UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Dissertação

Propagação *in vitro* de pinhão-manso

Tatiane Casarin

Pelotas, 2016

Tatiane Casarin

Propagação *in vitro* de pinhão-manso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia).

Orientador: Luciano da Silva Pinto
Coorientador(es): Luciana Bicca Dode
Sergio Delmar dos Anjos e Silva

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C334p Casarin, Tatiane

Propagação in vitro de pinhão-manso / Tatiane Casarin ; Luciano da Silva Pinto, orientador ; Luciana Bicca Dode, Sergio Delmar dos Anjos e Silva, coorientadores. — Pelotas, 2016.

63 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Jatropha curcas. 2. Biocombustível. 3. Cultura in vitro. 4. Cotilédone. 5. Hipocótilo. I. Pinto, Luciano da Silva, orient. II. Dode, Luciana Bicca, coorient. III. Silva, Sergio Delmar dos Anjos e, coorient. IV. Título.

CDD : 583.95

Elaborada por Maria Beatriz Vaghetti Vieira CRB: 10/1032

Tatiane Casarin

Propagação *in vitro* de pinhão-manso

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 04/03/2016.

Banca examinadora

Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Drª. Luciana Bicca Dode
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Sergio Delmar dos Anjos e Silva
Doutor em Fitotecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Drª. Marcia Wulff Schuch (UFPel, FAEM)
Doutora em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas

Aos meus pais, com carinho e gratidão.

Dedico.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade de realização deste trabalho;

À Capes pela concessão da bolsa de estudos;

Aos professores Luciana Bicca Dode e Luciano da Silva Pinto pela orientação, apoio e incentivo, não só neste trabalho, mas como desde o início da minha jornada acadêmica, e também pelas oportunidades oferecidas;

Ao pesquisador Dr. Sergio dos Anjos, pela colaboração e oportunidades oferecidas;

Aos demais professores do PPGB pelas colaborações no decorrer do curso;

Aos funcionários e demais integrantes do PPGB pelas colaborações;

Aos professores José Antônio Peters, Eugênia Braga e Valmor Bianchi, pela disponibilidade em ceder as dependências do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas para a realização do experimento;

Aos colegas de LCTP pela receptividade, acolhimento e auxílio;

A meus pais, Nelso e Marta, que me apoiaram e incentivaram desde o momento em que decidi cursar Biotecnologia, e não pouparam esforços para que eu pudesse chegar até aqui;

Aos demais familiares que mesmo distantes sempre torceram por mim;

Aos amigos, de perto e de longe, pelo apoio e torcida;

Ao Paulo por todo apoio, paciência e incentivo ao longo dessa jornada;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a construção deste trabalho;

Muito obrigada!

“A ciência compõe-se de erros, que por sua vez são passos para a verdade.”

Júlio Verne

Resumo

CASARIN, Tatiane. **Propagação *in vitro* de pinhão-manso.** 2016. 63f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Com o crescente interesse a cerca do cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), uma oleaginosa da família Euforbiaceae com potencialidade para a produção de biocombustíveis, faz-se necessária a aplicação de ferramentas biotecnológicas que tornem possível o desenvolvimento e seleção de genótipos com as características de interesse e melhores condições sanitárias. Nesse sentido, o estabelecimento de condições de cultivo e protocolos de regeneração eficientes para os genótipos de interesse local é de grande importância. O objetivo deste trabalho foi, portanto testar as condições para a propagação *in vitro* de pinhão-manso. Inicialmente investigou-se a otimização do processo de germinação *in vitro* de sementes, como fonte inicial de explantes, onde foi observado que o acréscimo de 0,94 µM de GA3 resultou em melhores médias de germinação. No protocolo de regeneração, após a modificação da composição dos meios de cultura e condições de cultivo, não foi observada diferença significativa entre os diferentes tratamentos de indução de calos, entretanto foi possível observar uma redução no desenvolvimento dos explantes que foram mantidos em condições de maior luminosidade. Para o alongamento das brotações adventícias obtidas, o tratamento mais eficiente foi T1: 9,69 µM AIA + 2,22 µM BAP. Para o enraizamento dos explantes foi utilizado meio MS com metade da concentração de sais, acrescido de 2,07 µM AIB. Foram obtidas 12 plantas regeneradas e enraizadas, entretanto estas não sobreviveram ao processo de aclimatação. Além dos ensaios de regeneração foram realizados ensaios de cultivo *in vitro* de ápices caulinares de plântulas germinadas *in vitro*, no qual se observou que a utilização de 22,2 µM de BAP + 2,07 µM de AIB + 1 $g.L^{-1}$ de carvão ativado pode ser uma alternativa para a propagação da espécie

Palavras-chave: *Jatropha curcas*, biocombustível, cultura *in vitro,* ápice, cotilédone, hipocótilo.

Abstract

CASARIN, Tatiane. ***In* vitro propagation of *Jatropha curcas***. 2016. 63f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Due to growing interest about *Jatropha curcas* L. cultivation, an oil crop from the Euforbiaceae family with potential for biofuel production, it is necessary to apply biotechnology tools that make possible the development and selection of genotypes with the features of interest and better health. Accordingly, the establishment of efficient culture conditions and regeneration protocols for local interest genotype is of great importance. Therefore the aim of this study was try to establish the best conditions for the *in vitro* propagation for genotypes from the Embrapa Clima Temperado breeding program. Initially we investigated the optimization of the process of *in vitro* germination of seeds, as an initial source of explants, where it was observed that the addition of 0.94 µM GA3 resulted in better average germination. About the regeneration protocol, after changing the composition of the culture media and cultivation conditions, there was no significant difference between the different callus induction treatments, though we observed a reduction in the development of explants that were maintained in more intense light. For elongation of adventitious shoots, the most effective treatment was T1: 9,69 µM AIA + 2,22 µM BAP. For the shoot rooting was used MS medium with half salt concentration plus 2.07 µM IBA. 12 regenerated and rooted plants were obtained, though these did not survive the acclimatization process Apical *in vitro* culture assays were performed in which it was observed that the treatment T2: 22.2 µM BAP + 2.07 µM IBA + 1 gL-1 of activated carbon can be an alternative for the propagation of the species.

Keywords: *Jatropha curcas*, biofuel, *in vitro* culture, apex, cotyledon, hypocotyl.

Lista de Figuras

Figura 1. Médias de sementes germinadas por repetição; 1A: safra 2012/2013; 1B: safra 2013/2014.. 34

Figura 2. Cotilédones aos 14 dias de cultivo em meio de regeneração A-E: 2000 lux (T1-T5); F-J: 4000 lux (T1-T5).....43

Figura 3: Hipocótilos aos 14 dias de cultivo em meio de regeneração A-E: 2000 lux (T1-T5); F-J: 4000 lux (T1-T5).....44

Figura 4: Média do número de explantes com brotações adventícias alongando aos 42 dias de cultivo.....45

Figura 5: Médias de explantes apresentando proliferação de calos aos 42 dias de cultivo.....46

Figura 6: Média de explantes totalmente oxidados aos 42 dias de cultivo...46

Figura 7: Brotações adventícias em hipocótilos de pinhão-manso aos 42 dias de cultivo, T1 (A): apresentando melhor desenvolvimento; T2 (B): apresentando folhas com desenvolvimento anormal; e T3 (C): apresentando explantes completamente oxidados.....47

Figura 8: Planta regenerada obtida a partir de hipocótilo (tratamento T2 na indução de calos) após uma semana de aclimatação em condições de sala de crescimento.....50

Figura 9: Ápices de pinhão-manso do tratamento T4 após 42 dias de cultivo em condições de sala de crescimento, apresentando bom desenvolvimento de parte aérea e raízes.....51

Figura 10: Plantas resultantes do tratamento T4, em condições de casa de vegetação, após 32 semanas de aclimatação.....52

Lista de Tabelas

Tabela 1. Relação de exemplos de trabalhos de propagação *in vitro* de pinhão-manso por diferentes estratégias publicados nos últimos anos.. 24

Tabela 2. Tratamentos utilizados para indução de calos em cotilédones e hipocótilos de pinhão-manso.....30

Tabela 3. Concentração de BAP adicionada ao meio de cultivo para incução de calos a partir de cotilédones e hipocótilos de pinhão-manso.....31

Tabela 4. Frequência de explantes com brotações por repetição após 42 de regeneração.. 36

Tabela 5. Exemplos de trabalhos de regeneração de pinhão-manso demonstrando a variedade de tratamentos, eficiência de regeneração e origem do material doador..... 37

Tabela 6. Médias de calo formados a partir de hipocótilos após 28 dias em meio de indução sob diferentes condições de luminosidade nos diferentes tratamentos.....38

Tabela 7. Médias de explantes formado calo após 28 dias em meio de indução, sob diferentes condições de luminosidade.....39

Tabela 8. Média de estruturas potencialmente organogênicas formadas a partir de cotilédones após 28 dias de cultivo em meio de regeneração sob diferentes condições de luminosidade nos diferentes tratamentos

Tabela 9.Média de estruturas potencialmente organogênicas formadas a partir de hipocótilos após 28 dias de cultivo em meio de regeneração sob diferentes condições de luminosidade nos diferentes tratamentos.....39

Tabela 10. Média de explantes apresentado estruturas potencialmente organogênicas após 28 dias de cultivo em meio de regeneração, sob diferentes condições de luminosidade.....40

Tabela 11.Média de explantes apresentado estruturas potencialmente organogênicas após 28 dias de cultivo em meio de regeneração, sob diferentes condições de luminosidade.....40

Tabela 12Média brotações adventícias formadas a partir de cotilédones após 28 dias de cultivo em meio de regeneração sob diferentes condições de luminosidade nos diferentes tratamentos.....41

Tabela 13. Média de explantes apresentado brotações adventícias após 28 dias de cultivo em meio de regeneração, sob diferentes condições de luminosidade.....41

Tabela 14 Porcentagem de explantes apresentando alongamento > 3cm após 10 dias de cultivo, no escuro 51

Lista de Abreviaturas

BAP – 6-benzilaminopurina

ANA – ácido naftaleno acético

AIB – ácido indol butírioco

AIA – ácido indol acético

GA3 – ácido giberélico

TDZ – tidiazuron

2,4D – ácido 2,4-diclorofenoxiacético

BOD – *Byosistem Organized Development*

IVG – Índice de velocidade de germinação

MS – Murashige & Skoog

µM – micromol

Sumário

RESUMO.....7

ABSTRACT.....8

LISTA DE FIGURAS.....9

LISTA DE TABELAS.....10

LISTA DE ABREVIATURAS.....11

1 INTRODUÇÃO GERAL.....15

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....17

2.1 Pinhão-manso.....17

2.1.1 Caracterização botânica.....17

2.1.2 Aspectos agronômicos.....18

2.1.2.2 Usos.....19

2.1.2.3 Pragas e doenças.....20

2.1.2.4 Métodos de propagação.....21

2.2 Cultura de tecidos vegetais.....21

2.2.1 Micropropagação de plantas.....23

2.2.2 Micropropagação de pinhão-manso.....23

2.3 Avanços biotecnológicos no estudo da espécie.....25

2.3.1 Genômica.....25

2.3.2 Transformação genética.....26

2.3.3 Proteômica.....26

3 OBJETIVOS.....28

3.1 Objetivo Geral.....28

3.2 Objetivos Específicos.....28

4 Material e Métodos.....29

4.1 Germinação *in vitro* de sementes de pinhão-manso.....29

4.2 Efeito de diferentes concentrações de BAP na indução de calos.....30

4.3 Efeito dos meios de cultura e das condições de cultivo 31
4.4 Alongamento das brotações adventícias obtidas a partir de hipocótilos de pinhão-manso via organogênese indireta 32
4.5 Enraizamento de brotações adventícias.....32
4.6 Aclimatação de plantas regeneradas 33
4.7 Cultivo *in vitro* de ápices caulinares 33
4.8 Análise estatística 33
5 Resultados e Discussão.....34
5.1 Germinação *in vitro* de sementes de pinhão-manso 34
5.2 Efeito de diferentes concentrações de BAP na indução de calos 36
5.3 Efeito dos meios de cultura e das condições de cultivo 38
5.4 Alongamento das brotações adventícias obtidas a partir de hipocótilos de pinhão-manso via organogênese indireta 45
5.5 Enraizamento de brotações adventícias.....48
5.6 Aclimatação de plantas regeneradas 49
5.7 Cultivo *in vitro* de ápices caulinares 50
6 CONCLUSÃO.....54
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....55
8 REFERÊNCIAS.....56

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Pinhão-manso *(Jatropha curcas* L.) é uma espécie pertencente à família Euphorbiaceae, amplamente distribuída pelas áreas tropicais e subtropicais do planeta que tem sido estudada nos últimos anos devido a potencialidade de utilização de seu óleo para a produção de biodiesel (Ly et al. 2014).

A utilização de culturas energéticas como fonte de combustíveis renováveis é um conceito com grande relevância no atual contexto econômico e ecológico, tanto em escala nacional quanto global. Culturas oleaginosas, das quais são obtidos óleos vegetais já são bem conhecidas e estudadas quanto à sua utilização para a produção de biocombustível, no caso o biodiesel, se apresentando como uma importante fonte de energia renovável. O interesse em biocombustíveis como alternativa aos combustíveis fósseis é impulsionado principalmente pela preocupação com o esgotamento das reservas de petróleo, o aquecimento global e o aumento da demanda de combustível para transporte nas economias em desenvolvimento. A produção de biocombustíveis vai reduzir a dependência dos países em fontes estrangeiras de petróleo, e irá reduzir as emissões de gases causadores do efeito estufa. Usinas de biocombustíveis são consideradas de alto valor comercial de grande importância e desempenham um papel vital de impulso ao desenvolvimento da economia dos países produtores (Mukherjee et al. 2011).

Dentre as características que tornam o pinhão-manso uma alternativa para suprir a demanda de matéria prima para a produção de biodiesel estão: alto conteúdo de óleo extraído das sementes, superior a maioria das espécies oleaginosas; tolerância a seca; capacidade de crescer e recuperar diversos tipos de áreas, incluindo solos degradados, marginais e contaminados; pouca necessidade de irrigação e tratos culturais (Adil et al. 2015).

Apesar disso, esta é uma espécie em processo de “domesticação” e suas características agronômicas começaram a ser estudadas nas últimas décadas (Saturnino et al. 2005). Assim, os estudos que existem relativamente à aplicação de diferentes técnicas de propagação da espécie são diversificados e variam em função da origem das plantas. A propagação convencional do pinhão-manso apresenta desvantagens quanto ao rendimento, que é bastante instável, e por ser uma planta de polinização cruzada as sementes são de potencial genético desconhecido. Já as plantas propagadas por estacas apresentam uma menor longevidade, assim como menor resistência à seca, pragas e doenças, quando comparadas às obtidas por

sementes, além de menor produtividade (Sujatha et al. 2005).

Com base no exposto acima, o desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* para produção de mudas de pinhão-manso com elevados padrões genéticos e sanitários, é uma etapa essencial à expansão da cultura. A produção e comercialização em larga escala exigirão o estabelecimento de sistemas de propagação capazes de garantir a sanidade e uniformidade dos propágulos, permitindo assim a implantação de cultivos padronizados, com a aplicação de tecnologia e com grande potencial produtivo (Koonin 2006).

Desse modo, ferramentas biotecnológicas contemporâneas tornam-se essenciais, para a aceleração e progresso de programas de melhoramento genético da espécie também garantindo a qualidade e identidade clonal. A falta de uniformidade dos cultivos obtidos a partir de sementes e a variação das respostas dependentes dos genótipos são desafios a serem superados (Kumar & Reddy 2010; Jha et al. 2007).

Por estes motivos o desenvolvimento de protocolos de regeneração *in vitro* apropriados ao germoplasma regional é um passo importante no desenvolvimento e aplicação de ferramentas biotecnológicas, assim como outros estudos que permitam estudar a fisiologia da espécie e outras aplicações, podendo assim contribuir para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético da espécie também garantindo a qualidade e identidade clonal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pinhão-manso

2.1.1 Caracterização botânica

À família Euphorbiaceae pertencem aproximadamente 290 gêneros e 7500 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Dentre estas, cerca de 70 gêneros e 1000 espécies podem ser encontradas no Brasil. *Jatropha curcas*, comumente conhecida como o pinhão de purga, pinhão de cerca, pinhão-manso, pinhão do Paraguai, entre outros, é uma das espécies mais conhecida e estudada desta família atualmente, devido a potencialidade da sua utilização para produção de biodiesel (Vasconcelos et al. 2010).

A origem do pinhão-manso é bastante controversa, e são encontradas informações diversas a respeito, entretanto é consenso de que a espécie seja originária das regiões tropicais das Américas (Nunes 2007).

A planta pode atingir até oito metros de altura, com caule de cerca de 20 a 70 cm de diâmetro, liso e de medula desenvolvida, mas pouco resistente. Segue a estrutura clássica das euforbiáceas, apresentando sua primeira inflorescência na região apical, de onde se originam novos ramos que passa a ser axilares até apresentarem novas inflorescências, as quais, por sua vez, impediram o crescimento apical, gerando novos ramos e assim sucessivamente. Apresenta floema com longos canais, que se estendem até as raízes, onde circula o látex. As raízes são curtas e pouco ramificadas (Albuquerque et al. 2008; Ávila et al. 2009).

As árvores são caducifólias, perdendo suas folhas na estação seca. Estas são esparsas, largas, alternas e palminervadas. Apresentam de três a cinco lóbulos, com 6-15 cm de comprimento por igual largura, normalmente menores que os pecíolos, os quais podem ter até 18 cm. As flores são pequenas, amarelo-esverdeadas, a floração é monóica, apresentando na mesma planta (mas com sexo separado), flores masculinas, as quais são encontradas em maior número, nas extremidades das ramificações, sendo constituídas de um cálice com cinco pétalas e cinco sépalas e possuem pedúnculo articulado; já as flores femininas, são encontradas nas ramificações, possuem o mesmo número de pétalas e sépalas das masculinas e pedúnculos não articulados. O ovário possui três carpelos e três

lóculos A ocorrência de flores hermafroditas é rara, sendo que estas podem autopolinizar-se. A polinização ocorre por insetos, principalmente abelhas (Albuquerque et al. 2008; Kumar & Sharma 2008; Hoppen 2011).

Cada inflorescência pode produzir um total de 10 ou mais frutos, constituídos pelo fruto seco, contendo três cavidades globosas, liso, coriáceo, capsular, ligeiramente roliço, com ápice e base agudos. Apresenta diâmetro de 1,5 a 3 cm, o pericarpo duro e lenhoso com pequenos orifícios nos pontos de união dos carpelos. A coloração dos frutos varia ao longo do período de maturação, sendo inicialmente esverdeado, passando por amarelo, castanho e por fim marrom-escuro quando maduro. O fruto seco apresenta deiscência, apresenta normalmente três sementes, sendo composto por 53 a 62 % de sementes e 38 a 47 % de casca (Albuquerque et al. 2008; Hoppen 2011; Pessoa 2011).

A semente de pinhão-manso apresenta formato ovalado, com tegumento rijo e quebradiço. Quando secas, as sementes apresentam um tamanho aproximado de 1,5±2,0 cm de comprimento e 1,0±1,5cm de largura. Dentro das sementes encontra-se um álbumem branco e oleaginoso, o qual contém o eixo embrionário de formato reto e cotilédones planos, foliáceos e arredondados. Este álbumem pode ser constituído de até 60% de óleo, sendo que a composição de óleo encontrada é de aproximadamente 14,3 % de ácido palmítico, 5,1 % de ácido esteárico, 41,1 % de ácido oléico e 38,1 % de ácido linoleico (Albuquerque et al. 2008; Nunes 2007).

2.1.2 Aspectos agronômicos

O pinhão-manso é considerado uma planta rústica ao cultivo, visto que os conhecimentos agronômicos relativos à espécie ainda são limitados, sendo considerada uma espécie em processo de domesticação. Não existem cultivares registradas oficialmente no país, justamente por ainda haver necessidade de estudos mais aprofundados em relação à caracterização do material genético que se tem disponível. Por isso considera-se que o pinhão-manso está numa fase de pré-melhoramento, aonde essas características vem sendo estudadas (Costa 2009; Santos 2012).

Nesse sentido, cada centro de pesquisa busca estudar e caracterizar acessos obtidos no germoplasma regional, visando a seleção de genótipos de interesse. A falta de uniformidade genética entre os acessos utilizados é uma das grandes dificuldades encontradas no estudo da espécie, uma vez que certas

respostas são altamente genótipo dependentes. Além disso, materiais geneticamente desconhecidos e desuniformes e não possuem garantias mínimas quanto à adaptabilidade ambiental e produtividade de cada genótipo, para a sua utilização em programas de melhoramento genético (Laviola 2010).

Devido a rusticidade do pinhão-manso este pode ser cultivado em uma variedade de solos e climas, adaptando-se a desde regiões tropicais secas a regiões equatoriais úmidas, suportando precipitações anuais baixas e podendo ser cultivado em diferentes altitudes. Dessa forma, torna-se uma alternativa de cultivo para regiões nas quais outras espécies não encontram condições favoráveis (Sato et al. 2009; Oliveira 2013).

Apesar de apresentar certa tolerância a solos de baixa fertilidade e ser indicado para a recuperação de solos marginais e degradados, para um melhor crescimento e desenvolvimento do pinhão-manso recomenda-se que seja cultivado em solos pouco compactados e profundos, permitindo assim melhor desenvolvimento das raízes (Arruda et al. 2004).

A produtividade é bastante variável, sendo diretamente influenciada pelas condições edafoclimáticas a que as plantas estão submetidas, bem como aos métodos de cultivo e tratos culturais aplicados. Portanto, em cultivos comerciais alta produtividade de frutos, a planta necessita de água e de solos férteis com boas condições físicas. Logo, a irrigação, a correção da acidez e da fertilidade do solo são pontos decisivos para se obter sucesso e lucratividade com essa cultura. Dessa forma seria possível chegar a uma produtividade superior a 6000 kg ha^{-1} de sementes (Oliveira 2013; Evangelista et al. 2011).

2.1.2.2 Usos

A possibilidade de múltiplas aplicações é uma das principais características do pinhão-manso, juntamente com sua ampla adaptabilidade, anteriormente mencionada, apesar disso, como também já citado, a inexistência de variedades melhoradas e bem caracterizadas, dificulta a plena exploração destas possibilidades (Divakara et al. 2010).

A planta de pinhão-manso pode ser utilizada na construção de cercas vivas, ajudando a evitar o acesso de animais a determinados espaços, uma vez que suas folhas e frutos não são comestíveis. Suas propriedades medicinais são historicamente exploradas na América Central, e possivelmente do Sul, Índia e

China, sendo utilizadas todas as partes da planta (folhas, sementes, cascas e raízes), bem como seu óleo e látex (Nunes 2007; Pessoa 2011).

Ainda sobre as aplicações medicinais merece destaque a lectina tóxica curcina, mais recentemente purificada de sementes da espécie, já descrita por apresentar atividade N-glicosidase, apresentando diversos efeitos farmacológicos e atividades biológicas, como: atividade antitumoral, pesticida e antifúngica (Lin et al. 2010).

Ainda que as utilizações do pinhão-manso sejam diversas, pode-se dizer que a principal delas e que mais vem estimulando o interesse na espécie é a possibilidade de utilização do óleo extraído de suas sementes na produção de biodiesel, devido a suas propriedades já mencionadas anteriormente. Além do biodiesel, o óleo de pinhão-manso tem outras aplicações industriais como produção de sabão, pesticidas e componentes em cosméticos. O processo de extração do óleo de pinhão-manso tem como coproduto uma torta altamente tóxica, devido à presença da proteína curcina, ésteres de forbol e outros fatores antinutricionais, não podendo, portanto, ser utilizada na alimentação animal, a menos que detoxificada. Apesar disso este coproduto pode ser utilizado como fertilizante, por ser rico em nitrogênio, e também para a produção de biogás (Kumar & Sharma 2008).

Algumas variedades não tóxicas, que não apresentam éteres de forbol, foram encontradas no México e América Central. Estas poderiam ser utilizadas na alimentação humana e animal, como sementes assadas e folhas jovens cozidas no vapor. O óleo produzido a partir destas variedades também poderia ser utilizado na alimentação humana, e o coproduto de extração, a torta, poderia servir de boa fonte proteica para humanos e animais (Benge 2006).

2.1.2.3 Pragas e doenças

Apesar de comumente descrita como uma espécie resistente a pragas e doenças, algumas práticas de manejo devem ser adotadas para garantir o pleno desenvolvimento das plantas. Nos estágios iniciais de estabelecimento da planta no campo, faz-se necessário o controle mecânico ou a aplicação de herbicidas para o controle de plantas daninhas, uma vez que nesse estádio inicial de crescimento as plantas são sensíveis à competição (Saturnino et al. 2005).

A ocorrência de pragas varia de acordo com a idade da planta, seu estádio nutricional, época do ano, proximidade de plantas hospedeiras e condições

climáticas. Dentre as pragas que acometem a cultura, o ácaro-vermelho *Tetranychus bastosi* Tuttle, Baker & Sales, 1977 (Acari: Tetranychidae) tem sido destacado como a mais danosa. Algumas das outras espécies com ocorrência relatada são: *Pachycoris torridus* Scopoli, 1772 (Hemiptera; Scutelleridae), *Sternocoelus notaticeps* Marsall, 1925 (Coleoptera; Curculionidae) e o ácaro branco *Polyphagotarsonemus latus* Banks, 1904 (Acari; Tarsonemidae) (Saturnino et al 2005; Franco & Gabriel 2008; Marques et al. 2015).

Já em relação a doenças, as principais que acometem o pinhão-manso, e outras espécies do gênero *Jatropha,* são: oídio ou mofo-branco (*Oidium hevea*), gomose (*Phytophthora* sp.), ferrugem (*Phakopsora jatrophicola* e *P. arthuriana*), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. e *C. capsici* (Syd.) Butl. & Bisby) e também algumas viroses como as causadas por *Jatropha mosaic virus* e *African cassava mosaic vírus* e *Begomovirus* (Franco & Gabriel 2008).

2.1.2.4 Métodos de propagação

A propagação do pinhão-manso pode ser feita tanto de forma sexuada quanto assexuada. A propagação via seminífera gera maior variabilidade genética, já que se trata de uma espécie de polinização cruzada, e uma produção mais tardia. Entretanto, plantas propagadas desta forma são mais robustas, com melhor desenvolvimento das raízes e consequentemente apresentam maior vigor e resistência a secas prolongadas. Plantas propagadas vegetativamente são mais precoces na produção de frutos, e garantem a perpetuação das características de interesse das plantas matrizes. Entretanto, desenvolvem apenas raízes secundarias, tornando-se menos resistentes a estresses e de menor longevidade (Furlani 2014; Kumar & Sharma 2008).

2.2 Cultura de tecidos vegetais

O cultivo *in vitro* de plantas é um conjunto de técnicas que consiste em cultivar células, tecidos ou órgãos de plantas em um meio de cultura sintético sob condições assépticas em ambiente controlado de luminosidade, temperatura e umidade. O desenvolvimento da cultura de tecidos está diretamente ligado ao descobrimento e caracterização dos hormônios vegetais, e tem possibilitado um melhor entendimento sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas. Além disso, o desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos como ferramenta

biotecnológica tem permitido grandes desenvolvimentos não só na agricultura, como na indústria (Dagla 2012).

O conceito de cultura de tecidos vegetais foi definido claramente pela primeira vez em 1902 por German Botanist Haberlandt, sendo que a partir de 1935 a técnica passou a se desenvolver mais rapidamente. As principais dificuldades encontradas inicialmente foram em relação aos aspectos bioquímicos da técnica, como a nutrição orgânica e inorgânica, relações entre hormônios, necessidade de suplementação vitamínica, entre outros (White 1942).

Atualmente as diferentes técnicas que compreendem a cultura de tecidos de plantas tem sido de grande valia nos programas de melhoramento de plantas, para a conservação de recursos genéticos e para a produção de moléculas de interesse biológico. Além de possibilitar a propagação clonal de plantas de interesse, estas técnicas são fundamentais para o desenvolvimento de outras ferramentas como a transformação genética de plantas, a obtenção de plantas livres de vírus, a produção de duplo-haploides, a produção de híbridos somáticos via fusão de protoplastos, a produção em larga escala de metabólitos secundários ou proteínas recombinantes em células vegetais em suspensão (Dagla 2012; Neto & Andrade 2011; Morais et al. 2012).

O processo de desenvolvimento de uma nova planta a partir de uma célula, tecido ou órgão vegetal pode ocorrer por diferentes rotas morfogenéticas: embriogênese ou organogênese, sendo que ambas podem ser diretas ou indiretas. Diversos fatores podem influenciar estes processos, desde o tipo e qualidade fisiológica do explante, bem como a composição do meio de cultura utilizado. Embriogênese somática é o processo pelo qual uma célula somática vegetal se diferencia formando um embrião somático, enquanto na organogênese compreende a formação de um novo órgão, brotação ou raízes adventícias, a partir de um explante. Estes processos são ditos diretos quando não ocorre a formação de calos durante a morfogênese e indiretos quando ocorre (Neto & Andrade 2011).

Mesmo que os princípios básicos da cultura de tecidos vegetais sejam claramente estabelecidos, como a composição geral dos meios de cultura e o papel de cada regulador de crescimento utilizado, cada espécie ou genótipo específico necessita de estudos direcionados a fim de estabelecer as condições ótimas para o seu cultivo.

2.2.1 Micropropagação de plantas

A propagação *in vitro* em larga escala de plantas tem sido uma das principais aplicações da cultura de tecidos, e engloba um amplo processo que se inicia com o estabelecimento *in vitro* de uma cultura e culmina na aclimatação das microplantas. Processo este que depende da obtenção de explantes iniciais viáveis (que apresentem todas as condições necessárias para gerar uma nova planta), em boas condições sanitárias, que permitam o estabelecimento de cultivos assépticos, bem como meios de cultura que supram as necessidades nutricionais do explante/planta e os balanços hormonais adequados em cada etapa (Moreira 2013; Pinhal et al. 2011).

Após o estabelecimento da cultura *in vitro*, a obtenção da nova planta pode ocorrer através de três formas principais: multiplicação de gemas axilares, indução de gemas adventícias direta ou indiretamente (com ou sem a formação de calos no explante inicial) e através da indução de embriogênese somática, a qual também pode ocorrer de forma direta ou indireta (Murashige 1974).

Além de permitir a produção de mudas em qualquer época do ano, de forma mais rápida e necessitando de menos espaço, a micropropagação de plantas permite ainda a obtenção em larga escala de mudas de qualidade superior por serem livres de patógenos, serem geneticamente uniformes e fisiologicamente mais ativas. Portanto este método de propagação já é utilizado comercialmente para diversas espécies ornamentais, frutíferas e florestais, como por exemplo, orquídeas, bananeiras, eucaliptos, entre outras (Moreira 2013; Neto & Andrade 2011).

2.2.2 Micropropagação de pinhão-manso

Na última década houve um significativo aumento no interesse pela propagação *in vitro* do pinhão-manso, como resultado, um grande número de trabalhos foi publicado, reportando o desenvolvimento de protocolos de indução de calos, embriogênese somática e micropropagação. Essa estratégia tem sido preferida em relação aos demais métodos de propagação vegetativa, pois permite maior flexibilidade para atender as demandas de mercado e a produção de mudas livres de patógenos. Além disso, outro interesse que move os estudos de micropropagação da espécie é a possibilidade de transformação genética, uma vez que protocolos de regeneração estejam estabelecidos (Attaya et al. 2012).

Nesse sentido, diversos são os estudos enfocados na obtenção de protocolos eficazes de regeneração e multiplicação *in vitro* do pinhão-manso. Para a indução de processos organogênicos diretos e indiretos, bem como processos de embriogênese somática, têm sido utilizados como explante primários: folhas, pecíolos, nós axilares, ápices, hipocótilos, epicótilos e cotilédones. O meio de cultura majoritariamente utilizado para iniciar e promover as respostas no cultivo *in vitro* é o meio MS (Murashige & Skoog 1962), suplementado com os reguladores de crescimento TDZ, BAP, AIB e ANA, isolados ou em diferentes combinações e em concentrações variadas. A sacarose (3% p/v) é a fonte de carbono comumente utilizada. Para o alongamento e enraizamento de explantes, os mesmos meios podem ser utilizados, diferindo no tipo e balanço dos reguladores de crescimento utilizados. Especificamente para o enraizamento de regenerantes, é comum a utilização do meio MS com a metade da concentração de sais (Mukherjee et al. 2011).

A grande diversidade nos protocolos encontrados reflete os efeitos da não domesticação da espécie e ausência de genótipos plenamente caracterizados. Dessa forma, as respostas são absolutamente dependentes dos genótipos utilizados, evidenciando a necessidade de estabelecimento de protocolos adequados a cada material genético de interesse. A Tabela 1 a seguir exemplifica alguns dos protocolos já publicados.

Tabela 1: Trabalhos de propagação *in vitro* de pinhão-manso, por diferentes estratégias, publicados nos últimos anos.

Autor	**Título**	**Explante inicial**	**Rota Morfogenética**
Sujatha & Mukta (1996)	Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*	Hipocótilo, pecíolo e folha	Organogênese direta (Regeneração)
Datta et al. (2007)	*In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.).	Gema axilar	Organogênese direta (Multiplicação)
Khurana-Kaul et al. (2010)	Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in the medium	Folhas	Organogênese direta (Regeneração)
Kumar & Reddy (2012)	Thidiazuron (TDZ) induced plant regeneration from cotyledonary petiole explants of elite genotypes of *Jatropha curcas*: a candidate biodiesel plant	Pecíolo coltiledonar	Organogênese direta (Regeneração)
Rathore et al. (2015)	Micropropagation of elite genotype of *Jatropha curcas* L. through	Gema axilar	Organogênese direta (Multiplicação)

	enhanced axillary bud proliferation and ex vitro rooting		
Maharana et al. (2012)	*In vitro* regeneration from node and leaf explants of *Jatropha curcas* L. and evaluation of genetic fidelity through RAPD markers.	Segmentos nodais e folhas	Organogênese indireta
Varshney & Johnson (2010)	Efficient plant regeneration from immature embryo cultures of *Jatropha curcas*, a biodiesel plant	Embriões imaturos	Organogênese indireta
Jha et al. (2007)	Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant	Folhas	Embriogênese indireta
Chiangmai et al. (2015)	Regeneration of adventitious shoots from callus and leaf explants in *Jatropha curcas* L. 'Phetchaburi'.	Folhas	Organogênese indireta
Nindita et al. (2014)	Somatic Embryogenesis Media Optimization Study of Physic Nut (*Jatropha curcas*) as Biodiesel Feedstock	Eixo embrionário e cotilédones	Embriogênese indireta
Mahalakshmi et al. (2015)	*In vitro* regeneration from different ages of petioles of physic nut (*Jatropha curcas* L.)	Pecíolo	Embriogênese indireta

2.3 Avanços biotecnológicos no estudo da espécie

2.3.1 Genômica

Pouco se sabe sobre o genoma das espécies do gênero *Jatropha*. Estas apresentam cromossomos bastante pequenos, sendo que a maioria é diploide, com 2n = 2x = 22 cromossomos (Divakara et al. 2010; Mukherjee et al. 2011).

A utilização de marcadores moleculares poderia ser uma importante fonte de informações sobre a diversidade genética do pinhão-manso, permitindo uma melhor gestão dos recursos genéticos bem com a seleção assistida nos programas de melhoramento. Entretanto, também são poucos os estudos quanto à variação genética dentro da espécie através de marcadores moleculares, sendo que os mais utilizados são: RAPD, AFLP, ISSR e SSR (Mukherjee et al. 2011).

Além disso, a identificação e caracterização de genes envolvidos no metabolismo lipídico e na resposta a estresses abióticos são economicamente importantes uma vez que permitiriam a modificação genética da espécie tendo em vista enriquecer o conteúdo lipídico e melhorar o desempenho agronômico. Alguns dos genes já estudados são: gene da betaína-aldeído desidrogenase (JcBD1), gene

da proteína intrínseca de membrana plasmática (JcPIP2), diacilglicerol acetiltransferase (DGAT), entre outros (Kumar et al. 2015).

2.3.2 Transformação genética

A tecnologia de transformação de plantas tornou-se uma plataforma versátil para o melhoramento genético de plantas, bem como para o estudo da função dos genes em plantas. Este sucesso é resultado de muitos anos de esforço na otimização das técnicas de cultura de tecidos, em técnicas de transformação e na engenharia genética (Hansen 1999).

Assim, esta ferramenta pode ser bastante útil para melhorar características do pinhão-manso e auxiliar o desenvolvimento de novas variedades. (Li et al. 2008) estabeleceram um processo de transformação genética altamente eficiente para acessos chineses de *J. curcas* pela primeira vez via *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando como explantes discos cotiledonares, e mais tarde (Trivedi et al. 2009) estabeleceram a transformação genética mediada por *A. tumefasciens* de folhas cotiledonares de acessos indianos. (Kumar, Anand, et al. 2010) estabeleceram protocolo do mesmo método de transformação genética utilizando explantes foliares. (Purkayastha et al. 2010) utilizaram ápices regenerados *in vitro* para a transferência de genes através de bombardeamento de partículas, com sucesso. Estas técnicas ajudam na modificação genética e posterior multiplicação *in vitro* de cultivares para vários usos. Além disso, a tecnologia ajuda na melhor compreensão e posterior melhoria da via de biossíntese de óleo, o que pode ter implicações positivas na ampliação da sua utilização como fonte de combustível renovável. O estabelecimento de protocolos de regeneração eficazes é o primeiro passo crucial para o sucesso de tecnologias de transformação genética (Mukherjee et al. 2011).

2.3.3 Proteômica

A proteômica tem demonstrado grande valor para propiciar conhecimento sobre processos bioquímicos complexos e está sendo utilizada para a análise das respostas fisiológicas vegetais e para encontrar biomarcadores relacionados com a resistência a diversos fatores bióticos e abióticos tais como resistência a seca, ao estresse hídrico e ao ataque de predadores.

No que diz respeito ao pinhão-manso, os estudos de proteômica já identificaram proteínas que parecem ser essenciais para a germinação de sementes maduras (Liu et al. 2011), foram também identificadas e caracterizadas proteínas

relacionas aos corpos lipídicos e aquelas envolvidas na resposta ao estresse. Outros estudos permitiram a compreensão da biossíntese de ácidos graxos no pinhão-manso e a identificação de proteínas envolvidas, assim como de proteínas regulatórias, como fatores de transcrição e fatores de iniciação da tradução. As proteínas tóxicas produzias pelo pinhão-manso, como a curcina e fatores anti-nutricionais, também já foram alvos de estudos de proteômica (Ndimba et al. 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer as condições para a propagação *in vitro* de pinhão-manso.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do GA3 na germinação *in vitro* de sementes de pinhão-manso;
- Avaliar o efeito da concentração de BAP e do tipo de explante na organogênese;
- Avaliar o efeito da concentração de BAP, do tipo de explante e da luminosidade na organogênese;
- Avaliar o efeito de diferentes reguladores de crescimento no alongamento de brotações adventícias;
- Enraizar brotações adventícias;
- Aclimatar plantas regeneradas;
- Avaliar o efeito da concentração de BAP e do carvão ativado no cultivo in vitro de ápices caulinares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todas as atividades foram conduzias nos Laboratório de Biotecnologia Vegetal, CDTec, UFPel, e Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Departamento de Botânica, UFPel.

4.1 Germinação *in vitro* de sementes de pinhão-manso

As sementes utilizadas foram gentilmente cedidas pela Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

As sementes de pinhão-manso foram descascadas com o auxílio de um quebra-nozes, desinfestadas superficialmente com álcool 70% por 2 minutos, lavadas abundantemente com água destilada estéril, imersas em solução de hipoclorito de sódio 2% durante 20 minutos e novamente lavadas com água destilada estéril, sendo secas em papel filtro também estéril antes da inoculação no meio de cultura.

Posteriormente as sementes foram inoculadas em frascos contendo aproximadamente 30 mL de substrato de água destilada geleificada com 6 $g.L^{-1}$ de ágar, sendo duas sementes por frasco, mantidas em estufa BOD, no escuro, em temperatura de 28 °C. Foram estabelecidos diferentes tratamentos com a adição de ácido giberélico, sendo: T0: 0 µM GA3, T1: 0,94 µM GA3 e T2: 1,88 µM GA3. Cada tratamento contou com 30 repetições, sendo que cada repetição constava de duas sementes.

O experimento foi realizado em duas vezes independentemente, uma utilizando sementes da safra 2012/2013 e a outra utilizando sementes da safra 2013/2014, com o intuito de verificar o efeito do tempo de armazenamento das sementes na germinação e qualidade de plântulas obtidas *in vitro*. Foram analisados o índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de plântulas anormais e média de germinação por repetição, para cada tratamento e cada lote de sementes utilizado.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3, sendo dois lotes de sementes de diferentes safras e três concentrações de ácido giberélico. Cada tratamento de cada safra contou com 24 repetições, sendo que cada repetição foi constituída um frasco contento duas sementes. Os dados foram submetidos à análise de variância e analisados por regressão polinomial.

O pH dos meios de cultura foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. Todos os meios de cultura e vidraria utilizadas foram autoclavados durante 20 minutos a 121 ° C e 15 lb / pol2. Algumas substâncias sensíveis ao calor como o GA3 foram adicionados assepticamente para o meio semi-sólido autoclavado, antes de solidificar. Estes procedimentos foram adotados para todas as etapas de cultivo *in vitro*.

Posteriormente a realização do experimento observou-se a necessidade de substituição do meio de água destilada solidificada com ágar pelo meio MS com a metade da concentração de sais acrescido de 1% (p/v) de sacarose. Além disso, foi adicionada uma etapa de lavagem das sementes antes da retirada do tegumento. Este processo consistiu da lavagem das sementes em água corrente com detergente neutro por cinco minutos, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v) durante dois minutos, finalizando com lavagem abundante em água corrente.

4.2 Efeito de diferentes concentrações de BAP na indução de calos

Plântulas obtidas a partir de germinação *in vitro* conforme descrito acima foram utilizadas como fontes iniciais de explantes. Os cotilédones e hipocótilos foram isolados com auxílio de pinça e bisturi e transferidos para frascos contendo meio de cultura Murashige & Skoog (MS), 3% (p/v) de sacarose, solidificado com 7g L^{-1} de ágar e distribuídos em entre os diferentes tratamentos, listados na tabela 2:

Tabela 2: Tratamentos utilizados para indução de calos em cotilédones e hipocótilos de pinhão-manso.

Tratamento	Reguladores de Crescimento
T1	17,76 µM BAP + 2,07 µM AIB
T2	22,2 µM BAP + 2,07 µM AIB
T3	26,64 µM BAP + 2,07 µM AIB

Os explantes foram repicados após 15 dias para meio fresco, nos mesmos tratamentos e após 28 dias foram transferidos para MS contendo 3% de sacarose, acrescido de 22,2 µM de BAP e 1,07 µM de ácido naftalenacético (ANA) (meio de regeneração).

As avaliações foram realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias de incubação, sendo avaliada a presença de calos, após a repicagem aos 28 dias foi avaliada a presença de estruturas potencialmente organogênicas (calos compactos e de coloração verde intensa, apresentando estruturas organogênicas globulares, na superfície nodular dos calos (Dode et al. 2011) e de brotações adventícias aos 14, 28 e 42 dias a partir

desta repicagem. O material foi mantido em sala de cultivo a 25±2 °C e fotoperíodo de 16h.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, sendo avaliados separadamente os efeitos dos tratamentos sobre os dois tipos de explantes. Foram realizadas 10 repetições em cada tratamento, para cada tipo de explante, sendo que cada repetição constituía-se de uma placa de petri contendo seis explantes. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan a 5%.

Um experimento complementar foi realizado sob as mesmas condições, alterando-se apenas as concentrações de BAP utilizadas, sendo: 13,32 µM, 15,54 µM e 17,76 µM, novamente em combinação com 2,07 µM de AIB.

4.3 Efeito dos meios de cultura e das condições de cultivo

Com objetivo de diminuir o efeito da oxidação dos explantes observado nos experimentos anteriores foi realizado experimento semelhante ao anterior, porém com a adição de caseína e o antibiótico amoxilina, conforme descrito por Toppo et al (2012), nas concentrações de 30 $mg.L^{-1}$ e 50 $mg.L^{-1}$, respectivamente. As concentrações de BAP testadas podem ser observadas na tabela a seguir, novamente em combinação com 2,07 µM de AIB. O meio de cultura utilizado foi, novamente, o meio MS acrescido de 3% (p/v) de sacarose e solidificado com 7g.L-1 de ágar.

Tabela 3: Concentração de BAP adicionada ao meio de cultivo para incução de calos a partir de cotilédones e hipocótilos de pinhão-manso.

Tratamento	Concentração de BAP
T1	13,32 µM
T2	15,54 µM
T3	17,76 µM
T4	22,2 µM
T5	26,64 µM

Foram realizadas avaliações aos 28 dias de incubação, sendo avaliada a presença de calos, após a repicagem aos 28 dias para meio de regeneração anteriormente citado, foi avaliada a presença de estruturas potencialmente organogênicas e de brotações adventícias aos 14, 21 e 28 dias a partir desta repicagem.

Este experimento foi conduzido em duas condições de luminosidade: 2000 lux (27 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) e 4000 lux (54 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x2, sendo 5 tratamentos de indução de calos e duas condições de luminosidade. Os efeitos dos tratamentos sobre os dois tipos de explantes foram avaliados separadamente. Foram realizadas 10 repetições em cada tratamento, para cada tipo de explante, sendo que cada repetição constituía-se de uma placa de petri contendo quatro explantes. O experimento foi realizado três vezes.

4.4 Alongamento das brotações adventícias obtidas a partir de hipocótilos de pinhão-manso via organogênese indireta

Para este experimento foram utilizados hipocótilos do experimento anterior, do tratamento de indução de calos de 15,54 µM de BAP + 2,07 µM de AIB. Após 21 dias em meio de regeneração, cada explante apresentando brotações adventícias foi seccionado em três e inoculado em um dos tratamentos de alongamento, que consistiam de meio MS contendo 3% (p/v) de sacarose, solidificado com 7g.L^{-1} de ágar, acrescido 30 mg.L^{-1} de caseína hidrolisada e 50 mg.L^{-1} de amoxicilina e diferentes reguladores de crescimento, isolados ou em combinação: T1: 9,69 µM AIA + 2,22 µM BAP; T2: 0,5 µM GA3; T3: 8,88 µM BAP (Kumar et al, 2010; Purkayastha et al, 2010; Khemkladngoen et al, 2010).

Aos 42 dias de cultivo foi avaliado o alongamento de brotações adventícias (brotos com mais de 3 cm), número de explantes totalmente oxidados e número de explantes com proliferação de calos. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. Os dados foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis. Foram realizadas 10 repetições para cada tratamento sendo que cada repetição foi constituída de 3 explantes.

4.5 Enraizamento de brotações adventícias

Todos explantes resultantes obtidos após a etapa de alongamento foram repicados para meio de enraizamento após, no mínimo, 42 dias de alongamento. O meio de enraizamento consistiu de MS com a metade da concentração de sais + 30 mg.L^{-1} de caseína + 50 mg.L^{-1} de amoxicilina + 2,07 µM. de AIB. Os explantes formam mantidos neste meio por, no mínimo 30 dias. Plantas com raízes maiores que 3 cm foram então aclimatadas. Após esse período, os explantes não enraizados foram transferidos para meio de alongamento novamente (9,69 µM AIA + 2,22 µM BAP).

4.6 Aclimatação de plantas regeneradas

As plantas enraizadas foram inicialmente transferidas para embalagens de plástico com tampa contendo vermiculita e solução nutritiva de Hoagland e mantidas nas condições de sala de crescimento. As embalagens foram gradativamente abertas e após um período de aproximadamente uma semana as plantas foram transferidas para tubetes contendo substrato comercial e mantidas em casa de vegetação com temperatura controlada de aproximadamente 28ºC.

4.7 Cultivo *in vitro* de ápices caulinares

Ápices caulinares de plântulas germinadas *in vitro* conforme descrito anteriormente, foram distribuídos nos seguintes tratamentos: T1: 22,2 µM de BAP + 2,07 µM de AIB; T2: 22,2 µM de BAP + 2,07 µM de AIB + 1 $g.L^{-1}$ de carvão ativado; T3: 44,4 µM de BAP + 2,07 µM de AIB; T4: 44,4 µM de BAP + 2,07 µM de AIB + 1 $g.L^{-1}$ de carvão ativado. O meio de cultivo utilizado foi o meio MS suplementado com 3% (p/v) de sacarose e solidificado com $7g.L^{-1}$ de ágar. Após a inoculação no meio de cultura, os explantes foram mantidos em estufa BOD a 28°C no escuro durante 10 dias.

Foram realizadas 30 repetições de cada tratamento, cada repetição constituída de um frasco contendo 5 explantes. Após o período de 10 dias foi avaliado o alongamento e enraizamento dos explantes, e então estes foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de ±25°C e fotoperíodo de 16 horas. Após 42 dias de cultivo em condições de sala de crescimento, foi avaliado o desenvolvimento da parte aérea dos explantes. Posteriormente os explantes enraizados e com bom desenvolvimento da parte aérea foram submetidos ao processo de aclimatação.

4.8 Análise estatística

As análises de variância, comparação de médias e regressão foram realizadas utilizando o programa WinStat (Machado & Conceição 2003).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Germinação *in vitro* de sementes de pinhão-manso

Para o estudo de índice de velocidade de germinação (IVG), as sementes de 2012/2013, foram obtidos os seguintes resultados: T0: 38,75; T1: 45,11 e T2: 34,4. Enquanto para as sementes da safra 2013/2014 o IGV obtidos foram: T0: 64,8; T1: 84,9 e T2: 78,35.

Após a realização da análise variância observou-se significância para ambos os fatores, assim como interação entre os mesmos. A média de sementes germinadas de repetição foi visivelmente influenciada pelo uso de GA3, sendo que a concentração de 0,94 uM mostrou os melhores resultados para ambas as sementes da colheita 2012/2013 assim como para as sementes da colheita de 2013/2014, como pode ser observado nas Figuras 1A e 1B, respectivamente. Os resultados são ajustados para uma equação quadrática, e para colheita de sementes 2012/2013 o ponto máximo da curva foi de 1,2, enquanto para as sementes da safra 2013/2014 foi de 0,94. Estes resultados permitem concluir que a concentração de 0,94 é o mais apropriado, independente do período de armazenagem.

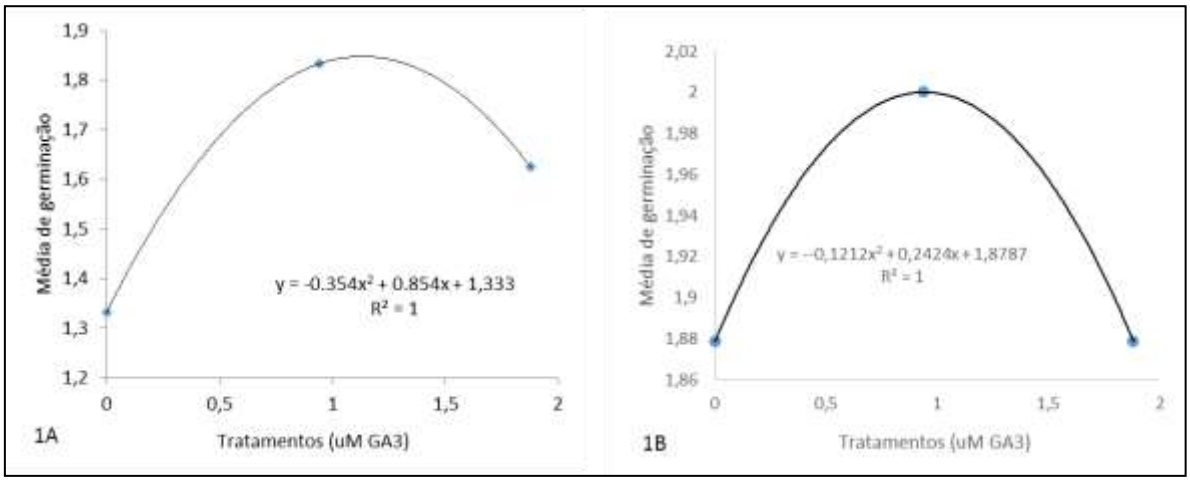

Figura 1: Médias de sementes germinadas por tratamento; 1A: safra 2012/2013; 1B: safra 2013/2014.

Em relação à porcentagem de plântulas anormais, para as sementes da safra 2012/2013 foram observados os seguintes valores: T0: 55,5%; T1: 18% e T2: 34%, enquanto que para a safra 2013/2014 foram: T0: 3,33%; T1: 4,6% e T2: 6,45%.

A partir destes resultados a concentração de 0,94 foi adotada como padrão para a germinação *in vitro* nos experimentos seguintes. O meio de cultura para germinação *in vitro* foi posteriormente substituído por MS/2 1%, para possibilitar a

eliminação de plântulas contaminadas nesta etapa, diminuindo as contaminações nas etapas seguintes.

A micropropagação de espécies lenhosas é uma tarefa desafiadora devido à dificuldade de estabelecimento de culturas livres de contaminação. Além disso, a cultura *in vitro* dessas espécies é relativamente difícil de estabelecer a partir da maioria dos órgãos vegetais (Oliveira et al. 2013). Portanto, a germinação de sementes *in vitro*, pode ser uma excelente alternativa para superar estas dificuldades, uma vez que as sementes são tipicamente mais resistentes a processos de desinfestação, permitindo o estabelecimento de culturas assépticas mais facilmente.

No entanto, a utilização de sementes, em especial de plantas oleaginosas, encontra-se uma limitação no que diz respeito à perda de vigor das sementes durante o período de armazenamento. Além disso, em plantas em que existe uma alta taxa de polinização cruzada, tais como o pinhão-manso, outra limitação pode ser encontrada: a elevada variabilidade genética das sementes produzidas e, por conseguinte, uma germinação não uniforme (Nunes 2007).

O uso de GA3 para otimizar a germinação *in vitro* de sementes é amplamente utilizados em várias espécies, uma vez que as giberelinas desempenham um papel chave na germinação de sementes, estando envolvidas tanto na quebra de dormência, como a mobilização das reservas (por síntese de novo de α-amilase). Aplicação exógena de ácido giberélico nas concentrações adequadas permite a aceleração e padronização de germinação (Braun et al. 2010).

Em pinhão-manso, Vedovato et al. (2010) examinou os efeitos da utilização deste regulador de crescimento na germinação de sementes, obtendo os melhores resultados, tanto para a germinação e para o desenvolvimento de plântulas, quando usado em concentrações de 1,04 µM de GA3. Que foi semelhante aos resultados obtidos neste estudo, uma vez que o tratamento mais eficaz foi usando 0,94 µM. O mesmo autor, em 2011, testou concentrações 2,6 a 20,8 µM de GA3 e não foi observado efeito significativo sobre a germinação. Estes dados permitem inferir que as sementes de pinhão-manso tendem a responder bem somente em baixas concentrações de ácido giberélico.

Por fim, podemos constatar que o tratamento contendo 0,94 µM permite a obtenção de taxas de germinação elevadas, iguais ou superiores a 90%,

independentemente do tempo de armazenamento das sementes. Além disso, foi observada uma redução na porcentagem de plântulas anormais quando utilizada esta concentração na germinação de sementes mais velhas. Estes resultados permitem inferir que este tratamento possivelmente apresente, além de um efeito de acelerar e padronizar o processo de germinação das sementes influencia positivamente o metabolismo de sementes em condições fisiológicas diferentes.

5.2 Efeito de diferentes concentrações de BAP na indução de calos

Neste estudo, para a formação de calo em tratamentos iniciais, não houve diferença significativa entre os tratamentos tanto para cotilédones quanto hipocótilos, sendo que hipocótilos de 14 dias tinham todos explantes com formação de calo. Do mesmo modo, não foi observada diferença nos dois tipos de explante quanto a taxa de estruturas potencialmente organogênicas.

No que diz respeito a formação de brotos a partir de cotilédones para 42 dias de regeneração, os resultados são mostrados na Tabela 2. Para hipocótilos, não houve diferença significativa na mesma avaliação.

Tabela 4: frequência de cotilédones com brotações após 42 dias de regeneração.

Tratamento	Frequência
17,76 µM BAP + 2,07 µM IBA	12,9% a
22,2 µM BAP + 2,07 µM IBA	7,3% ab
26,64 µM BAP + 2,07 µM IBA	4,8% b

Frequências seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente pelo teste de Duncan, p <0,5.

No experimento complementar realizado utilizando concentrações menores de BAP, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos.

Protocolos eficientes de regeneração *in vitro* têm sido relatados em vários estudos, com diferentes tipos de explantes (Mukherjee et al. 2011), no entanto, os resultados são diferentes e não permitem a identificação de um protocolo reprodutível, sugerindo a necessidade de mais estudos. Além disso, as respostas têm sido relatadas como fortemente dependente das variedades utilizadas, destacando a necessidade de estabelecer protocolos apropriados para cada material genético de interesse (Franco 2013; Nascimento 2013). Em estudos anteriores do grupo Casarin et al. (2012), foi observado que a combinação de BAP nas concentrações entre 12,12 µM - 26,64 µM com 0,2 µM de AIB, foi mais favorável para o processo de organogênese indireta.

Encontra-se na literatura grandes variações quanto às concentrações e tipos de citocininas ideais na regeneração dos explantes de pinhão-manso. Por exemplo, Kalimuthu et al. (2007) observaram que 8,88 µM de BAP seria mais eficiente para cotilédones, enquanto Hoppen (2011), verificou que 27,8 µM BAP e 0,5 µM de IBA seria o tratamento mais eficaz tanto para cotilédones quanto hipocótilos. Além disso, é relatado o uso de outros reguladores do crescimento, como thidiazuron (TDZ), cinetina e dicamba (Mukherjee et al. 2011), com resultados variáveis. Esta diversidade de abordagens e os resultados demonstram a necessidade de estudos específicos para genótipos de diferentes origens, uma vez que as respostas são altamente dependentes do genótipo utilizado, como pode ser observado na tabela 5 a seguir:

Tabela 5: Exemplos de trabalhos de regeneração de pinhão-manso demonstrando a variedade de tratamentos, eficiência de regeneração e origem do material doador.

Autor	**Meio de indução de calos**	**Eficiência de Regeneração**	**Origem do material**
(Khemkladngoen et al. 2011)	13,32 µM BAP + 0,41 µM IBA	77,93%	Japão
(Kumar et al. 2011)	9,08 µM TDZ	93%	Índia
(Mazumdar et al. 2010)	6,66 µM BAP + 0,24 µM IBA escuro	87,50%	Índia
(Hoppen 2011)	27,8 µM BAP + 0,5 µM AIB	92,50%	Minas Gerais/Brasil
(Tee Chong Siang 2012)	3,61 µM dicamba	83,3 a 73,33% *	Malasia

* = Embriogênese somática.

Há relatos de protocolos de regeneração eficientes também utilizam uma grande variedade de explantes, por exemplo, Singh et al. (2014) teve a maior frequência de regeneração (91%) a partir de explantes de pecíolo e como meio de indução de calos o meio MS suplementado com BAP (4,44 µM) e AIB (2,45 µM). Enquanto que para explantes de folha a maior eficiência (61%) foi observada quando se utiliza meio MS suplementado com BAP (4,44 µM) na indução de calos. A multiplicação de explantes nodais e gemas axilares também são relatadas como uma alternativa para a propagação *in vitro* das espécies (Hassan et al. 2014; Behera et al. 2014).

É importante ressaltar que a idade de explantes iniciais usados pode ser um fator determinante para o sucesso de protocolos de regeneração, bem como transformação genética de plantas (Mazumdar et al. 2010). Além disso, quanto mais jovem dos explantes, menor é a probabilidade de seus tecidos terem sofrido alguma mutação, podendo garantir maior confiabilidade e manutenção da identidade clonal

dos possíveis propágulos. Portanto, a adoção da estratégia de obtenção de explantes iniciais a partir da germinação *in vitro* de sementes revela-se uma excelente alternativa.

5.3 Efeito dos meios de cultura e das condições de cultivo

Após as modificações na composição dos meios de cultivo utilizados, observou-se melhora no desenvolvimento dos explantes em relação aos ensaios anteriores, principalmente em relação à diminuição de oxidação e contaminações. Além disso, um menor tempo de cultivo foi necessário para que fosse observada a formação de estruturas organogênicas, bem como brotações adventícias. Quanto às diferentes condições de luminosidade estabelecidas, observou-se diferença significativa quanto ao efeito da intensidade luminosa para a maioria das avaliações realizadas.

Na avaliação de indução de calos a partir de cotilédones, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, para as duas condições de luminosidade, assim com não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as duas condições de luminosidade, em nenhum dos tratamentos. Não foi observada interação entre os fatores.

Já em relação à indução de calos a partir de hipocótilos, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos utilizados. Nesta avaliação observou-se efeito significativamente negativo da maior intensidade luminosa para os explantes do tratamento T2, assim como para todos os tratamentos de maneira geral, como pode ser observado nas tabelas 6 e 7, respectivamente. Foi observada interação entre os fatores.

Tabela 6: Médias de calo formados a partir de hipocótilos após 28 dias em meio de indução sob diferentes condições de luminosidade nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	2000 lux	4000 lux
T1	4a	3,96a
T2	4a	3,83b
T3	4a	3,93a
T4	4a	3,96a
T5	4a	3,96a
CV	2,53%	

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si, na linha, pelo teste de Tukey, $p<0,5$.

Tabela 7: Médias de explantes formado calo após 28 dias em meio de indução, sob diferentes condições de luminosidade.

Tipo de explante	2000 lux	4000 lux
Cotilédones	3,78a	3,58a
Hipocótilos	4a	3,93b

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si, na linha, pelo teste de Tukey, p<0,5.

Quanto à formação de estruturas potencialmente organogênicas, em cotilédones, após 28 dias de cultivo em meio de regeneração, observou-se efeito negativo de maior intensidade luminosa nos tratamentos T1 e T5, assim como para a média geral dos tratamentos. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para a condição de 2000 lux de luminosidade, enquanto para a condição de 4000 lux de luminosidade observou-se diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos T2 e T5, como pode ser observado na tabela 8. Não foi observada interação entre os fatores

Tabela 8: Média de estruturas potencialmente organogênicas formadas a partir de cotilédones após 28 dias de cultivo em meio de regeneração sob diferentes condições de luminosidade nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	2000 lux	4000 lux
T1	3,16 a NS	1,86 b AB
T2	3,70 a NS	2,50 a A
T3	2,90 a NS	2,00 a AB
T4	3,43 a NS	2,76 a A
T5	3,46 a NS	0,66 b B
CV	39,3%	

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes apresentaram diferença entre si na linha. Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si na coluna. Teste de Tukey, p<0,5. NS: não significativo para a comparação das médias na coluna.

Para hipocótilos, na mesma avaliação foi observado efeito negativo da maior intensidade luminosa para os tratamentos T2 e T3. Os tratamentos T1 e T2 foram significativamente superiores ao tratamento T5, não diferindo entre si, para a condição se 2000 lux. Enquanto na condição de 4000 lux de luminosidade, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Não foi observada interação entre os fatores.

Tabela 9: Média de estruturas potencialmente organogênicas formadas a partir de hipocótilos após 28 dias de cultivo em meio de regeneração sob diferentes condições de luminosidade nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	2000 lux	4000 lux
T1	2,86 a A	1,83 a NS
T2	3,26 a A	1,83 b NS
T3	2,63 a AB	1,43 b NS
T4	2,13 a AB	1,53 a NS
T5	1,60 a B	1,13 a NS
CV	46,2%	

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem entre si na linha. Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si na coluna. Teste de Tukey, p<0,5. NS: não significativo para a comparação das médias na coluna.

Considerando as médias gerais dos tratamentos de ambos os tipos de explante, observou-se que houve efeito negativo da maior luminosidade, conforme pode ser observado na tabela 10:

Tabela 10: Média de explantes apresentado estruturas potencialmente organogênicas após 28 dias de cultivo em meio de regeneração, sob diferentes condições de luminosidade.

Tipo de explantes	2000 lux	4000 lux
Cotilédones	3,33 a	1,93 b
Hipocótilos	2,50 a	1,56 b

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si, na linha, pelo teste de Tukey, p<0,5.

Já em relação à formação de brotações adventícias não foi observada diferença significativa para os tratamentos em nenhuma das condições de luminosidade, bem como para os tipos de explante. Para cotilédones, foi observado efeito negativo da maior luminosidade nos tratamentos T1, T2 e T5, enquanto que para hipocótilos este efeito foi observado no tratamento T2, conforme pode ser observado nas tabelas 11 e 12, respectivamente. Não foi observada interação entre os fatores para nenhum dos tipos de explante. Esse efeito também pôde ser observado quando analisadas as médias gerais dos tratamentos, conforme tabela 13.

Tabela 11: Média brotações adventícias formadas a partir de cotilédones após 28 dias de cultivo em meio de regeneração sob diferentes condições de luminosidade nos diferentes tratamentos

Tratamentos	2000 lux	4000 lux
T1	1,15 a	0,40 b
T2	1,26 a	0,40 b
T3	0,36 a	0,71 a
T4	0,43 a	0,40 a
T5	1a	0,25b
CV	101,27%	

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si, na linha, pelo teste de Tukey, p<0,5.

Tabela 12: Média brotações adventícias formadas a partir de hipocótilos após 28 dias de cultivo em meio de regeneração sob diferentes condições de luminosidade nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	2000 lux	4000 lux
T1	0,83a	0,56a
T2	1,76a	0,66b
T3	1,23a	0,53a
T4	1a	0,43a
T5	0,7a	0,26a
CV	99,85%	

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si, na linha, pelo teste de Tukey, p<0,5.

Tabela 13: Média de explantes apresentado brotações adventícias após 28 dias de cultivo em meio de regeneração, sob diferentes condições de luminosidade.

Tipos de explante	2000 lux	4000 lux
Cotilédones	0,84a	0,43b
Hipocótilos	1,1a	0,49b

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si, na linha, pelo teste de Tukey, p<0,5.

Apesar não terem sido observadas diferenças significativas, para a maior parte dos tratamentos, o desenvolvimento visual dos explantes variou bastante. O aspecto dos cotilédones e hipocótilos, aos 14 dias de cultivo em meio de regeneração pode ser observados nas figuras 2 e 3 a seguir.

Segundo Toppo et al. (2012), a adição de glutamina e arginina, 15 $mg.L^{-1}$ cada, aos meios de multiplicação de brotações, melhorou o desenvolvimento das mesmas, assim como incrementou o posterior enraizamento e aclimatação. A adição destes aminoácidos também foi realizada nos meios de enraizamento, suprindo a menor disponibilidade de nitrogênio do meio MS com metade da concentração de sais. Esse efeito se deve provavelmente à alta demanda de nitrogênio da espécie, que pode ser compensada pela suplementação dos meios de cultivo. A suplementação dos meios de cultivo para pinhão-manso com aminoácidos também foi relatada por Cai et al. (2011), que utilizaram glutamina e asparagina,

conjuntamente com KNO_3 para a manutenção de suspensões celulares embriogênicas.

Alternativamente a suplementação com aminoácidos, pode-se obter resultados semelhantes através da utilização de caseína hidrolisada, que no presente estudo melhorou o desenvolvimento dos explantes nos meios de indução de calos e regeneração, e também reduziu a oxidação das brotações adventícias em meio de enraizamento. Varshney & Johnson (2010) obtiveram os melhores resultados para indução de calos e subsequente regeneração em meio MS suplementado com 100 $mg.L^{-1}$ de caseína hidrolisada, 200 $mg.L^{-1}$ de L-glutamina, e 8 $mg.L^{-1}$ de CuSO4. Os efeitos positivos da suplementação de meios de cultivo com caseína hidrolisada e aminoácidos como glutamina e prolina para a manutenção e regeneração de calos também já foram relatados em outras espécies, como arroz (Minhas et al. 1999).

Dentre os fatores ambientais que influenciam a morfogênese *in vitro,* a luz parece ser o principal deles. Tanto que muitos estudos são conduzidos no escuro, especialmente na fase de estabelecimento das culturas, a fim de evitar a oxidação dos explantes. Tal procedimento é adotado devido ao fato de que a enzima chave para a produção de compostos fenólicos, a fenilalaninamonioliase, é dependente de luz. Os efeitos diretos da luz sobre o desenvolvimento dos tecidos é mediado por receptores como o fitocromo. Esta relação já foi evidenciada por Lercari et al. (1999) onde um mutante de tomateiro defectivo para o gene que codifica uma enzima na formação do cromóforo do fitocromo, praticamente não forma gemas *in vitro* (Peres 2002).

Não foram encontrados relatos sobre os efeitos de diferentes intensidades luminosas no cultivo *in vitro* de pinhão-manso. Entretanto, conforme relatado por Hangarter & Stasinopoulos (1991), além dos efeitos diretos da luz sobre os tecidos em cultivo é preciso considerar a ocorrência de mudanças fotoquímicas na composição dos meios de cultura, antes e durante os períodos de cultivo.

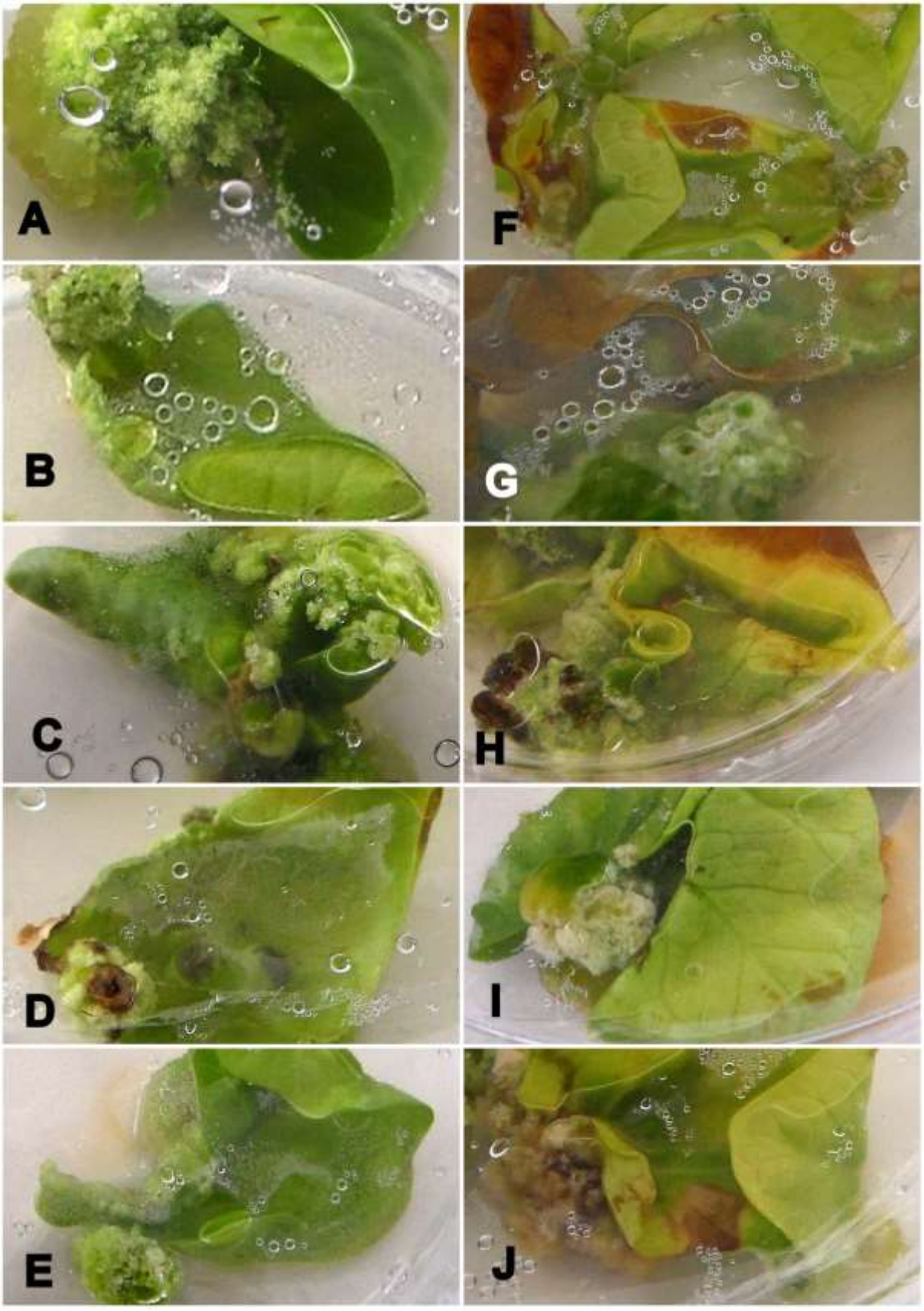

Figura 2: Cotilédones aos 14 dias de cultivo em meio de regeneração A-E: 2000 lux (T1-T5); F-J: 4000 lux (T1-T5).

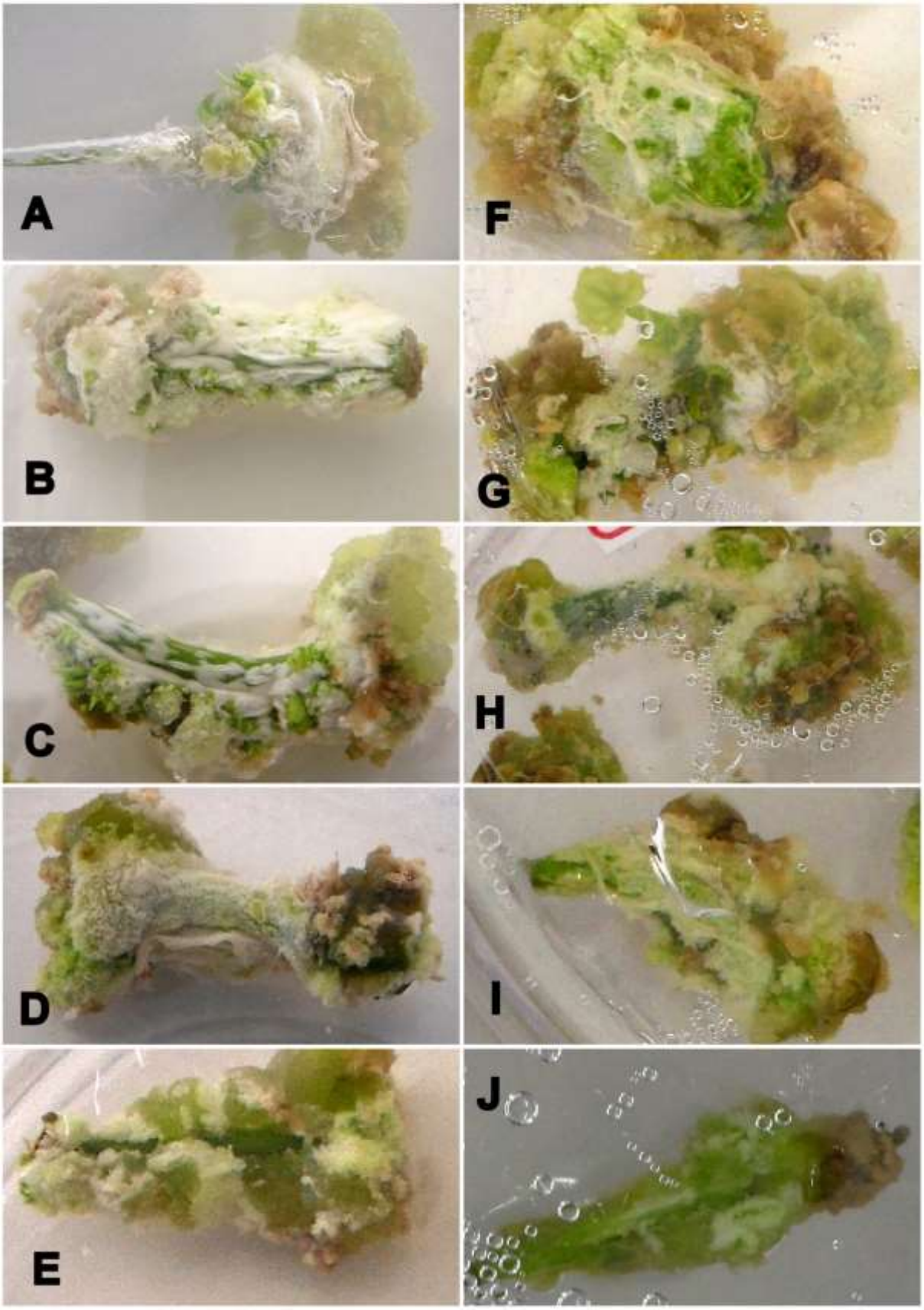

Figura 3: Hipocótilos aos 14 dias de cultivo em meio de regeneração A-E: 2000 lux (T1-T5); F-J: 4000 lux (T1-T5).

5.4 Alongamento das brotações adventícias obtidas a partir de hipocótilos de pinhão-manso via organogênese indireta

O alongamento das brotações adventícias nos explantes foi observado aos 14 dias de cultivo, sendo que aos 42 dias de cultivo o tratamento T1 se mostrou significativamente superior ao T3, mas não apresentando diferença estatisticamente significativa com T2, assim como T2 e T3 não diferiram significativamente, conforme pode ser observado na figura 4:

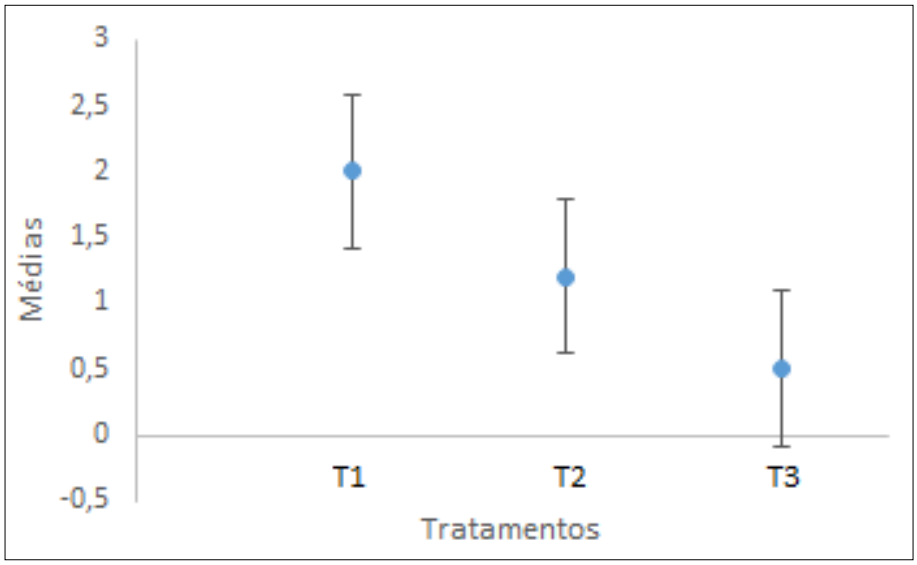

Figura 4: Média do número de explantes com brotações adventícias alongando aos 42 dias de cultivo. P<0,01 no teste de Kruskal-Wallis.

Entretanto, outros parâmetros precisam ser analisados. Por exemplo, os explantes do tratamento T3, apresentaram maior frequência de proliferação de calos, como pode ser observado na figura 5, sendo essa diferença estatisticamente significativa em relação aos tratamentos T1 e T2. Estes por sua vez, não apresentaram diferença significativa entre si. Nesta etapa do processo de obtenção de plantas via organogênese indireta, a proliferação dos calos é indesejada e compromete o bom desenvolvimento das brotações adventícias, tanto que aos 42 dias os explantes do tratamento T3 apresentavam maior frequência de oxidação completa e necrose dos tecidos, conforme pode ser observado na figura 6.

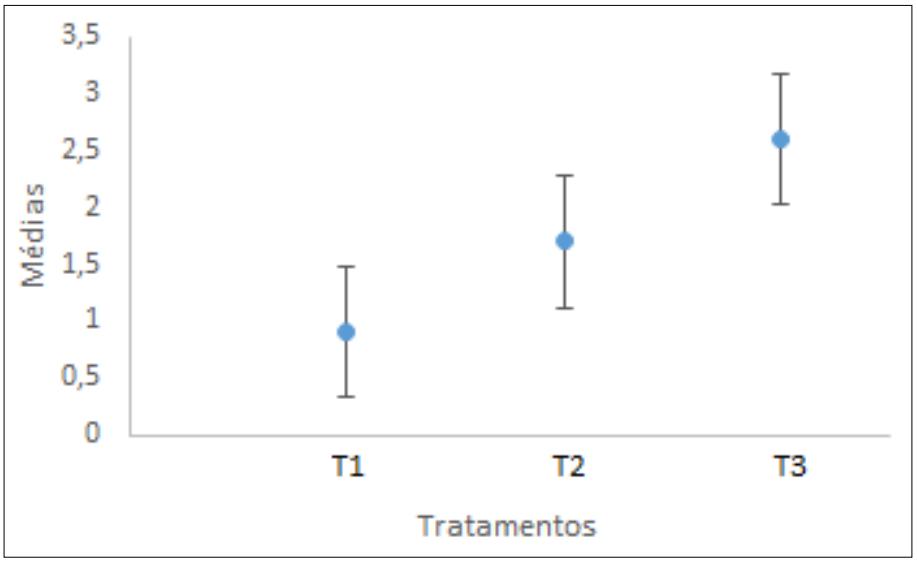

Figura 5: Médias de explantes apresentando proliferação de calos aos 42 dias de cultivo. P<0,001 no teste de Kruskal-Wallis.

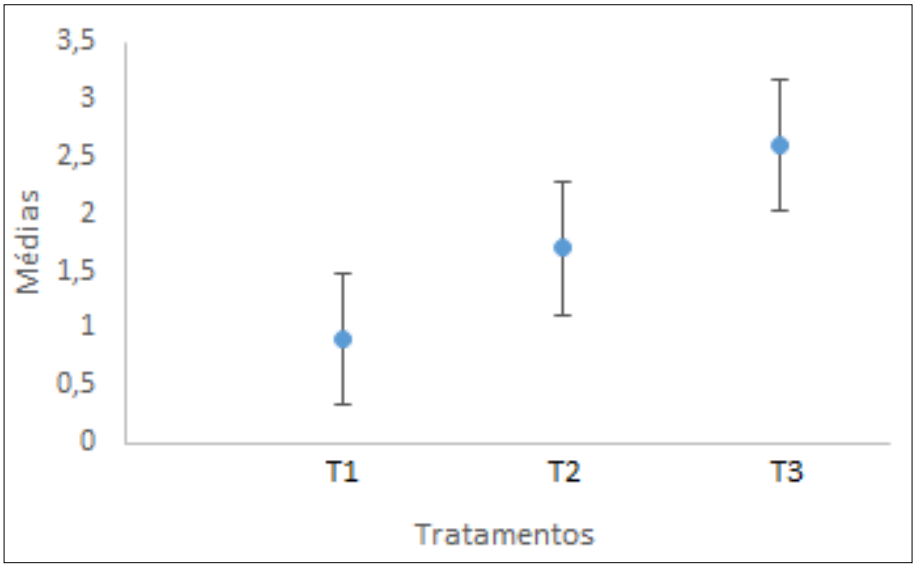

Figura 6: Média de explantes totalmente oxidados aos 42 dias de cultivo. P<0,01 no teste de Kruskal-Wallis.

Apesar de não ser observada diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos T1 e T2 para os parâmetros avaliados, os explantes do tratamento T1 visualmente apresentaram um melhor desenvolvimento, como pode ser observado na Figura 7.

Figura 7: Brotações adventícias em hipocótilos de pinhão-manso aos 42 dias de cultivo, T1 (A): apresentando melhor desenvolvimento; T2 (B): apresentando folhas com desenvolvimento anormal; e T3 (C): apresentando explantes completamente oxidados.

Neste experimento o T1, relatado por (Kumar, Vijay Anand, et al. 2010) como o mais eficiente no alongamento de brotações adventícias, se mostrou ser o mais eficiente também nas condições desse estudo. Durante o processo de regeneração de plantas, uma etapa importante é o alongamento das brotações adventícias, para posterior enraizamento e aclimatação. Diversos tratamentos vêm sendo relatados para o alongamento de brotações adventícias de pinhão-manso, obtidas por diferentes vias morfogenéticas e tipos de explantes. Os tratamentos utilizados por (Kumar, Vijay Anand, et al. 2010; Purkayastha et al. 2010; Khemkladngoen et al. 2011) foram selecionados para serem testados neste estudo por se aproximarem às condições do nosso experimento.

Khemkladngoen et al. (2011) relatou que a utilização de 8,88 µM de BAP seria mais eficiente no alongamento de brotações adventícias de pinhão-manso, e a sua combinação com uma auxina (AIB) ocasionou a continuação da formação de calos. O oposto do observado em nosso experimento, onde a utilização de apenas uma citocinina ocasionou uma maior proliferação de calos nos explantes. Purkayastha et al. (2010) relataram que a utilização de GA3 seria essencial para o alongamento de brotações adventícias, entretanto em nosso experimento isto não foi confirmado, já que o tratamento mais eficiente não utilizava este regulador. Assim sendo o T1, relatado por Kumar, Vijay Anand, et al. (2010) como o mais eficiente no alongamento de brotações adventícias, se mostrou ser o mais eficiente também nas condições desse estudo. Singh et al. (2010) também observaram que a combinação de AIA e BAP teria uma ação sinérgica no alongamento de botações adventícias, e a utilização de AIA isoladamente não seria suficiente, evidenciando um importante papel do BAP tanto na regeneração quanto no algongamento de brotações.

Outro regulador de crescimento também relatado no alongamento de brotações é o TDZ. Mahalakshmi et al. (2015) utilizaram 2,27 µM deste regulador, combinado a 0,44 µM de BAP e 1,04 µM L-1 de GA3 para o alongamento de brotações obtidas a partir de pecíolos. A utilização de AIB foi relatada por Franco (2013), na concentração de 0,41 µM combinado a 1,33 µM de BAP, utilizando como explantes iniciais segmentos de folhas. Entretanto, tanto TDZ quanto AIB também já foram relatados por apresentar efeitos negativos nesta etapa, seja pelo efeito inibitório observado quando em altas concentrações, sendo desejável a utilização de outra citocinina, no caso do TDZ, ou por provavelmente estimular a multiplicação, e não o alongamento, das brotações no caso do AIB.

5.5 Enraizamento de brotações adventícias

Após 30 dias no meio de enraizamento, 36% dos explantes enraizaram. Os explantes apresentavam sinais de oxidação, especialmente os não enraizados. Os explantes não enraizados foram repicados novamente para meio de alongamento. Os explanes que apresentavam raízes foram submetidos ao processo de aclimatação.

Algumas espécies vegetais podem iniciar o processo de formação de raízes adventícias *in vitro* sem que seja necessária a adição de algum regulador de crescimento ao meio de cultura, enquanto outras podem necessitar de diferentes reguladores, mas na sua grande maioria, auxinas. Dentre as auxinas, o AIB, uma auxina sintética, tem sido relatado como uma regulador mais efetivo na iniciação de raízes adventícias do que o AIA, de ocorrência natural, sendo efetivo para uma ampla gama de espécies de plantas e não tóxico (Syros et al. 2004; Noor Camellia et al. 2009).

O pinhão-manso é uma espécie conhecida por ser uma espécie difícil de ser micropropagada, que apesar de apresentar boa multiplicação de brotações, o desenvolvimento das brotações obtidas é limitado, bem como as taxas de enraizamento *in vitro* são normalmente muito baixas, resultando em dificuldades na aclimatação das plantas (Toppo et al. 2012; Singh & Shetty 2012).

Portanto Singh & Shetty (2012) validar diferentes tratamentos utilizados no enraizamento de brotações adventícias de pinhão-manso já relatados, bem como novas combinações de auxinas e outros reguladores de crescimento. Nesse estudo constatou a baixa reprodutibilidade dos protocolos, o que pode ser justificado não

apenas pelo efeito dos reguladores de crescimento utilizados, mas também pode haver influência direta ou indireta de fatores químicos (composição dos meios de cultura), físicos (pH, luminosidade, temperatura) e biológicos (idade, tipo e tempo de cultivo do explante). Dentre os novos tratamentos testados, observaram que a utilização tanto de AIB (6,21 µM) quanto de AIA (11,4 µM) pode resultar em enraizamento significativo dos brotos (50% ou mais), enquanto a utilização de ANA não parece ser efetiva. O meio basal utilizado foi o MS com a metade da concentração de sais, comumente utilizados em diversos estudos de enraizamento para diferentes espécies.

Entretanto, como já discutido anteriormente e relatado por Toppo et al. (2012), a utilização do meio MS com metade das concentrações de sais pode comprometer o desenvolvimento dos explantes de pinhão-manso *in vitro*, devido a grande demanda de nitrogênio da espécie, fazendo necessária a suplementação dos meios de cultura com, por exemplo aminoácidos, ou conforme testado neste trabalho através da utilização de caseína.

Neste estudo, reproduzindo-se o tratamento mais eficiente de enraizamento testado por Toppo et al. (2012), obteve-se uma eficiência de enraizamento bastante reduzida (36%) em relação à relatada (87%). Como já mencionado, estas divergências podem ser resultantes de da interferência direta ou indireta de outros fatores além dos reguladores de crescimento.

5.6 Aclimatação de plantas regeneradas

No total, foram obtidas 12 brotações adventícias enraizadas. Após o período de aclimatação em laboratório, em vermiculita, todas as plantas foram transferidas para tubetes contendo substrato comercial e transferidas para condições de casa de vegetação, com temperatura controlada a ±28°C, na Embrapa Clima Temperado. Na figura 8 pode ser observada uma das plantas obtidas após o período de aproximadamente uma semana de aclimatação no laboratório. Após 60 dias de aclimatação, não restava nenhuma planta sobrevivente.

Figura 8: Planta regenerada obtida a partir de hipocótilo (tratamento T2 na indução de calos) após uma semana de aclimatação em condições de sala de crescimento.

O processo de aclimatação pode ter sido prejudicado pelos intervalos entre a transferência das plantas das condições de sala de crescimento para casa de vegetação, que devido a indisponibilidade de local adequado, foram mantidas fora das condições ideais até que pudessem serem transferidas pra a casa de vegetação na Embrapa Clima Temperado. Entretanto, devido ao clima frio da época e à fragilidade intrínseca de plantas como estas, as condições fisiológicas das plantas já haviam sido comprometidas, e as mesmas não tiveram condições de se recuperar.

5.7 Cultivo *in vitro* de ápices caulinares

Neste experimento foram considerados alongados explantes que atingiram 3 cm ou mais após o período de 10 dias no escuro. De maneira geral, nos tratamentos contendo 22,2 µM de BAP observou-se menor média de alongamento do explantes quando comparados aos dos tratamentos contendo 44,4 µM, independentemente da adição de carvão ativado, como pode ser observado na tabela 11. Portanto, pode-se observar que o tratamento T4 foi o mais eficiente no estímulo ao alongamento dos ápices caulinares, enquanto o T1 foi o menos eficiente.

Em relação ao enraizamento dos explantes, os tratamentos sem a adição de carvão ativado apresentaram a totalidade de seus explantes com formação de calo na base, resultando no não enraizamento dos mesmos. Entre os tratamentos com adição de carvão ativado, o tratamento contento 22,2 µM BAP + 2,07 µM AIB + 1

$g.L^{-1}$ carvão ativado (T2) apresentou a maior porcentagem de enraizamento, como pode ser observado na tabela 14:

Tabela 14: Porcentagem de explantes apresentando alongamento > 3cm e porcentagem de explantes enraizados após 10 dias de cultivo, no escuro:

Tratamentos	Explantes algondados (%)	Explantes enraizados (%)
T1	18,6 c	0 c
T2	34,6 bc	58,0 a
T3	46,0 b	0 c
T4	67,3 a	39,3 b
C.V.	72,8%	55,9%

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente no teste de Tukey a 5%.

Após o período de 42 dias de cultivo em condições de sala de crescimento, os explantes dos tratamentos sem adição de carvão ativado apresentaram extensa oxidação, grande proliferação dos calos formados na base e folhas pequenas com formato atípico. Já para os tratamentos com adição de carvão ativado observou-se um bom desenvolvimento da parte aérea, especialmente para os explanes já enraizados. O desenvolvimento dos explantes dos tratamentos T4, após o período de 42 dias em condições de sala de crescimento e após 32 semanas de aclimatação pode ser observado nas figuras 9 e 10, respectivamente:

Figura 9: Plantas resultantes de ápices de pinhão-manso do tratamento T4 (44,4 µM BAP + 2,07 µM AIB + 1 $g.L^{-1}$ carvão ativado) após 42 dias de cultivo em condições de sala de crescimento, apresentando bom desenvolvimento de parte aérea e raízes.

Figura 10: Plantas resultantes do tratamento T4 (µM BAP + 2,07 µM AIB + 1 $g.L^{-1}$ carvão ativado), em condições de casa de vegetação, após 32 semanas de aclimatação.

Tratamentos utilizando altas concentrações de citocininas, conhecidos como *pulse*, são comumente utilizados para induzir a formação de múltiplas brotações em diferentes explantes, como em gemas axilares e ápices caulinares de diferentes espécies. Estes tratamentos podem variar em concentração, tempo de exposição (minutos, horas ou dias) e tipo de meio utilizado (líquido ou semissólido). As citocininas são utilizadas para este fim devido a sua capacidade de quebra de dormência de brotos e aumentar as taxas de multiplicação (Villa et al. 2015).

Madhulatha et al. (2004) observaram que o tratamento líquido de 222 µM de BAP e 232 µM cinetina durante 30 minutos foi o mais eficiente na indução de múltiplas brotações a partir de rebentos meristemáticos de banana (*Musa* spp. AAA) obtidos a partir de ápices caulinares decapitados mantidos *in vitro* por 30 dias. Stojičić & Budimir (2004) relataram que o tratamento contendo 222 µM de BAP e 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) por uma hora foi o mais eficiente em induzir a multiplicação de ápices caulinares de *Pinus heldreichii.* A utilização de pulses de citocina também já foi relatada para a indução de organogense indireta em folhas e cotilédones de berinjela (Mansur et al. 1998) e indução de embriogênese somática em calos de café (Papanastasiou et al. 2007).

Há relatos que a adição de auxina a estes meios não seja indicado, pois estas promoveriam a formação de calos e raízes indesejadas e reduziriam a multiplicação de brotos (Villa et al. 2015). Isto pode justificar os resultados obtidos

neste trabalho, onde foi observado o enraizamento ou formação de calo nos explantes (dependendo da presença ou não de carvão ativado, respectivamente) em detrimento à multiplicação de brotos esperada.

A utilização de carvão ativado no cultivo in vitro é bem conhecida devido aos efeitos que pode proporcionar: ambiente escuro que auxilia o enraizamento, adsorção dos reguladores de crescimento e outros componentes orgânicos do meio e substâncias presentes no carão ativado que podem favorecer o desenvolvimento dos explantes. As concentrações utilizadas variam de 0,2 a 3% do volume de meio de cultivo e os efeitos podem ser variados dependendo da espécie estudada. Diversos relatos de efeitos positivos da utilização do carvão ativado podem ser encontrados, especialmente na micropropagação de espécies frutíferas, mas também para o cultivo in vitro de embriões de pinhão-manso (Nunes et al. 2008; Villa et al. 2015).

Possivelmente os resultados obtidos tenham sido influenciados pela utilização de auxina e carvão ativado ao meio de pulse, sendo observado o enraizamento dos ápices e não a multiplicação esperada.

6 CONCLUSÃO

Nas condições desse estudo observou-se que a utilização de GA3 na germinação de sementes pode melhorar este processo, sendo a concentração de 0,94 µM a mais eficiente.

Nos ensaios de indução de calos e regeneração não foi observada diferença significativa entre os tratamentos testados, entretanto foi possível observar a importância da suplementação do meio basal em todas as etapas de cultivo (especialmente no enraizamento), bem como os efeitos negativos de uma maior intensidade luminosa no desenvolvimento dos explantes.

Para o alongamento de brotações adventícias o tratamento T1: 9,69 µM AIA + 2,22 µM BAP, apesar de não ter apresentado diferença significativa em relação ao tratamento T2, possibilitou um melhor desenvolvimento das mesmas.

Foi possível enraizar plantas regeneradas com o meio de cultivo utilizado, entretanto as mesmas não sobreviveram ao processo de aclimatação devido às condições estruturais e climáticas.

Quanto ao cultivo *in vitro* de ápices caulinares, foi possível observar que a utilização de 22,2 µM BAP + 2,07 µM AIB + 1 g.L-1 carvão ativado foi o tratamento mais eficiente para a obetenção de mudas a partir deste tipo de explante.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Através dos resultados obtidos no decorrer dos experimentos foi possível observar que os reguladores de crescimento utilizados são apenas uma das variáveis a serem consideradas no desenvolvimento de protocolos de cultura de tecidos de plantas. Muitas vezes o meio basal comumente utilizado pode não ser suficiente para suprir as necessidades nutricionais explantes *in vitro* e garantir o seu desenvolvimento adequado, necessitando de suplementações. Além disso, as condições ambientais de cultivo também representam um papel chave no sucesso das estratégias de propagação *in vitro*. Portanto, apesar de não ter sido possível estabelecer as concentrações de reguladores de crescimento mais adequadas ao processo de regeneração de pinhão manso, foi possível avançar no conhecimento das necessidades da espécie, o que permitirá o aprimoramento destas estratégias futuramente.

8 REFERÊNCIAS

Adil, S. et al., 2015. Jatropha curcas L .: A cruci fi ed plant waiting for resurgence. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, pp.855–862. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.082.

Albuquerque, F.A. de et al., 2008. Crescimento e Desenvolvimento do Pinhão Manso: 1º Ano Agrícola. *Embrapa Algodão*, Documentos(1), p.21. Available at: http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA-2009-09/22147/1/DOC197.pdf.

Arruda, F.P. et al., 2004. Cultivo de pinhão manso (Jatropha curca L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. *Revista Brasileira de Olericultura Fibrose*, 8(1), pp.789–799.

Attaya, A.S., Geelen, D. & Belal, A.E.F.H., 2012. Progress in Jatropha curcas tissue culture. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 6(1), pp.6–13.

Ávila, T.T. de, Ávila, D.T. de & Silva, S.D. dos A. e, 2009. Características Do Pinhão Manso (Jatropha Curcas L.) Na Região Do Planalto Central Do Estado Do Rio Grande Do Sul. *Cadernos de Agroecologia*, 4(1). Available at: http://www.aba-agroecologia.org.br/revistas/index.php/cad/article/view/5159 [Accessed March 30, 2016].

Behera, L.K. et al., 2014. In vitro mass multiplication of Jatropha (Jatropha curcas L .) through axillary bud culture.

Benge, M., 2006. Assessment of the potential of Jatropha curcas, (biodiesel tree,) for energy production and other uses in developing countries. *ECHO*, p.22. Available at: http://www.ascension-publishing.com/BIZ/jatropha.pdf.

Braun, H. et al., 2010. In vitro germination of beetroot seeds treated with Ga 3 and sucrose. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(3), pp.539–546.

Cai, L., Fu, L. & Ji, L., 2011. Regeneration of Jatropha curcas through efficient somatic embryogenesis and suspension culture. *GM Crops*, (June), pp.110–117.

Casarin, T. et al., 2012. Efeito de diferentes concentrações de citocinina na organogênese de cotilédones de pinhão manso. Available at: http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/951957 [Accessed March 28, 2016].

Chiangmai, P.N. et al., 2015. Regeneration of adventitious shoots from callus and leaf explants in Jatropha curcas L. “Phetchaburi”. *Silpakorn University Science and Technology Journal*, 9(1), pp.28–39. Available at: http://www.cabdirect.org/abstracts/20153076913.html [Accessed January 25, 2016].

Costa, M.D.J.C., 2009. *Pinhão-Manso (Jatropha Curcas L.): Aspectos Sócio-Econômicos E A Fisiologia De Sementes Econômicos E A Fisiologia De Sementes*. Universidade Federal de Sergipe.

Dagla, H.R., 2012. Plant tissue culture. *Resonance*, 17(8), pp.759–767. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s12045-012-0086-8 [Accessed January 21, 2016].

Datta, M.M. et al., 2007. In vitro clonal propagation of biodiesel plant (Jatropha curcas L.). *Current Science*, 93(10), pp.1438–1442. Available at:

http://www.cabdirect.org/abstracts/20073287827.html [Accessed January 25, 2016].

Divakara, B.N. et al., 2010. Biology and genetic improvement of Jatropha curcas L.: A review. *Applied Energy*, 87(3), pp.732–742. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030626190900302X.

Dode, L.B. et al., 2011. Cultivo in vitro de pinhão-manso. Available at: http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/920546 [Accessed March 23, 2016].

Evangelista, A.W.P. et al., 2011. Produtividade e rendimento de sementes de pinhão-manso submetido à irrigação e adubação com OMM-Tech. *Engenharia Agrícola*, 31(2), pp.315–323. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69162011000200011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt [Accessed January 15, 2016].

Franco, D.A. de S. & Gabriel, D., 2008. Aspectos Fitossanitários Na Cultura Do Pinhão Manso (Jatropha Curcas L .) Para Produção De Biodiesel. *Instituto Biológico*, (1), pp.63–64.

Franco, M.C., 2013. *Micropropagação e transformação genética de pinhão-manso (J. curcas L.)*. Instituto Agronômico.

Furlani, R.C.M., 2014. *Propagação do Pinhão Manso por estaquia , enxertia e sementes*. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira.

Hangarter, R.P. & Stasinopoulos, T.C., 1991. Repression of plant tissue culture growth by light is caused by photochemical change in the culture medium. *Plant Science*, 79(2), pp.253–257. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016894529190114N [Accessed February 24, 2016].

Hansen, G., 1999. Recent advances in the transformation of plants. *Trends in Plant Science*, 4(6), pp.226–231. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138599014120 [Accessed January 9, 2016].

Hassan, M.A.K.M.S. et al., 2014. In vitro shoot multiplication of the biodiesel plant Jatropha curcas L . through direct organogenesis. , 49(1), pp.41–46.

Hoppen, C., 2011. *Efeito de diferentes fontes de fitorreguladores na morfogênese de diferentes procedências e explantes de Jatropha curcas L. cultivados in vitro.* Universidade Federal do Paraná.

Jha, T. baran, Mukherjee, P. & Datta, M.M., 2007. Somatic embryogenesis in Jatropha curcas Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotechnology Reports*, 1(3), pp.135–140. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s11816-007-0027-2 [Accessed January 25, 2016].

Kalimuthu, K. et al., 2007. In vitro Propagation of the Biodiesel Plant Jatropha curcas L. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 17(2), pp.137–147. Available at: http://www.banglajol.info/index.php/PTCB/article/view/3234 [Accessed March 28, 2016].

Khemkladngoen, N. et al., 2011. Adventitious shoot regeneration from juvenile

cotyledons of a biodiesel producing Plant, Jatropha curcas L. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(1), pp.67–70. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172310002914.

Khurana-Kaul, V., Kachhwaha, S. & Kothari, S.L., 2010. Direct shoot regeneration from leaf explants of Jatropha curcas in response to thidiazuron and high copper contents in the medium. *Biologia Plantarum*, 54(2), pp.369–372. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s10535-010-0066-3 [Accessed January 25, 2016].

Koonin, S.E., 2006. Getting serious about biofuels. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5760), p.435. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16439624 [Accessed February 24, 2016].

Kumar, A. & Sharma, S., 2008. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (Jatropha curcas L.): A review. *Industrial Crops and Products*, 28(1), pp.1–10. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669008000046.

Kumar, N. et al., 2015. Biotechnological approaches for the genetic improvement of Jatropha curcas L.: A biodiesel plant. *Industrial Crops and Products*, 76, pp.817–828. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669015302521.

Kumar, N., Anand, K.G.V., et al., 2010. Stable genetic transformation of Jatropha curcas via Agrobacterium tumefaciens -mediated gene transfer using leaf explants. , 32, pp.41–47.

Kumar, N., Anand, K.G.V. & Reddy, M.P., 2011. Plant regeneration of non-toxic Jatropha curcas — impacts of plant growth regulators , source and type of explants. , 20(June), pp.125–133.

Kumar, N. & Reddy, M.P., 2010. Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of Jatropha curcas : a biofuel plant.

Kumar, N. & Reddy, M.P., 2012. Thidiazuron (TDZ) induced plant regeneration from cotyledonary petiole explants of elite genotypes of Jatropha curcas: A candidate biodiesel plant. *Industrial Crops and Products*, 39(1), pp.62–68. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.011.

Kumar, N., Vijay Anand, K.G. & Reddy, M.P., 2010. Shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of jatropha curcas: A biodiesel plant. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(5), pp.917–924.

Laviola, B.G., 2010. Diretrizes para o melhoramento de pinhão-manso visando a produção de biocombustíveis. Available at: http://www.infobibos.com/Artigos/2010_1/DiretizesPinhaoManso/index.htm [Accessed January 14, 2016].

Lercari, B. et al., 1999. Photomorphogenic control of shoot regeneration from etiolated and light-grown hypocotyls of tomato. *Plant Science*, 140(1), pp.53–62. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016894529800209X [Accessed February 24, 2016].

Li, M., Li, Æ.H. & Jiang, Æ.H., 2008. Establishment of an Agrobacteriuim -mediated cotyledon disc transformation method for Jatropha curcas. , pp.173–181.

Lin, J. et al., 2010. Purification and characterization of curcin, a toxic lectin from the seed of Jatropha curcas. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 40(2), pp.107–18. Available at: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826060903558588?journalCode=lpbb20 [Accessed January 21, 2016].

Liu, H. et al., 2011. Plant Science The differential proteome of endosperm and embryo from mature seed of Jatropha curcas. *Plant Science*, 181(6), pp.660–666. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.03.012.

Ly, M.O. et al., 2014. Effect of NaCl concentrations on germination of Jatropha curcas L . Seeds in vitro condition. *Academia Journal of Agricultural Research*, 2(March), pp.100–105. Available at: https://www.academiapublishing.org/journals/ajar/pdf/2014/Mar/Ousseynou et al.pdf.

Machado, A.D.A. & Conceição, A.R., 2003. Sistema de análise estatística para Windows. *WinStat. versão*, 2.

Madhulatha, P. et al., 2004. Influence of Liquid Pulse Treatment with Growth Regulators on in vitro Propagation of Banana (Musa spp. AAA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76(2), pp.189–192. Available at: http://link.springer.com/10.1023/B:TICU.0000007291.31439.6c [Accessed February 12, 2016].

Mahalakshmi, R., Eganathan, P. & Parida, A., 2015. In vitro regeneration from different ages of petioles of physic nut (Jatropha curcas L.). *African Journal of Biotechnology*, 13(2). Available at: http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/117116 [Accessed January 25, 2016].

Maharana, S.B. et al., 2012. In vitro regeneration from node and leaf explants of Jatropha curcas L. and evaluation of genetic fidelity through RAPD markers. *Indian Journal of Biotechnology*, 11(3), pp.280–287. Available at: http://www.cabdirect.org/abstracts/20123374192.html [Accessed January 25, 2016].

Mansur, E. et al., 1998. Efficient shoot organogenesis of eggplant (Solanum melongena L.) induced by thidiazuron. *Plant Cell Reports*, 17(8), pp.661–663. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s002990050461 [Accessed February 12, 2016].

Marques, C. de C. et al., 2015. Biologia e tabela de vida do ácaro predador Euseius concordis (CHANT, 1959) (Acari: Phytoseiidae) em pinhão-manso. *Revista Caatinga*, 28(2), pp.249–255. Available at: http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/sistema/article/view/3852 [Accessed January 21, 2016].

Mazumdar, P. et al., 2010. 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*, 76(2), pp.337–344. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629910000037.

Minhas, D., Rajam, M. V & Grover, A., 1999. Maintenance of callus growth during subculturing is a genotype-dependent response in rice: mature seed-derived

callus from IR 54 rice cultivar lacks culturability. *Current Science*, 77(11), pp.1410–1413.

Morais, T.P. et al., 2012. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 14(1), pp.110–121.

Moreira, E.R., 2013. *Métodos de propagação do pinhão manso (Jatropha curcas L .)*. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira.

Mukherjee, P. et al., 2011. Jatropha curcas: a review on biotechnological status and challenges. *Plant Biotechnology Reports*, 5(3), pp.197–215. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s11816-011-0175-2 [Accessed January 26, 2016].

Murashige, T., 1974. Plant Propagation Through Tissue Cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 25(1), pp.135–166. Available at: http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pp.25.060174.001031?journalCode=arplant.1 [Accessed October 16, 2015].

Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp.473–497. Available at: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x [Accessed November 15, 2014].

Nascimento, M.S. do, 2013. Organogênese a partir de segmentos cotiledonares e calogênese de anteras de pinhão-manso (Jatropha curcas L.).

Ndimba, B.K. et al., 2013. Biofuels as a sustainable energy source: an update of the applications of proteomics in bioenergy crops and algae. *Journal of proteomics*, 93, pp.234–44. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391913003321 [Accessed March 15, 2016].

Neto, S.P. da S. & Andrade, S.R.M. de, 2011. Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações. In F. G. Faleiro & S. R. M. de Andrade, eds. *Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, pp. 409–434.

Nindita, A. et al., 2014. Somatic Embryogenesis Media Optimization Study of Physic Nut (Jatropha curcas) as Biodiesel Feedstock. *Energy Procedia*, 47, pp.21–28. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876610214002082.

Noor Camellia, N.A. et al., 2009. Improvement on rooting quality of Jatropha curcas using indole butyric acid (IBA). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5(4), pp.338–343.

Nunes, C.F., 2007. *Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão manso (Jatropha curcas L.)*. Universidade Federal de Lavras.

Nunes, C.F. et al., 2008. Diferentes suplementos no cultivo in vitro de embriões de pinhão-manso. , (1), pp.9–14.

Oliveira, L.S. de, Dias, P.C. & Brondani, G.E., 2013. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 33(76), pp.439–453. Available at: http://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/481

[Accessed March 28, 2016].

Oliveira, M.M. de, 2013. *Caracterização Agronômica Em Banco De Germoplasma De Pinhão Manso No Recôncavo Baiano*. Universidade Federal Do Recôncavo Da Bahia.

Papanastasiou, I. et al., 2007. Effect of liquid pulses with 6-benzyladenine on the induction of somatic embryogenesis from coffee (Coffea arabica L.) callus cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92(2), pp.215–225. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s11240-007-9326-0 [Accessed February 12, 2016].

Peres, L.E.P., 2002. Bases Fisiológicas e Genéticas da regeneração de plantas in vitro. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 25(março/abril 2002), pp.44–48.

Pessoa, A.M. dos S., 2011. *Fenologia e Caracterização Morfológica Floral , Molecular e Agronômica De Acessos De Pinhão-Manso (Jatropha curcas L .)*. Universidade Federal De Sergipe.

Pinhal, H.F. et al., 2011. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. *Ciência Rural*, 41(7), pp.1136–1142.

Purkayastha, J. et al., 2010. Efficient in vitro plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in Jatropha curcas. *Biologia Plantarum*, 54(1), pp.13–20.

Rathore, M.S. et al., 2015. Micropropagation of elite genotype of Jatropha curcas L. through enhanced axillary bud proliferation and ex vitro rooting. *Biomass and Bioenergy*, 83, pp.501–510. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953415301343 [Accessed January 25, 2016].

Santos, D.N. dos, 2012. Caracterização genética de pinhão-manso (Jatropha curcas L.) por meio de citometria de fluxo e marcadores moleculares.

Sato, M. et al., 2009. A cultura do pinhão-manso (Jatropha curcas L.): uso para fins combustiveis e descrição agronómica. *Revista Varia Scientia*, 07, pp.47–62.

Saturnino, H.M. et al., 2005. Cultivation of Jatropha curcas L. *Informe Agropecuario*, 26(229), pp.44–78. Available at: http://www.cabdirect.org/abstracts/20063029563.html [Accessed February 24, 2016].

Singh, A. et al., 2010. A simple regeneration protocol from stem explants of Jatropha curcas-A biodiesel plant. *Industrial Crops and Products*, 31, pp.209–213.

Singh, A., Jani, K. & Sagervanshi, A., 2014. High-Frequency Regeneration by Abscisic Acid (ABA) from Petiole Callus of Jatropha curcas.

Singh, G. & Shetty, S., 2012. Evaluation of in vitro rooting efficiency in the biodiesel plant , Jatropha curcas. , 2(1), pp.591–596.

Stojičić, D. & Budimir, S., 2004. Cytokinin-Mediated Axillary Shoot Formation in Pinus heldreichii. *Biologia Plantarum*, 48(3), pp.477–479. Available at: http://link.springer.com/10.1023/B:BIOP.0000041109.27037.21 [Accessed February 12, 2016].

Sujatha, M., Makkar, H.P.S. & Becker, K., 2005. Shoot Bud Proliferation from Axillary Nodes and Leaf Sections of Non-toxic Jatropha curcas L. *Plant Growth*

Regulation, 47(1), pp.83–90. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s10725-005-0859-0 [Accessed January 9, 2016].

Sujatha, M. & Mukta, N., 1996. Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of Jatropha. , pp.135–141.

Syros, T. et al., 2004. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of Ebenus cretica L. *Journal of plant physiology*, 161(1), pp.69–77. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15002666 [Accessed February 17, 2016].

Tee Chong Siang, 2012. Plant regeneration studies of Jatropha curcas using induced embryogenic callus from cotyledon explants. *African Journal of Biotechnology*, 11(31), pp.8022–8031.

Toppo, D.D. et al., 2012. Improved in vitro rooting and acclimatization of Jatropha curcas plantlets. *Biomass and Bioenergy*, 44, pp.42–46. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953412001857 [Accessed February 14, 2016].

Trivedi, S. et al., 2009. Establishment of Agrobacterium-mediated genetic transformation in Jatropha curcas L. *International Journal of Agriculture Sciences*, 1(2), pp.11–20.

Varshney, A. & Johnson, T.S., 2010. Efficient plant regeneration from immature embryo cultures of Jatropha curcas, a biodiesel plant. *Plant Biotechnology Reports*, 4(2), pp.139–148. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s11816-010-0129-0 [Accessed January 25, 2016].

Vasconcelos, G.C.L. et al., 2010. Caracterização botânica de acessos de pinhão manso do banco de germoplasma da embrapa algodão. *IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas*, pp.2165–2169.

Vedovato, N.P.F. et al., 2010. Germinação in vitro de sementes de pinhão manso na presença de ácido giberélico (GA3). *Ciência & Tecnologia*, 1(supl.).

Villa, F. et al., 2015. Influência do carvão ativado e BAP na multiplicação in vitro de duas frutíferas de clima temperado. *Ceres*, 54(312).

White, P.R., 1942. Plant Tissue Cultures. *Annual Review of Biochemistry*, 11(1), pp.615–628. Available at: http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.bi.11.070142.003151 [Accessed January 21, 2016].