagem de folha (%F).

As variáveis percentagem de plântulas com raiz maior que 1 cm (%P>1) e percentagem de plântulas com raiz menor que 1 cm (%P<1) foram não significativas pelo Teste F, ou seja, não alteraram seu comportamento em função dos diferentes tratamentos aplicados de doses de complexo vitamínico no meio de cultura MS.

Os coeficientes de variação experimental apresentaram grande amplitude, desde 5,3% para a variável %PR até 89,07 para a variável %F, indicando que os dados obtidos tiveram grande dispersão, fato já esperado em função da natureza complexa das variáveis analisadas.

Como os embriões foram provenientes de sementes colhidas de várias plantas e o pinhão-manso apresenta um alto índice de polinização cruzada, o resultado é uma grande variabilidade genética. Ou seja, embriões com características genotípicas diversas podendo apresentar respostas variadas diante dos tratamentos utilizados (Figura 4 A).

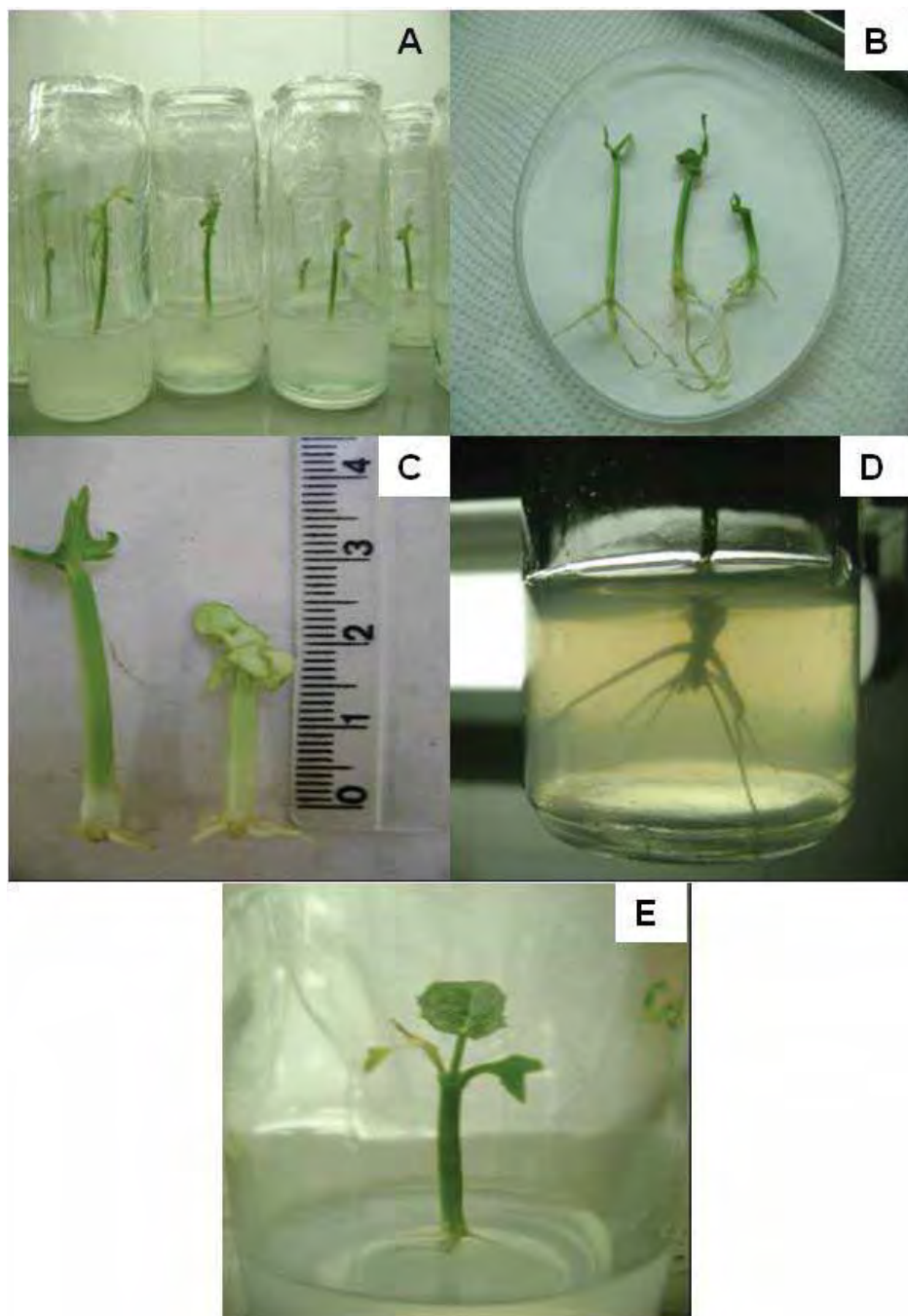


Figura 4. Aspecto geral da cultura *in vitro* de embriões em sala de crescimento (A); embriões de pinhão-mansinho desenvolvidos em meio MS acrescido de diferentes doses de complexo vitamínico (B) e (C); detalhes do sistema radicular de embriões de pinhão-mansinho em meio de cultura (D) e plântula de pinhão-mansinho desenvolvida a partir de embriões cultivados *in vitro* com presença de folha (E).

Tabela 1. Quadrados médios, valores médios (Médias) e coeficientes de variação (CV%) da análise de variância do ensaio conduzido com diferentes doses de complexo vitamínico acrescido em meio MS, para dez variáveis analisadas.

FV	GL	Quadrados Médios									
		%EG	%P0	%P1	%P2	%P3	%PR	NTR	%PR > 1	%PR < 1	%F
Tratamentos	5	566,66**	993,82**	2033,23**	542,69*	1089,62**	957,19**	107,37**	98,23 ^{ns}	94,85 ^{ns}	358,34*
Resíduos	18	30,55	17,33	148,2	172	104,19	24,18	19,09	102,83	105,41	121,05
Médias		80,83	6,43	24,97	40,9	27,68	92,63	28,12	69,02	31,25	12,35
CV (%)		6,83	64,69	48,75	32,05	36,87	5,3	15,53	14,69	32,85	89,07

*e** Significativo ao nível de 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F. Variáveis: percentagem de embriões germinados (%EG); percentagem de plântulas com tamanho 0 (%P0); percentagem de plântulas com tamanho 1 (%P1); percentagem de plântulas com tamanho 2 (%P2); percentagem de plântulas com tamanho 3 (%P3); percentagem de plântulas com raiz (%PR); número total de raízes (NTR); percentagem de plântulas com raiz maior que 1 cm (%PR>1); percentagem de plântulas com raiz menor que 1 cm (%PR<1) e percentagem de folhas (%F).

Na Tabela 2, encontram-se os resultados obtidos a partir da análise do Teste de Tukey (5%), onde podemos observar que para a variável percentagem de embriões germinados (%EG), a presença da vitamina, de forma geral, não apresentou uma resposta linear ou diretamente ligada às doses maiores ou menores das concentrações de vitaminas no meio de cultura.

Nesse caso a germinação do embrião não apresentou uma relação direta quanto à quantidade de complexo de vitaminas presente no meio de cultura, mas está firmemente relacionada às reservas nutricionais dos cotilédones, que neste caso encontram-se representada pelo fornecimento de nutrientes do meio de cultura. Tal fato também foi observado por NUNES et al. (2008), trabalhando com diferentes doses de sacarose em meio de cultura MS com embriões de pinhão-manso e também por GARCIA et al. (2002), trabalhando com embriões zigóticos de oliveira na presença de carboidratos, onde concluíram que a presença dos mesmos pode ser mínima ou dispensável, a depender da espécie e do estágio de desenvolvimento do embrião, mesmo porque o meio MS possui em sua composição uma alta disponibilidade de nutrientes, o que pode torná-lo suficiente para este processo inicial de desenvolvimento.

Tabela 2. Percentagem de embriões germinados (%EG); percentagem de plântulas com tamanho 0 (%P0); percentagem de plântulas com tamanho 1 (%P1); percentagem de plântulas com tamanho 2 (%P2); percentagem de plântulas com tamanho 3 (%P3); percentagem de plântulas com raiz (%PR); número total de raízes (NTR); percentagem de plântulas com raiz maior que 1 cm (%PR>1); percentagem de plântulas com raiz menor que 1 cm (%PR<1) e percentagem de folhas (%F) desenvolvidas em meio MS com diferentes doses de complexo vitamínico ⁽¹⁾.

Tratamentos	%EG	%P0	%P1	%P2	%P3	%PR	NTR	%PR>1	%PR<1	%F
T0 - 0,0	100,00a	38,61a	18,33b	33,05ab	10,00bc	61,39b	19,50b	72,96a	27,03a	7,50ab
TA - 0,5	75,00cd	0,00b	13,84b	56,69a	29,46ab	100,00a	28,00ab	61,73a	38,26a	0,00b
TB - 1,0	80,00bc	0,00b	5,90b	46,82ab	47,27a	100,00a	35,00a	65,75a	34,25a	6,25ab
TC - 2,0	77,50bc	0,00b	15,62b	48,66ab	35,71a	100,00a	30,25a	70,98a	30,68a	19,19ab
TD - 3,0	65,00d	0,00b	27,38b	34,52ab	38,09a	100,00a	26,00ab	75,14a	24,86a	15,47ab
TE - 4,0	87,50b	0,00b	68,75ab	25,69b	5,55c	94,44a	30,00a	67,57a	32,42a	25,69a

(1) Médias seguidas de letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, significativo a 5% de probabilidade (*) e 1% de probabilidade (**).

A ausência de vitaminas no meio de cultura, neste caso, proporcionou o maior número de embriões germinados. Outros autores também sustentam a idéia de que a germinação de embriões maduros *in vitro* pode até acontecer em meio de cultura com baixas concentrações de carboidratos, mas não para o posterior crescimento da planta.

Para a variável percentagem de plântulas com tamanho 0 (%P0) foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos com dose zero de vitaminas (T0) em relação aos demais tratamentos, indicando que a presença do complexo vitamínico, independente da dosagem, influenciou o crescimento da plântula limitando o desenvolvimento inicial das mesmas, pois no meio de cultura desprovido de vitaminas as plântulas atingiram 1 cm (Tabela 2).

Este resultado também foi obtido por PINHEIRO et al. (2001), trabalhando com a suplementação de água de coco ao meio MS, onde a presença deste componente limitou o desenvolvimento inicial de embriões de mangabeira (*Hancornia speciosa*).

Quanto a variável percentagem de plântulas com tamanho 1 (%P1), observamos na Tabela 2, que a maior dosagem de vitaminas (TE - 4 mg/L⁻¹) forneceu o melhor resultado, destacando-se das demais dosagens fornecidas. Já no tamanho 3 os melhores resultados foram com as dosagens intermediárias (TB, TC e TD).

A dosagem do tratamento TA (0,5 mg/L⁻¹) parece ter influenciado o desenvolvimento de um maior percentual de embriões neste intervalo de comprimento (1,0 a 3,0 cm), ou seja, para a percentagem de plântulas com tamanho 2 (%P2).

Os melhores resultados para o comprimento da parte aérea foram com as doses intermediárias do complexo vitamínico (TB, TC e TD), como podemos observar na Tabela 2 para a variável %P3, sendo que a dose maior do complexo vitamínico inibiu o alongamento maior das plântulas quando comparamos com os valores obtidos com o tratamento sem o complexo vitamínico (T0) para estas mesmas variáveis (Figura 4 B e C). Em contradição com a variável %P1, onde o maior percentual de plantas obtidas para este tamanho (até 1 cm) foi com a dosagem máxima (TE). Tais fatos podem indicar que provavelmente essa alta dosagem de vitaminas influencie no estágio inicial de desenvolvimento da plântula, reduzindo o desenvolvimento nas fases posteriores de alongamento.

Quanto ao enraizamento, analisados pelas variáveis %PR e NTR, os resultados da Tabela 2 e da regressão polinomial (Figura 5 e Figura 6) indicam que a presença da vitamina foi favorável ao seu desenvolvimento, quando comparada com o tratamento sem a adição da vitaminas, evidenciando grande aumento na percentagem de plântulas com raiz (%PR).

Uma explicação para o bom enraizamento nas plântulas, sem que houvesse a adição de hormônios indutores de enraizamento, pode ser a presença das vitaminas induzindo o crescimento rápido da parte aérea, como pode ser comprovado no índice %P3, onde este crescimento pode ter proporcionado uma intensa produção de auxina, a qual foi translocada para a base, estimulando a rizogênese (Figura 4 D). Vale lembrar que este fato é muito comum nos processos que envolvem cultura de tecidos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Além destes fatos, podemos citar os resultados similares obtidos por NUNES et al. (2008), onde o aumento de doses de sacarose no

meio MS, proporcionou um aumento relevante no número de raízes formadas a partir de embriões de pinhão-manso. Outro trabalho com a cultura do ginseng (SKREBSKY et al., 2004) apresentou resultados semelhantes também utilizando sacarose.

Em relação ao comprimento radicular, o resultado para a percentagem de plântula com raiz > 1 cm (%P>1) e percentagem de plântulas com raiz menor que 1 cm (%P<1) não foram significativos. Apenas para a variável número total de raízes (NTR) houve diferença nos tratamentos com a adição do complexo vitamínico em relação ao tratamento controle (T0).

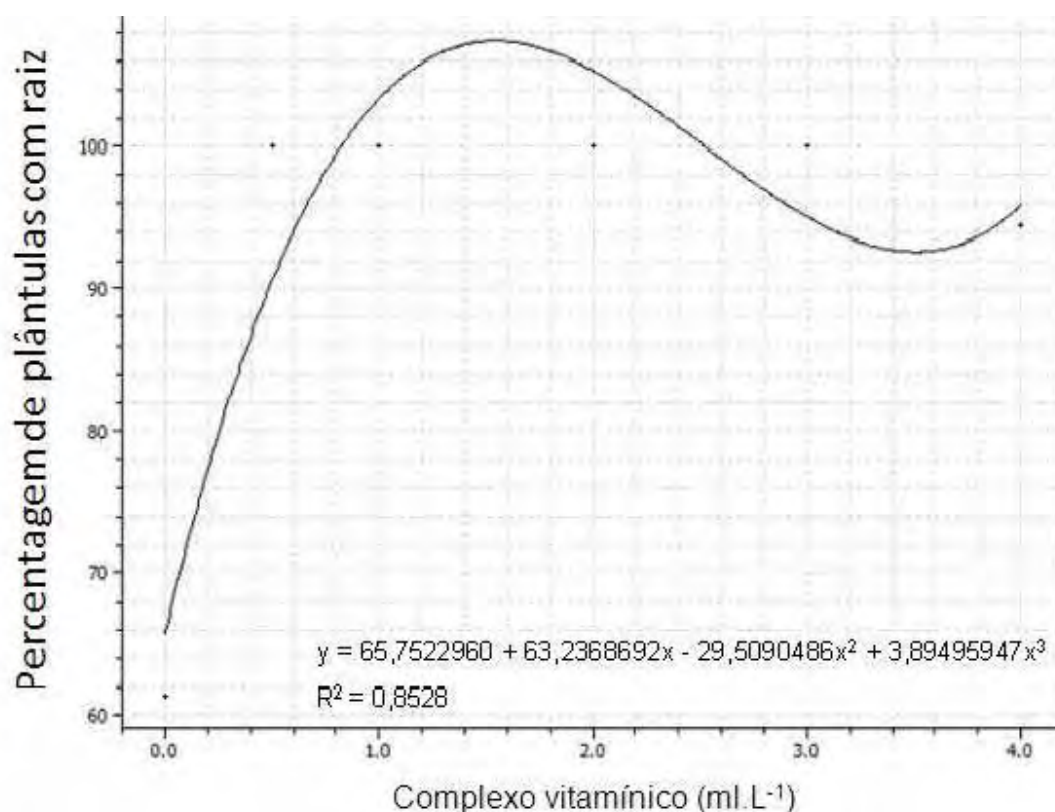


Figura 5. Percentagem de plântulas com raiz (%PR) em função de concentrações de complexo vitamínico no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-manso.

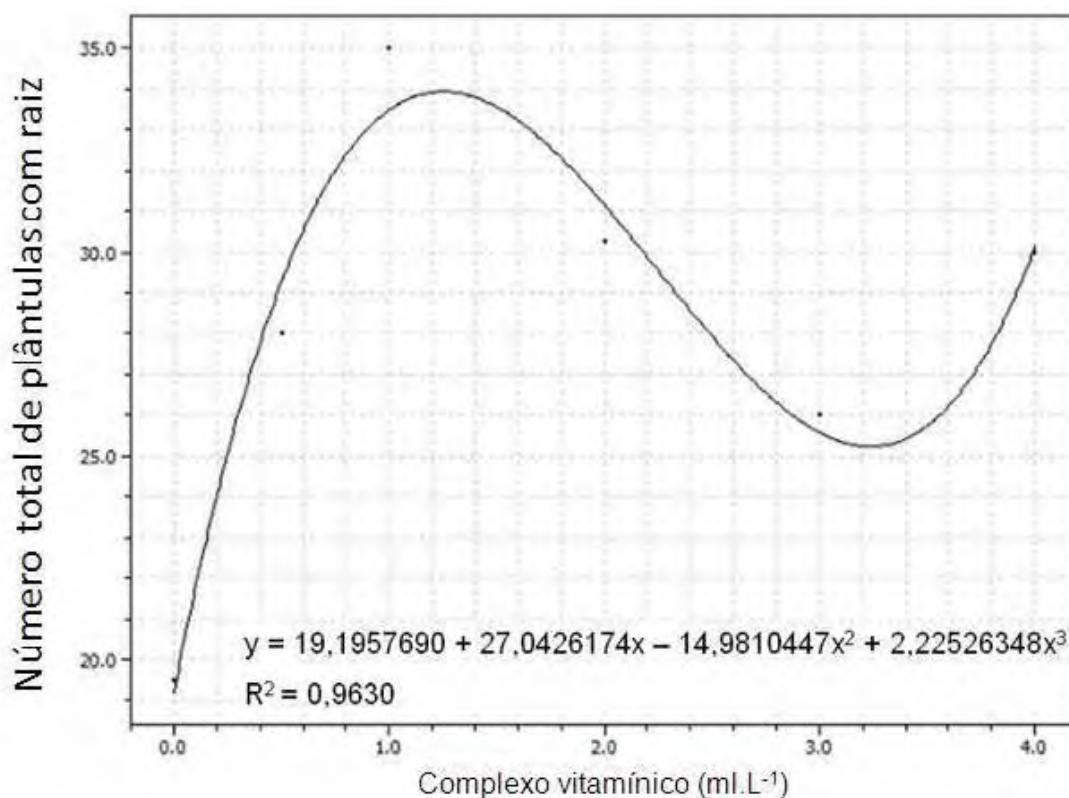


Figura 6. Número total de plântulas com raiz (NTR) cultivadas em meio MS acrescido com diferentes doses de complexo vitamínico.

O fato das raízes não apresentarem um crescimento significativo pode estar relacionado às condições do meio de cultura que permitem uma grande incidência de luz.

GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998) constataram, em experimento realizado com a adição de carvão ativado em meio de cultura, que em alguns casos, a adição de carvão ativado em determinadas concentrações podem ser benéficas ao desenvolvimento radicular. Fato que simula, fisicamente, a condição de escuro, no qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor, pela redução da incidência de luz na zona de crescimento ativo do sistema radicular. Resultados similares foram observados por NUNES et al. (2008), onde embriões zigóticos provenientes de frutos secos

produziram raízes que se desenvolveram bem em meio de cultura acrescido de carvão ativado.

Para a percentagem de folhas (%F) observamos que o aumento da dosagem de vitaminas no meio MS exerceu influência sobre o surgimento e desenvolvimento das folhas (Figura 4 E), sendo que a dosagem maior (TE) diferiu significativamente da dosagem mínima (TA). Este efeito da dosagem de vitaminas sobre o desenvolvimento foliar tendeu para um aumento linear conforme ilustrado na Figura 7, concordando com os resultados de NUNES et al. (2008), também trabalhando com a cultura do pinhão-manso e concentrações crescentes de água de coco ao meio MS.

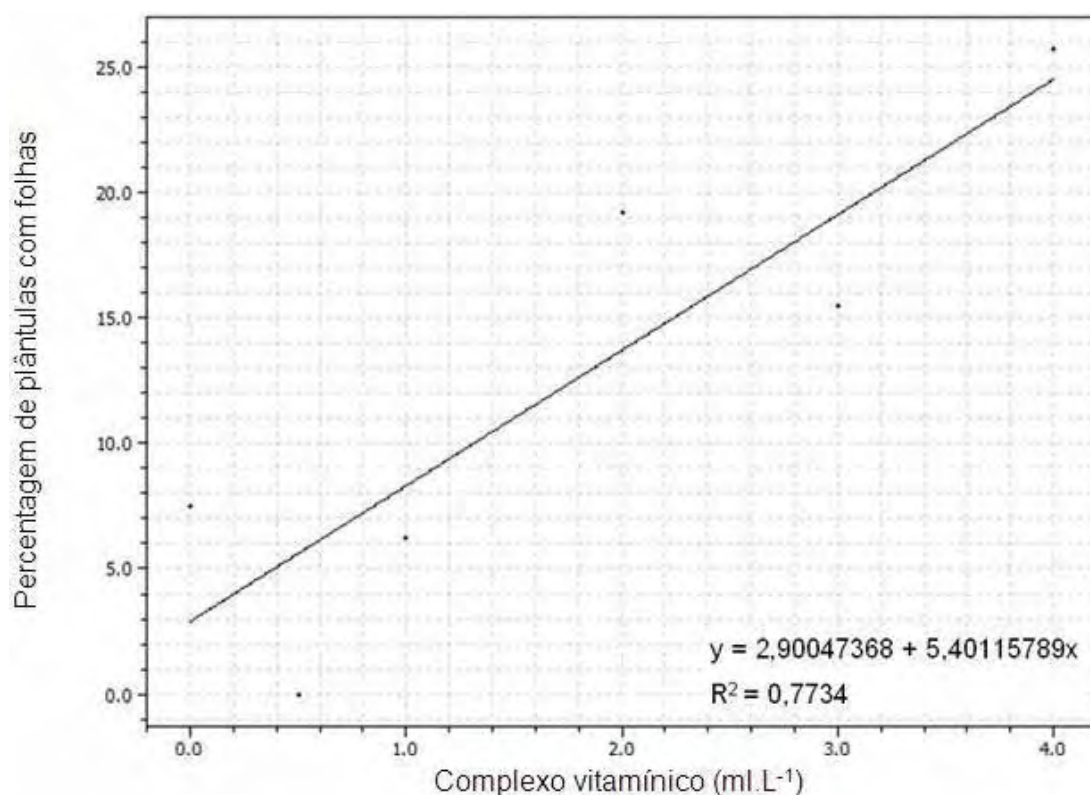


Figura 7. Percentagem de plântulas com folhas (%F) cultivadas in vitro em meio MS em função de várias dosagens de complexo vitamínico.

Diante dos resultados apresentados e considerando alguns experimentos realizados em outras culturas de embriões, futuros trabalhos poderão ser desenvolvidos para incrementar o cultivo de embriões *in vitro* de pinhão-manso. Dessa forma pode-se obter uma quantidade maior de plântulas com parte aérea e radicular bem desenvolvida, transplantando-se as plântulas, após germinação em meio MS com sacarose e ágar, para meio acrescido com o complexo vitamínico, hormônios e carvão ativado. Obtendo-se assim, mais plântulas assépticas e bem desenvolvidas em um curto espaço de tempo.

4.2. Experimento 2 - Germinação de sementes *in vitro* de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) na presença de ácido giberélico GA3

Os resultados obtidos, de acordo com a Tabela 3, foram significativos ao nível de 1%, pelo teste F, para as variáveis: percentagem de plântulas com tamanho 1 (%P1); percentagem de plântulas com tamanho 3 (%P3); percentagem de plântulas com raiz maior que 1 cm (%PR > 1) e percentagem de plântulas com raiz menor que 1 cm (%PR < 1). O Teste ainda apresentou-se significativo ao nível de 5% para as variáveis: percentagem de plântulas com o tamanho 0 (%P0) e percentagem de plântulas com raízes (%PR).

Para as variáveis: percentagem de sementes germinadas (%SG); percentagem de plântulas com tamanho 2 (%P2); número total de raízes (NTR) e percentagem de plântulas com folha (%F) o teste não apresentou significância.

Os coeficientes de variação experimental apresentaram grande amplitude, variando desde 7,52% para a variável %SG até 148,78 para a variável %F, indicando que os dados obtidos tiveram grande dispersão, fato já esperado em função da natureza complexa das variáveis analisadas. Pois as sementes são provenientes de cruzamentos entre varias plantas o que nos leva a supor uma grande variabilidade genética, gerando diferentes respostas diante dos tratamentos aqui propostos.

Tabela 3. Quadrados médios, valores médios (Médias) e coeficientes de variação (CV%) da análise de variância do ensaio conduzido com diferentes doses de ácido giberélico (GA3) acrescido em meio MS, para dez variáveis analisadas.

FV	GL	Quadrados Médios									
		%SG	%P0	%P1	%P2	%P3	%PR	NTR	%PR > 1	%PR < 1	%F
Tratamentos	5	71,31 ^{ns}	340,53*	682,51**	89,3 ^{ns}	877,72**	506,76 ^{ns}	120,86 ^{ns}	1054,17**	1060,25**	9,68 ^{ns}
Resíduos	18	46,5	105,07	83,72	74,01	184,11	144,17	133,97	118,61	118,85	5,39
Médias		90,63	30,39	10,55	17,65	40,93	58,69	31,58	51,26	48,87	1,56
CV (%)		7,52	33,72	86,67	48,74	33,14	20,45	36,64	21,24	22,3	148,75

*e** Significativo ao nível de 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F. Variáveis: percentagem de embriões germinados (%EG); percentagem de plântulas com tamanho 0 (%P0); percentagem de plântulas com tamanho 1 (%P1); percentagem de plântulas com tamanho 2 (%P2); percentagem de plântulas com tamanho 3 (%P3); percentagem de plântulas com raiz (%PR); número total de raízes (NTR); percentagem de plântulas com raiz maior que 1 cm (%PR>1); percentagem de plântulas com raiz menor que 1 cm (%PR<1) e percentagem de folhas (%F).

Na Tabela 4 encontram-se os resultados obtidos a partir da análise do Teste de Tukey, onde podemos observar que para a variável percentagem de sementes germinadas (%SG), a presença da vitamina, não apresentou uma resposta linear ou diretamente ligada às doses maiores ou menores do GA3 acrescido ao meio de cultura. Tal comportamento era esperado, já que esta variável não apresentou significância pelo Teste F.

Tabela 4. Percentagem de sementes germinadas (%EG); percentagem de plântulas com tamanho 0 (%P0); percentagem de plântulas com tamanho 1 (%P1); percentagem de plântulas com tamanho 2 (%P2); percentagem de plântulas com tamanho 3 (%P3); percentagem de plântulas com raiz (%PR); número total de raízes (NTR); percentagem de plântulas com raiz maior que 1 cm (%PR>1); percentagem de plântulas com raiz menor que 1 cm (%PR<1) e percentagem de folhas (%F) desenvolvidas em meio MS com diferentes doses de ácido giberélico ⁽¹⁾.

Tratamentos	%SG	%P0	%P1	%P2	%P3	%PR	NTR	%PR > 1	%PR < 1	%F
T0 - 0,0	89,58 ^a	33,23ab	35,47a	16,85a	14,43b	40,91b	26,00a	63,84ab	36,16bc	0,00a
TA - 1,0	88,54 ^a	25,06ab	3,85b	24,39a	46,69a	70,05a	33,50a	74,23a	25,77c	1,47a
TB - 2,0	89,18 ^a	19,16b	3,91b	21,85a	55,06a	63,41ab	34,75a	35,90c	64,09a	3,84a
TC - 4,0	86,80 ^a	24,26ab	13,99b	17,24a	44,49ab	68,23a	38,00a	54,53abc	45,47abc	1,13a
TD - 6,0	98,81 ^a	36,52ab	0,00b	12,50a	50,97a	59,44ab	33,54a	49,97bc	53,84ab	2,91a
TE - 8,0	90,87 ^a	44,10a	6,11b	13,05a	33,95ab	50,06ab	23,75a	32,10c	67,89a	0,00a

(1) Médias seguidas de letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, significativo a 5% de probabilidade (*) e 1% de probabilidade (**).

Estes resultados obtidos com sementes de pinhão-mansão, foram diferentes dos obtidos por AOYAMA et al. (1996) e SCALON et al. (2004), com sementes de lavanda e *Eugenia unala* (uvaia) respectivamente, onde houve um aumento significativo na percentagem de germinação das sementes em tratamentos com giberelina. Por sua vez, em sementes de *Passiflora nitida* germinadas *in vitro* não houve diferença significativa com adição de GA3 (PASSOS et al., 2004), concordando com os resultados aqui obtidos. LEITE & HEBLING (2011), também trabalharam com germinação de sementes de *Cattleya warnerii* em meio com GA3, na presença de luz e no escuro, e obtiveram resultado semelhante aos aqui apresentados, ou seja, o ácido giberélico não influenciou na germinação das sementes na presença de luz.

De acordo com os resultados obtidos por outros autores, aliado ao fato do tratamento T0 também ter proporcionado o desenvolvimento das sementes, são indicativos de que as respostas fisiológicas da cada espécie variam e o fato das

sementes germinarem em todas as concentrações do ácido giberélico pode estar relacionado à presença de GA3 nas sementes, sendo esta concentração existente já suficiente para sustentar metabolicamente a germinação (Figura 8 A e B).

Quanto ao comprimento inicial da parte aérea, que foram avaliadas através das variáveis %P0, %P1 e %P2, sendo o crescimento até 3 cm, verificamos que em %P0 a presença do GA3 na maior dosagem (TE) teve somente uma ligeira diferença de melhoria nos resultados, já na variável %P1 a ausência do GA3 (T0) é que gerou o melhor resultado e para a variável %P2 não houve diferença significativa em relação a presença e as dosagens da giberelina. Assim, de modo geral, podemos supor que a presença do GA3 nesta fase inicial do crescimento, mesmo em diferentes dosagens, não teve uma influência significativa no seu desenvolvimento (Figura 8 C). Tal ocorrência pode ser devido ao fato de que, as sementes nessa fase ainda estejam utilizando as suas reservas nutritivas provenientes dos cotilédones, não sendo afetadas diretamente pelas disponibilidades nutritivas do meio. OLIVEIRA (1994), trabalhando com crisântemo, verificaram que a adição de GA3 não influenciou no tamanho e número de brotos novos.

Fisiologicamente, de acordo com BEWLEY & BLACK (1983), os hormônios podem estar relacionados com o desenvolvimento das sementes ou podem estar sendo acumulados para sua subsequente participação no controle de germinação e crescimento da plântula. Este fato também foi observado em relação à variável %P3.

De acordo com a Tabela 4, para a variável %P3 (acima de 3 cm), a presença do GA3 mostrou-se eficiente, apesar da pequena variação entre os tratamentos TA até TD, caindo um pouco em TE, sendo que o melhor resultado obtido foi no tratamento TB ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$).

Provavelmente, as sementes necessitem de certa quantidade mínima de hormônio e nutrientes para estimular sua germinação e desenvolvimento, que é disponibilizada pelas suas reservas nutricionais. À medida que suas reservas vão se tornando ineficientes começam a absorver alguns elementos do meio, necessários para a continuidade do seu crescimento. No entanto, seu excesso pode inibir ou ser eventualmente tóxico (Figura 8 D).

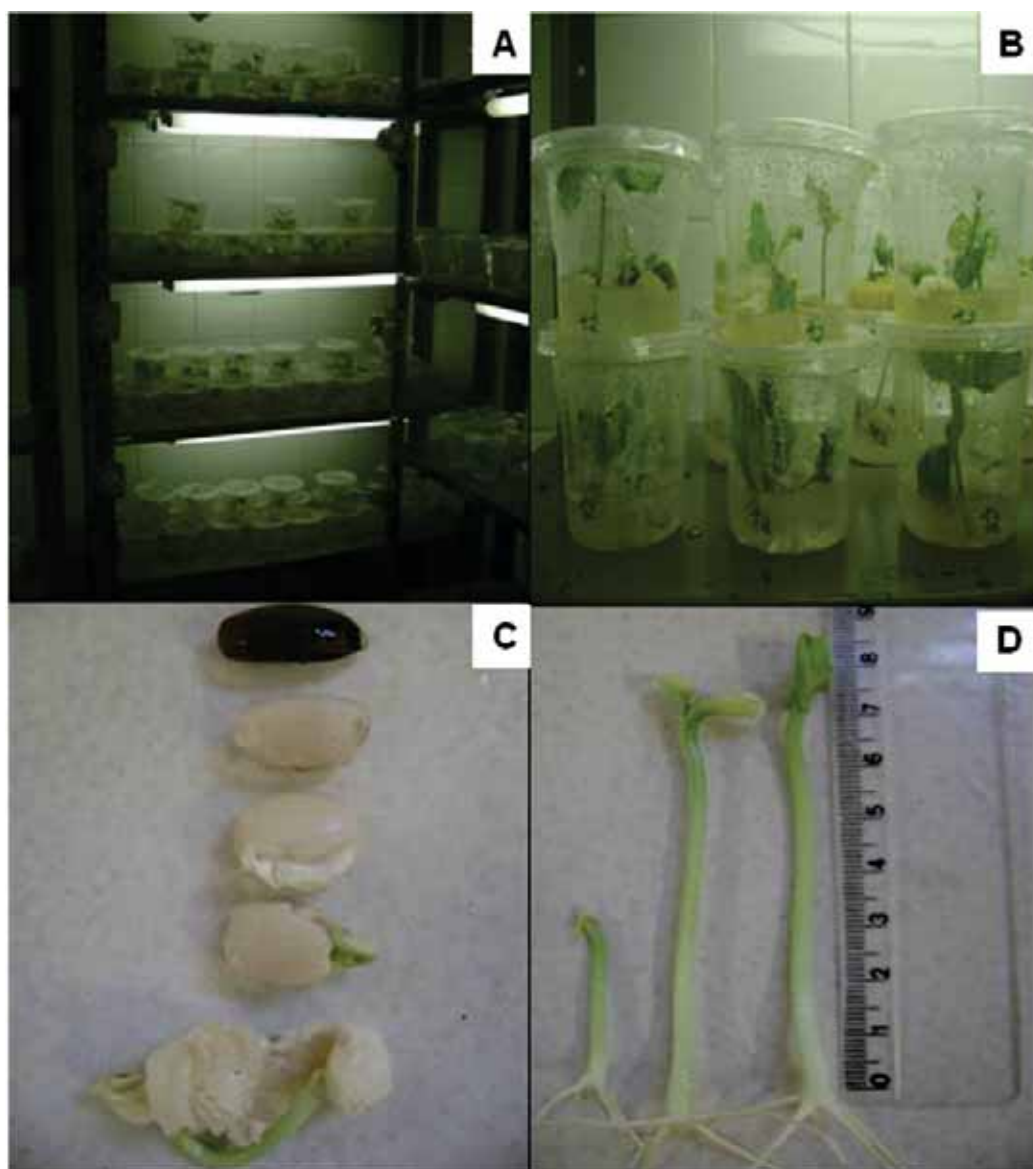


Figura 8. Aspecto geral da germinação *in vitro* de sementes de pinhão-mansão em sala de crescimento (A) e (B); sementes de pinhão-mansão, na sequência de cima para baixo: com tegumento, sem o tegumento e as demais germinadas (C) e plântulas de pinhão-mansão desenvolvidas após germinação *in vitro* de sementes, com diferentes tamanhos (D).

O ácido giberélico pode agir simultaneamente em vários fatores de crescimento celular, tais como: extensibilidade da parede celular, na permeabilidade da membrana celular, na atividade enzimática, na variação do potencial osmótico e na mobilização de açúcares (GUARDIA & BENLLOCH, 1980; MÉTRAUX, 1987). Dependendo da espécie, o local e o modo de ação podem originar respostas contraditórias mesmo entre e dentro da mesma espécie (KING et al., 1987).

Quanto ao enraizamento das plântulas, analisados através das variáveis %PR e NTR, os resultados da Tabela 4 indicam que a presença do GA3 influenciou no número total de raízes (NTR), indicando que a disponibilidade de GA3 no meio de cultura promoveu um aumento crescente na formação das raízes, acompanhando o aumento da concentração de GA3, desde o tratamento TA ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) até o TC ($4,0 \text{ mg.L}^{-1}$), ocorrendo um decréscimo do NTR nas concentrações do TD ($6,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e TE ($8,0 \text{ mg.L}^{-1}$). A concentração de GA3 também exerceu efeito na percentagem de plântulas com raiz (%PR), quando comparado com o tratamento controle (T0), sendo os maiores índices obtidos nas concentrações dos tratamentos TA e TC, seguidos de TB, TD e TE, respectivamente (Figuras 9).

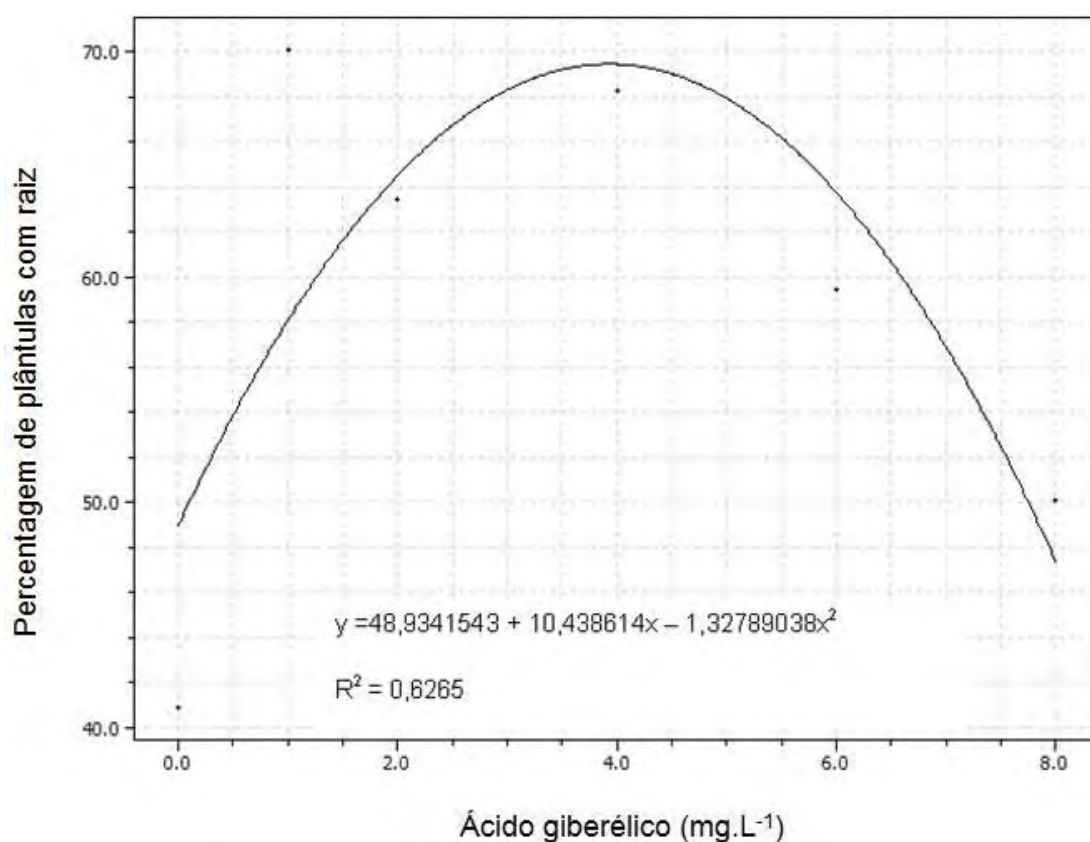


Figura 9. Percentagem de plântulas com raiz (%PR), desenvolvidas em meio MS a partir de sementes germinadas na presença de várias doses de GA3.

Diversos autores demonstram que os efeitos do GA3 podem ser contraditórios, muitas vezes inibindo e outras estimulando a organogênese do sistema radicular.

Na germinação *in vitro* de pinhão-mansão em meio MS com varias doses de GA3, verificamos que com o aumento da concentração de GA3 houve também um aumento crescente na formação de raízes, até a concentração do TC, quando então a partir daí, observou-se um efeito inverso. Fato similar foi apresentado por SILVA (2001), trabalhando com gloxínia até a concentração de 10 mg L⁻¹ de GA3, onde o autor verificou que o aumento das concentrações desse regulador de crescimento causou queda no fator estudado.

Em relação ao maior comprimento das raízes, para a variável %PR>1, a concentração menor (TA) forneceu um melhor resultado quando comparado à maior concentração (TE), evidenciado que o aumento da concentração de GA3 reduz o comprimento das raízes. Isso também pode ser percebido nos resultados do teste de Tukey e pela regressão polinomial (Figura 10) para a variável %PR < 1, onde no tratamento TE obteve-se o maior número de plântulas com raízes menores que 1 cm.

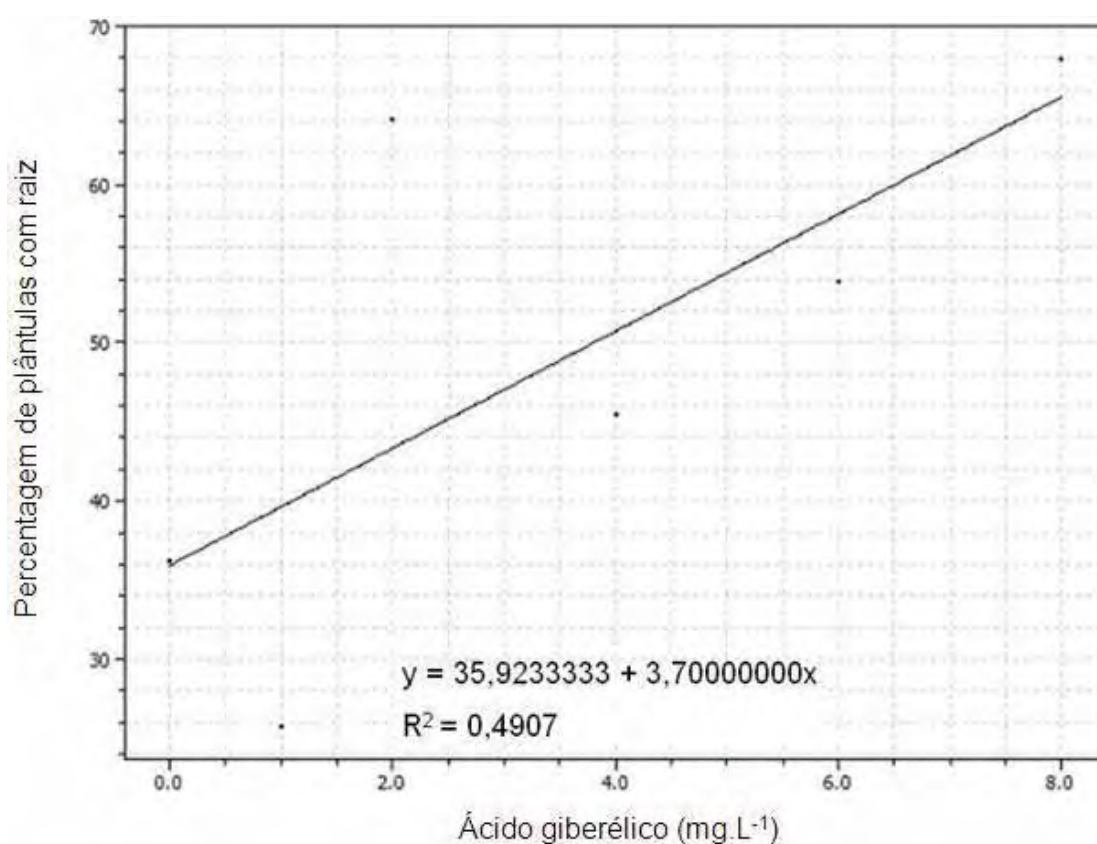


Figura 10. Percentagem de plântulas com raiz menor que 1 cm (%PR<1) cultivadas *in vitro* em meio MS, com diferentes doses de GA3.

Assim, temos um melhor efeito do GA3 sobre o enraizamento (%PR e NTR) que no alongamento radicular, permitindo o desenvolvimento da zona radicular. O sucesso

do enraizamento não depende apenas do comprimento radicular obtido, mas também do número e da qualidade das raízes formadas (SCZEPANSKI, 2001).

Para a variável %F observamos que não houve diferença significativa entre os tratamentos sem a adição do GA3 e com as diferentes doses, provavelmente devido ao fato de que o tempo de avaliação do experimento foi reduzido para a completa avaliação do desenvolvimento das folhas.

5. CONCLUSÕES

1) No experimento 1 o complexo vitamínico não influenciou positivamente na germinação dos embriões;

2) O maior alongamento da parte aérea foi obtido com a utilização das doses intermediárias de vitaminas, assim como o maior desenvolvimento de raízes;

3) A presença de folhas foi influenciada pela adição de vitaminas no meio, sendo observadas diferenças de respostas entre as doses adicionadas;

4) No experimento 2, a presença do ácido giberélico GA3 não influenciou positivamente na germinação das sementes;

5) O desenvolvimento da parte aérea foi obtido nos tratamentos com adição de GA3, sendo observadas diferenças de respostas entre as doses adicionadas;

6) A formação do sistema radicular foi influenciada positivamente pela adição de GA3 ao meio de cultura, sendo também observadas diferenças de respostas entre as doses adicionadas;

7) A suplementação do meio MS com o complexo vitamínico ou GA3 *in vitro* proporcionou o desenvolvimento de plântulas assépticas com parte aérea bem desenvolvida e presença de raízes, sendo ótimas fontes de extração de explantes para novos processos de cultura de tecidos de pinhão-mansão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADERIBIGBE, A. O.; JOHNSON, C. O. L. E.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; FOIDL, N. Chemical composition and effect of heat on organic matter – and nitrogen degradability and some antinutritional components of *Jatropha* meal. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 67, p. 223-243, 1997.

ALMEIDA, S. **Pinhão-manso, a opção para o biodiesel**. 2007. Disponível em: <http://www.pinhaomanso.com.br/noticias/jatropha/pinhao_manso_opcao_biodiesel_18_04_07.html>. Acesso em: 10 de novembro 2009.

ALBUQUERQUE, F.A.; OLIVEIRA, M.I.P.; LUCENA, A.M.A.; BARTOLOMEU, C.R.C.; BELTRÃO, N. E.M. 2008. Crescimento e Desenvolvimento do Pinhão manso: 1º Ano Agrícola. **Embrapa Algodão**. Documento, 197. Campina Grande, 2008. 21p.

ALVES, C.; OLIVEIRA, J. R; REIS, E. S.; CORRÊA, R.M.; SOUZA, J.; SILVA, J. C. DE O.; PAULA. J. C. R. de; RODRIGUES, L. H. F; SOUZA, M. A. de; MENDONÇA, M. R. de. **A cultura de tecidos na agricultura**. In: I Jornada Científica e VI FIPA do CEFET Bambuí, 6. Disponível em: <http://www.cefetbambui.edu.br/str/artigos_aprovados/Ci%C3%Anais%20Agrarias/14-PT-12.pdf>. Acesso em: 16 janeiro de 2011.

AOYAMA, E.M.; ONO, E.O.; FURLAM, M.R. Estudo da germinação de sementes de lavanda (*Lavandula angustifolia* Miller). **Scientia Agrícola**. 53: 267-272. 1996.

ARRUDA, F.P.; BELTRÃO, N.E.M.; ANDRADE, A.P.; PEREIRA, W.E.; SEVERINO, L.S. Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativo para o Semi-Árido nordestino. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v.8, p.789-799, 2004.

ARTECA R.D. **Plant growth substances:** principles and applications. New York: Chapman & Hall, 1996 p. 332.

AUGUSTUS, G.D.P.S.; JAYABALAN, M.; SEILER, G. J. Evaluation and bioinduction of energy components of *Jatropha curcas*. **Biomass & Bioenergy**, v.23, p.161-164, 2002.

BARBOSA, J.C., MALDONADO, J.R. AgroEstat - Sistema de Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos, versão1.0, 2010.

BECKER K., MAKAR H. P. S., FOIDL N., OLIVER G., SCHMOOK B., BHANDARE T. N., PANDEY J. B., SUJATHA M.. **Studies on Propagation of non-toxic variety of Jatropha curcas**, Stuttgart, Germany, 1999.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination:** development, germination and growth. Berlin. Springer-Verlag, 1983. 306p.

BIODIESEL. **Embrapa identifica pinhão-manso atóxico**. [200-]. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/em-foco/embrapa-identifica-pinhao-manso-atoxico-150611.htm>>. Acesso em: 22 de janeiro de 2011.

CARVALHO, J. M. F. C.; ARAÚJO, S. de S. **Aplicação do cultivo de embrião zigótico ou imaturo no melhoramento vegetal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2007. 35 p. Embrapa Algodão. Documentos, 170.

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

CARVALHO, J. M. F. C.; ARRIEL, N. H. C.; LIMA, I. C. S.; ALVES, M. M., MILANI, M.. Avaliação de meios de cultivo para pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), Congresso

Brasileiro de Mamona, 4 & Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, 1, 2010, João Pessoa. Inclusão Social e Energia: **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 211-216.

CID, L. P. B. A propagação in vitro de plantas. O que é isso? **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v.2, n. 25, 2000.

CORTESÃO, M. **Culturas Tropicais:** plantas oleaginosas, coqueiro, rícino, purgueira e aleurites. Lisboa: Livraria Clássica, 1956.231 p.

COSTA, J. L.; SILVA A. L. L.; SCHEIDT, G. N.; LEMUS, E. A. E.; SOCCOL, C. R. **Estabelecimento in vitro de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) – Euphorbiaceae** Caderno de Pesquisa série Biologia, Universidade de Santa Cruz do Sul, Vol. 22, No. 3, 2010, pp. 5-12.

DRUMOND, M. A.; SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R. de; ANJOS, J.B. dos; EVANGELISTA, M. R. V. Desempenho agrônômico de genótipos de pinhão manso irrigado no Semiárido pernambucano aos 12 e 24 meses de idade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA EM PINHÃO MANSO, 1.,2009, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009.

EMBRAPA – **Crescimento e desenvolvimento do pinhão manso:** 1º Ano Agrícola. Ministério da Agricultura e Abastecimento. 2008

FARIAS, P. M. **Estudos preliminares do protocolo de micropropagação do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)** Monografia - Instituto de Energias Renováveis e Eficiência Energética, Tubarão-SC. IDEAL. 2008.

FERREIRA, M. A.; CALDAS L. S.; PEREIRA E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO J. A.

Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH. v. 1, p. 21- 43, 1998.

GARCÍA, J. L.; TRONCOSO, J.; SARMIENTO, R.; TRONCOSO, A. Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, p. 95-100, 2002.

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

GLOBO RURAL. Biodiesel o petróleo verde, novembro 45 p. 2006.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, DF: Embrapa-SPI, Embrapa-CNPH, 1998. v.1, p.183-260.

GRIGOLETTO, E. R. **Micropropagação de *Hancornia speciosa* Gomez (Mangabeira).** 1997. 73 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade de Brasília, Brasília.

GUARDIA, M.D. de la; BENLLOCH, M. Effects of potassium and gibberellic acid on stem growth of whole sunflower plants. **Physiologia Plantarum**, v.49, p.443-448, 1980.

GUERRA, M. P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.). **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** Brasília, Embrapa-CBAB. v.2. p. 533-568, 1999.

GUIMARÃES, R.M.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, A.R. Aspectos Fisiológicos de Sementes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, MG. V.27. n. 232, p. 40-50, 2006.

HELLER, J. **Physic nut. *Jatropha curcas* L.**: promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 66p.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1998. p. 71-81.

JOKER, D.; JEPSEN, J. *Jatropha curcas* L. **Seed Leaflet**, Humleback, Denmark, n. 83, p. 1-2, Aug. 2003.

KING, R.W.; PHARIS, R.P.; MANDER, L.N. Gibberellins in relation to growth and flowering in *Pharbitis nil* Chois. Camberra, Austrália. **Plant Physiology**. v.84, p.1126-1131, 1987.

LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.60, p.197-214, 1981.

LEITE, V.C.A. & HEBLING, S.A. (2007) Efeito do ácido giberélico (GA₃) e da luz na germinação *in vitro* de sementes de *Cattleya warnerii* T. Moore. **Natureza on line** 5(2): 55-62. Disponível em: <<http://www.naturezaonline.com.br>> Acesso em: 22 de janeiro de 2011.

MAKKAR, H. P. S.; ADERIBIGBE, A. O.; BECKER, K. Comparative evaluation of non-toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. **Food Chemistry**, London, v. 62, p. 207-215, 1998.

METIVIER, J. R. Citocininas e giberelinas. In: FERRI, M. G. **Fisiologia vegetal**. 2ed. São Paulo: EDUSP, 1986. v.2, p.93-162

MÉTRAUX, J.P. Gibberellins and plant cell elongation. In: DAVIES, P.J. (Ed). **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht : Martinus Nijhoff Publishers, 1987. p.296-317.

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

NI, B.R.; BRADFORD, K.J. Germination and dormancy of abscisic acid and gibberellin – deficient mutant tomato (*Lycopersicum esculentum*) seeds. **Plant Physiology**. 101:607–617 (1993).

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. dos S. Micropropagação de copaíba. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 109-120, jul./dez. 2004.

NUNES, C.F. **Caracterização de Frutos, Sementes e Plântulas e Cultivo de Embriões de Pinhão Manso (*Jatropha curca* L.)** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras. 2007. 78p.

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

OLIVEIRA, P.D. **Propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tezlev.) cv. ‘Orange Reagen’**. 1994. 116f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Curso de Pós-graduação em Agronomia (Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG.

PASSOS, I.R.S.; MATOS, G.V.C.; MELETTI, L.M.M.; SCOTT, M.D.S.; BERNACCI, L.C. & VIEIRA, M.A.R. (2004) Utilização do ácido giberélico para a quebra de dormência de sementes de *Passiflora nitida* Kunth germinadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 26: 380-381.

PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.25, p.44-48, 2002.

PINHÃO MANSO. **Aspectos Gerais da Cultura da Jatropha curcas**. 2011 a. Disponível em: <<http://www.pinhaomanso.com.br/cultura.html>> Acesso em: 22 de janeiro de 2011.

PINHÃO MANSO. **Propagação da Cultura**. 2011 b. Disponível em: <http://www.pinhaomanso.com.br/jatropha_curcas/pinhao_manso/propagacao.html> Acesso em: 22 de janeiro de 2011.

PINHEIRO, C.S.R.; MEDEIROS, D.N. ; MACÊDO, E.C. ; ALLOUFA, M.A.I. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancorniaspeciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.413-416, 2001.

PRAMANIK, K. Properties and use of *Jatropha curcas* oil and diesel fuel blends in compression ignition engine. **Renewable Energy**, v.28, p.239-248, 2003.

PURCINO, A. A. C. & DRUMMOND, O. A. **Pinhão manso**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1986. 7p.

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

RIBEIRO, L. M.; NEVES, S. C.; SILVA, O. S.; ANDRADE, I. G.; Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento *in vitro* de coquinho-azedo. **Revista Ceres**, v.58, p.133-130, 2011.

RODRIGUES, T.M.; PAIVA, P.D.O.; RODRIGUES, C.R.; CARVALHO, J.G.; FERREIRA, C.A.; PAIVA, R. Desenvolvimento de mudas de bromélia-imperial (*Alcantarea imperialis*) em diferentes substratos. **Ciência e Agrotecnologia**. 28:757-763,(2004).

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.;TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão manso. **Informe Agropecuário**, v. 26, n. 229, 2005, p. 44-78.

SCALON, S.P.Q.; SCALON, F..H; RIGONI, M.R. (2004) Armazenamento e germinação de sementes de Uvaia (*Eugenia uvalha Cambess*). **Ciência e Agrotecnologia**. 28: 1228-1234.

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

SCZEPANSKI, P.H.G. **Propagação in vitro de porta-enxerto de Ameixeira Mirabolano (*Prunus cerasifera* Ehrh)**. Pelotas, 2001. 52p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

SHIVASTAVA S. & BANERIJEE M. In vitro clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): Influence of additives. **International Journal of Integrative Biology**, v.3, n.1, p.73–79, 2009.

SILVA, A.B. **Efeito de diferentes concentrações de BAP e GA3 na multiplicação in vitro de glóxinia (*Sinningia speciosa* Lodd. Hiern.)**. 2001. 59f. Dissertação (Mestrado

em Agronomia) - Curso de Pós-graduação em Agronomia (Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG.

SILVA, M. de A.; BRANDÃO, D. da S. J.; SILVA, H. P.; NEVES, J. M. G. Superação de dormência em sementes de pinhão-mansó (*Jatropha curcas* L.). In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: MCT/ABIPTI, 2007. 1 CD-ROM.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 648p.

TAPANES, N.O.; ARANDA, D. A. G.; CARNEIRO, J.W. de M. **Transesterificação dos glicerídeos do óleo de *Jatropha curcas* L.**: estudo teórico. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/producao/Glice27.pdf>> Acesso em: 20 de janeiro de 2011.

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

TOMINAGA, N.; KAKIDA, J.; YASUDA, E. K. **Cultivo de pinhão-mansó para produção de biodiesel**. Viçosa, MG, CPT, 2007. 220p.

VIEIRA, E.L. **Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2001. 268p. Dissertação de Mestrado, ESALQ, Piracicaba.

WILLADINO, L. & CÂMARA, T. **Cultura de tecidos vegetais**. Disponível em: <<http://www.ufrpe.br/quimica/culttec.htm>>. Acesso em: 21 nov. 2009.