

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA HOPPEN

**EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE FITORREGULADORES NA
MORFOGÊNESE DE DIFERENTES PROCEDÊNCIAS E EXPLANTES DE
Jatropha curcas L. CULTIVADOS *in vitro*.**

CURITIBA
2011

CAROLINA HOPPEN

**EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE FITORREGULADORES NA
MORFOGÊNESE DE DIFERENTES PROCEDÊNCIAS E EXPLANTES DE
Jatropha curcas L. CULTIVADOS *in vitro*.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Grossi

CURITIBA
2011

PARECER

Defesa nº. 885

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, após arguir o(a) mestrando(a) *Carolina Hoppen* em relação ao seu trabalho de dissertação intitulado "**EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE FITORREGULADORES NA MORFOGÊNESE DE DIFERENTES PROCEDÊNCIAS E EXPLANTES DE *Jatropha curcas* CULTIVADOS *in vitro***", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de *Mestre* em Engenharia Florestal, área de concentração em SILVICULTURA.



Dr. Edson Perez Guerra

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Primeiro examinador



Dr. Antonio Carlos Nogueira

Universidade Federal do Paraná
Segundo examinador



Dr. Fernando Grossi

Universidade Federal do Paraná
Orientador e presidente da banca examinadora

Curitiba, 02 de setembro de 2011.



Antonio Carlos Batista

Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal

Carlos Roberto Sanquetta

Vice-coordenador do curso

A Deus, aos meus pais, Milton e Vera Hoppen e ao meu esposo, Ronan Tonial.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos recebidas e pela vida a mim dada.

À minha família, por estar sempre ao meu lado.

Ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de cursar o mestrado.

Ao Prof. Dr. Fernando Grossi, pela orientação e dedicação a mim dispensadas.

À acadêmica do Curso de Engenharia Florestal Francielen Paola de Sá pela preciosa ajuda e pelas horas dedicadas ao trabalho.

A todos os meus amigos pelos bons momentos de alegria e descontração.

“Amarás o Senhor teu Deus de todo o teu coração, de toda a tua alma e de todo o teu entendimento”.

(Mateus 22:37)

RESUMO

Jatropha curcas é uma espécie florestal pertencente à família *Euphorbiaceae* e conhecida popularmente como pinhão manso. Apesar de possuir elevado potencial para produção de biodiesel, ainda existem poucas informações e estudos a respeito da espécie, inclusive quanto ao seu potencial de propagação vegetativa. Para tanto, os objetivos deste trabalho foram o estabelecimento *in vitro* sob condições assépticas de diferentes explantes (epicótilos, hipocótilos, raízes e cotilédones) de *Jatropha curcas* em meio de cultura para a multiplicação a partir de sementes de cinco procedências germinadas *in vitro*. No primeiro experimento as sementes foram germinadas em meio de cultura Murashige e Skoog (MS) com a metade da concentração de nutrientes e sem adição de sacarose, onde foram avaliadas a desinfestação e a germinação das sementes de cada procedência. Este experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Após germinarem, as partes de cada plântula foram transferidas para meio de cultura Murashige e Skoog (MS) com diferentes fontes e concentrações de fitorreguladores (benzilaminopurina, cinetina, thidiazuron, sulfato de adenina e ácido indol butírico), combinados entre si, sendo este o segundo experimento, onde foram avaliados contaminação e oxidação dos explantes, além de parâmetros qualitativos e quantitativos, como indução de gemas e calos, coloração de gemas e calos, textura de calos, número e tamanho de gemas e peso de matéria fresca e seca. Este experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial. No primeiro experimento, a desinfestação foi eficiente em apenas duas das cinco procedências estudadas, sendo que a contaminação deu-se principalmente por fungos e também por bactérias, com porcentagem de contaminação das procedências variando de 0 a 85%; a germinação aconteceu em duas das cinco procedências, sendo que as porcentagens de germinação variaram de 0 a 99,17%. No segundo experimento, pôde-se verificar tanto contaminação quanto oxidação dos explantes aos sete dias de cultivo, havendo diferença significativa entre procedências, combinações de fitorreguladores e fontes de explante para ambas as avaliações. A porcentagem de explantes que induziram tanto gemas quanto calos variou significativamente para procedências, combinações de fitorreguladores e fontes de explantes. A coloração de gemas variou entre verde e amarela, a de calos entre creme, verde e marrom, e a textura de calos variou entre compacta e friável, todos diferindo estatisticamente para procedências, combinações de fitorreguladores e fontes de explante. Quanto às análises quantitativas, o número de gemas apresentou os melhores resultados, de maneira geral, para a procedência Santa Vitória – MG, para a combinação de fitorreguladores composta de meio MS com adição de 27,8 μM de BAP e 0,5 μM de AIB e para explantes cotiledonares, com média de formação de brotos por explante de 5,02, 10,92 e 7, respectivamente. Quanto ao tamanho dos brotos, houve variação entre brotos pequenos (menores que 0,1 centímetro), médios (entre 0,1 e 1 cm) e grandes (maiores que 1 cm), sendo que a maioria dos brotos apresentou tamanho grande. Para as variáveis peso de massa fresca e seca, houve diferença estatística para procedências, combinações de fitorreguladores e fontes de explante, sendo os maiores resultados, de maneira geral, apresentados pela procedência Janaúba – MG, pela combinação de fitorreguladores composta de meio MS adicionado de 27,8 μM de BAP e 0,5 μM de AIB e pelo explantes do tipo hipocótilo.

Palavras-chave: *Jatropha curcas*; micropropagação; cultura de tecidos.

ABSTRACT

Jatropha curcas is a forest specie that belongs to Euphorbiaceae family and is popularly known as physic nut. Despite having high potential for biodiesel production, there is little information and studies about the type, including the potential for vegetative propagation. To this end, the aim of the study were the establishment *in vitro* under aseptic conditions of different explants (epicotyls, hypocotyls, rootlets and cotyledons) of *Jatropha curcas* in culture medium for multiplication from seeds of five provenances germinated *in vitro*. At the first experiment, the seeds were germinated in culture medium Murashige and Skoog (MS) with half strength of nutrients and without addition of sucrose, which were evaluated disinfection and germination of seeds from each origin. This experiment was conducted in completely randomized design. After germination, the parts of each seedling were transferred to complete culture medium Murashige and Skoog (MS) with different sources and concentrations of growth regulators (benzylaminopurine, kinetin, thidiazuron, adenine sulfate and indol butiric acid), interconnected, being this the second experiment, where were evaluated contamination and oxidation of explants as well as qualitative and quantitative parameters, such as bud and callus induction, color of buds and callus, callus texture, size and number of buds and fresh and dry weight. This experiment was conducted in completely randomized design with factorial arrangement. In the first experiment, the disinfection was effective in only two of the five origins that were studied, and the contamination was mainly by fungi and bacteria also, with a percentage of the origins of contamination ranging from 0 to 85%; germination happens in two of five origins, and the percentages of germination ranged from 0 to 99,17%. In the second experiment, could be verified that both oxidation and contamination of the explants happened in the seventh day of cultivation, with statistical difference between the origins, combinations of growth regulators and explant sources for both evaluations. The percentage of explants that induced buds and callus varied significantly for origins, combinations of growth regulators and sources of explants. The color of buds ranged from green to yellow, the color of callus ranged from cream, green and brown, and the texture of callus ranged from compact and friable, all statistically different for origins, combinations of growth regulators and sources of explant. As to quantitative analysis, the number of buds that showed the best results, in general, happened for the origin Santa Vitoria – MG, to the combination of growth regulators composed by MS medium with addition of 27.8 μM of BAP and 0.5 μM of IBA, and for cotyledonary explants, with an average of formation of shoots per explant of 5.02, 10.92 and 7, respectively. As for the size of the shoots, this ranged from small seedlings (less than 0.1 cm), medium (between 0.1 and 1 cm) and large (greater than 1 cm), in which the majority of the shoots had small size. For the variables fresh weight and dry weight, there was statistical difference for origins, combinations of growth regulators and sources of explant, being the results, in general, presented for the origin Janaúba – MG, for the combination of growth regulators compound by MS medium supplemented with 27.8 μM of BAP and 0.5 μM of IBA, and for hypocotyls explants type.

Keywords: *Jatropha curcas*; micropropagation; tissue culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1.	ASPECTO DAS SEMENTES DE <i>Jatropha curcas</i>	21
FIGURA 2.	DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Jatropha curcas</i> PARA INOCULAÇÃO <i>in vitro</i> . a. Sementes em solução de hipoclorito de sódio 2% após tríplice lavagem. Sementes após agitação por 30 minutos em agitador digital. c. Sementes após tríplice lavagem com água destilada e imersão em álcool 70% por um minuto.	22
FIGURA 3.	SEMENTES DE <i>Jatropha curcas</i> APÓS IMERSÃO EM ÁLCOOL 100% E FLAMBAGEM.	22
FIGURA 4.	SEMENTES DE <i>Jatropha curcas</i> APÓS COMPLETA ASSEPSIA E RETIRADA DO TEGUMENTO.	24
FIGURA 5.	SEMENTES DE <i>Jatropha curcas</i> APÓS INOCULAÇÃO EM MEIO DE CULTURA, JÁ EM SALA DE CRESCIMENTO.	24
FIGURA 6.	ASPECTO DA PLÂNTULA DE <i>Jatropha curcas</i> APÓS SETE DIAS DE INOCULAÇÃO DAS SEMENTES <i>in vitro</i>	25
FIGURA 7.	ASPECTO DE ALGUMAS SEMENTES DE <i>Jatropha curcas</i> DA PROCEDÊNCIA NATAL.	32
FIGURA 8.	ASPECTO GERAL DA OXIDAÇÃO DOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> DA PROCEDÊNCIA JANAÚBA – MG APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Epicótilo; b. Hipocótilo; c. Raiz; d. Cotilédone.	45
FIGURA 9.	ASPECTO GERAL DA OXIDAÇÃO DOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> DA PROCEDÊNCIA SANTA VITÓRIA – MG APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Epicótilo; b. Hipocótilo; c. Raiz; d. Cotilédone.	46
FIGURA 10.	ASPECTO DA COLORAÇÃO DAS GEMAS DESENVOLVIDAS NOS EPICÓTILOS DA PROCEDÊNCIA JANAÚBA – MG. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.	54
FIGURA 11.	ASPECTO DA COLORAÇÃO DAS GEMAS DESENVOLVIDAS NOS HIPOCÓTILOS DA PROCEDÊNCIA JANAÚBA – MG. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.	55
FIGURA 12.	ASPECTO DA COLORAÇÃO DAS GEMAS DESENVOLVIDAS NAS RAÍZES DA PROCEDÊNCIA JANAÚBA – MG. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.	55
FIGURA 13.	ASPECTO DA COLORAÇÃO DAS GEMAS DESENVOLVIDAS NOS COTILÉDONES DA PROCEDÊNCIA JANAÚBA – MG. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e.	

	Combinação C5.....	56
FIGURA 14.	ASPECTO DA COLORAÇÃO DAS GEMAS DESENVOLVIDAS NOS EPICÓTILOS DA PROCEDÊNCIA SANTA VITÓRIA – MG. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.	57
FIGURA 15.	ASPECTO DA COLORAÇÃO DAS GEMAS DESENVOLVIDAS NOS HIPOCÓTILOS DA PROCEDÊNCIA SANTA VITÓRIA – MG. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.	57
FIGURA 16.	ASPECTO DA COLORAÇÃO DAS GEMAS DESENVOLVIDAS NAS RAÍZES DA PROCEDÊNCIA SANTA VITÓRIA – MG. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.....	58
FIGURA 17.	ASPECTO DA COLORAÇÃO DAS GEMAS DESENVOLVIDAS NOS COTILÉDONES DA PROCEDÊNCIA SANTA VITÓRIA – MG. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.	58
FIGURA 18.	ASPECTO DOS CALOS FORMADOS NOS EPICÓTILOS DA PROCEDÊNCIA JANAÚBA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.	69
FIGURA 19.	ASPECTO DOS CALOS FORMADOS NOS EPICÓTILOS DA PROCEDÊNCIA SANTA VITÓRIA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.	70
FIGURA 20.	ASPECTO DOS CALOS FORMADOS NOS HIPOCÓTILOS DA PROCEDÊNCIA JANAÚBA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.	71
FIGURA 21.	ASPECTO DOS CALOS FORMADOS NOS HIPOCÓTILOS DA PROCEDÊNCIA SANTA VITÓRIA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.	72
FIGURA 22.	ASPECTO DOS CALOS FORMADOS NAS RAÍZES DA PROCEDÊNCIA JANAÚBA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.	73
FIGURA 23.	ASPECTO DOS CALOS FORMADOS NAS RAÍZES DA PROCEDÊNCIA SANTA VITÓRIA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.	73
FIGURA 24.	ASPECTO DOS CALOS FORMADOS NOS COTILÉDONES DA PROCEDÊNCIA JANAÚBA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a.	

Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5. 75

FIGURA 25. ASPECTO DOS CALOS FORMADOS NOS COTILÉDONES DA PROCEDÊNCIA SANTA VITÓRIA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5. 75

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 –	PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO <i>in vitro</i> DAS SEMENTES DAS DIFERENTES PROCEDÊNCIAS DE <i>Jatropha curcas</i>	31
GRÁFICO 2 –	PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO <i>in vitro</i> DAS SEMENTES DE <i>Jatropha curcas</i> DAS PROCEDÊNCIAS JANAÚBA E SANTA VITÓRIA.	34
GRÁFICO 3 –	PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO <i>in vitro</i> DOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> EM FUNÇÃO DAS PROCEDÊNCIAS.....	36
GRÁFICO 4 –	PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO <i>in vitro</i> DOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> EM FUNÇÃO DAS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.....	37
GRÁFICO 5 –	PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO <i>in vitro</i> DOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> EM FUNÇÃO DAS FONTES DE EXPLANTE.	38
GRÁFICO 6 –	PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO <i>in vitro</i> DOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> EM FUNÇÃO DAS PROCEDÊNCIAS.....	42
GRÁFICO 7 –	PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO <i>in vitro</i> DOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> EM FUNÇÃO DAS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.....	43
GRÁFICO 8 –	PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO <i>in vitro</i> DOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> EM FUNÇÃO DAS FONTES DE EXPLANTE.	44
GRÁFICO 9 –	PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE GEMAS <i>in vitro</i> DOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> EM FUNÇÃO DAS PROCEDÊNCIAS.....	49
GRÁFICO 10 –	PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE GEMAS <i>in vitro</i> DOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> EM FUNÇÃO DAS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.	50
GRÁFICO 11 –	PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE GEMAS <i>in vitro</i> DOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> EM FUNÇÃO DAS FONTES DE EXPLANTE.....	51
GRÁFICO 12 –	PORCENTAGEM DE COLORAÇÃO DE GEMAS <i>in vitro</i> DOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i>	60
GRÁFICO 13 –	PORCENTAGEM DE EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> COM INDUÇÃO DE CALOS <i>in vitro</i> EM FUNÇÃO DAS PROCEDÊNCIAS. ...	63
GRÁFICO 14 –	PORCENTAGEM DE EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> COM INDUÇÃO DE CALOS <i>in vitro</i> EM FUNÇÃO DAS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.....	63

GRÁFICO 15 –	PORCENTAGEM DE EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> COM INDUÇÃO DE CALOS <i>in vitro</i> EM FUNÇÃO DAS FONTES DE EXPLANTE.....	65
GRÁFICO 16 –	PORCENTAGEM DE TEXTURA DE CALOS FORMADOS <i>in vitro</i> PELOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i>	77
GRÁFICO 17 –	PORCENTAGEM DE COLORAÇÃO DE CALOS <i>in vitro</i> APRESENTADA PELOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i>	80
GRÁFICO 18 –	NÚMERO MÉDIO DE BROTOS FORMADOS <i>in vitro</i> PELOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> EM FUNÇÃO DAS PROCEDÊNCIAS.....	84
GRÁFICO 19 –	NÚMERO MÉDIO DE BROTOS FORMADOS <i>in vitro</i> PELOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> EM FUNÇÃO DAS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.	84
GRÁFICO 20 –	NÚMERO MÉDIO DE BROTOS FORMADOS <i>in vitro</i> PELOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> EM FUNÇÃO DAS FONTES DE EXPLANTE.....	87
GRÁFICO 21 –	PESO DE MASSA FRESCA DOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> EM FUNÇÃO DAS PROCEDÊNCIAS.....	95
GRÁFICO 22 –	PESO DE MASSA SECA DOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> EM FUNÇÃO DAS PROCEDÊNCIAS.....	95
GRÁFICO 23 –	PESO DE MASSA FRESCA DOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> EM FUNÇÃO DAS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.....	96
GRÁFICO 24 –	PESO DE MASSA SECA DOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> EM FUNÇÃO DAS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.	96
GRÁFICO 25 –	PESO DE MASSA FRESCA DOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> EM FUNÇÃO DAS FONTES DE EXPLANTE.	97
GRÁFICO 26 –	PESO DE MASSA SECA DOS EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> EM FUNÇÃO DAS FONTES DE EXPLANTE.....	97

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CONCENTRAÇÃO DE FITORREGULADORES (μM) PARA CADA UMA DAS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.....	26
TABELA 2 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO DAS DIFERENTES PROCEDÊNCIAS DE <i>Jatropha curcas</i> GERMINADAS <i>in vitro</i>	30
TABELA 3 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO <i>in vitro</i> DAS SEMENTES DE <i>Jatropha curcas</i> DAS PROCEDÊNCIAS JANAÚBA E SANTA VITÓRIA.	33
TABELA 4 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EFEITOS DAS PROCEDÊNCIAS, COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i> NA PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO <i>in vitro</i>	36
TABELA 5 -	MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS DE <i>Jatropha curcas</i> E AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.....	39
TABELA 6 -	MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i>	39
TABELA 7 -	MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E AS FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i>	40
TABELA 8 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EFEITOS DAS PROCEDÊNCIAS, COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i> NA PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO <i>in vitro</i>	41
TABELA 9 -	MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS DE <i>Jatropha curcas</i> E AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.....	46
TABELA 10 -	MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i>	47
TABELA 11 -	MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E AS FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i>	47
TABELA 12 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EFEITOS DAS PROCEDÊNCIAS, COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i> NA PORCENTAGEM DE INDUÇÃO	

	DE GEMAS <i>in vitro</i>	49
TABELA 13 -	MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE GEMAS <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS DE <i>Jatropha curcas</i> E AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.....	52
TABELA 14 -	MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE GEMAS <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i>	52
TABELA 15 -	MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE GEMAS <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E AS FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i>	53
TABELA 16 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EFEITOS DAS PROCEDÊNCIAS, COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E FONTES DE EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> NA COLORAÇÃO DE GEMAS <i>in vitro</i>	59
TABELA 17 -	MÉDIAS DA PORCENTAGEM DAS DIFERENTES COLORAÇÕES DAS GEMAS DE <i>Jatropha curcas</i> DESENVOLVIDAS <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO DAS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E COLORAÇÕES DE GEMAS.	60
TABELA 18 -	MÉDIAS DA PORCENTAGEM DAS DIFERENTES COLORAÇÕES DAS GEMAS DE <i>Jatropha curcas</i> DESENVOLVIDAS <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS FONTES DE EXPLANTE E COLORAÇÕES DE GEMAS	61
TABELA 19 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EFEITOS DAS PROCEDÊNCIAS, COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E FONTES DE EXPLANTES DE <i>Jatropha curcas</i> NA PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE CALOS <i>in vitro</i>	62
TABELA 20 -	MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE CALOS <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS DE <i>Jatropha curcas</i> E AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.	66
TABELA 21 -	MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE CALOS <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i>	67
TABELA 22 -	MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE CALOS <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E AS FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i>	67
TABELA 23 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EFEITOS DAS PROCEDÊNCIAS, COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i> NA TEXTURA DE CALOS <i>in vitro</i>	76

TABELA 24 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE TEXTURA DE CALOS <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS TEXTURAS DE CALOS DE <i>Jatropha curcas</i>	77
TABELA 25 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE TEXTURA DE CALOS <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E AS TEXTURAS DE CALOS DE <i>Jatropha curcas</i>	78
TABELA 26 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE TEXTURA DE CALOS <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS FONTES DE EXPLANTE E AS TEXTURAS DE CALOS DE <i>Jatropha curcas</i>	79
TABELA 27 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE COLORAÇÃO DE CALOS <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS COLORAÇÕES DE CALOS DE <i>Jatropha curcas</i>	81
TABELA 28 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE COLORAÇÃO DE CALOS <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E AS COLORAÇÕES DE CALOS DE <i>Jatropha curcas</i>	81
TABELA 29 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE COLORAÇÃO DE CALOS <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS FONTES DE EXPLANTE E AS COLORAÇÕES DE CALOS DE <i>Jatropha curcas</i>	82
TABELA 30 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EFEITOS DAS PROCEDÊNCIAS, COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i> NO NÚMERO MÉDIO DE BROTOS FORMADOS POR EXPLANTE <i>in vitro</i>	83
TABELA 31 - NÚMERO MÉDIO DE BROTOS FORMADOS <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS DE <i>Jatropha curcas</i> E AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.....	89
TABELA 32 - NÚMERO MÉDIO DE BROTOS FORMADOS <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i>	89
TABELA 33 - NÚMERO MÉDIO DE BROTOS FORMADOS <i>in vitro</i> PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E AS FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i>	90
TABELA 34 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EFEITOS DAS PROCEDÊNCIAS, COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i> NO TAMANHO DE GEMAS FORMADAS <i>in vitro</i>	91
TABELA 35 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE BROTOS <i>in vitro</i> COM TAMANHOS PEQUENO, MÉDIO E GRANDE PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E OS TAMANHOS DE BROTOS DE <i>Jatropha curcas</i> ..	91

TABELA 36 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE BROTOS <i>in vitro</i> COM TAMANHOS PEQUENO, MÉDIO E GRANDE PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E OS TAMANHOS DE BROTOS DE <i>Jatropha curcas</i>	92
TABELA 37 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE BROTOS <i>in vitro</i> COM TAMANHOS PEQUENO, MÉDIO E GRANDE PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS FONTES DE EXPLANTE E OS TAMANHOS DE BROTOS DE <i>Jatropha curcas</i>	93
TABELA 38 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EFEITOS DAS PROCEDÊNCIAS, COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i> NO PESO DE MASSA FRESCA E PESO DE MASSA SECA DOS EXPLANTES.....	94
TABELA 39 - MÉDIAS DO PESO DE MASSA FRESCA PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS DE <i>Jatropha curcas</i> E AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.....	98
TABELA 40 - MÉDIAS DO PESO DE MASSA SECA PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS DE <i>Jatropha curcas</i> E AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.....	99
TABELA 41 - MÉDIAS DO PESO DE MASSA FRESCA PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i>	99
TABELA 42 - MÉDIAS DO PESO DE MASSA SECA PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i>	99
TABELA 43 - MÉDIAS DO PESO DE MASSA FRESCA PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E AS FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i>	100
TABELA 44 - MÉDIAS DO PESO DE MASSA SECA PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E AS FONTES DE EXPLANTE DE <i>Jatropha curcas</i>	100

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA - Ácido indolacético

AIB - Ácido indol-3-butírico

ANA - Ácido α -naftalenoacético

B5 – Meio de cultura de Gamborg

BA – Benziladenina

BAP – 6-benzilaminopurina

HCl – Ácido clorídrico

KIN – Cinetina

MS – Meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962)

NaClO – Hipoclorito de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

S. A. – Sulfato de adenina

spp. – Espécies

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
2.1 OBJETIVO GERAL	2
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1 <i>Jatropha curcas</i> L.	3
3.1.1 Botânica	3
3.1.2 Ecologia	4
3.1.3 Usos	5
3.1.4 Cultivo	7
3.1.5 Pragas e Doenças	9
3.1.6 Propagação Sexuada e Assexuada	10
3.1.6.1 Propagação por Sementes	11
3.1.6.2 Estaquia	12
3.1.6.3 Enxertia	13
3.1.6.4 Cultura de Tecidos <i>in vitro</i>	13
3.2 MICROPROPAÇÃO DE PLANTAS	15
3.2.1 Planta Matriz	16
3.2.2 Desinfestação do Material Vegetal	16
3.2.3 Isolamento do Material Vegetal	17
3.2.4 Meio de Cultura	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DO EXPERIMENTO	20
4.2 SELEÇÃO DE MATERIAL VEGETAL	20
4.3 EXPERIMENTO 1 – INFLUÊNCIA DA PROCEDÊNCIA DA SEMENTE DE <i>Jatropha curcas</i> NA RESPOSTA À DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO <i>in vitro</i>	21
4.3.1 Desinfestação das Sementes	21
4.3.2 Inoculação das Sementes	23
4.3.3 Delineamento Experimental e Análise Estatística	25
4.4 EXPERIMENTO 2 – INDUÇÃO DE GEMAS E CALOS	26

4.4.1 Delineamento Experimental e Análise Estatística	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 EXPERIMENTO 1 – DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO <i>in vitro</i> DE SEMENTES DE <i>Jatropha curcas</i>	29
5.2 EXPERIMENTO 2 – INDUÇÃO DE GEMAS E CALOS	35
5.2.1 CONTAMINAÇÃO DOS EXPLANTES	35
5.2.2 OXIDAÇÃO DOS EXPLANTES.....	41
5.2.3 ANÁLISES QUALITATIVAS	48
5.2.3.1 Indução de Gemas	48
5.2.3.2 Coloração das Gemas.....	54
5.2.3.3 Indução de Calos	62
5.2.3.4 Textura e Coloração de Calos.....	68
5.2.4 ANÁLISES QUANTITATIVAS	83
5.2.4.1 Número de Gemas	83
5.2.4.2 Tamanho das Gemas.....	90
5.2.4.3 Peso de Massa Fresca e Seca.....	94
6 CONCLUSÕES	101
7 REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO

Jatropha curcas L., popularmente conhecida como pinhão manso, é uma espécie florestal pertencente à família *Euphorbiaceae*, a qual contém cerca de 220 gêneros e 5970 espécies registradas.

Possui origem tropical e se adapta bem a maioria das regiões brasileiras, sendo vasta a sua distribuição geográfica.

A planta possui diversos usos. Pode servir como cerca viva, suporte para plantas trepadeiras, fixadora de dunas na orla marítima, além de possuir capacidade de recuperação de áreas degradadas (PEIXOTO, 1973). Nos últimos anos, a planta se tornou alternativa para produção de óleo biodiesel, sendo incluída como espécie potencial para ações de investimento do Programa Nacional de Biodiesel, pois além de ser perene e de fácil cultivo, adapta-se bem a diversos climas e condições ambientais, além de apresentar elevada produção de óleo por hectare.

Apesar de todas estas características, a espécie ainda é pouco estudada e não possui um sistema de produção minimamente avaliado em campo, necessitando de estudos relacionados à domesticação e a implantação de programas de melhoramento genético (CARGNIN, 2007).

Para a propagação de espécies florestais, incluindo o pinhão manso, podem ser utilizados tanto métodos sexuais quanto assexuais, sendo estes também chamados métodos de propagação vegetativa, onde estão inclusos a macropropagação e a micropropagação (HARTMANN *et al.*, 2002).

A micropropagação é assim denominada devido ao tamanho dos seus propágulos. Podem ser utilizados diversos tipos de explantes, como gemas apicais ou axilares, folhas, segmentos nodais, entre outros. Esta multiplicação baseia-se no potencial das células em iniciarem um novo indivíduo a partir de explantes unicelulares ou pluricelulares, a chamada teoria da totipotência (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Este método pode ser uma ferramenta importante para obterem-se clones de espécies vegetais em larga escala, tornando o processo de multiplicação mais rápido, uniforme e com bom estado fitossanitário (OLIVEIRA, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de protocolo para estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Jatropha curcas* a partir de sementes germinadas *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- a) Estabelecimento *in vitro* de culturas assépticas de *Jatropha curcas* a partir de sementes provenientes de diferentes procedências;
- b) Avaliação da germinação *in vitro* das diferentes procedências de *Jatropha curcas*;
- c) Adequação da concentração e fonte de fitorreguladores para a multiplicação *in vitro* de diferentes procedências e fontes de explantes de *Jatropha curcas*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Jatropha curcas* L.

3.1.1 Botânica

Jatropha curcas é conhecido na botânica como pinhão manso. Possui outros nomes populares, como purgueira, grão maluco, pinhão de purga e pinhão do Paraguai. Pertence à família das euforbiáceas (CORTESÃO, 1956; PEIXOTO, 1973).

Diversos autores tentaram definir a origem do pinhão manso, porém a fonte permanece controversa (HELLER, 1996). Cortesão (1956) e Peixoto (1973) afirmam em suas obras que a espécie é oriunda da América do Sul, do Brasil e ainda das Antilhas, tendo sido introduzido por navegadores portugueses, em fins do século XVIII, nas ilhas de Cabo Verde e em Guiné, de onde mais tarde foi difundido pelo continente africano, estando atualmente disseminado e conhecido em todo o mundo (GUIMARÃES, 2008).

O pinhão manso é um arbusto que atinge de dois a cinco metros de altura. O diâmetro do tronco pode chegar a vinte centímetros. Possui raízes curtas e pouco ramificadas (PEIXOTO, 1973).

Seu tronco é cinzento-castanho, esverdeado, dividido em ramos desde a raiz (CORTESÃO, 1956). Seu lenho é mole e a medula desenvolvida (PEIXOTO, 1973). Nos seus vasos lactíferos circula um látex, que é expelido em grandes quantidades e serve para cicatrização de ferimentos (FACT FOUNDATION, 2010).

As folhas são caducas, esparsas, largas, alternas e palminervadas. Possuem três a cinco lóbulos, com recortes em ângulo obtuso, que terminam com a ponta aguda. Têm cor verde com nervuras esbranquiçadas e salientadas na parte inferior. Seus pecíolos são longos e esverdeados, e no fim da estação seca caem (CORTESÃO, 1956; PEIXOTO, 1973).

A espécie é monoica com flores díclinas, sendo as flores de coloração amarela ou verde. As flores masculinas encontram-se na extremidade e são mais

numerosas, constituem-se de um cálice com cinco pétalas e cinco sépalas e possuem pedúnculo articulado; as flores femininas ficam nas ramificações, possuem o mesmo número de pétalas e sépalas das masculinas e pedúnculos não articulados. O ovário possui três carpelos e três lóculos. Cada inflorescência possui dez ou mais frutos (CORTESÃO, 1956; PEIXOTO, 1973). A polinização normalmente é feita por insetos (HELLER, 1996).

O fruto é seco, capsular, ovóide, liso, coriáceo, ligeiramente roliço, com ápice e base agudos (NUNES *et al.*, 2009). Apresenta diâmetro de 1,5 a 3 centímetros (PEIXOTO, 1973). Sua coloração varia de acordo com o grau de maturação, começando com verde, quando o fruto está jovem, passando a amarelo e por fim apresentando coloração marrom-escura, quando está maduro. Entre os carpides, observa-se a presença de sulcos. Se seco, o fruto apresenta deiscência. Apresenta superfície lisa e pericarpo com duas zonas diferentes: o exocarpo e o endocarpo, aquele mais liso e este dando-lhe aspecto mais áspero. Dentro do fruto, encontram-se normalmente três sementes (NUNES *et al.*, 2009).

A semente é endospérmica, grande, oblonga e achatada em suas extremidades. Possui envoltório liso e superfície externa de cor preta, marcada por suaves estrias. Seu tegumento é rijo e quebradiço. Apresenta rafe, que é pouco evidente, e uma carúncula situada próximo a micrópila, presa na parte ventral. Quando a semente está seca, a carúncula é pouco visível (NUNES *et al.*, 2009). Abaixo do tegumento, encontra-se uma película branca a qual cobre a amêndoa, e é formada por um endosperma oleoso esbranquiçado, rico em óleo e que contém o embrião provido de dois cotilédones (PEIXOTO, 1973). Esses cotilédones são foliáceos, largos, mas pouco espessos, funcionando temporariamente como órgãos de reserva. Seu contorno é ovalado, com nervação marcada e com eixo hipocótilo-radícula cilíndrico e reto (NUNES *et al.*, 2009).

3.1.2 Ecologia

O pinhão manso possui adaptação a diferentes climas e solos. Cresce e se desenvolve bem tanto nas regiões tropicais secas quanto nas zonas equatoriais úmidas, em terrenos áridos e pedregosos, suportando longos períodos de seca,

baixa fertilidade e propriedades físicas ruins (CORTESÃO, 1956). Sua introdução foi mais bem sucedida nas regiões mais secas dos trópicos, com precipitação média entre 300 e 1000 milímetros (HELLER, 1996).

Apesar de crescer em solos com propriedades físicas ruins, deve ser preferencialmente cultivado em solos bem estruturados e profundos, assim seu sistema radicular cresce e se desenvolve melhor e suas necessidades nutricionais são atendidas (PEIXOTO, 1973). Em solos pesados, sua formação radicular é limitada (HELLER, 1996).

No Brasil, a espécie possui distribuição geográfica vasta, indo desde o Nordeste até o Paraná. Encontra-se desde o nível do mar até 1000 metros de altitude, sendo seu cultivo mais adequado em regiões com altitude de 500 a 800 metros (CORTESÃO, 1956; PEIXOTO, 1973).

Adapta-se melhor em áreas com temperaturas mais altas, acima de 20°C, não sendo sensível à luz (HELLER, 1996).

Em longos períodos de seca, a planta entra em dormência e perde suas folhas. Com isso, consegue sobreviver, pois armazena no caule os nutrientes que as compõem, permanecendo este verde e fotossinteticamente ativo (HELLER, 1996; FACT FOUNDATION, 2010).

A espécie pode, naturalmente, realizar simbiose com micorrizas no solo, o que aumenta a sua absorção de nutrientes e água, sua tolerância à secas e a baixos níveis nutricionais no solo (FACT FOUNDATION, 2010).

3.1.3 Usos

O pinhão manso pode servir de cerca viva, pois os animais evitam tocar suas folhas e casca por serem ásperas e irritantes, além de também possuírem látex cáustico, que escorre das folhas quando estas são arrancadas ou feridas (PEIXOTO, 1973). Para essa finalidade, o plantio da espécie deve ser bem adensado (HELLER, 1996).

Também pode ser utilizado como suporte para plantas trepadeiras, como a baunilha, já que seu tronco apresenta casca lisa e macia, e na fixação de dunas da orla marítima (PEIXOTO, 1973).

Seu uso já foi bem sucedido aplicando-o na conservação de solo, no controle de erosão e na adubação verde (BRANDENBURG, 2007). Possui capacidade de recuperação de áreas degradadas por ter raízes profundas e crescer em solos de baixa fertilidade (TEIXEIRA, 2005).

Preparações feitas com diversas partes da planta são usadas na medicina humana e veterinária (HELLER, 1996). Na medicina doméstica, seu látex é aplicado como cicatrizante de úlcera, hemostático e purgante. As suas raízes apresentam poder diurético, estomáquico e adstringente. As folhas podem ser utilizadas no combate a doenças de pele e reumatismo, além de possuírem poder anti-sifilítico (PEIXOTO, 1973). Se transformadas em chá, são eficientes para tosse (HELLER, 1996). As sementes são utilizadas como purgante, mas se ingeridas em excesso possuem efeito nocivo e até fatal; são também empregadas como archote, servindo para iluminação nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (PEIXOTO, 1973).

A casca das frutas, as sementes e a madeira proveniente dos arbustos da espécie podem ser utilizadas como material combustível, por exemplo, em fornalhas (HELLER, 1996; SATO *et al.*, 2009).

Farelos e tortas de pinhão manso são ricos em nitrogênio, podendo ser utilizados como adubo orgânico (SATO *et al.*, 2009). Após detoxificação, estes produtos podem ser empregados na alimentação de animais, como ruminantes, devido ao seu alto teor de proteínas (ABDALLA *et al.*, 2008).

Antigamente, o óleo extraído da semente era usado para produção de sabão de excelente qualidade e bastante solúvel em água (PEIXOTO, 1973; HELLER, 1996).

Nos últimos anos a espécie tem se tornado alternativa para fornecimento de matéria prima para fabricação de biodiesel através da extração e transesterificação de seu óleo vegetal (GUIMARÃES, 2008; SATO *et al.*, 2009). A planta possui todas as qualidades necessárias para ser utilizada para este fim, pois é perene, de fácil cultivo, sua semente colhida conserva-se bem e pode ser cultivado em pequenas propriedades rurais, o que gera promoção do acesso à produção de renda, desenvolvimento rural e conseqüente fixação do homem no campo (PURCINO e DRUMMOND, 1986; SATO *et al.*, 2009). O óleo extraído da semente é inodoro, e seu teor em relação ao peso da semente varia de 30 a 35%, com boa qualidade de queima, podendo ser utilizado como combustível substituto em motores a diesel ou misturado tanto em diesel quanto em gasolina (SATURNINO, 2005).

3.1.4 Cultivo

Inicialmente, deve-se proceder a correção do pH do solo. Solos alcalinos necessitam de correção com drenagem associada ao emprego de gesso, enxofre e matéria orgânica em fermentação (PEIXOTO, 1973). Solos ácidos necessitam de calagem, ou seja, correção com calcário, que deve ser realizada três meses antes do plantio, em duas aplicações, uma anterior à aração e outra no momento da calagem específica para correção do solo (PEIXOTO, 1973; ARRUDA *et al.*, 2004). Para uma melhor produção da espécie, solos pobres podem ser melhorados com adubação orgânica, estrume, adubo verde ou outros (PEIXOTO, 1973).

Todas as quantidades ideais de calcário, gesso, macro e micronutrientes são indicadas pela análise química do solo. Os elementos necessários à correção do solo devem ser distribuídos e então incorporados a ele numa profundidade máxima de 20 centímetros (PEIXOTO, 1973). Esse preparo pode ser feito com arado, que além de revolver o solo, incorpora ao terreno resíduos da cultura anterior, o adubo verde e a vegetação espontânea presente, descompactando-o e promovendo assim melhor desenvolvimento radicular (PEIXOTO, 1973).

Segue-se o nivelamento da superfície com grade leve e a abertura das covas com espaçamento adequado (ARRUDA *et al.*, 2004; PEIXOTO, 1973).

O espaçamento pode variar desde 2 até 5 metros, em todos os sentidos, dependendo das condições de solo, clima e o modo de condução das plantas (PEIXOTO, 1973). Em plantios sem consórcio com outras culturas, é comum utilizar espaçamento de 3 x 2,5 metros. No caso da realização do plantio consorciado, recomenda-se um espaçamento de 4 x 2,5 ou 4 x 3 metros (FACT FOUNDATION, 2010). As covas devem ter, no mínimo, 30 centímetros de diâmetro e 30 centímetros de profundidade (PEIXOTO *et al.*, 1973).

Para o pinhão manso, Fact Foundation (2010) recomenda que após a abertura das covas, estas sejam reabastecidas com uma mistura de solo e matéria orgânica na proporção 1:1, seguido de 10 a 20 gramas de NPK comum (variando de 6:6:6 a 15:15:15), misturando-se tudo uniformemente. Outros compostos também podem ser utilizados na nutrição das plantas de pinhão manso, como esterco bovino ou de galinha, compostos de resíduos animais e vegetais e tortas de mamona ou de pinhão manso (MALAVOLTA, 1979). Nesse caso, Peixoto (1973) recomenda que a

terra dos 10 centímetros superficiais seja misturada com 8 ou mais litros de esterco bovino ou composto, ou 2 litros de esterco de galinha, ou torta de mamona ou de pinhão manso, ou terra do mato.

O plantio deve ser iniciado, preferencialmente, na época em que as chuvas são regulares, pois assim já haverá umidade no solo e a espécie não sofrerá falta de água, dispensando-se as regas (PEIXOTO, 1973). Se a quantidade de chuvas for insuficiente, regas até o terceiro mês de plantio são, então, necessárias (FACT FOUNDATION, 2010). Esta etapa pode ser realizada de diferentes formas, como por semeadura, mudas, estacas, blocos e raiz nua. Plantios por semeadura evitam que as raízes sofram traumas, mas requerem maiores cuidados como constante vigilância e capinas, a fim de controlar a competição com outras espécies por água, luz e nutrientes. Plantios por mudas vindas de viveiro são mais práticos e dispensam os cuidados necessários no plantio por semeadura, porém, as raízes ficam sujeitas aos traumatismos danosos (ARRUDA *et al.*, 2004). O plantio por estacas pode ser feito, atentando-se para que estas sejam enterradas diretamente nas covas de plantio, em profundidade máxima de 20 centímetros (PEIXOTO, 1973). O plantio em blocos ou em raiz nua pode ser feito imediatamente após o preparo da cova, deixando o colo ou nó vital a 4 ou 6 centímetros acima do nível do solo (ARRUDA *et al.*, 2004).

As mudas mortas devem ser substituídas assim que a falha for observada. Costuma-se deixar uma reserva de 15 a 20% de mudas no viveiro (PEIXOTO, 1973).

Após o plantio e pegamento das mudas, deve-se realizar adubação de cobertura (SATO *et al.*, 2009). O solo pode ser coberto com uma camada de matéria seca, o que o protege contra erosão, além de enriquecê-lo de matéria orgânica decomposta (PEIXOTO, 1973). Essa adubação deve ser repetida após seis meses. Passado esse tempo, a adubação deve ser realizada anualmente (SATO *et al.*, 2009). Aproveitar os resíduos da extração de óleo da planta como adubo orgânico nos plantios enriquece o solo em matéria orgânica e incorpora uma grande quantidade de nitrogênio, fósforo e potássio.

No primeiro ou segundo mês de plantio, pode-se adicionar adubo comercial NPK nas quantidades de 50 a 100 gramas por planta, misturado com solo superficial na proporção 1:1, cobrindo superficialmente um diâmetro de 50 centímetros ao redor da planta (FACT FOUNDATION, 2010).

Quando não há indicação de adubação, pode-se realizar uma aplicação anual, na cova da planta em produção, com 20 litros de estrume, 120 gramas de nitrocálcio, 100 gramas de cloreto de sulfato ou de potássio e 200 gramas de farinha de ossos ou fosforita (PEIXOTO, 1973).

Capinas devem ser feitas principalmente nas primeiras fases de crescimento e desenvolvimento da planta, pois pode haver concorrência com outras espécies indesejadas por água, luz, ar, umidade e nutrientes. Dependendo do espaçamento, podem ser realizadas com grade de disco (PEIXOTO, 1973). Também podem ser utilizados herbicidas para este fim, especialmente em estágios iniciais de crescimento (ARRUDA *et al.*, 2004; SATURNINO, 2005).

3.1.5 Pragas e Doenças

Quando o pinhão manso cresce isolado ou em pequenos plantios, raramente é atacado por organismos indesejáveis. Porém, quando cultivado em altas densidades, pode sofrer com pragas e doenças (FACT FOUNDATION, 2010).

Alguns insetos podem atacar a espécie, utilizando partes da planta na sua alimentação e reprodução. Esta, ao receber o ferimento, tenta repelir estes organismos com exsudação de seu látex cáustico (PEIXOTO, 1973). De acordo com Arruda *et al.* (2004), os insetos mais prejudiciais à espécie são as cochonilhas, que a atacam intensamente e podem até provocar sua morte, e os pulgões, que se alimentam e destroem suas inflorescências. As plantas também podem ser atacadas por outras espécies, como formigas, cupins, ácaros, percevejos, tripes e cigarrinhas (SATURNINO, 2005).

Quanto à incidência de doenças, *Jatropha curcas* pode ser atacada por diversos patógenos. Solos extremamente ácidos ou argilosos favorecem este ataque, o qual pode ser evitado com calagem (PEIXOTO, 1973).

Em terrenos com umidade elevada, a planta fica suscetível ao ataque de uma espécie de cogumelo que pode até mesmo levá-la a morte. O tratamento para este parasita é a drenagem, que promove mais oxigênio às raízes (PEIXOTO, 1973).

Ferrugem causada por *Phakopsora jatrophiicola* já foi constatada em diversos plantios e regiões brasileiras, com diferentes níveis de importância em cada

uma. Carneiro *et al.* (2009) relataram presença de ferrugem em viveiro e em campo, na cidade de Londrina, Paraná. As folhas apresentaram pontos cloróticos na parte adaxial e pústulas salientes na abaxial, as quais evoluíram para manchas castanhas nos tecidos mais afetados; este foi o primeiro relato da doença no estado em questão. Vieira Junior *et al.* (2009) detectaram a doença no estado de Rondônia, destacando para a formação de lesões nas folhas de cor marrom escuras a negras e circundadas por halo clorótico esmaecido. A doença também já foi verificada em outras regiões, como Mato Grosso do Sul, São Paulo e Minas Gerais (DIAS *et al.*, 2007; ROESE *et al.*, 2008).

Freire *et al.* (2006), em estudo sobre doenças associadas ao pinhão manso em Fortaleza-CE, constatou a presença de antracnose causada por *Colletotrichum* spp, seca descendente originária do fungo *Lasiodiplodia theobromae* e manchas foliares produzidas por *Passalora ajrekari*.

Oidium spp. também já foi relatado no Brasil. Esse organismo adapta-se em regiões com baixa umidade relativa e ausência de chuvas, como constatado no Mato Grosso do Sul e no Distrito Federal (ROESE *et al.*, 2008; DIANESE *et al.*, 2008)

Outras doenças causadas por *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Cercospora* spp., *Helminthosporium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. já foram igualmente verificadas e descritas (VIEIRA JUNIOR *et al.*, 2009).

3.1.6 Propagação Sexuada e Assexuada

Propagar plantas consiste no ato de multiplicá-las, naturalmente ou por métodos controlados pelo homem, através de propágulos, que são partes de plantas utilizadas para produzir novos indivíduos ou populações (HARTMANN *et al.*, 2002). A propagação de plantas pode ser feita de duas formas: via sexuada, por sementes, ou via assexuada, por clonagem (HILL, 1996; SILVA, 2005).

O método sexuado de propagar plantas é o mais divulgado. Consiste em formar um novo ser a partir de uma semente (HILL, 1996). A maior parte das plantas pode ser produzida desta forma. O método assexuado, também conhecido como propagação vegetativa, é mais utilizado quando o método sexuado não tem sucesso, quando o número de plantas que o mercado requer não é suficiente ou

quando se tem interesse em propagar plantas com algumas características selecionadas (HARTMANN *et al.*,2002). Esta forma de propagação produz uma nova planta igual à que lhe deu origem, através de divisão, estaquia, mergulhia ou enxertia. Por meio de cultura de tecidos, as plantas são produzidas *in vitro* sob condições absolutamente estéreis (HILL, 1996).

Para a propagação de pinhão manso, deve-se escolher rigorosamente as plantas matrizes, selecionando-se as melhores (CORTESÃO, 1956; PEIXOTO, 1973).

3.1.6.1 Propagação por Sementes

A propagação por sementes é a mais simples e consiste em um método natural (FOGG, 1978). Gera maior variabilidade entre os indivíduos, o que possibilita maior distribuição e adaptação do material em condições de solo e clima diferentes (SILVA, 2005).

As plantas de pinhão manso originadas de sementes possuem maior robustez e longevidade, e sua produção inicial se dá após 4 ou 5 anos de plantio (PEIXOTO, 1973). As sementes precisam ser trabalhadas na sementeira até atingirem desenvolvimento adequado (PEIXOTO, 1973). Alguns fatores alteram a qualidade das mudas, como profundidade e tempo de semeadura, condições de umidade, boa precipitação, data e qualidade das sementes (HELLER, 1996; SHRIVASTAVA; BANERJEE, 2008). As sementes devem ter espaçamento entre si de 5 centímetros no sulco. Deve-se colocar em cada metro quadrado 200 sementes, duas em cada cova. Com isso, pode-se contar 25 mudas excelentes depois do pegamento na plantação definitiva (PEIXOTO, 1973).

As mudas podem ser produzidas em tubetes, o que fornece suporte e nutrição para as mesmas, além de proteger as raízes de danos mecânicos e desidratação, moldando-as para que tenham um desenvolvimento melhor, maximizando a taxa de sobrevivência e o crescimento inicial das mudas em campo. Esse tipo de recipiente também facilita o manuseio, tanto no viveiro quanto no plantio (CARNEIRO, 1995). O tamanho do recipiente influencia diretamente o custo final das mudas, devido à quantidade de substrato e outros insumos que deve ser

utilizada, o espaço ocupado no viveiro, a mão-de-obra para transporte, remoção e aclimação das mudas, bem como retirada para entrega ao produtor (QUEIROZ *et al.*, 2001). Para o pinhão manso, Avelar *et al.* (2006), testando recipientes do tipo tubetes de 50 e 120 ml para produção de mudas de pinhão manso, constataram um melhor desenvolvimento da parte aérea das mudas, com maior número de folhas por plantas, quando estas foram produzidas em tubetes de 120 ml.

3.1.6.2 Estaquia

Estaquia é o processo de enraizamento de estacas, obtidas de material selecionado (SILVA, 2005).

As estacas podem ser retiradas dos galhos lenhosos com um ou dois anos. As plantas matrizes devem ter boa conformação, elevada produtividade, bom estado de sanidade e ausência de pragas. A produção por estacas começa a partir do segundo ano (PEIXOTO, 1973). Devem ser cortadas com utensílio afiado para que os tecidos não sejam esmagados (CORTESÃO, 1956; PEIXOTO, 1973). O pé da estaca deve ser conservado para cima para que o látex coagule em torno do talho, formando um rebordo de onde surgirão as primeiras raízes (PEIXOTO, 1973).

Os ramos mais próximos da base do tronco são os mais indicados para o fornecimento de estacas retas, de grossura mediana, casca lisa, cinzas e brilhantes. Ramos de casca solta, rugosa, castanha e com as pontas secas devem ser evitados (CORTESÃO, 1956; PEIXOTO, 1973).

O comprimento adequado para as estacas é de 40 a 50 centímetros; devem possuir entrenós curtos, gemas ou olhos salientes. As estacas devem ser conservadas em local fresco e na sombra (PEIXOTO, 1973).

Dentre as desvantagens do método, as plantas advindas de estacas são de vida mais curta e seu sistema radicular é mais enfraquecido (CORTESÃO, 1956; PEIXOTO, 1973). Também é necessário um grande volume de material para a produção em escala comercial (SATURNINO, 2005).

3.1.6.3 Enxertia

Este processo consiste na inserção da parte superior de uma planta em outra, implantando-se o ramo, gema ou borbulha da planta que será multiplicada sobre o porta-enxerto (SILVA, 2005).

A enxertia em pinhão manso é praticada de acordo com as normas estabelecidas para as demais plantas. O látex que oxida deve ser retirado com um pano limpo antes de ser adaptado ao escudo ou a gema. A parte incrustada deve ser atada com um fio ou pano encerado, também com fita de material plástico. As partes devem ser bem ajustadas, e, decorrendo duas semanas ou um pouco mais, o amarelo deve ser retirado. Se o enxerto não pegar, deve-se repetir o procedimento, mas do lado contrário (PEIXOTO, 1973).

O tipo de enxerto mais indicado para o pinhão manso é o de fenda ou pirâmide esvaziada. Quando se adota esse sistema, deve-se deixar um broto, uma haste no porta-enxerto, de modo a facilitar o pegamento (PEIXOTO, 1973).

Existem alguns fatores indispensáveis na utilização desta técnica, como nebulização, estado nutricional, utilização de hormônios e condições adequadas de desenvolvimento.

Em trabalho realizado por Anjos *et al.* (2007), selecionaram-se galhos de *Jatropha mollissima* (pinhão bravo), que foram posteriormente enxertados com garfos de *Jatropha curcas* (pinhão manso), oriundos da mesma planta-mãe. Observou-se que enxertia através de garfagem é viável, com produção de frutos iniciando-se um ano após o procedimento.

3.1.6.4 Cultura de Tecidos *in vitro*

A cultura de tecidos se enquadra nos métodos de propagação vegetativa. Este método fornece uma alternativa de cultivo para plantas que possuem dificuldades no cultivo, têm um longo período de cultivo ou baixo rendimento de produto (SOOMRO; MEMON, 2007). Dentre outras vantagens, a cultura de tecidos

oferece um aumento na qualidade do material vegetal e a facilitação da produção em larga escala (KUMAR *et al.*, 2010).

Para isso, utiliza-se o explante, que pode ser uma célula, tecido ou órgão de uma planta. Sua escolha depende do objetivo da cultura, da idade, das condições fisiológicas e sanitárias da planta. A possibilidade de se utilizar vários tipos de explantes para iniciar uma cultura baseia-se na totipotência das células vegetais, ou seja, na sua capacidade de iniciar um novo indivíduo a partir de explantes unicelulares ou pluricelulares (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O explante deve ser inoculado em meio de cultura, em local livre de contaminações, em câmara de fluxo laminar.

O crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e balanço dos reguladores de crescimento existentes no meio de cultura, principalmente auxinas e citocininas (GEORGE; SHERRINGTON, 1984). Ambos reguladores são essenciais para a viabilidade das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2002). Efeitos fisiológicos de diferentes condições desses hormônios exercem diferentes resultados no crescimento e na resposta ao número de brotações.

As citocininas são utilizadas para quebrar a dominância apical dos brotos e aumentar a taxa de multiplicação. Sua principal ação é na estimulação da divisão das células vegetais. Deste modo, ocorre um grande número de brotações por meio do crescimento de meristemas laterais. Também atuam em outros efeitos nos processos fisiológicos de desenvolvimento, como senescência foliar, mobilização de nutrientes, dominância apical, formação e atividade dos meristemas apicais, desenvolvimento floral, germinação de sementes e quebra de dormência das gemas (TAIZ; ZEIGER, 2002).

As auxinas, apesar de não promoverem a proliferação de brotações axilares, podem incrementar o crescimento da cultura. Uma das possíveis ações da auxina no meio de multiplicação seria a supressão das altas concentrações de citocinina sobre a alongação das brotações axilares, restaurando o crescimento normal das mesmas (HU; WANG, 1983).

Portanto, diferentes combinações entre auxinas e citocininas na morfogênese resultarão em diferentes taxas de crescimento e alongação das brotações axilares, até encontrar-se uma combinação que dê um resultado ótimo de crescimento e multiplicação para cada espécie, já que, enquanto as citocininas estimulam a divisão das células vegetais, as auxinas anulam o efeito supressivo de

altas concentrações daquelas sobre o alongamento das brotações axilares, o que resultará na restauração do crescimento normal destas brotações.

Programas de melhoramento genético de *Jatropha curcas* através de métodos modernos de agrobiotecnologia são de interesse mundial devido à importância econômica da cultura e ao aumento da qualidade do material vegetal. Porém, apesar dessa importância econômica, apenas um número limitado de estudos sobre cultura de tecidos *in vitro* de *Jatropha curcas* foi relatado até hoje em todo o mundo (SHRIVASTAVA; BANERJEE, 2008). Com isso, levanta-se a necessidade de desenvolverem-se protocolos de cultura de tecidos para facilitar a produção em larga escala utilizando-se métodos de engenharia genética (KUMAR *et al.*, 2010).

3.2 MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS

A micropropagação, uma das técnicas de cultivo *in vitro*, consiste na produção em larga escala de clones de uma planta a partir de uma única célula vegetal somática ou de um pequeno pedaço de tecido vegetal, o explante.

Neste procedimento, as células, órgãos ou tecidos de plantas são introduzidos *in vitro*, estabelecidos e mantidos em culturas assépticas para regenerar novas plantas (HARTMANN *et al.*, 2002). A micropropagação possui este nome devido ao tamanho dos propágulos utilizados (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A micropropagação ganhou impulso a partir da década de setenta (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Murashige (1974) apresentou os diferentes estágios que os explantes passam no processo de propagação *in vitro*. Estes estágios, padrão para processos de micropropagação até hoje, dividem-se em: a) Seleção de explantes, desinfestação e cultivo em meio nutritivo sob condições assépticas; b) Multiplicação de propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação; c) Transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplante das plantas obtidas para substrato ou solo.

No caso de espécies lenhosas, existe a necessidade de mais uma etapa, para que as gemas sofram alongamento anterior ao enraizamento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Portanto, o desenvolvimento e o aprimoramento da eficiência de técnicas de micropropagação de *Jatropha curcas* é muito importante, principalmente porque a planta é considerada como promissora para a produção do biodiesel (SHRIVASTAVA; BANERJEE, 2008).

3.2.1 Planta Matriz

A planta matriz fornece os segmentos de tecidos ou órgãos vegetais utilizados para início da cultura *in vitro* (CORTESÃO, 1956; PEIXOTO, 1973).

Explantos com melhor qualidade são fornecidos quando são utilizadas plantas saudáveis e sem sinais de deficiência nutricional e hídrica. Estas características possuem importância e influenciam o comportamento das culturas. Também é relevante a condição fitossanitária da planta matriz, pois quanto melhor, mais fácil se torna a etapa de desinfestação dos explantes, com posterior sucesso no estabelecimento das culturas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Diversos explantes podem ser utilizados neste processo. Para *Jatropha curcas*, múltiplos brotos foram induzidos de diferentes tipos de explantes, tais como folhas, pecíolos, hastes, epicótilos, hipocótilos, pedúnculos e segmentos nodais (SHRIVASTAVA; BANERJEE, 2008). Porém, estas técnicas relatadas não foram promissoras, pois seu índice de multiplicação foi baixo e não satisfatório.

3.2.2 Desinfestação do Material Vegetal

A germinação de sementes *in vitro* sob condições assépticas possui vantagem devido à eliminação de infestações internas ou externas que podem vir a ocorrer (SKIRVIN, 1981).

Quando o material de origem é proveniente de sementes, os métodos de desinfestação devem ser eficazes para que a plântula esteja livre de microorganismos maléficos (COUTO *et al.*, 2004).

Várias substâncias com ação germicida podem ser utilizadas neste processo, sendo mais comum agentes como etanol e compostos a base de cloro, tal como hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio. Além desses, também podem ser utilizados bicloreto de mercúrio, ácido clorídrico, peróxido de hidrogênio, entre outros (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Após esta desinfestação, o material deve ser triplamente lavado em câmara de fluxo laminar com água destilada autoclavada, pois a permanência de resíduos pode prejudicar tecidos saudáveis e comprometer o desenvolvimento da plântula (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

3.2.3 Isolamento do Material Vegetal

O isolamento do material vegetal deve ser realizado dentro de câmaras de fluxo laminar após a desinfestação do mesmo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Deste modo, a contaminação por microorganismos diminui e é até mesmo evitada (GEORGE; SHERRINGTON, 1984). A manipulação nesta fase é o que condiciona a sobrevivência do explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

É necessária destreza manual para evitar, principalmente, a desidratação dos tecidos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A excisão do explante em um curto espaço de tempo, a inoculação em meio de cultura e a imediata vedação do frasco são fundamentais para evitar a desidratação do material (HU; WANG, 1983).

São utilizados, nesta fase, diversos instrumentos, como bisturis, pinças de tamanhos variados, estiletos, seringas, dentre outros, que devem ser flambados após serem imersos em solução de etanol absoluto e utilizados apenas após seu resfriamento a fim de evitar danos aos tecidos do explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Alguns problemas podem surgir durante o isolamento dos explantes. A oxidação dos compostos fenólicos liberados pelas células que foram danificadas com o corte é o mais freqüente e crítico no isolamento de explantes de espécies

lenhosas. Alguns antioxidantes podem ser utilizados para evitar este problema, além de carvão ativado, que absorve estes compostos e evita a oxidação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; WENDLING; DUTRA; GROSSI, 2006). Além disso, estas espécies apresentam dificuldades no estabelecimento *in vitro* devido a quantidade de contaminantes, principalmente quando o material vegetal é oriundo de indivíduos adultos (COUTO *et al.*, 2004).

Outros fatores também atuam no sucesso do isolamento dos explantes, tais como o tamanho e a idade cronológica e fisiológica dos explantes (DAVEY; ANTHONY, 2010).

Apesar de a tecnologia de isolamento ser amplamente empregada, apenas um número limitado de espécies arbóreas possui técnicas *in vitro* avançadas para a produção em larga escala (RAZDAN, 2003).

As culturas, uma vez iniciadas, são colocadas em salas de incubação ou crescimento, onde fatores como luz, temperatura e umidade podem ser controlados. A taxa de crescimento de uma cultura depende dos regimes de temperatura e luz adotados (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

3.2.4 Meio de Cultura

Os meios nutritivos ou de cultura fornecem todos os elementos inorgânicos essenciais para o crescimento e desenvolvimento *in vitro*. A ele, vários compostos são adicionados a fim de suprirem-se as necessidades metabólicas, estruturais e energéticas das células (CALDAS *et al.*, 1998). São combinações de elementos essenciais, como água, macro e micronutrientes, carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento, e também de componentes opcionais, como ácidos orgânicos e misturas complexas, além de reguladores de crescimento (GUERRA; NODARI, 2006). Estas substâncias fornecem condições para o desenvolvimento dos tecidos e o padrão do desenvolvimento *in vitro* (CALDAS *et al.*, 1998).

Estes compostos podem ter diferentes consistências, como sólidos, semi-sólidos e líquidos, de acordo com o protocolo para o sistema de cultivo. Nos meios de cultura sólidos e semi-sólidos, substâncias gelificantes são adicionadas, sendo o ágar amplamente utilizado para este fim (GUERRA; NODARI, 2006). Os meios

líquidos, apesar de não conterem agentes solidificantes, necessitam de constante agitação, o que pode se tornar uma desvantagem frente às demais consistências conhecidas.

Durante anos, o meio desenvolvido por White foi utilizado para a cultura de tecidos de diversas espécies (CALDAS *et al.*, 1998). Esse meio apresenta em sua constituição baixos níveis de oxigênio e potássio, sendo ainda hoje utilizada em situações onde se necessita baixa concentração de sais (GUERRA; NODARI, 2006).

A partir de testes com o meio de White com suplementação de folhas de fumo, surgiu o meio de cultura de Murashige e Skoog, também conhecido como meio MS (CALDAS *et al.*, 2006). Este meio apresenta altos níveis de nitrato, potássio e amônio (GUERRA; NODARI, 2006). Outro meio de cultura muito conhecido é o de Gamborg, também chamado de meio B5, que contém baixas quantidades de sais minerais (CALDAS *et al.*, 1998).

A escolha do meio de cultura depende da espécie em questão e do propósito da cultura. O meio de cultura MS, juntamente com o meio B5, é utilizado na cultura de tecidos da maioria das espécies (CALDAS *et al.*, 1998). Modificações e diluições do meio MS vêm apresentando resultados positivos para várias espécies. Outras formulações, especialmente desenvolvidas para espécies lenhosas, já estão sendo empregadas a fim de aperfeiçoar a micropropagação (WENDLING; DUTRA; GROSSI, 2006).

O pH do meio de cultura é um fator muito importante. Este valor é normalmente ajustado para um valor ligeiramente ácido (entre 5 e 6) com HCl ou NaOH, sempre depois de adicionarem-se todos os componentes (CALDAS *et al.*, 1998).

Os meios devem ser esterilizados, antes ou após a distribuição nos frascos ou vasilhames de cultivo. Esta esterilização é feita por autoclavagem a 121°C por 15 a 20 minutos, dependendo do tempo mínimo de esterilização do volume de meio no recipiente em que se encontra (CALDAS *et al.*, 1998).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DO EXPERIMENTO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação de Plantas, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, situada na cidade de Curitiba – Paraná. A cidade está localizada a uma latitude de 25°25'40" sul e a uma longitude de 49°16'23" oeste.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com irradiância de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura média de 28°C.

4.2 SELEÇÃO DE MATERIAL VEGETAL

Para realização dos experimentos, foram utilizadas sementes de *Jatropha curcas* provenientes de cinco procedências, com o objetivo de verificar possíveis variações de resposta em função da origem do material.

As procedências foram as seguintes:

- a) Araçatuba – São Paulo, adquiridas diretamente com o produtor;
- b) Campo Grande – Mato Grosso do Sul, recebidas como doação;
- c) Janaúba – Minas Gerais, adquiridas diretamente com a empresa Biojan-MG Agro Industrial Ltda.;
- d) Santa Vitória – Minas Gerais, adquiridas diretamente com o produtor;
- e) Natal – Rio Grande do Norte, adquiridas diretamente com o produtor.

As sementes foram adquiridas em meados do ano de 2010 e armazenadas dentro de sacos plásticos em câmara fria (temperatura média de 6 °C e umidade média de 80%) por um período de 4 meses, até serem utilizadas. O aspecto das mesmas pode ser visualizado na Figura 1.



FIGURA 1 - ASPECTO DAS SEMENTES DE *Jatropha curcas*.

4.3 EXPERIMENTO 1 – INFLUÊNCIA DA PROCEDÊNCIA DA SEMENTE DE *Jatropha curcas* NA RESPOSTA À DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO *in vitro*

4.3.1 Desinfestação das Sementes

Neste experimento, as sementes foram desinfestadas segundo a metodologia a seguir:

- a) Lavagem em água corrente por 3 minutos;
- b) Imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% de cloro ativo sob agitação constante, com auxílio de um agitador orbital, variando entre 60 e 70 rotações por minuto, durante 30 minutos;
- c) Tríplex lavagem com água destilada seguida de imersão em solução de álcool etílico a 70% por um minuto, já em câmara de fluxo laminar;
- d) Retirada das sementes da solução em álcool 70% seguida de imersão individual em solução alcoólica pura (96 GL) 100% por 30 segundos;

- e) Flambagem individual das sementes na câmara de fluxo laminar em chama, com auxílio de lamparina de álcool, durante 30 segundos.

A ilustração de todos estes passos pode ser visualizada nas Figuras 2 e 3.



FIGURA 2 - DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES DE *Jatropha curcas* PARA INOCULAÇÃO *in vitro*. a. Sementes em solução de hipoclorito de sódio 2%. b. Sementes após agitação por 30 minutos em agitador digital. c. Sementes após tríplice lavagem com água destilada e imersão em álcool 70% por um minuto.



FIGURA 3 - SEMENTES DE *Jatropha curcas* APÓS IMERSÃO EM ÁLCOOL 100% E FLAMBAGEM.

4.3.2 Inoculação das Sementes

Após a realização de toda a assepsia, ainda dentro de câmara de fluxo laminar, o tegumento externo de cada semente foi inteiramente removido com auxílio de bisturi. As sementes ficaram com aspecto que pode ser visualizado na Figura 4.

As sementes foram inoculadas individualmente em frascos contendo 10 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), esterilizados em autoclave a 121°C com pressão de 1 atm por 20 minutos, contendo metade da concentração de nutrientes, sem adição de sacarose e gelificado com de 6 g/l de ágar Vetec®. Os frascos foram lacrados com papel alumínio e filme de PVC e então acondicionados em sala de crescimento com irradiância de 20 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura média de 28°C, conforme Figura 5.

O material foi mantido em sala de crescimento pelo período de 7 dias para que germinasse, conforme demonstrado pela Figura 5. Após este período, foram avaliadas as porcentagens de germinação e contaminação do material *in vitro*. Sementes com emissão de raiz superior a 2 mm foram consideradas como germinadas. As sementes contaminadas por fungos e/ou bactérias e aquelas que não germinaram foram avaliadas e descartadas. O aspecto das sementes germinadas, após o período de 7 dias, pode ser visualizado na Figura 6.



FIGURA 4 - SEMENTES DE *Jatropha curcas* APÓS COMPLETA ASSEPSIA E RETIRADA DO TEGUMENTO.



FIGURA 5 - SEMENTES DE *Jatropha curcas* APÓS INOCULAÇÃO EM MEIO DE CULTURA, JÁ EM SALA DE CRESCIMENTO.



FIGURA 6 - ASPECTO DA PLÂNTULA DE *Jatropha curcas* APÓS SETE DIAS DE INOCULAÇÃO DAS SEMENTES *in vitro*.

4.3.3 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O experimento foi montado em esquema inteiramente casualizado, constituindo das cinco diferentes procedências, Araçatuba – SP, Campo Grande – MS, Janaúba – MG, Natal – RN e Santa Vitória – MG, totalizando quatro repetições e trinta sementes por repetição, com 120 sementes por tratamento.

Os dados de germinação e contaminação obtidos foram submetidos ao teste de Bartlett ($p < 0,05$) para verificação da homogeneidade da variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), com auxílio do programa ASSISTAT®.

4.4 EXPERIMENTO 2 – INDUÇÃO DE GEMAS E CALOS

Após a retirada das sementes germinadas, em câmara de fluxo laminar, as mesmas foram divididas em epicótilo, hipocótilo, raiz e cotilédone, constituindo-se assim quatro diferentes fontes de explantes.

Estes explantes foram inoculados isoladamente em frascos contendo aproximadamente 10 ml de meio de cultura sólido, já esterilizados em autoclave a 121 °C com pressão de 1 atm por 20 minutos. O meio de cultura utilizado foi de Murashige e Skoog (1962), com 100% da concentração de sais, onde foram adicionadas três fontes de citocininas (benzilaminopurina, cinetina e thidiazuron), sulfato de adenina e uma fonte de auxina (ácido indol butírico), combinados entre si, constituindo assim cinco diferentes combinações. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N. As combinações entre fitorreguladores aplicadas estão na Tabela 1.

TABELA 1 - CONCENTRAÇÃO DE FITORREGULADORES (μM) PARA CADA UMA DAS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.

COMBINAÇÕES	FITORREGULADORES				
	BAP (μM)	KIN (μM)	SULFATO DE ADENINA (μM)	TDZ (μM)	AIB (μM)
C1	27,8				0,5
C2		27,8			0,5
C3			27,8		0,5
C4		2,3	27,8		0,5
C5				9	0,5

BAP – benzilaminopurina; KIN – cinetina; S. A. – sulfato de adenina; TDZ – thidiazuron; AIB – ácido indol butírico.

O material foi mantido em sala de crescimento com irradiância de $20 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura média de 28°C por um período de trinta dias.

Decorridos os trinta dias, realizou-se um subcultivo do material. A brotação existente foi transferida para frascos contendo o mesmo meio de cultura em que se encontrava anteriormente. Excessos de material vegetal foram retirados, pesados e

secos, para posterior aferição da massa fresca e seca destes. Frascos oxidados e contaminados foram avaliados e retirados.

Após sessenta dias, o material vegetal resultante foi retirado da sala de crescimento e o experimento foi finalizado, avaliando-se contaminação e oxidação dos explantes, além dos seguintes parâmetros qualitativos (indução de gemas, coloração de gemas, indução de calos, textura de calos e coloração de calos) e quantitativos (número de gemas, tamanho das gemas, peso de matéria fresca e peso de matéria seca).

Para a determinação da indução de gemas e calos, foram feitas observações dos explantes sadios, e os que responderam positivamente à formação de um ou destes dois aspectos foram considerados.

Quanto ao tipo de calo, as amostras foram enquadradas dentro de duas categorias: calos compactos, ou seja, aqueles que se apresentaram maciços e unidos, ou friáveis, quando se fragmentavam facilmente.

Quanto à coloração das gemas, os explantes foram enquadrados dentro de duas diferentes categorias de cor, de acordo com as cores que foram sendo encontradas, a saber, verde e amarelo.

Quanto à coloração dos calos, estes foram enquadrados em três diferentes categorias de cor, a saber, creme, verde e marrom.

Para determinação do número e do tamanho das gemas, estas foram contadas uma a uma, sendo seu tamanho dividido em diferentes categorias, a saber: pequeno, quando estas apresentavam tamanho inferior a 0,1 cm; médio, quando estas apresentavam tamanho entre 0,1 e 1 cm; grandes, quando estas apresentavam tamanho superior a 1 cm.

A massa de matéria fresca foi determinada em balança analítica. Após esta avaliação, todas as amostras foram levadas para secagem em estufa com ventilação forçada, onde permaneceram por 48 horas a 65°C. Após este período, procedeu-se a nova pesagem do material vegetal para determinação da massa seca do material, na mesma balança utilizada para determinação da massa fresca.

4.4.1 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Para todas as avaliações deste experimento, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial.

Para indução de gemas e de calos, o experimento fatorial foi $2 \times 5 \times 4$, sendo os fatores compostos por 2 procedências, 5 combinações de reguladores de crescimento e 4 fontes de explantes, com 4 repetições cada.

Para coloração de gemas, o experimento fatorial foi $2 \times 5 \times 4 \times 2$, sendo os fatores compostos de 2 procedências, 5 combinações de reguladores de crescimento, 4 fontes de explantes e 2 colorações de gemas, com 4 repetições cada.

Para coloração de calos, o experimento fatorial foi $2 \times 5 \times 4 \times 3$, sendo os fatores compostos de 2 procedências, 5 combinações de reguladores de crescimento, 4 fontes de explantes e 3 colorações de calos, com 4 repetições cada.

Para textura de calos, o experimento fatorial foi $2 \times 5 \times 4 \times 2$, sendo os fatores compostos de 2 procedências, 5 combinações de reguladores de crescimento, 4 fontes de explantes e 2 texturas de calos, com 4 repetições cada.

Para os parâmetros número de gemas por explante, peso de matéria fresca e peso de matéria seca, o experimento fatorial foi $2 \times 5 \times 4$, sendo os fatores compostos de 2 procedências, 5 combinações de reguladores de crescimento e 4 fontes de explantes, com 4 repetições cada.

Para tamanho de gemas, o experimento fatorial foi $2 \times 5 \times 4 \times 3$, sendo os fatores compostos de 2 procedências, 5 combinações de reguladores de crescimento, 4 fontes de explantes e 3 tamanhos, com 4 repetições cada.

Quando se tratavam de porcentagens, os dados de cada repetição foram transformados através da fórmula $\arcseno \sqrt{x/100}$, sendo x a porcentagem em questão.

Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett para avaliação da homogeneidade de variância entre os tratamentos, e, após, foi realizada análise de variância. De acordo com a significância, as médias foram submetidas ao teste de Tukey a nível de 5% mediante programa computacional Assistat®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTO 1 – DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO *in vitro* DE SEMENTES DE *Jatropha curcas*

A desinfestação de sementes mostrou-se eficiente em apenas algumas das procedências analisadas. A contaminação das sementes deu-se por fungos e/ou bactérias, sendo os primeiros em maior ocorrência. Na presença destes as sementes não germinaram, constatando-se que neste caso estes organismos atuaram como fatores limitantes do processo de germinação, pois causaram a deterioração da semente e conseqüente perda de sua viabilidade.

Estes patógenos estavam, possivelmente, localizados no interior das sementes, uma vez que o processo de descontaminação é superficial, não penetrando no endosperma e embriões.

A procedência Janaúba – MG não apresentou contaminação. De acordo com algumas informações fornecidas pelo diretor da empresa fornecedora das sementes, Nagashi Tominaga, pode-se concluir que as sementes passam por processos de beneficiamento, secagem e armazenamento que reduzem a incidência de contaminação, levando a um maior sucesso na germinação. Não foram obtidas informações sobre estes processos das demais procedências

Além disso, na procedência Janaúba, os frutos foram colhidos no ponto de maturação, quando estão na coloração amarela, sendo debulhados em seguida para separação da casca e das sementes. As sementes foram secas ao sol, e, após este processo, armazenadas dentro de sacos de papel em local seco com pouca alteração da temperatura, para que se adaptem, e posteriormente em silo com temperatura estável. O lote enviado para estudo possuía uma porcentagem média de germinação de 95%.

Vanzolini *et al.* (2010) testaram a sanidade de sementes colhidas diretamente de frutos maduros de *Jatropha curcas*, utilizando água e hipoclorito de sódio como agentes desinfestantes, não encontrando diferença significativa entre os tratamentos. A maior parte da contaminação foi devida a fungos fitopatogênicos dos gêneros *Alternaria*, *Macrophomina*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*,

Pestalotiopsis, *Phoma*, *Helminthosporium*, *Epicocum* e *Nigrospora*. Contudo, mesmo as sementes contaminadas apresentaram boa germinação.

A análise de variância para a porcentagem de contaminação das sementes apresentou efeito significativo da procedência pelo teste de F a 1% de probabilidade, conforme demonstrado na Tabela 2. Foram analisadas apenas as procedências que apresentaram alguma contaminação.

TABELA 2 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO DAS DIFERENTES PROCEDÊNCIAS DE *Jatropha curcas* GERMINADAS *in vitro*.

FATOR DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
PROCEDÊNCIAS	3	1,38	0,46	43,37**
RESÍDUO	12	0,13	0,01	
TOTAL	15	1,51		
C.V. (%)				13,56

** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F.

GL – graus de liberdade, SQ – Soma de quadrados, QM – quadrado médio, C. V. – coeficiente de variação experimental.

Morais *et al.* (2008) testaram a germinação de *Jatropha curcas* com três diferentes tratamentos. Na testemunha, as sementes, quando colocadas em temperatura variando entre 25-30°C chegaram a apresentar 100% de contaminação; com tratamento consistindo de hipoclorito de sódio 2% por um minuto, à mesma temperatura, obteve contaminação máxima de 34,5%; com uso de fungicida Captan, numa proporção de 2 gramas/quilograma de semente, o resultado atingiu uma máxima de 25% de contaminação.

Neves *et al.* (2009) testaram desinfestação superficial das sementes da mesma espécie com dois tratamentos, o primeiro combinando álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 0,5% por dois minutos e lavagem com água destilada esterilizada e o segundo consistindo apenas de lavagem com água destilada esterilizada. O primeiro tratamento apresentou porcentagem de contaminação de fungos como *Aspergillus* spp. numa proporção de 28%. Já o segundo, apresentou contaminação para fungos do mesmo gênero em 80%. Outros fungos como *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. também foram encontrados, com maior porcentagem no segundo tratamento e, segundo os autores, isto aconteceu porque fungos como estes normalmente encontram-se em maior concentração no exterior

das sementes, sendo maior a sua eliminação quando da utilização de hipoclorito de sódio.

Todas as porcentagens de contaminação, bem como a diferença estatística entre as procedências através do teste de Tukey a 5% de probabilidade, podem ser visualizadas no Gráfico 1.

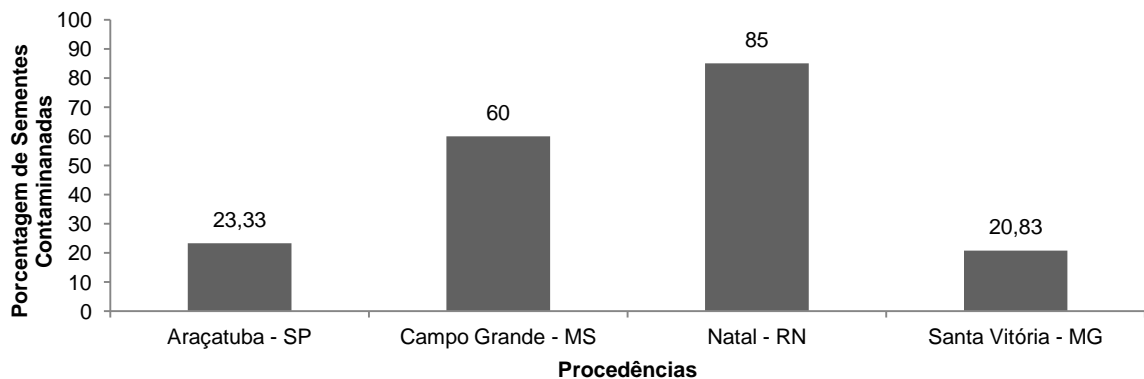


GRÁFICO 1 – PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO *in vitro* DAS SEMENTES DAS DIFERENTES PROCEDÊNCIAS DE *Jatropha curcas*. Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Conforme se pode visualizar, as procedências com maiores taxas de contaminação foram as sementes de Natal – RN e Campo Grande – MS, com 85% e 60%, respectivamente.

As sementes da procedência Natal apresentaram muita dificuldade no estabelecimento, pois, grande parte das sementes que eram abertas para inoculação *in vitro* estava visivelmente contaminada por fungos. Foram estabelecidas *in vitro* apenas aquelas sementes que não apresentavam sinais visíveis de contaminação, sendo as demais descartadas. Além disso, as sementes vieram de seu local de origem dentro de sacolas plásticas e cheias de sujeira, como pedras, terra e galhos finos, e acabaram necessitando de limpeza e separação da sujeira anteriormente ao início da assepsia, ou seja, anterior a lavagem em água corrente por 3 minutos. Além disso, era visível a deterioração de algumas das sementes, que se esfarelavam ao serem apertadas, além de apresentarem aberturas em sua extremidade exterior, conforme se pode visualizar na Figura 7.



FIGURA 7 – ASPECTO DE ALGUMAS SEMENTES de *Jatropha curcas* DA PROCEDÊNCIA NATAL.

Acredita-se que a procedência Campo Grande apresentou germinação de sementes nula devido a alguns fatores. O lote havia sido colhido no ano de 2009, ou seja, estava com aproximadamente 1 ano quando da data da realização do teste de germinação *in vitro*. Além disso, devido aos testes que estas sementes eram submetidas no Laboratório que as doou, as mesmas não necessitavam e tampouco possuíam armazenamento adequado, ficando expostas a temperatura ambiente dentro de sacos plásticos durante meses, o que provavelmente comprometeu a sua qualidade fisiológica.

Quanto à germinação, apenas duas das cinco procedências germinaram. A análise de variância das procedências pode ser visualizada na Tabela 3, e foi realizada apenas com as sementes que germinaram.

TABELA 3 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO *in vitro* DAS SEMENTES DE *Jatropha curcas* DAS PROCEDÊNCIAS JANAÚBA E SANTA VITÓRIA.

FATOR DE VARIAÇÃO	GL	S.Q.	QM	F
PROCEDÊNCIAS	1	0,44	0,44	40,47**
RESÍDUO	6	0,065	0,011	
TOTAL	7	0,5		
C.V. (%)				8,07

** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F.

GL – graus de liberdade, SQ – soma de quadrados, QM – quadrado médio, C.V. – coeficiente de variação experimental.

As procedências Janaúba – MG e Santa Vitória – MG apresentaram 99,17% e 75% de germinação, respectivamente, conforme se pode visualizar no Gráfico 2.

Castro *et al.* (2006) testaram a germinação de três procedências de *Jatropha curcas* em sementeiras. Cada procedência, a saber, Janaúba – MG, Santa Vitória – MG e Paraguai – PI compôs um tratamento. A procedência Janaúba apresentou média de germinação de 84% e a procedência Santa Vitória de 81,6%. Já a porcentagem de germinação da procedência paraguaia mostrou-se significativamente inferior, com média de germinação de 50,96% das sementes.

Acredita-se que as sementes *in vitro* apresentaram uma germinação maior do que a apresentada por Castro *et al.* (2006) devido ao melhor controle da temperatura, além de água, luz, umidade e oxigênio. Estes fatores também afetaram a rapidez na germinação, que iniciou-se após três dias de inoculação, para ambas as procedências. Além disso, esta rapidez justifica-se pela ausência de dormência nas sementes e pela retirada do tegumento externo destas. Sem a retirada do tegumento, Castro *et al.* (2006) obtiveram a germinação de sementes de *Jatropha curcas* de três procedências, dentre elas, Janaúba e Santa Vitória, ambas de Minas Gerais, apenas no oitavo dia do experimento.

Carvalho *et al.* (2002) ao avaliarem a capacidade de germinação *in vitro* de três genótipos de mamona (*Ricinus communis*) concluíram que, sementes onde o tegumento foi extraído com ou sem carúncula apresentaram uma germinação maior e mais rápida, além de menor incidência de patógenos, quando comparadas com sementes onde apenas a carúncula foi retirada.

Observa-se no Gráfico 2 que, através do teste de Tukey a 5% de probabilidade, as procedências mostraram diferença estatística significativa na germinação.

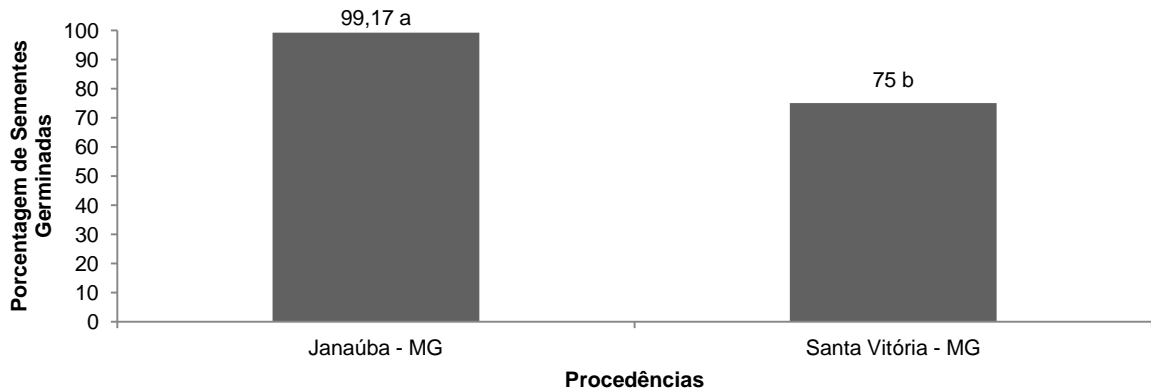


GRÁFICO 2 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO *in vitro* DAS SEMENTES DE *Jatropha curcas* DAS PROCEDÊNCIAS JANAÚBA E SANTA VITÓRIA. Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

As procedências Araçatuba – SP, Campo Grande – MS e Natal – RN não apresentaram nenhuma semente germinada, apesar das condições de temperatura, luz e umidade serem as mesmas para todas. Algumas sementes não foram contaminadas, mas tampouco germinaram. Este fato pode ter-se dado devido à baixa qualidade das sementes, pois não são conhecidas as condições de colheita, beneficiamento e armazenamento destas anteriormente à sua chegada para os testes, ou também, devido ao tipo de assepsia utilizado, que pode ter afetado apenas algumas das procedências, menos resistentes.

Farias (2008), aplicou para assepsia de sementes de *Jatropha curcas* hipoclorito de sódio 2% por períodos de tempo de 20 e 30 minutos. O primeiro tratamento apresentou taxa de contaminação de 64%; o segundo apresentou taxa de contaminação de 36%. Porém, apesar de as sementes do segundo tratamento terem sofrido uma menor contaminação, a taxa de germinação destas foi de apenas 21%, enquanto que as sementes que ficaram expostas ao hipoclorito de sódio por 20 minutos apresentaram taxa de germinação de 79%, o que demonstra que uma exposição prolongada ao hipoclorito de sódio provavelmente gera a morte dos embriões.

Faiad *et al.* (1997) testaram desinfestação de sementes de *Commiphora leptophloeos* combinando entre si diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (1, 2, 3, 4, 5 e 10%) e tempos de imersão (10, 15 e 20 minutos). Os resultados mostraram que, de maneira geral, com o aumento da concentração do hipoclorito de sódio, a porcentagem de incidência fúngica diminuiu. Porém, elevados tempos de

imersão diminuem a germinação com conseqüente perda da viabilidade. Concentrações de 5 e 10% e exposição de 15 a 20 minutos apesar de reduzir a incidência fúngica, causaram a morte das sementes.

5.2 EXPERIMENTO 2 – INDUÇÃO DE GEMAS E CALOS

5.2.1 CONTAMINAÇÃO DOS EXPLANTES

Aos sete dias de cultivo *in vitro* já se pôde observar contaminação dos explantes.

Existem, a princípio, quatro fontes potenciais de contaminação *in vitro*: a fonte de explante, o meio nutritivo, o ambiente e a habilidade do operador (PIERIK, 1997). Apesar de as sementes fornecedoras de explantes terem sido desinfestadas e não apresentarem contaminação *in vitro* após sete dias, algumas das fontes de explantes retiradas de suas plântulas (epicótilos, hipocótilos, raízes e cotilédones) contaminaram quando foram inoculadas. Uma das possíveis causas desta contaminação pode estar relacionada a cuidados no ambiente em que foram manuseadas. Oliveira *et al.* (2000) relatam que, mesmo com todos os cuidados com assepsia em biofábricas brasileiras, já foram registradas porcentagens de contaminação superiores a 30% causadas tanto por fungos como por bactérias.

A análise estatística do experimento quanto à taxa de contaminação demonstrou que, em todas as variáveis analisadas ocorreu diferença estatística significativa a 1% de probabilidade de erro pelo teste de F, conforme Tabela 4.

TABELA 4 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EFEITOS DAS PROCEDÊNCIAS, COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E FONTES DE EXPLANTE DE *Jatropha curcas* NA PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO *in vitro*.

FONTE DE VARIACÃO	GL	SQ	QM	F
Procedências	1	0,36	0,36	75,77**
Combinações entre Fitorreguladores	4	4,07	1,02	270,19**
Fonte de Explante	3	0,28	0,09	24,56**
Proc. x Comb.	4	0,6	0,15	39,63**
Proc. x F. E.	3	0,17	0,06	14,80**
Comb. x F. E.	12	1,28	0,11	28,30**
Proc. x Comb. x F. E.	12	0,84	0,07	18,64**
Tratamentos	39	7,59	0,19	51,75**
Resíduo	120	0,45	0	
Total	159	8,04		
C.V. (%)				21,85

** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F.

GL – graus de liberdade, SQ – soma de quadrados, QM – quadrado médio, C. V.– coeficiente de variação experimental, Proc. – procedências, Comb. – combinação entre fitorreguladores, F. E. – fonte de explante.

O Gráfico 3 demonstra a diferença estatística apresentada entre as duas procedências estudadas. Pode-se notar através deste que a procedência Santa Vitória – MG apresentou uma contaminação maior, diferindo estatisticamente da procedência Janaúba – MG.

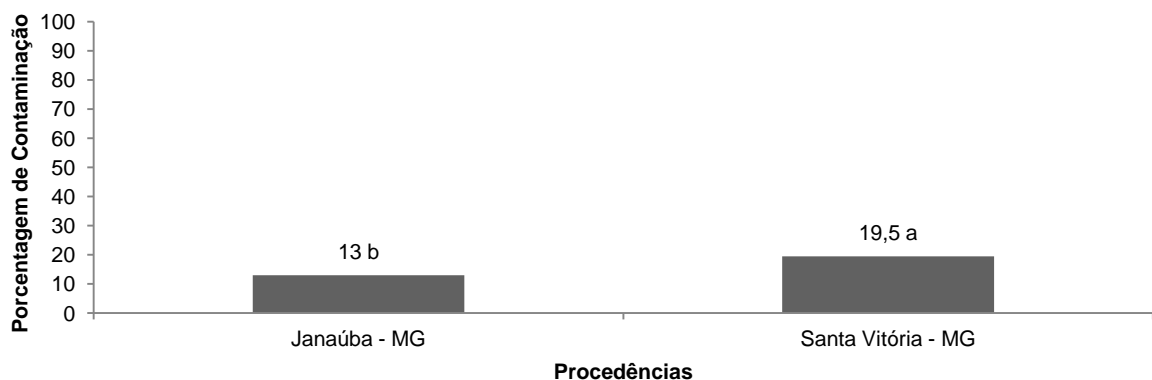


GRÁFICO 3 – PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO *in vitro* DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DAS PROCEDÊNCIAS.

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Nas combinações de fitorreguladores, as médias da porcentagem de contaminação apresentaram diferença significativa, conforme demonstrado pelo Gráfico 4.

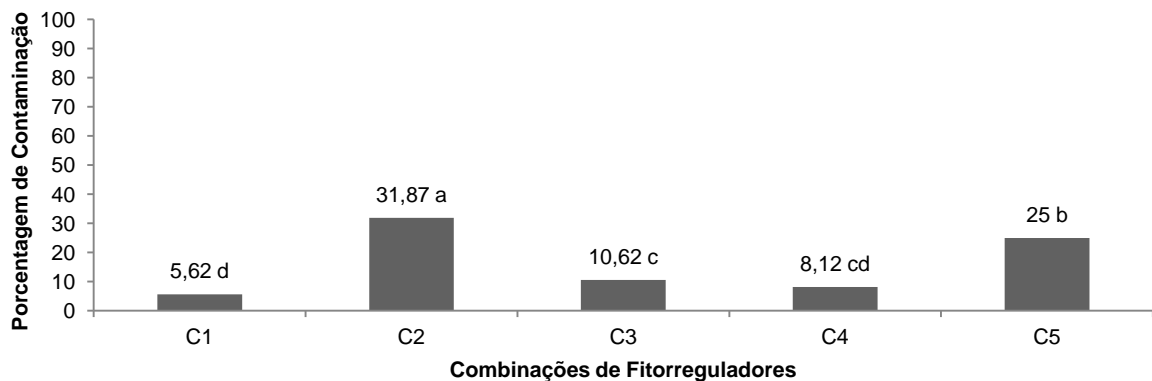


GRÁFICO 4 – PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO *in vitro* DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DAS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

Observa-se que a combinação C2, composta de meio MS acrescido de 27,8 μ M de KIN e 0,5 μ M de AIB apresentou a porcentagem de contaminação mais elevada, diferindo estatisticamente das demais. Já a combinação com menor taxa de contaminação foi a C1, composta de meio MS acrescido de 27,8 μ M de BAP e 0,5 μ M de AIB.

Não foram encontrados relatos para *Jatropha* spp. de que diferentes quantidades de fitorreguladores aumentam ou diminuem a contaminação dos explantes.

A comparação da germinação entre as fontes de explante utilizadas está apresentada no Gráfico 5. As porcentagens médias das análises apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

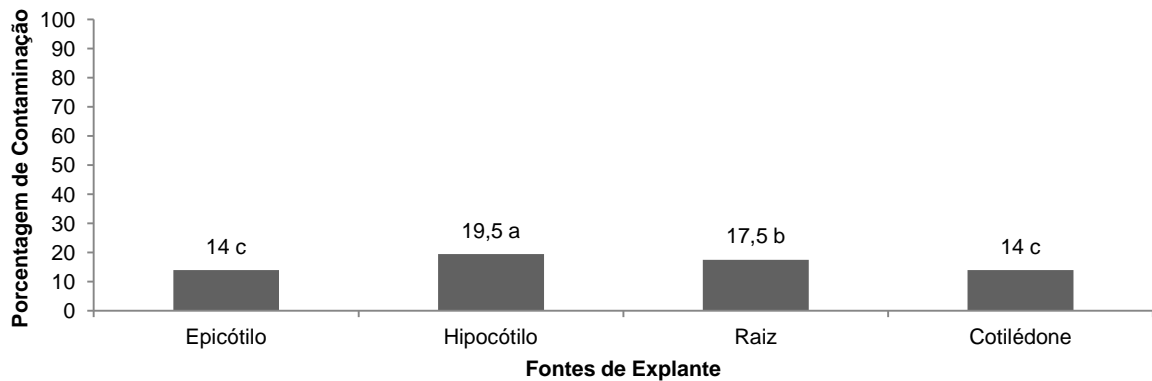


GRÁFICO 5 – PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO *in vitro* DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DAS FONTES DE EXPLANTE.

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Pode-se visualizar através do Gráfico 5 que a fonte de explante hipocótilo apresentou a maior taxa de contaminação, diferindo estatisticamente das demais fontes de explantes. Apesar disto, estas taxas de contaminação variaram pouco entre si, indo desde 14% até 19,5%.

A interação entre procedências e combinações de fitorreguladores foi significativa ($p < 0,01$) e apresentou diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Conforme se pode visualizar com a Tabela 5, a maior taxa de contaminação apresentada foi pela combinação C2 da procedência Santa Vitória – MG, com porcentagem média de 43,75%.

A maior taxa de contaminação para Janaúba – MG, de 22,5%, ocorreu na combinação C5, porém, este valor mostrou-se significativamente inferior à combinação C5 da procedência Santa Vitória – MG.

TABELA 5 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS DE *Jatropha curcas* E AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.

COMBINAÇÕES	PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO	
	Janaúba - MG	Santa Vitória - MG
C1 27,8 µM BAP + 0,5 µM de AIB	3,75 cB	7,5 cA
C2 27,8 µM KIN + 0,5 µM de AIB	20 aB	43,75 aA
C3 27,8 µM S.A. + 0,5 µM de AIB	12,5 bA	8,75 cB
C4 27,8 µM S.A. + 2,3 µM de KIN + 0,5 µM de AIB	6,25 cB	10 cA
C5 9,0 µM TDZ + 0,5 µM de AIB	22,5 aB	27,5 bA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A interação entre procedências e fontes de explantes, verificada na Tabela 6, foi significativa ($p < 0,01$) e apresentou diferença estatística das médias através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A maior taxa de contaminação ocorreu para a procedência Santa Vitória – MG com a fonte de explante raiz, porém, este resultado não diferiu estatisticamente dos explantes do tipo hipocótilo. Para Janaúba – MG, a maior taxa de contaminação ocorreu para explantes de hipocótilo, conforme Tabela 6.

TABELA 6 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS FONTES DE EXPLANTES DE *Jatropha curcas*.

PROCEDÊNCIAS	FONTES DE EXPLANTE			
	Epicótilo	Hipocótilo	Raiz	Cotilédone
Janaúba – MG	12 aB	18 bA	11 bB	11 bB
Santa Vitória – MG	16 aB	21 aA	24 aA	17 aB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A interação entre as combinações de fitorreguladores e fontes de explantes foi significativa ($p < 0,01$) e apresentou diferença estatística das médias através do teste de Tukey a 5% de probabilidade, conforme Tabela 7.

TABELA 7 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E AS FONTES DE EXPLANTE DE *Jatropha curcas*.

	COMBINAÇÕES	FONTES DE EXPLANTE			
		Epicótilo	Hipocótilo	Raiz	Cotilédone
C1	27,8 µM BAP + 0,5 µM de AIB	10 cA	5 dB	5 dB	2,5 cB
C2	27,8 µM KIN + 0,5 µM de AIB	20 aC	47,5 aA	37,5 aB	22,5 bC
C3	27,8 µM S.A. + 0,5 µM de AIB	7,5 dB	12,5 cA	15 cA	7,5 cB
C4	27,8 µM S.A. + 2,3 µM de KIN + 0,5 µM de AIB	15 bA	7,5 dB	5 dB	5 cB
C5	9,0 µM TDZ + 0,5 µM de AIB	17,5 abC	25 bB	25 bB	32,5 aA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observa-se que a maior taxa de contaminação, na Tabela 7, foi apresentada na combinação C2 para o explantes do tipo hipocótilo, com média de 47,5%.

Varricchio *et al.* (2008) inocularam em meio MS segmentos nodais de *Euphorbia tirucalli* previamente desinfestados com água destilada, solução de fungicida Benlat® com concentração de 1 mg/L e álcool 70%, obtendo, ainda assim, uma contaminação de 74,4% dos explantes.

Campos (2007) inoculou *in vitro* segmentos nodais de *Jatropha elliptica* desinfestados com lavagem e imersão em solução de 1% de NaClO em meio de cultura MS. A taxa de contaminação dos explantes foi de 19,3%, a maioria deles contaminado por fungos do gênero *Fusarium*. O mesmo autor coloca que o estabelecimento *in vitro* de explantes provenientes de material *in vivo* é uma das fases mais críticas da propagação, já que são vários os fatores que afetam o índice de sobrevivência, como os agentes patogênicos, a resistência do explante aos procedimentos de desinfestação, as taxas de oxidação e a adequação do material às condições de cultivo.

Após a apresentação destes resultados, pode-se resumir que as maiores taxas de contaminação foram observadas na procedência Santa Vitória – MG. Quanto às combinações entre fitorreguladores, aquela que apresentou as porcentagens mais elevadas de contaminação foi a combinação C2, composta de meio de cultura MS adicionado de 27,8 µM de KIN e 0,5 µM de AIB. A fonte de explante com maiores taxas de contaminação foi hipocótilo.

5.2.2 OXIDAÇÃO DOS EXPLANTES

Aos sete dias de cultivo dos explantes *in vitro* já foi possível observar oxidação nos mesmos.

Este processo ocorre devido à liberação de compostos fenólicos no meio de cultura. As plantas perenes lenhosas são consideradas ricas em substâncias derivadas do metabolismo secundário como os polifenóis. Os compostos fenólicos são precursores da síntese da lignina. Estas substâncias, além de exercerem papel importante no metabolismo destas espécies, também atuam na defesa contra predadores e microorganismos. Porém, quando liberadas pela planta em meio de cultura *in vitro*, causam a oxidação fenólica dos explantes (FREITAS *et al.*, 2009). Esta oxidação é considerada um dos aspectos mais sérios relacionados com a cultura de tecidos, pois estes compostos escurecem a planta e impedem o seu crescimento (MELO *et al.*, 2001).

A análise de variância do experimento quanto à oxidação dos explantes pode ser observada na Tabela 8. Em todas as variáveis analisadas ocorreu diferença estatística significativa ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste de F.

TABELA 8 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EFEITOS DAS PROCEDÊNCIAS, COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E FONTES DE EXPLANTE DE *Jatropha curcas* NA PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO *in vitro*.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
Procedências	1	0,78	0,78	81,67**
Combinações entre Fitorreguladores	4	5,25	1,13	137,4**
Fonte de Explante	3	2,94	0,98	102,73**
Proc. x Comb.	4	4,02	1,01	105,35**
Proc. x F. E.	3	0,25	0,08	8,76**
Comb. x F. E.	12	8,79	0,73	70,75**
Proc. x Comb. x F. E.	12	3,76	0,31	32,86**
Tratamentos	39	25,8	0,66	69,29**
Resíduo	120	1,15	0,01	
Total	159	26,95		
C.V. (%)				22,04

** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F.

GL – graus de liberdade, SQ – soma de quadrados, QM – quadrado médio, C. V. – coeficiente de variação experimental, Proc. – procedências. Comb. – combinações entre fitorreguladores, F. E. – fontes de explante.

Os gráficos a seguir demonstram as diferenças estatísticas para as variáveis e suas interações através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O Gráfico 6 demonstra que a procedência Santa Vitória – MG apresentou uma porcentagem de oxidação maior, diferindo estatisticamente da procedência Janaúba – MG.

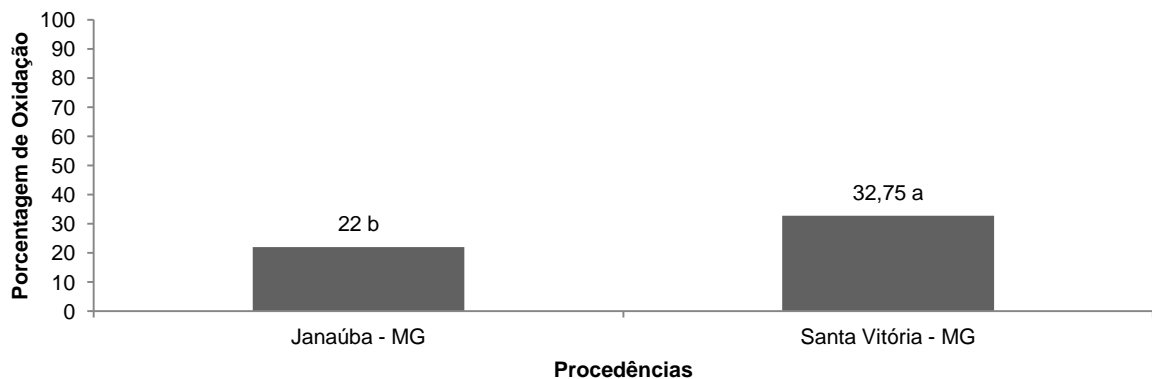


GRÁFICO 6 – PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO *in vitro* DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DAS PROCEDÊNCIAS.

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O Gráfico 7 demonstra a diferença estatística apresentada pelas combinações de fitorreguladores. A oxidação dos explantes apresentou taxas mais elevadas para a combinação C1, composta de meio MS acrescido de 27,8 μM de BAP e 0,5 μM de AIB, e para a combinação C4, composta de meio MS acrescido de 27,8 μM de sulfato de adenina, 2,3 μM de KIN e 0,5 μM de AIB, não diferindo estatisticamente entre si e diferindo estatisticamente dos demais tratamentos.

Apesar de a combinação C4 ter apresentado as taxas mais elevadas de oxidação, a combinação C3, contendo a mesma quantidade de sulfato de adenina e AIB, sem adição de KIN, apresentou a menor taxa de oxidação. Com isto, pode-se concluir que o sulfato de adenina não teve papel relevante na oxidação dos explantes da combinação C4.

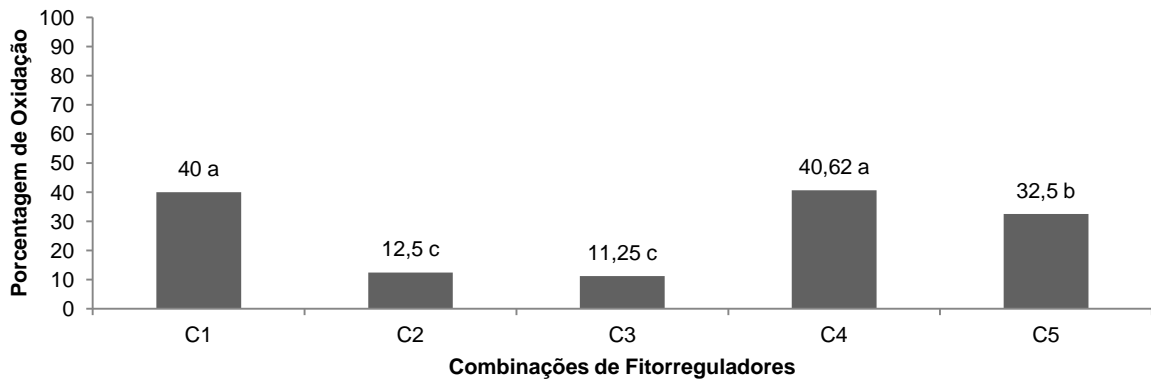


GRÁFICO 7 – PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO *in vitro* DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DAS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

As diferenças entre as combinações de fitorreguladores, vistas no Gráfico 7, se mostraram significativas porque as citocininas afetam tanto a atividade quanto a concentração da peroxidase, enzima que polimeriza compostos fenólicos e outros sistemas fenólicos oxidativos (GALSTON; PURVES, 1960).

Porém, para Costa *et al.* (2006), em experimentos com *Musa spp.*, aumentos na concentração de 6-benzilaminopurina no meio de cultura, variando de 0 a 6 mg/L, não alteraram significativamente a taxa de oxidação dos explantes, a qual diminuiu mais ainda quando se associou carvão ativado no meio de cultura numa proporção de 3 g/L. Apesar disto, esta adição, de maneira geral, afetou negativamente a taxa de multiplicação dos explantes.

A adição de carvão ativado evita o acúmulo de fenóis, sendo este utilizado em diversas culturas com concentrações que variam desde 0,2 até 5 g/L. Este composto pode, porém, absorver reguladores de crescimento e outros componentes do meio, causando toxicidade à planta (MELO *et al.*, 2001).

Quanto à 6-benzilaminopurina, o mesmo observaram Sato *et al.* (2004) ao testarem a oxidação de *Gallezia garazema*, onde diferentes concentrações deste fitorregulador não tiveram efeito sobre a oxidação de explantes em relação à testemunha, a qual não continha o fitorregulador.

Maciel *et al.* (2003) não registraram ocorrência de oxidação em explantes de *Coffea arabica* inoculados em meios de cultura suplementados com diferentes quantidades de cinetina, a saber, 0, 2, 4 e 8 mg/L.

Ainda no Gráfico 7, observa-se que meio de cultura com o fitorregulador TDZ numa proporção de 9 μM também apresentou elevada oxidação, com percentagem média de 32,5%. Em contrapartida, Ledo *et al.* (2002), ao avaliarem a oxidação de *Theobroma grandiflorum* constataram que o TDZ induz menor oxidação em segmentos de folhas jovens, pois explantes inoculados em meio com 1, 2 e 3 μM de TDZ apresentaram uma percentagem de oxidação de 6,7%, 3,33% e 3,33%, respectivamente.

O Gráfico 8 demonstra a diferença estatística apresentada entre as diferentes fontes de explantes. Raízes apresentaram a percentagem mais elevada de oxidação, diferindo estatisticamente das demais.

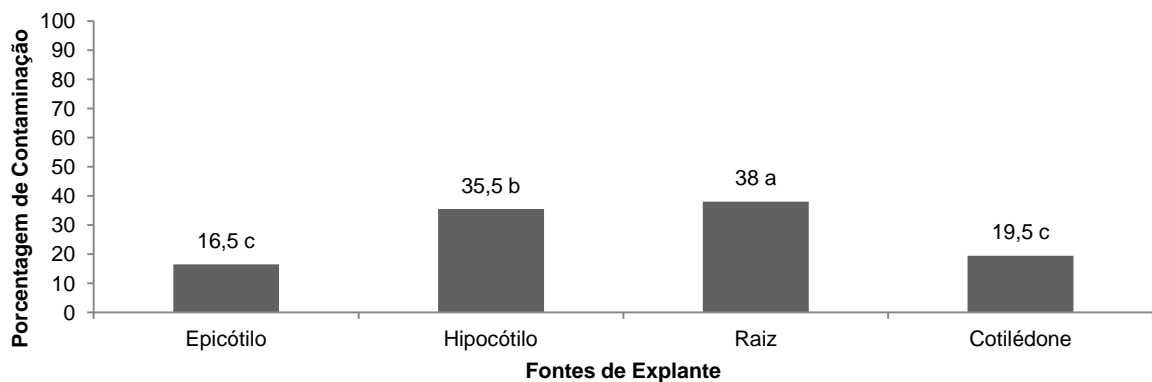


GRÁFICO 8 – PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO *in vitro* DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DAS FONTES DE EXPLANTE.

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Soomro e Memon (2007) utilizaram hipocótilos e cotilédones para formação de cultura de calos de *Jatropha curcas* inoculados em meio de cultura MS com reguladores de crescimento 2,4-D, BA e GA₃, além de água de coco. Estes autores colocam que, no começo da cultura, foi necessário fazer subcultivos do material a cada 15 dias, pois os calos aparentavam cor escura e o crescimento cessava, devido à oxidação do material pela liberação de compostos fenólicos. Porém esta oxidação não foi expressa em quantidades ou percentagens.

Conforme Gráfico 8, observa-se que a oxidação das raízes foi mais elevada, quando comparadas à outras fontes de explante. Acredita-se que estas fontes de

explante liberaram compostos fenólicos em maiores quantidades, o que ocasionou este processo.

Quanto ao seu comportamento nos explantes, a oxidação de ambas as procedências ocorreu da seguinte forma: a) para epicótilos, a oxidação foi mais evidente nas extremidades, atingindo calos, brotos e folíolos recém-formados; b) os hipocótilos oxidaram desde a extremidade inferior até a sua totalidade; c) tanto raízes quanto cotilédones apresentaram oxidação em toda a sua extensão, e para os últimos, esta se iniciou nas extremidades até chegar ao interior dos explantes.

As figuras a seguir, a primeira de explantes do tipo epicótilo, hipocótilo, raiz e cotilédone da procedência Janaúba – MG (Figura 8) e a segunda dos mesmos tipos de explantes, porém da procedência Santa Vitória – MG (Figura 9), demonstram o aspecto visual da oxidação.



FIGURA 8 - ASPECTO GERAL DA OXIDAÇÃO *in vitro* DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* DA PROCEDÊNCIA JANAÚBA – MG APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Epicótilo; b. Hipocótilo; c. Raiz; d. Cotilédone.



FIGURA 9 - ASPECTO GERAL DA OXIDAÇÃO *in vitro* DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* DA PROCEDÊNCIA SANTA VITÓRIA – MG APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Epicótilo; b. Hipocótilo; c. Cotilédone; d. Raiz.

A interação entre procedências e as combinações de fitorreguladores foi significativa ($p < 0,01$) e apresentou diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, conforme Tabela 9.

TABELA 9 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS DE *Jatropha curcas* E AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.

COMBINAÇÕES	PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO	
	Janaúba - MG	Santa Vitória – MG
C1 27,8 µM BAP + 0,5 µM de AIB	41,25 aA	38,75 bA
C2 27,8 µM KIN + 0,5 µM de AIB	11,25 cA	13,75 cA
C3 27,8 µM S.A. + 0,5 µM de AIB	17,5 bA	5 dB
C4 27,8 µM S.A. + 2,3 µM de KIN + 0,5 µM de AIB	18,75 bB	62,5 aA
C5 9,0 µM TDZ + 0,5 µM de AIB	21,25 bB	43,75 bA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Conforme pode ser visualizado na Tabela 9, a maior taxa de oxidação foi encontrada para a procedência Santa Vitória na combinação C4 e a menor taxa de

contaminação foi encontrada para a mesma procedência, porém para a combinação C3.

A interação entre as procedências e os tipos de explantes foi significativa ($p < 0,01$) e apresentou diferença estatística das médias através do teste de Tukey a 5% de probabilidade para as duas análises, conforme Tabela 10.

TABELA 10 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS FONTES DE EXPLANTE DE *Jatropha curcas*.

PROCEDÊNCIAS	FONTES DE EXPLANTE			
	Epicótilo	Hipocótilo	Raiz	Cotilédone
Janaúba – MG	12 bC	26 bB	36 aA	14 bC
Santa Vitória – MG	21 aB	45 aA	40 aA	25 aB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A oxidação apresentou-se mais elevada para a procedência Santa Vitória – MG em interação com hipocótilos e raízes. Observa-se que, hipocótilos e raízes, em interação com a procedência Santa Vitória – MG apresentaram resultados que, quando analisados estatisticamente, não diferem entre si.

A interação entre combinações de fitorreguladores e fontes de explantes foi significativa ($p < 0,01$) e apresentou diferença estatística das médias através do teste de Tukey a 5% de probabilidade, conforme Tabela 11. Nesta interação, a maior oxidação apresentou-se para hipocótilos da combinação C1. Já os hipocótilos da combinação C3, não apresentaram oxidação *in vitro*.

TABELA 11 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E AS FONTES DE EXPLANTE DE *Jatropha curcas*.

COMBINAÇÕES	FONTES DE EXPLANTE			
	Epicótilo	Hipocótilo	Raiz	Cotilédone
C1 27,8 µM BAP + 0,5 µM de AIB	15 bC	75 aA	65 aB	5 cD
C2 27,8 µM KIN + 0,5 µM de AIB	5 cB	15 dA	15 cA	15 bA
C3 27,8 µM S.A. + 0,5 µM de AIB	10 bcB	0 eC	15 cAB	20 bA
C4 27,8 µM S.A. + 2,3 µM de KIN + 0,5 µM de AIB	15 bC	35 cB	57,5 aA	55 aA
C5 9,0 µM TDZ + 0,5 µM de AIB	37,5 aB	52,5 bA	37,5 bB	2,5 cC

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Alguns parâmetros, além da quantidade de compostos fenólicos liberados pela planta, podem afetar a taxa de oxidação.

A metodologia de desinfestação, na qual foi utilizado hipoclorito de sódio, também pode ter afetado a taxa de oxidação dos explantes.

Erig e Schuch (2003), ao estudarem oxidação de três variedades de *Malus domestica*, a macieira, constataram que explantes desinfestados com hipoclorito de sódio apresentaram maior oxidação do que aqueles desinfestados com hipoclorito de cálcio.

Erig *et al.* (2003), ao estudarem oxidação em segmentos nodais de *Vaccinium ashei*, popularmente conhecida como mirtilo, também observaram uma maior oxidação em segmentos nodais desinfestados com hipoclorito de sódio, em comparação com o hipoclorito de cálcio.

Outro fator que pode afetar a oxidação é a luz. Segundo Freitas *et al.* (2009), o escurecimento dos explantes é menor quando estes são retirados de plantas cultivadas ou no escuro ou em baixa intensidade luminosa.

Após a apresentação destes resultados, pode-se resumir que as maiores taxas de oxidação, em todos os casos, foram observadas na procedência Santa Vitória – MG. Quanto às combinações de fitorreguladores, aquela que apresentou as porcentagens mais elevadas de oxidação, também em todos os casos, foi a combinação C1, composta de meio de cultura MS adicionado de 27,8 μM de BAP e 0,5 μM de AIB. As fontes de explante com maiores taxas de oxidação foram hipocótilos e raízes.

5.2.3 ANÁLISES QUALITATIVAS

5.2.3.1 Indução de Gemas

A análise de variância para a porcentagem de explantes que produziram gemas pode ser observada na Tabela 12. Em todas as variáveis analisadas ocorreu diferença estatística significativa ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste de F.

TABELA 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EFEITOS DAS PROCEDÊNCIAS, COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E FONTES DE EXPLANTE DE *Jatropha curcas* NA PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE GEMAS *in vitro*.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
Procedências	1	0,75	0,75	297,34**
Combinações entre Fitorreguladores	4	9,11	2,28	906,29**
Fonte de Explante	3	4,28	1,43	568,13**
Proc. x Comb.	4	0,67	0,17	66,82**
Proc. x F. E.	3	0,26	0,09	34,23**
Comb. x F. E.	12	8,88	0,74	294,39**
Proc. x Comb. x F. E.	12	1,48	0,12	49,07**
Tratamentos	39	25,44	0,65	259,45**
Resíduo	120	0,3	0	
Total	159			
C.V. (%)				11,04

** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F.

GL – graus de liberdade, SQ – soma de quadrados, QM – quadrado médio, C. V. – coeficiente de variação experimental, Proc. – procedências. Comb. – combinações entre fitorreguladores, F. E. – fontes de explante.

O Gráfico 9 demonstra a comparação entre as procedências. Observa-se que a procedência Janaúba – MG apresentou maior porcentagem de explantes que formaram gemas, diferindo estatisticamente de Santa Vitória – MG.

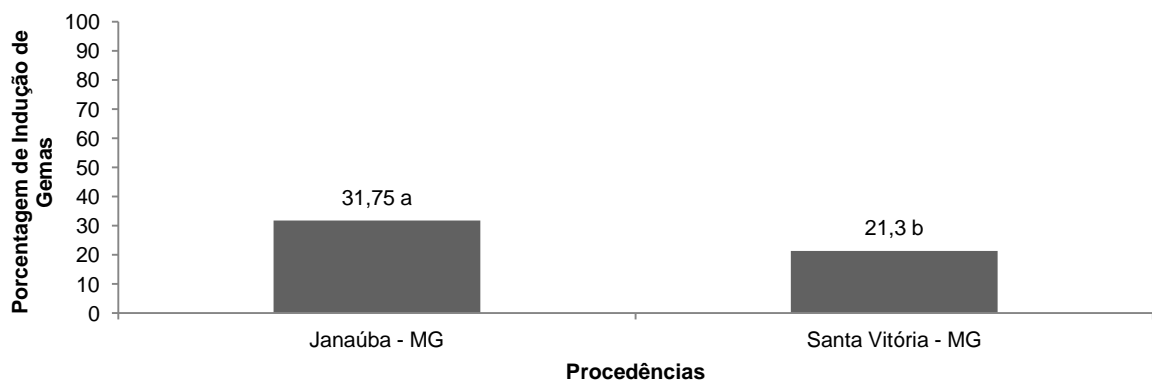


GRÁFICO 9 – PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE GEMAS *in vitro* DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DAS PROCEDÊNCIAS.

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O Gráfico 10 apresenta as porcentagens de explantes com formação de gemas quando se comparam as combinações de fitorreguladores. Percebe-se

através deste que, a combinação C1, contendo 27,8 μM de BAP e 0,5 μM de AIB apresentou a maior porcentagem de explantes que formaram gemas, diferindo estatisticamente das demais. Já os resultados inferiores foram apresentados pelas combinações C3 e C4, ambas contendo 27,8 μM de sulfato de adenina, que não diferiram estatisticamente entre si.

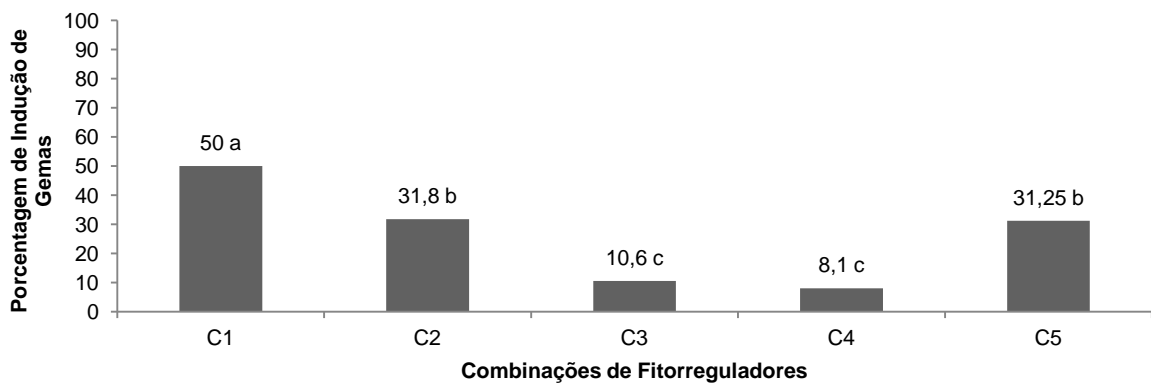


GRÁFICO 10 – PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE GEMAS *in vitro* DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DAS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. C1 – MS + 27,8 μM de BAP + 0,5 μM de AIB, C2 – MS + 27,8 μM de KIN + 0,5 μM de AIB, C3 – MS + 27,8 μM de sulfato de adenina + 0,5 μM de AIB, C4 - MS + 27,8 μM de sulfato de adenina + 2,3 μM de KIN + 0,5 μM de AIB, C5 – MS + 9 μM de TDZ + 0,5 μM de AIB.

Vianna *et al.* (2010), utilizaram gemas apicais de *Jatropha curcas* obtidas de plântulas cultivadas *in vitro* para avaliação do seu desenvolvimento em meio de cultura MS com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 mg/L). Após 15 dias, a maioria dos explantes se desenvolveu, e as gemas que estavam nos meios com 0,1 e 0,2 mg/L de BAP tiveram um crescimento mais acentuado, com o desenvolvimento de folhas e em alguns a formação de calos. Apesar disso, não houve, neste período, desenvolvimento de brotações.

Kalimuthu *et al.* (2007), utilizando explantes nodais de *Jatropha curcas* retirados de plântulas germinadas *in vitro* com 25 a 27 dias de idade, obtiveram uma porcentagem máxima de formação de brotos em 95% dos explantes do tipo segmento apical ao utilizarem 1,5 mg/L de BAP, 0,1 mg/L de KIN e 0,05 mg/L de AIA, e de 100% em explantes do tipo segmento nodal, com esta mesma concentração. Também concluíram que, de todas as concentrações testadas com

estes três fitorreguladores, a que forneceu menores porcentagens para ambos os tipos de explantes foi a combinação de 3,0 mg/L de BAP, 0,5 mg/L de KIN e 0,05 mg/L de AIA, com formação de gemas em 50% dos explantes do tipo segmento apical e em 53% dos explantes do tipo gemas.

Ao contrário dos resultados obtidos aqui, Samba *et al.* (2011) obtiveram 95% de explantes com formação de gemas quando inocularam segmentos nodais de *Jatropha curcas* em meio MS com adição de 2 g/L de carvão ativado, 25 g/L de sulfato de adenina e 2 mg/L de BAP.

Kumar *et al.* (2010), obtiveram bons resultados para *Jatropha curcas* inoculado em meio MS com TDZ.

O Gráfico 11 demonstra a porcentagem de fontes de explantes que formaram gemas. Nota-se através dele que, a maior porcentagem de formação de gemas está nos epicótilos, diferindo estatisticamente das demais fontes.

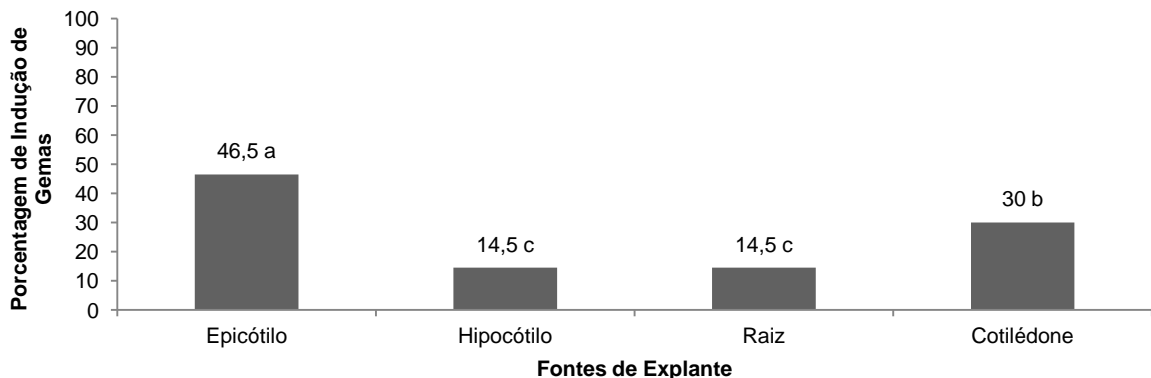


GRÁFICO 11 – PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE GEMAS *in vitro* DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DAS FONTES DE EXPLANTE.

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Diversos autores obtiveram respostas significativas com a espécie *Jatropha curcas* quando inocularam *in vitro* epicótilos (SILVA *et al.*, 2008; WARAKAGODA; SUBASINGHE, 2009) hipocótilos (SOOMRO; MEMON, 2007) e cotilédones (SOOMRO; MEMON, 2007; DEORE; JOHNSON, 2008; KUMAR *et al.*, 2010). Porém, não foram encontrados relatos da espécie quanto à inoculação de raízes.

A interação entre as procedências e as combinações entre fitorreguladores mostrou que a maior porcentagem de indução de gemas aconteceu para Santa Vitória na combinação C1, porém esta não diferiu estatisticamente de Janaúba – MG, conforme se pode visualizar na Tabela 13.

TABELA 13 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE GEMAS *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS DE *Jatropha curcas* E AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.

COMBINAÇÕES	PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE GEMAS	
	Janaúba - MG	Santa Vitória - MG
C1 27,8 µM BAP + 0,5 µM de AIB	48,75 aA	51,25 aA
C2 27,8 µM KIN + 0,5 µM de AIB	42,5 bA	21,25 bB
C3 27,8 µM S.A. + 0,5 µM de AIB	12,5 cA	8,75 cA
C4 27,8 µM S.A. + 2,3 µM de KIN + 0,5 µM de AIB	11,25 cA	5 cB
C5 9,0 µM TDZ + 0,5 µM de AIB	42,5 bA	20 bB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Já na interação entre as procedências e as fontes de explante, demonstrou-se que a melhor porcentagem de indução de gemas aconteceu para Janaúba com explantes do tipo epicótilo, conforme Tabela 14.

TABELA 14 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE GEMAS *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS FONTES DE EXPLANTE DE *Jatropha curcas*.

PROCEDÊNCIAS	FONTES DE EXPLANTE			
	Epicótilo	Hipocótilo	Raiz	Cotilédone
Janaúba – MG	56 Aa	18 aC	19 Ac	33 aB
Santa Vitória – MG	37 bA	11 bC	10 bC	27 bB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A Tabela 15 mostra a análise estatística da interação entre as combinações de fitorreguladores e as fontes de explante. Através desta, percebe-se que esta interação demonstrou que a melhor porcentagem de indução de gemas aconteceu para cotilédones na combinação C1.

TABELA 15 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE GEMAS *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E AS FONTES DE EXPLANTE DE *Jatropha curcas*.

COMBINAÇÕES	FONTES DE EXPLANTE			
	Epicótilo	Hipocótilo	Raiz	Cotilédone
C1 27,8 µM BAP + 0,5 µM de AIB	60 aB	17,5 bD	30 aC	92,5 aA
C2 27,8 µM KIN + 0,5 µM de AIB	67,5 aA	35 aB	25 aB	0 cC
C3 27,8 µM S.A. + 0,5 µM de AIB	37,5 bA	2,5 dB	2,5 cB	0 cB
C4 27,8 µM S.A. + 2,3 µM de KIN + 0,5 µM de AIB	25 cA	7,5 dB	0 cC	0 cC
C5 9,0 µM TDZ + 0,5 µM de AIB	42,5 bB	10 cC	15 bC	57,5 bA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nota-se que as raízes da combinação C4 e os cotilédones das combinações C2, C3 e C4, apesar de manterem-se vivas, não apresentaram produção de gemas.

Kumar *et al.* (2010) ao inocularem explantes cotiledonares de *Jatropha curcas* em meio de cultura MS com adição dos fitorreguladores TDZ e BAP, obtiveram uma média de aproximadamente 93% de explantes com formação de gemas quando do uso de 9,08 µM de TDZ, sem adição de BAP.

Deore e Johnson (2008) utilizaram discos foliares retirados de plantas de *Jatropha curcas* germinadas *in vitro* com dois meses de idade para indução de brotos. Para isso, utilizaram meio de cultura MS com diferentes concentrações de TDZ (2,27 e 4,55 µM), BAP (2,22 e 4,44 µM) e AIB (0,49 e 2,46 µM), combinados entre si. A maior porcentagem de explantes responsivos à indução de brotos, com medida de 53,5%, foi encontrada quando 2,27 µM de TDZ foram combinados com 2,22 µM de BAP e 0,49 µM de AIB, após o período de 4 a 6 semanas.

Após apresentação das análises, resume-se que Janaúba – MG apresentou os melhores resultados para explantes que induziram gemas, exceto na interação das procedências com as combinações entre fitorreguladores, onde Santa Vitória – MG resultou em uma média maior. Quanto às combinações de fitorreguladores, o meio de cultura MS adicionado de 27,8 µM de BAP e 0,5 µM de AIB apresentou os melhores resultados. Epicótilos, de maneira geral, apresentaram os melhores resultados para explantes que formaram gemas, porém, na interação entre fontes de explantes e combinações de fitorreguladores, cotilédones forneceram uma média maior.

5.2.3.2 Coloração das Gemas

Para Janaúba, ao final dos 60 dias, a coloração das gemas formadas nos explantes apresentou-se da seguinte maneira: a) os epicótilos de todas as combinações de fitorreguladores formaram gemas de coloração verde, exceto a combinação C1, que formou gemas de coloração amarela, conforme Figura 10; b) os hipocótilos de todas as combinações de fitorreguladores apresentaram gemas de coloração verde, conforme Figura 11; c) as raízes das combinações C1, C2 e C5 formaram gemas de coloração verde, as demais combinações não formaram gemas, conforme Figura 12; d) os cotilédones das combinações C1 e C5 apresentaram coloração verde, e as demais combinações não formaram gemas, conforme Figura 13.



FIGURA 10 - ASPECTO DA COLORAÇÃO DAS GEMAS DESENVOLVIDAS NOS EPICÓTILOS DA PROCEDÊNCIA JANAÚBA – MG. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.
 C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

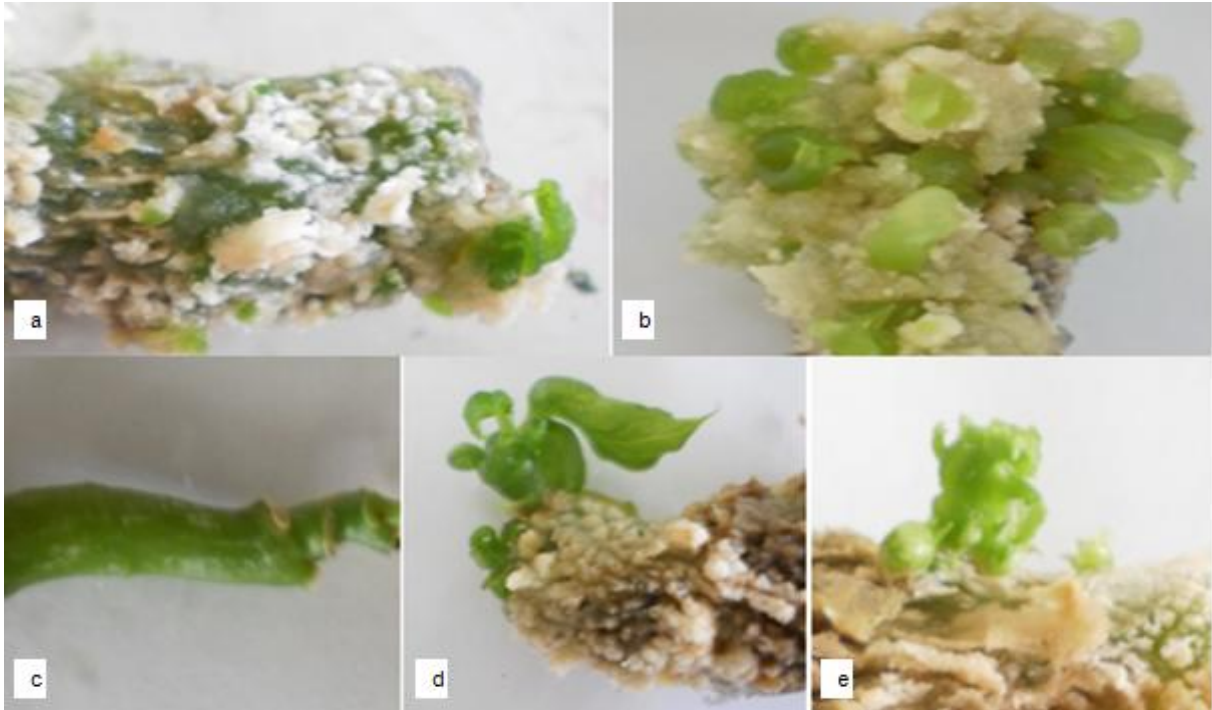


FIGURA 11 - ASPECTO DA COLORAÇÃO DAS GEMAS DESENVOLVIDAS NOS HIPOCÓTILOS DA PROCEDÊNCIA JANAÚBA – MG. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.

C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

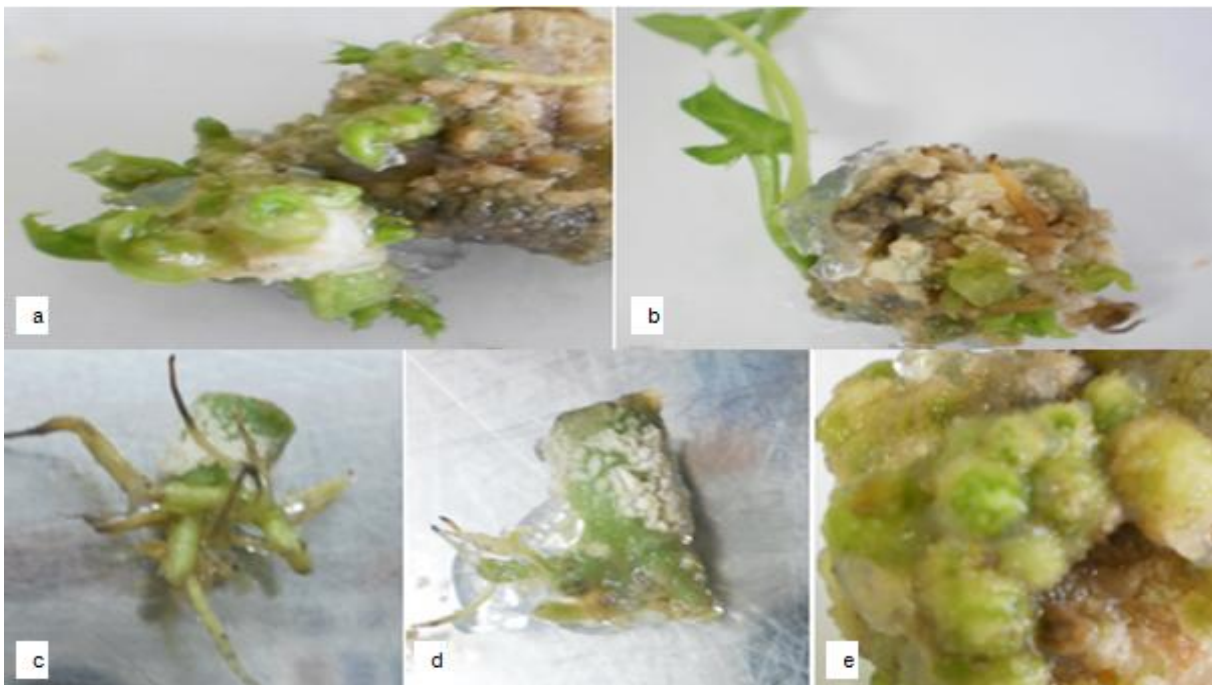


FIGURA 12 - ASPECTO DA COLORAÇÃO DAS GEMAS DESENVOLVIDAS NAS RAÍZES DA PROCEDÊNCIA JANAÚBA – MG. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.

C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

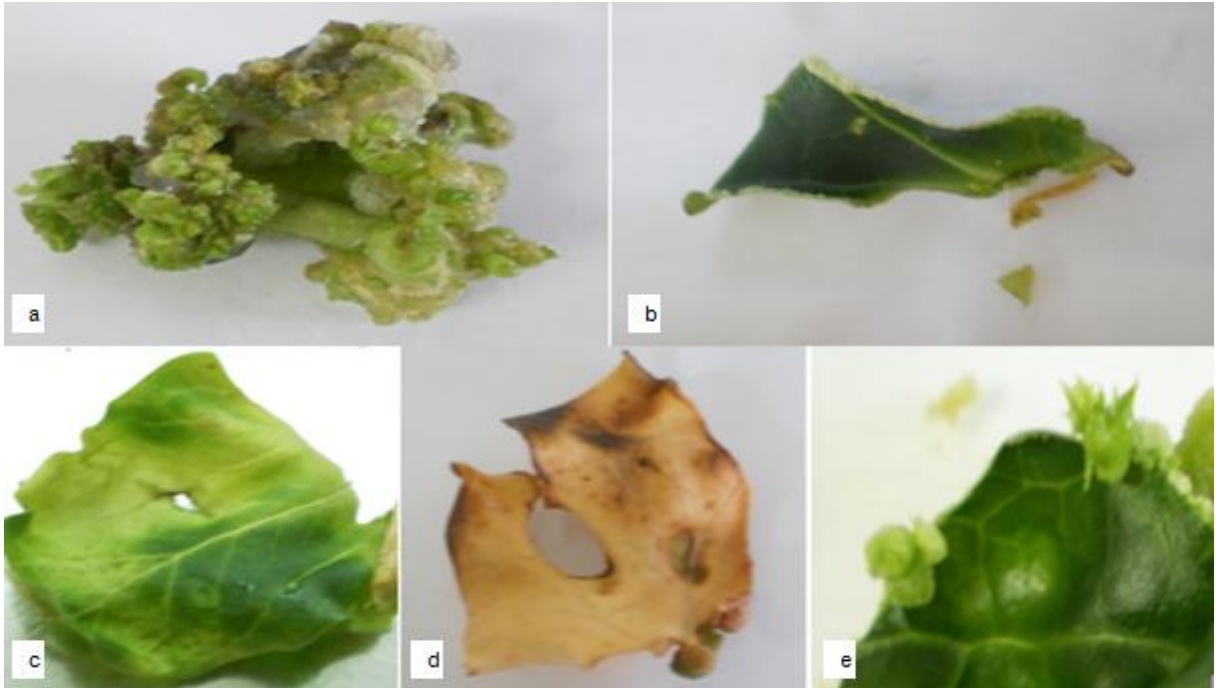


FIGURA 13 - ASPECTO DA COLORAÇÃO DAS GEMAS DESENVOLVIDAS NOS COTILÉDONES DA PROCEDÊNCIA JANAÚBA – MG. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.

C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

Para Santa Vitória, a coloração das gemas que foram formadas apresentou-se da seguinte maneira: a) os epicótilos apresentaram coloração verde, sem exceção, conforme Figura 14; b) os hipocótilos das combinações de fitorreguladores C1, C2 e C5 apresentaram gemas de coloração verde, os da combinação C4 de coloração amarela, e a combinação C3 não formou gemas, conforme Figura 15; c) as raízes apresentaram gemas de coloração verde, exceto a combinação C4, a qual não formou gemas, conforme Figura 16; d) os cotilédones das combinações C1 e C5 apresentaram gemas de coloração verde e as combinações C2, C3 e C4 não formaram gemas, conforme Figura 17.



FIGURA 14 - ASPECTO DA COLORAÇÃO DAS GEMAS DESENVOLVIDAS NOS EPICÓTILOS DA PROCEDÊNCIA SANTA VITÓRIA – MG. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.

C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

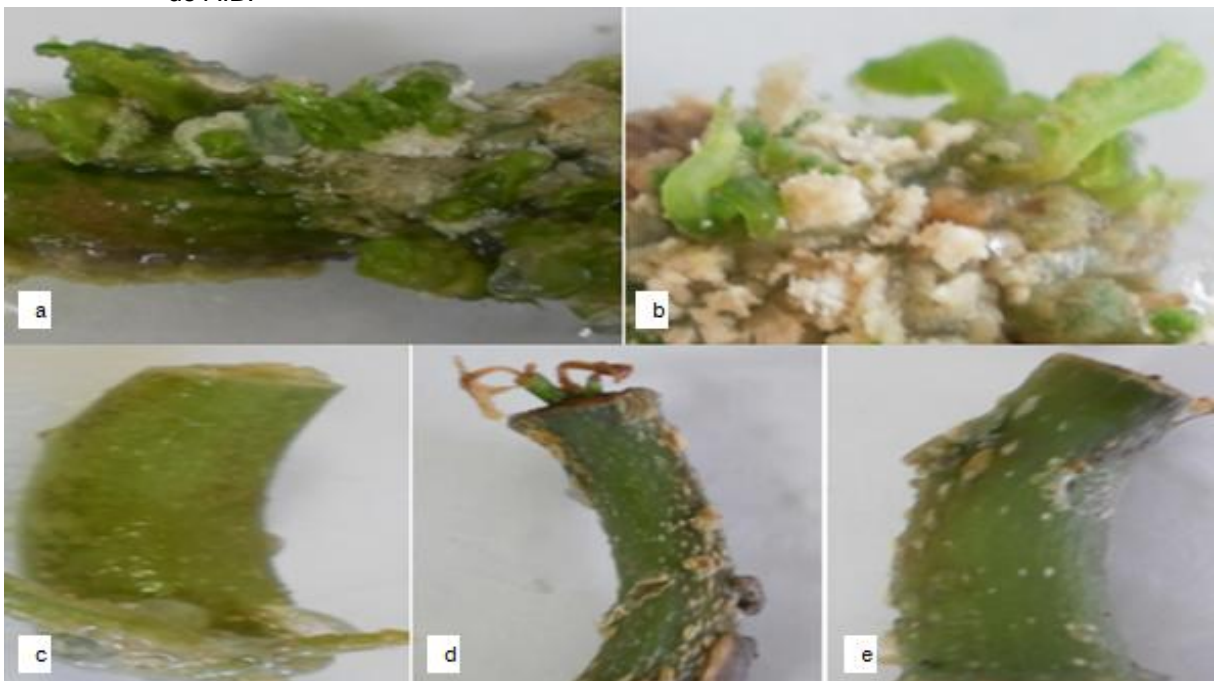


FIGURA 15 - ASPECTO DA COLORAÇÃO DAS GEMAS DESENVOLVIDAS NOS HIPOCÓTILOS DA PROCEDÊNCIA SANTA VITÓRIA – MG. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.

C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

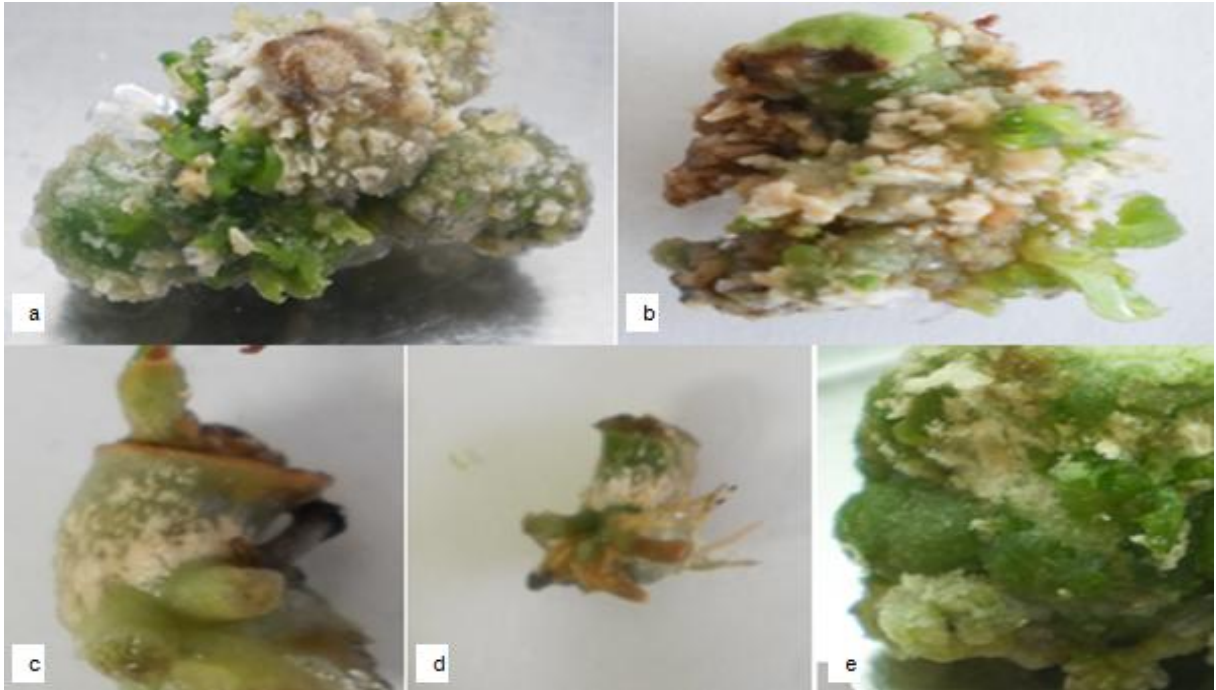


FIGURA 16 - ASPECTO DA COLORAÇÃO DAS GEMAS DESENVOLVIDAS NAS RAÍZES DA PROCEDÊNCIA SANTA VITÓRIA – MG. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.

C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.



FIGURA 17 - ASPECTO DA COLORAÇÃO DAS GEMAS DESENVOLVIDAS NOS COTILÉDONES DA PROCEDÊNCIA SANTA VITÓRIA – MG. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.

C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

A análise de variância para a variável coloração de gemas pode ser visualizada na Tabela 16. De todas as análises feitas com as fontes de variação, apenas as procedências em interação com as colorações não apresentaram significância. As demais fontes de variação e suas interações apresentaram significância pelo teste de F a 1% de probabilidade de erro.

TABELA 16 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EFEITOS DAS PROCEDÊNCIAS, COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E FONTES DE EXPLANTE DE *Jatropha curcas* NA COLORAÇÃO DE GEMAS *in vitro*.

FONTE DE VARIACÃO	GL	SQ	QM	F
Procedências	1	0,43	0,43	195,29**
Combinações entre Fitorreguladores	4	4,34	1,09	494,49**
Fonte de Explante	3	3,16	1,05	479,75**
Tamanhos	1	11,4	11,4	5194,59**
Proc. x Comb.	4	0,42	0,1	47,56**
Proc. x F. E.	3	0,18	0,06	27,33**
Proc. x Col.	1	0	0	0,69 ^{ns}
Comb. x F. E.	12	4,54	0,38	172,29**
Comb. x Col.	4	3,13	0,78	356,69**
F. E. x Col.	3	0,47	0,16	71,34**
Proc. x Comb. x F. E.	12	0,74	0,61	27,99**
Proc. x Comb. x Col.	4	1,74	0,44	198,18**
Proc. x F. E. x Col.	3	1,04	0,35	158,12**
Comb. x F. E. x Col.	12	7,54	0,63	286,29**
Proc. x Comb. x F. E x Col.	12	2,55	0,21	96,96**
Tratamentos	79	41,68	0,53	240,38**
Resíduo	240	0,53	0	
Total	319	42,21		
C.V. (%)				19,63

** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F; ^{ns} não significativo ao nível de 1% e de 5% de probabilidade de erro pelo teste de F.

GL – graus de liberdade, SQ – soma de quadrados, QM – quadrado médio, C. V.– coeficiente de variação experimental, Proc. – procedências. Comb. – combinações entre fitorreguladores, F. E. – fontes de explante, Col – colorações.

A porcentagem dos explantes que formaram gemas, segundo a sua coloração, pode ser visualizada no Gráfico 12. De todos os explantes do experimento, 24% formaram gemas de cor verde e 2,4% formaram gemas da cor amarela. Os demais explantes não formaram gemas, oxidaram ou contaminaram.

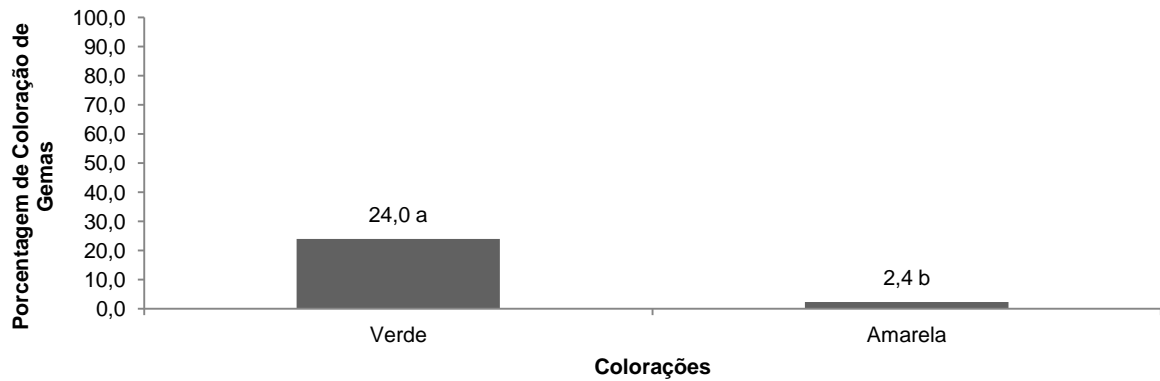


GRÁFICO 12 – PORCENTAGEM DE COLORAÇÃO DE GEMAS *in vitro* DE EXPLANTES DE *Jatropha curcas*.
Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Quando em interação, conforme já visualizado na Tabela 16, as procedências e as colorações não mostraram diferença estatística pelo teste de F.

Já as combinações de fitorreguladores, quando em interação com as colorações, apresentaram diferença estatística significativa a 1% de probabilidade de erro pelo teste de F. A Tabela 17 demonstra a diferença estatística das médias através do Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 17 – MÉDIAS DA PORCENTAGEM DAS DIFERENTES COLORAÇÕES DAS GEMAS DE *Jatropha curcas* DESENVOLVIDAS *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E COLORAÇÕES.

COMBINAÇÕES	COLORAÇÕES	
	Verde	Amarela
C1 27,8 µM BAP + 0,5 µM de AIB	42,5 aA	7,5 aB
C2 27,8 µM KIN + 0,5 µM de AIB	31,8 bA	0 cB
C3 27,8 µM S.A. + 0,5 µM de AIB	8,1 cA	2,5 bB
C4 27,8 µM S.A. + 2,3 µM de KIN + 0,5 µM de AIB	7,5 cA	0,6 bcB
C5 9,0 µM TDZ + 0,5 µM de AIB	30 bA	1,25 bB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nota-se que a combinação C1, composta de 27,8 µM de BAP e 0,5 µM de AIB apresentou a maior porcentagem de explantes com formação de gemas tanto da cor verde quanto da cor amarela. Também é visível na Tabela 17 que, em todas as

combinações, as porcentagens de explantes de coloração verde foram superiores às de coloração amarela.

A interação das fontes de explantes com as colorações também mostrou diferença significativa a 1% de erro pelo teste de F. As médias apresentaram diferença estatística e estão dispostas na Tabela 18.

TABELA 18 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DAS DIFERENTES COLORAÇÕES DAS GEMAS DE *Jatropha curcas* DESENVOLVIDAS *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS FONTES DE EXPLANTE E COLORAÇÕES.

FONTES DE EXPLANTE	COLORAÇÕES	
	Verde	Amarela
Epicótilo	37,5 aA	9 aB
Hipocótilo	14 cA	0,5 bB
Raiz	14,5 cA	0 bB
Cotilédone	30 bA	0 bB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Epicótilos apresentaram a maior porcentagem de explantes que formaram gemas de coloração verde. Neste caso, cotilédones e raízes não formaram gemas de coloração amarela e, como anteriormente, as médias para gemas de cor verde são maiores do que as de cor amarela, indicando maior formação daquelas, conforme Tabela 18.

As mudanças na coloração, tanto das combinações de fitorreguladores quanto das fontes de explantes, ocorreram durante o processo de divisão e crescimento dos explantes. Os explantes formaram e desenvolveram-nas na coloração verde. O aspecto verde destes tecidos indica a sua sobrevivência (ERIG; SCHUCH, 2003). Com o passar do tempo, a maioria cresceu e permaneceu nesta coloração, mas algumas apresentaram mudança da cor verde para amarela, indicando início de processo de seca e morte das gemas.

5.2.3.3 Indução de Calos

Os calos são massas celulares não diferenciadas que se originam da proliferação desordenada a partir de tecidos ou órgãos cultivados *in vitro* (GUERRA; NODARI, 2006).

A maioria das combinações de fitorreguladores testadas neste experimento formou calos. Foram observadas diferenças na proliferação dos mesmos, que se devem à variação da sensibilidade dos explantes para fitorreguladores ou devido a diferenças no teor endógeno de hormônios.

A indução e o crescimento dos calos foram influenciados significativamente pela interação entre as procedências, as combinações de fitorreguladores e as fontes de explante. A análise estatística do experimento quanto à porcentagem indução de calos pelos explantes pode ser observada na Tabela 19.

TABELA 19 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EFEITOS DAS PROCEDÊNCIAS, COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E FONTES DE EXPLANTE DE *Jatropha curcas* NA PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE CALOS *in vitro*.

FUNTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
Procedências	1	4,53	4,53	301,03**
Combinações entre Fitorreguladores	4	12,62	3,15	209,55**
Fonte de Explante	3	2,57	0,86	56,91**
Proc. x Comb.	4	3,81	0,95	63,35 **
Proc. x F. E.	3	0,28	0,09	6,26**
Comb. x F. E.	12	6,62	0,55	36,63**
Proc. x Comb. x F. E.	12	2,14	0,18	11,87**
Tratamentos	39	32,58	0,84	55,49**
Resíduo	120	1,81	0,02	
Total	159	34,38		
C.V. (%)				20,41

** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F.

GL – graus de liberdade, SQ – soma de quadrados, QM – quadrado médio, C. V. – coeficiente de variação experimental, Proc. – procedências. Comb. – combinações entre fitorreguladores, F. E. – fontes de explante.

O Gráfico 13 demonstra a diferença estatística entre as procedências analisadas. Janaúba – MG apresentou a maior porcentagem de explantes que formaram calos.

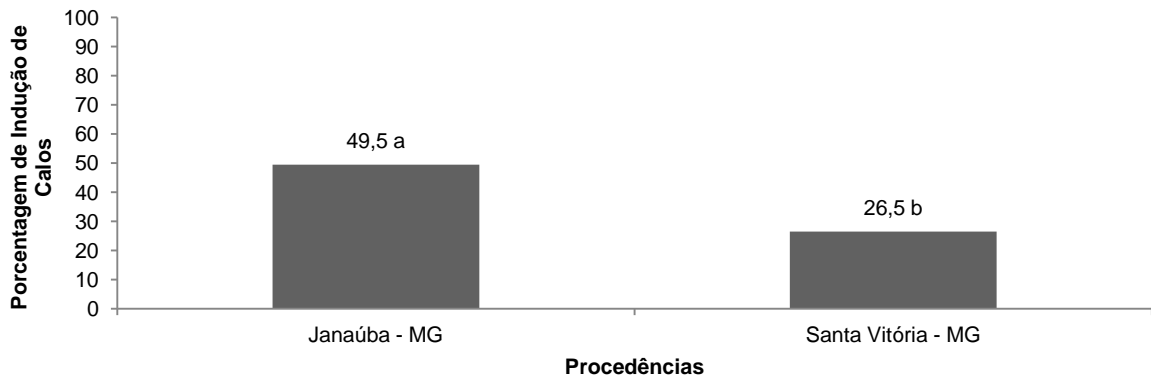


GRÁFICO 13 – PORCENTAGEM DE EXPLANTES DE *Jatropha curcas* COM INDUÇÃO DE CALOS *in vitro* EM FUNÇÃO DAS PROCEDÊNCIAS.
Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O Gráfico 14 demonstra a porcentagem de explantes que formaram calos nas diferentes combinações de fitorreguladores. A combinação C1, composta de meio MS, 27,8 μM de BAP e 0,5 μM de AIB foi a que apresentou maior porcentagem de explantes com formação de calos. Estes resultados demonstram que o BAP teve maior influência do que os demais fitorreguladores na multiplicação desordenada de calos nos explantes.

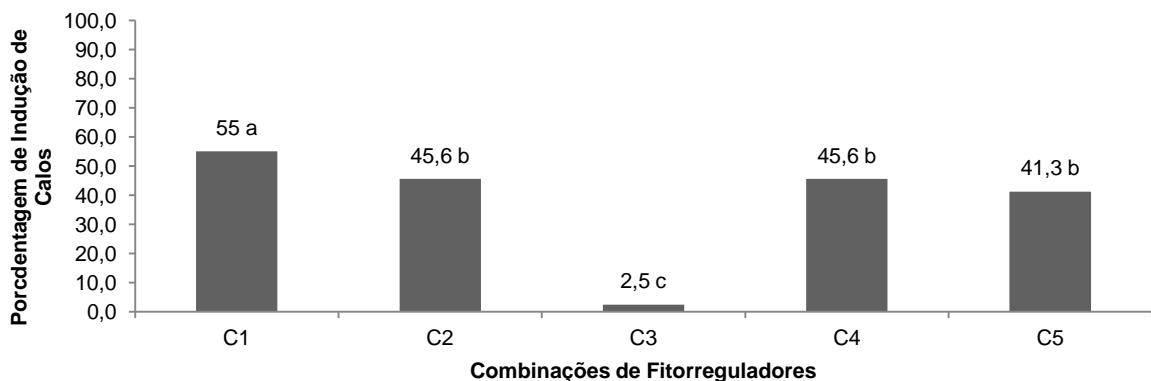


GRÁFICO 14 – PORCENTAGEM DE EXPLANTES DE *Jatropha curcas* COM INDUÇÃO DE CALOS *in vitro* EM FUNÇÃO DAS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.
Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. C1 – MS + 27,8 μM de BAP + 0,5 μM de AIB, C2 – MS + 27,8 μM de KIN + 0,5 μM de AIB, C3 – MS + 27,8 μM de sulfato de adenina + 0,5 μM de AIB, C4 - MS + 27,8 μM de sulfato de adenina + 2,3 μM de KIN + 0,5 μM de AIB, C5 – MS + 9 μM de TDZ + 0,5 μM de AIB.

Altas concentrações de citocininas no meio de cultura induzem excessiva formação de calos em explantes de espécies lenhosas (HUETTEMAN; PREECE, 1993).

Machado *et al.* (2010) buscaram produzir calos regeneráveis de *Jatropha curcas* a partir de explantes cotiledonares obtidos de sementes germinadas *in vitro*. Para isto, os explantes foram inoculados em meio de cultura MS com diferentes concentrações de BAP e ANA, em combinação, resultando em 25 diferentes tratamentos. Após 45 dias de cultivo, todos os meios de cultura foram capazes de induzir a formação de calos em pinhão manso, porém, estas quantidades ou porcentagens não foram expressas.

Deore e Johnson (2008) já citados anteriormente, ao utilizarem discos foliares retirados de plantas de *Jatropha curcas* germinadas *in vitro* com dois meses de idade para indução de brotos com diferentes concentrações dos fitorreguladores TDZ, BAP e AIB, concluíram também que o fitorregulador BAP, na ausência de TDZ e combinado com AIB promoveu indução de calos ao invés de indução de brotos. A concentração de 2,22 μM de BAP em combinação com 0,49 μM de AIB induziu calos em 58% dos explantes foliares; a concentração de 4,44 μM de BAP de 2,46 μM de AIB induziu calos em 62% dos explantes foliares.

Kaewpoo e Te-chato (2009), ao testarem indução de calos em epicótilos e hipocótilos de *Jatropha curcas* retirados de plântulas germinadas *in vitro* com 15 dias de idade e inoculados em meio MS com diferentes concentrações de BAP, TDZ, 2iP, AIB, ANA e 2-4 D nas concentrações de 1, 2 e 3 mg/L sozinhos ou em combinação, concluíram que, para ambos os tipos de explantes, a melhor indução de calos ocorreu nos meios de cultura suplementados com BAP.

A combinação C3, composta de 27,8 μM de sulfato de adenina e 0,5 μM de AIB, foi a que apresentou menor porcentagem de explantes com formação de calos. A combinação C4, no entanto, com a mesma concentração de sulfato de adenina, mas com adição de 2,3 μM de cinetina, apresentou uma porcentagem maior de formação de calos, o que indica que a adição deste último fitorregulador pode ter causado a formação de calos em *Jatropha curcas*.

Rocha e Quoirin (2004) estudaram a calogênese de *Swietenia macrophylla* com diferentes concentrações de KIN e ANA. Utilizaram como explantes folhas com 60 dias de idade obtidas de germinação *in vitro*, que foram mantidos no escuro. A porcentagem de explantes que formaram calos, aos 60 dias de cultivo, atingiu 70%

quando se combinou 4,7 μM de KIN com 0,54 μM de ANA. Aos 210 dias, 25% dos explantes responderam à formação de calos para o meio que continha 2,3 μM de KIN e 0,54 μM de ANA.

Gouvêa *et al.* (2010), extraíram hipocótilos de *Schizolobium parahyba* de embriões germinados *in vitro* e os inocularam em meio de cultura MS com diferentes concentrações de BAP, TDZ e KIN. O primeiro experimento avaliou a influencia de KIN (0,5 e 1 mg/L) e TDZ (0,1 e 0,5 mg/L) na formação de calos. Ambos os hormônios induziram calos, porém, a porcentagem de indução do hormônio TDZ foi maior. O segundo experimento avaliou a adição de BAP (1, 2, 3 e 4 mg/L) combinado com KIN (0,5 mg/L), onde concluiu-se que BAP em menores concentrações induziu maior porcentagem de formação de calos.

O Gráfico 15 mostra a análise estatística para comparação entre as fontes de explantes. Epicótilos foram os explantes que mais apresentaram formação de calos. Estes calos estavam sempre localizados na extremidade inferior em contato com o meio.

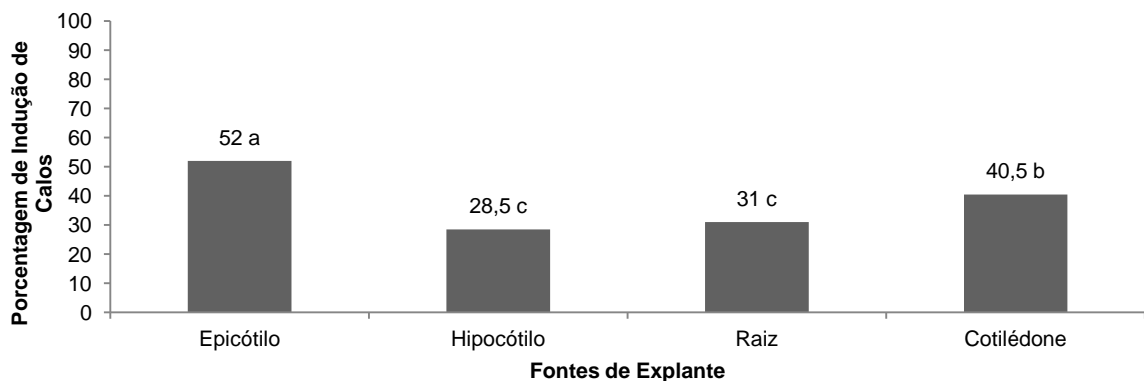


GRÁFICO 15 – PORCENTAGEM DE EXPLANTES DE *Jatropha curcas* COM INDUÇÃO DE CALOS *in vitro* EM FUNÇÃO DAS FONTES DE EXPLANTE.

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Dhar e Joshi (2005), concluíram que o tipo primário de explantes (hipocótilo, raízes, cotilédones e folhas) tem influencia sobre a taxa de formação de calos.

Brunetta *et al.* (2006), utilizaram epicótilos provenientes de plântulas germinadas *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla*) com 5 a 10 dias de idade para avaliação da calogênese *in vitro*. Os explantes foram inoculados em meio MS

com diferentes concentrações de BAP (0, 0,25 mg/L, 0,50 mg/L e 1 mg/L) e ANA (0, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, e 4 mg/L). Após 40 dias de inoculação, alguns dos tratamentos forneceram calejamento de 100% dos explantes, com variação nas suas intensidades e textura.

Soomro e Memon (2007), obtiveram sucesso na formação de calos provenientes de hipocótilos e cotilédones de *Jatropha curcas* retirados de sementes germinadas *in vitro* com 4 dias de idade. Os hipocótilos apresentaram crescimento de calos rápido, visível após 7 dias de incubação. Os cotilédones levaram mais tempo, formando os calos após 15 a 20 dias de incubação. De acordo com descrição dos autores, o início dos calos ocorreu nas bordas de corte para os dois tipos de explante.

Diversos autores também obtiveram sucesso na formação de calos com epicótilos (KAEWPOO; TE-CHATO, 2009), hipocótilos (KAEWPOO; TE-CHATO, 2009; GOUVÊA *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2010), raízes (QUORIM; ROCHA, 2004) e cotilédones (QUORIM; ROCHA, 2004).

A interação entre as procedências e as combinações de fitorreguladores demonstrou diferença estatística, sendo a média mais elevada aquela em que interagiram Janaúba – MG e combinação C4.

TABELA 20 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE CALOS *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS DE *Jatropha curcas* E AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.

COMBINAÇÕES	PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE CALOS	
	Janaúba - MG	Santa Vitória - MG
C1 27,8 µM BAP + 0,5 µM de AIB	56,25 bA	53,75 aA
C2 27,8 µM KIN + 0,5 µM de AIB	60 bA	31,25 bB
C3 27,8 µM S.A. + 0,5 µM de AIB	3,75 cA	1,25 dA
C4 27,8 µM S.A. + 2,3 µM de KIN + 0,5 µM de AIB	72,5 aA	18,75 cB
C5 9,0 µM TDZ + 0,5 µM de AIB	55 bA	27,5 bB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Conforme Tabela 20, a maior porcentagem de explantes com indução de calos para esta interação acima foi apresentada pela procedência Janaúba para a combinação C4. Para a procedência Santa Vitória, a maior porcentagem foi apresentada pela combinação C1.

A interação entre as procedências e os tipos de explante pode ser visualizada na Tabela 21. Janaúba – MG, ao interagir com epicótilos, apresentou a maior média de explantes que formaram calos, diferindo estatisticamente das demais. A menor produção de calos foi apresentada na interação entre radículas e a procedências Santa Vitória.

Comparando-se as duas procedências em relação à fonte de explante, observa-se que, para ambas as procedências, a fonte de explante com maior formação de calos foi epicótilo, sendo que a interação com maior produção de calo na procedência Janaúba – MG diferiu estatisticamente da interação com maior produção de calo na procedência Santa Vitória – MG.

TABELA 21 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE CALOS *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS FONTES DE EXPLANTE DE *Jatropha curcas*.

PROCEDÊNCIAS	FONTES DE EXPLANTE			
	Epicótilo	Hipocótilo	Raiz	Cotilédone
Janaúba – MG	64 aA	40 aC	47 aB	47 aB
Santa Vitória – MG	40 bA	17 bC	15 bC	34 bB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A Tabela 22 demonstra a interação entre as combinações entre fitorreguladores e as fontes de explante. Cotilédones da combinação C1 apresentaram a maior porcentagem de explantes que induziram calos.

TABELA 22 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE INDUÇÃO DE CALOS *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E AS FONTES DE EXPLANTE DE *Jatropha curcas*.

COMBINAÇÕES		FONTES DE EXPLANTE			
		Epicótilo	Hipocótilo	Raiz	Cotilédone
C1	27,8 µM BAP + 0,5 µM de AIB	75 aB	20 cC	32,5 bC	92,5 aA
C2	27,8 µM KIN + 0,5 µM de AIB	67,5 aA	37,5 abB	40 abC	37,5 bcB
C3	27,8 µM S.A. + 0,5 µM de AIB	2,5 cA	5 dA	2,5 cA	0 dA
C4	27,8 µM S.A. + 2,3 µM de KIN + 0,5 µM de AIB	70 aA	50 aB	32,5 bC	30 cC
C5	9,0 µM TDZ + 0,5 µM de AIB	45 bA	30 bcB	47,5 aA	42,5 bA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Percebe-se com a Tabela 22 que a interação entre a combinação C1 e cotilédones foi a que apresentou maior porcentagem de formação de calos, semelhante ao que aconteceu nas análises da Tabela 20, onde a mesma combinação apresentou a maior porcentagem de formação de calos, demonstrando que o meio de cultura MS adicionado de BAP e AIB favoreceu a formação de calos.

Flores *et al.* (2006), utilizando explantes de *Pfaffia tuberosa* concluíram que os de origem foliar proporcionam os melhores resultados para a formação de calos. Talvez por isso, em combinação com o tratamento que proporcionou a maior porcentagem de explantes que induziram calos, este resultado apresentou-se como mais elevado.

Com a apresentação dos resultados, pode-se resumir que Janaúba – MG, em todas as análises, apresentou as maiores porcentagens de explantes com formação de calos, bem como a combinação entre fitorreguladores C1 (MS + 27,8 µM de BAP + 0,5 µM de AIB), exceto na interação entre procedências e combinações de fitorreguladores, onde a combinação com maior porcentagem de explantes com formação de calos foi a C4 (MS + 27,8 µM de sulfato de adenina + 0,5 µM de AIB). Quanto às fontes de explantes, epicótilos apresentaram as maiores taxas, exceto na interação entre combinações de fitorreguladores e procedências, onde cotilédones prevaleceram.

5.2.3.4 Textura e Coloração de Calos

Conforme os resultados obtidos anteriormente, viu-se que apenas uma porcentagem de explantes do experimento formou calos. Destes que formaram calos, houve variação tanto na sua quantidade, quanto na sua textura, variando entre compacta e friável.

A seguir serão apresentadas as texturas dos calos formados para as respectivas fontes de explante de cada procedência.

Para epicótilos da procedência Janaúba – MG, todas as combinações de fitorreguladores formaram calos em maior ou menor quantidade, conforme Figura 18. As combinações C1 (MS + 27,8 µM de BAP + 0,5 µM de AIB e C5 (MS + 9 µM de TDZ + 0,5 µM de AIB) formaram uma grande massa de calos friáveis na parte

inferior dos epicótilos. A combinação C2 (MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB) formou uma grande massa de calos compactos na parte inferior dos epicótilos. As outras duas combinações formaram uma menor massa de calos compactos, as quais estavam localizadas na parte inferior do epicótilo.

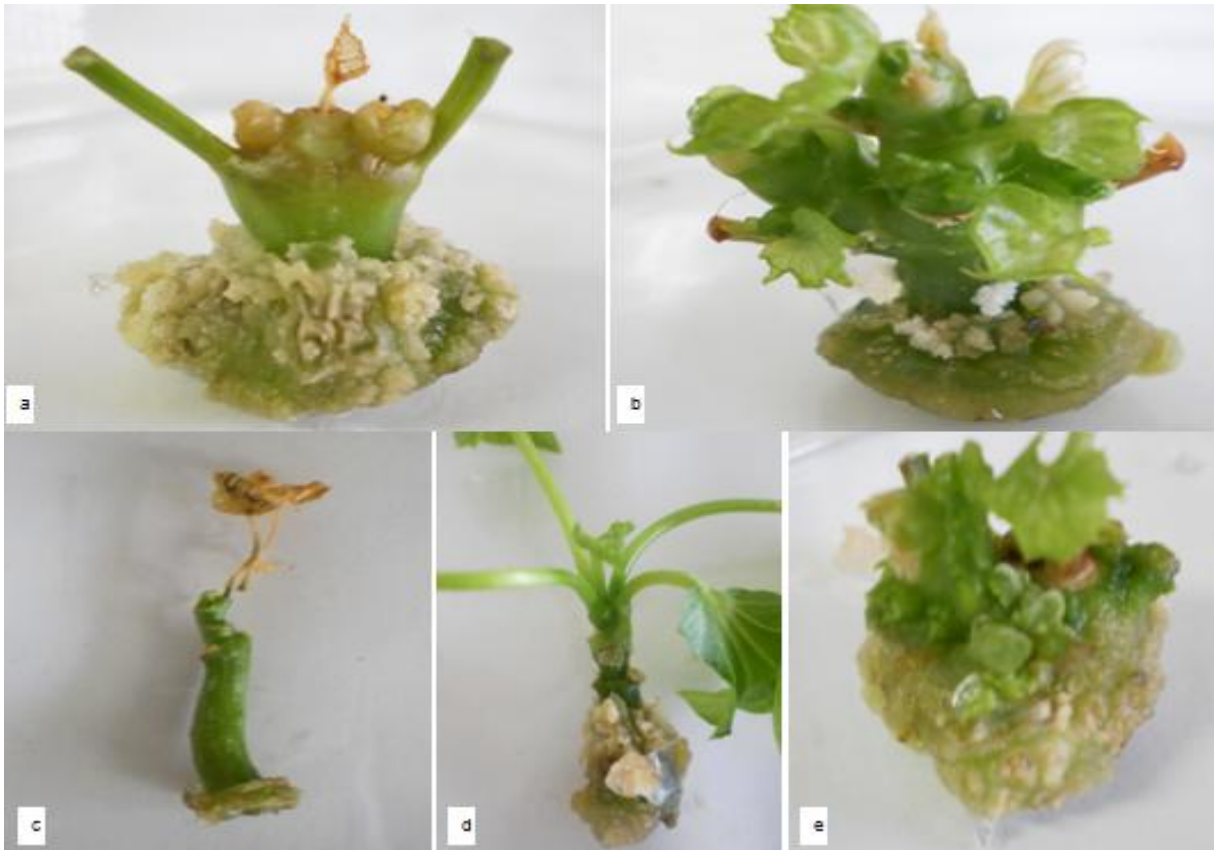


FIGURA 18 - ASPECTO DOS CALOS FORMADOS NOS EPICÓTILOS DA PROCEDÊNCIA JANAÚBA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.

C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

Para epicótilos da procedência Santa Vitória – MG, com exceção da combinação C3 (MS+ 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB), houve formação de calos compactos em todas as outras combinações de fitorreguladores. As combinações C1 (MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB) e C2 (MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB) formaram uma maior massa de calos na parte inferior dos explantes em contato com o meio de cultura. As outras combinações formaram calos em menor quantidade. Estas observações são demonstradas através da Figura 19.

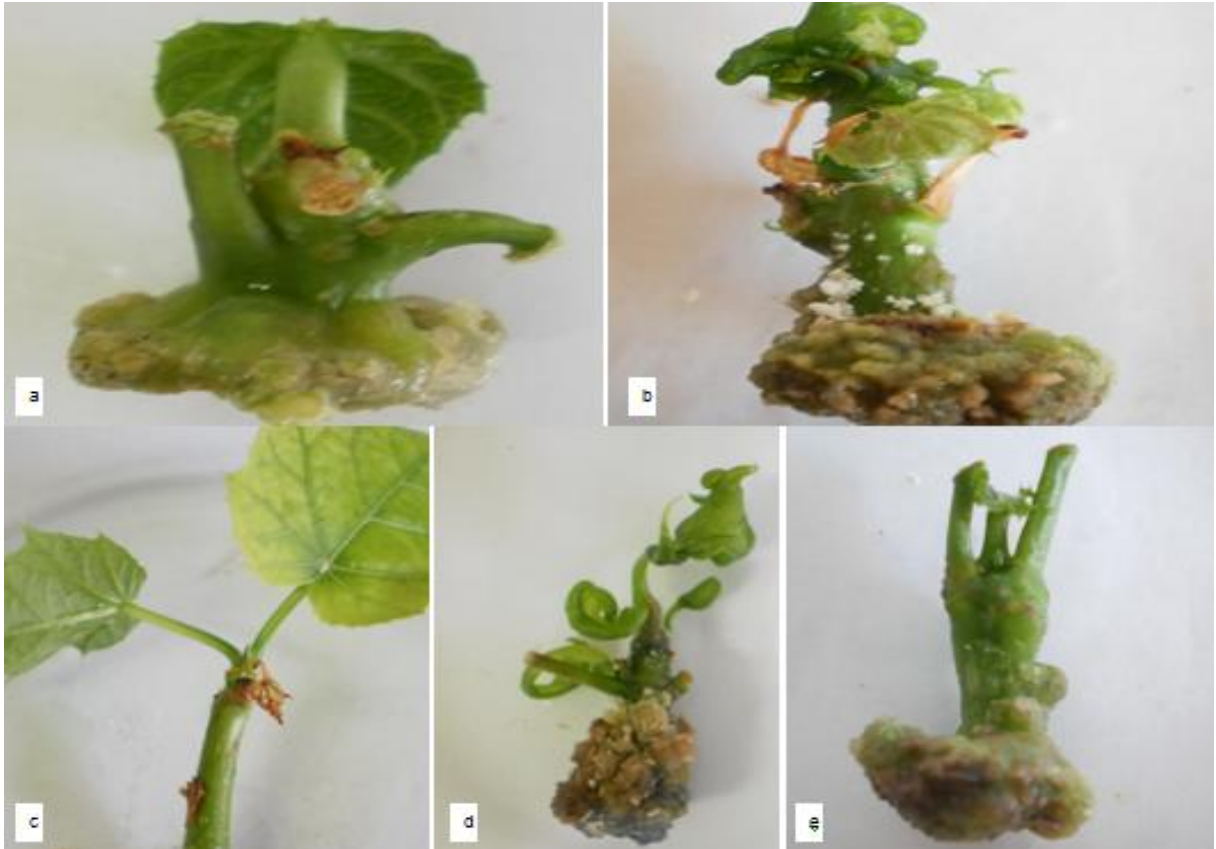


FIGURA 19 - ASPECTO DOS CALOS FORMADOS NOS EPICÓTILOS DA PROCEDÊNCIA SANTA VITÓRIA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.
 C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

Explantos do tipo hipocótilo formaram tanto calos compactos quanto friáveis.

Para Janaúba – MG, conforme Figura 20, os hipocótilos da combinação C2 (MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB) apresentaram uma grande massa de calos friáveis espalhados em toda a sua extensão. Os hipocótilos da combinação C1 (MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB) apresentaram uma grande e grossa camada de calos compactos, principalmente nas extremidades. Nas combinações C3 (MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB), C4 (MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB) e C5 (MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB) os hipocótilos formaram calos compactos em menor quantidade e principalmente localizados nas extremidades.



FIGURA 20. ASPECTO DOS CALOS FORMADOS NOS HIPOCÓTILOS DA PROCEDÊNCIA JANAÚBA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.

C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

Para Santa Vitória – MG, conforme Figura 21, os hypocótilos das combinações C1 (MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB) e C2 (MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB) apresentaram uma grossa camada de calos friáveis em toda sua extensão. Os hypocótilos da combinação C3 (MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB) apresentaram calos friáveis apenas nas suas extremidades. Os hypocótilos dispostos na combinação C4 (MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB) apresentaram calos compactos apenas na extremidade inferior, e os hypocótilos da combinação C5 (MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB) apresentaram calos compactos nas duas extremidades.



FIGURA 21 - ASPECTO DOS CALOS FORMADOS NOS HIPOCÓTILOS DA PROCEDÊNCIA SANTA VITÓRIA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.
 C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

Quanto às raízes, a maioria dos calos apresentou textura compacta.

Para Janaúba – MG, os calos formados foram de textura compacta, conforme Figura 22. A quantidade formada foi superior para as combinações C1 (MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB), C2 (MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB) e C5 (MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB), cobrindo toda extensão das raízes. Nas combinações C3 (MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB) e C4 (MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB), pouca quantidade de calos formou-se, estando localizada apenas na parte superior da raiz.

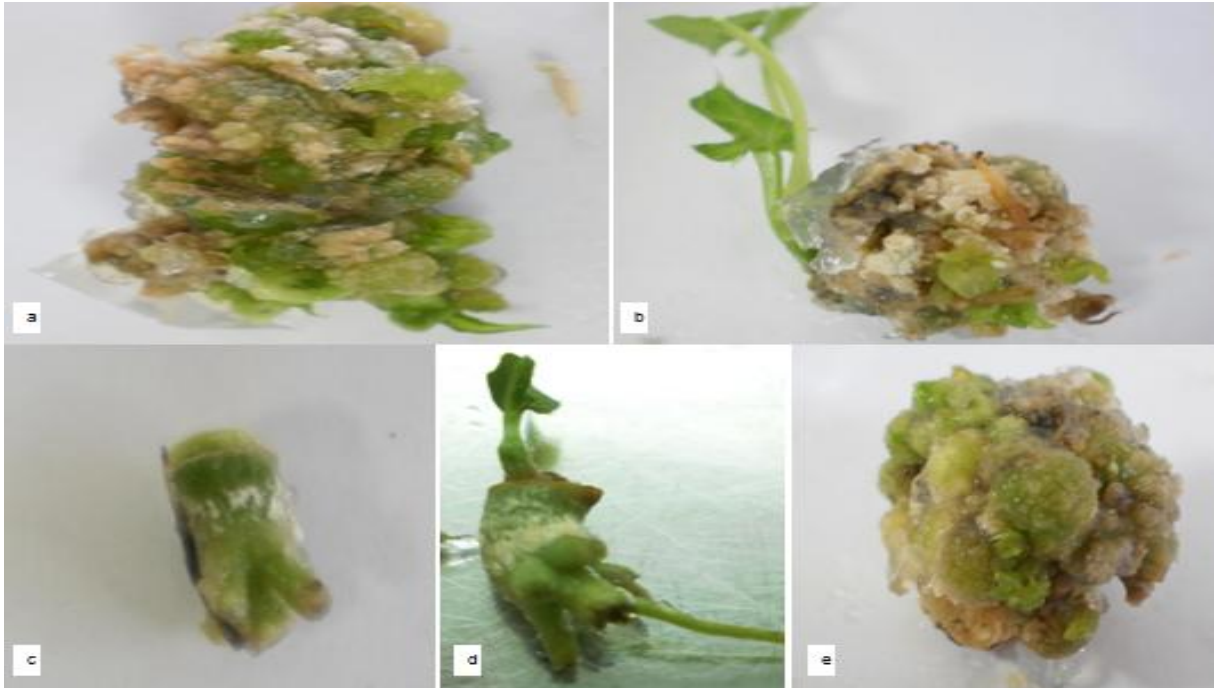


FIGURA 22 - ASPECTO DOS CALOS FORMADOS NAS RAÍZES DA PROCEDÊNCIA JANAÚBA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.

C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

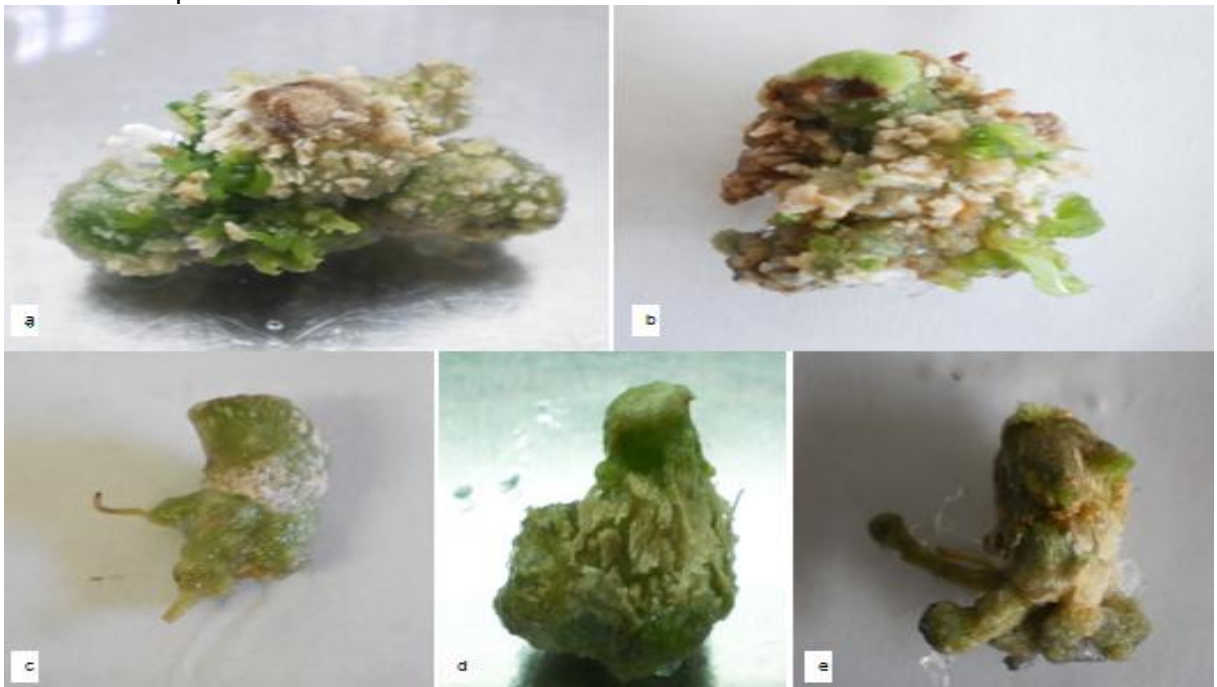


FIGURA 23 - ASPECTO DOS CALOS FORMADOS NAS RAÍZES DA PROCEDÊNCIA SANTA VITÓRIA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.

C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

Para Santa Vitória – MG, conforme pode-se visualizar na Figura 23, as combinações C1 (MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB) e C2 (MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB) formaram massa de calos friáveis em maior quantidade e cobrindo toda a raiz. Na combinação C3 (MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB) formaram-se pequenas quantidades de calos friáveis apenas na extremidade inferior, a qual estava em contato com o meio de cultura. Na combinação C5 (MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB), houve pouca formação de calos compactos, também dispostos na extremidade inferior. A combinação C4 não formou calos.

Quanto aos cotilédones, nem todas as combinações formaram calos.

Para Janaúba, conforme Figura 24, a combinação C3 (MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB) não apresentou formação de calos nos cotilédones. As combinações C1 (MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB) e 5 (MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB) apresentaram grande formação de calos, espalhados em todas as partes e com textura compacta. Na combinação C4 (MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB) os calos formaram-se apenas nas extremidades peciolares, e na combinação C2 (MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB) houve crescimento de pouca quantidade de calos apenas nas extremidades da folha, todos de textura compacta.

Para Santa Vitória, conforme Figura 25, os cotilédones das combinações C3 (MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB) e C4 (MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB) não apresentaram formação de nenhum tipo de calo. Na combinação C1 (MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB) ocorreu grande formação de calos em toda a extensão dos cotilédones e de textura friável, obtendo a combinação C5 (MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB) a mesma extensão, porém de textura compacta, cobrindo todo o cotilédone. Os explantes cotiledonares da combinação C2 (MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB) formaram poucos calos, apenas nas extremidades, em maior quantidade na inserção do pecíolo e de textura compacta.



FIGURA 24 - ASPECTO DOS CALOS FORMADOS NOS COTILÉDONES DA PROCEDÊNCIA JANAÚBA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.

C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

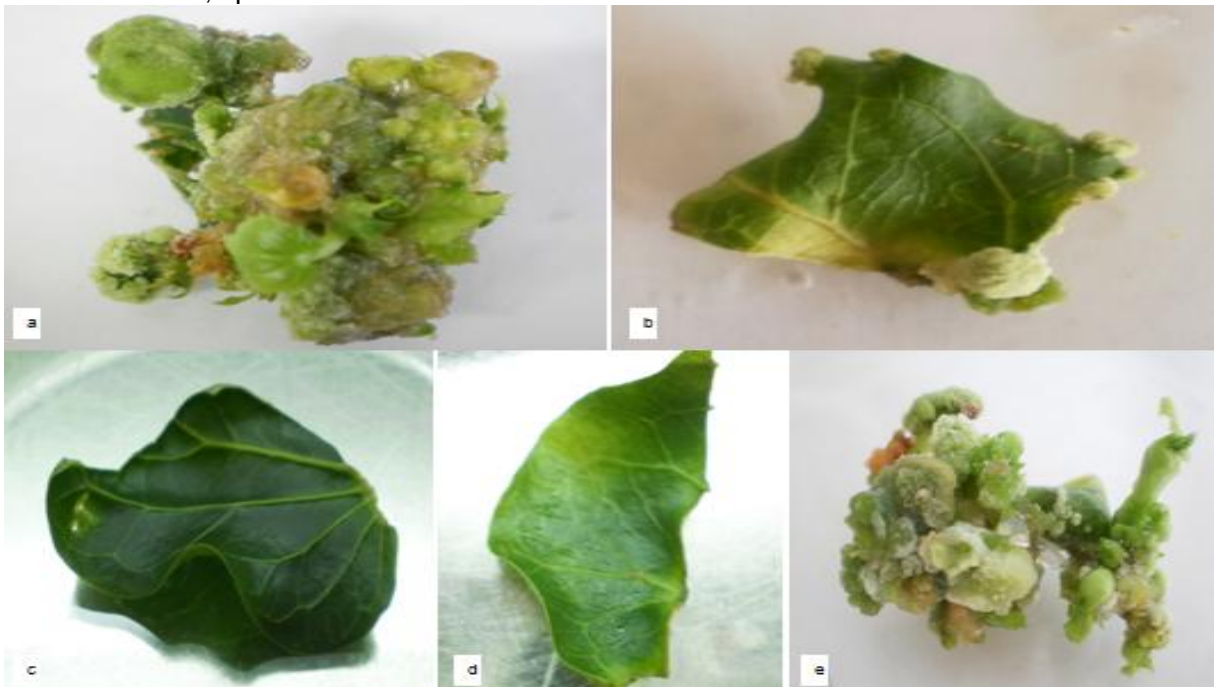


FIGURA 25 - ASPECTO DOS CALOS FORMADOS NOS COTILÉDONES DA PROCEDÊNCIA SANTA VITÓRIA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO. a. Combinação C1. b. Combinação C2. c. Combinação C3. d. Combinação C4. e. Combinação C5.

C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

A análise estatística para a variável textura de calos pode ser visualizada na Tabela 23.

TABELA 23 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EFEITOS DAS PROCEDÊNCIAS, COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E FONTES DE EXPLANTE DE *Jatropha curcas* NA TEXTURA DE CALOS *in vitro*.

FUNTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
Procedências	1	3,73	3,73	217,2**
Combinações entre Fitorreguladores	4	14,75	3,18	185,26**
Fonte de Explante	3	0,53	0,18	10,23**
Textura	1	30,22	30,22	1761,45**
Proc. x Comb.	4	3,04	0,76	44,28**
Proc. x F. E.	3	0,55	0,18	10,72**
Proc. x Text.	1	1,37	1,37	80,02**
Comb. x F. E.	12	2,95	0,25	14,32**
Comb. x Text.	4	6,59	1,65	95,94**
F. E. x Text.	3	6,88	2,3	133,73**
Proc. x Comb. x F. E.	12	3,07	0,26	14,92**
Proc. x Comb. x Text.	4	5,24	1,31	76,40**
Proc. x F. E. x Text.	3	9,43	3,14	183,11**
Comb. x F. E. x Text.	12	31,95	2,66	155,19**
Proc. x Comb. x F. E. x Text.	12	16,55	1,38	80,38**
Tratamentos	79	134,82	1,7	99,46**
Resíduo	240	4,12	0,02	
Total	319	138,94		
C.V. (%)				22,18

** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F.

GL – graus de liberdade, SQ – soma de quadrados, QM – quadrado médio, C. V. – coeficiente de variação experimental, Proc. – procedências. Comb. – combinações entre fitorreguladores, F. E. – fontes de explante, Text. – textura.

Conforme se pode visualizar no Gráfico 16, 31% dos explantes do experimento apresentaram calos do tipo compacto e 7% dos explantes apresentaram calos do tipo friável.

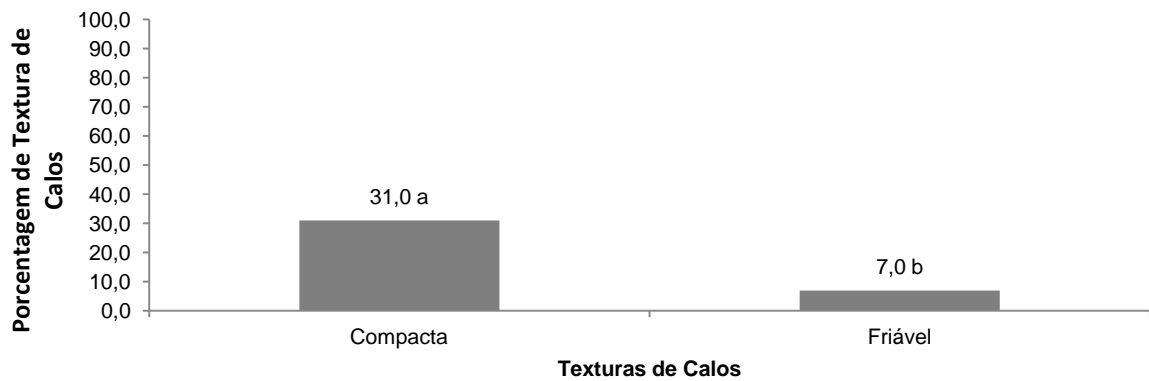


GRÁFICO 16 – PORCENTAGEM DE TEXTURA DOS CALOS FORMADOS *in vitro* PELOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas*.
Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

As interações das procedências, combinações de fitorreguladores e fontes de explantes com os tipos de calos apresentaram diferença estatística significativa pelo teste de F a 1% de probabilidade de erro.

As médias e suas comparações estão apresentadas nas tabelas a seguir.

TABELA 24 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE TEXTURA DE CALOS *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS TEXTURAS DE CALOS DE *Jatropha curcas*.

PROCEDÊNCIAS	TEXTURA	
	Compacta	Friável
Janaúba - MG	39,25 aA	10,25 aB
Santa Vitória - MG	22,75 bA	3,75 bB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Percebe-se através da Tabela 24 que Janaúba – MG obteve a maior formação de calos de ambas as texturas, sendo a maior média aquela referente à formação de calos friáveis.

A seguir, tem-se a interação entre as combinações de fitorreguladores e as texturas de calos.

TABELA 25 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE TEXTURA DE CALOS *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E AS TEXTURAS DE CALOS DE *Jatropha curcas*.

	COMBINAÇÕES	TEXTURA	
		Compacta	Friável
C1	27,8 µM BAP + 0,5 µM de AIB	40 aA	15 aB
C2	27,8 µM KIN + 0,5 µM de AIB	33,75 bA	11,9 bB
C3	27,8 µM S.A. + 0,5 µM de AIB	1,9 cA	0,63 cB
C4	27,8 µM S.A. + 2,3 µM de KIN + 0,5 µM de AIB	45,63 aA	0 cB
C5	9,0 µM TDZ + 0,5 µM de AIB	33,75 bA	7,5 bB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Conforme Tabela 25, percebe-se que a combinação C4 formou a maior porcentagem de calos compactos, além de não ter formado calos friáveis. A combinação C1, porém, não diferiu estatisticamente deste valor para calos compactos.

Machado *et al.* (2010), obtiveram sucesso na formação de calos friáveis em *Jatropha curcas* quando combinaram em meio MS os fitorreguladores ANA e BAP em 25 diferentes tratamentos, obtendo calos em todos os resultados, sendo os melhores tratamentos os melhores resultados quando combinaram 0,5 mg/L de ANA e 1 mg/L de BAP ou 2 mg/L de ANA e 1 mg/L de BAP.

Do mesmo modo, Monteiro *et al.* (2000) trabalharam com discos foliares de *Passiflora suberosa*, e obtiveram 100% de formação de calos friáveis nos explantes inoculados em meio MS contendo 0,5 ou 1,0 mg/L de BAP, após 4 semanas de cultivo no escuro

Reis *et al.* (2007), ao combinarem BAP e AIB para calogênese *in vitro* de *Schizolobium parahyba* com explantes de segmentos apicais e intercotiledonares, com concentração de fitorreguladores nas proporções de 0,5 mg/L de AIB + 1,0 mg/L de BAP, 1,0 mg/L de AIB + 0,5 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de AIB + 1,5 mg/L de BAP obtiveram 100% dos calos formados do tipo friáveis.

A combinação C3, composta de 27,8 µM de sulfato de adenina e 0,5 µM de AIB formou a menor quantidade de calos compactos, e a combinação C4, com as mesmas quantidades de sulfato de adenina e AIB, porém, com adição de cinetina, formou a maior quantidade de calos compactos. Isto indica que a cinetina pode ter influenciado na promoção de calos nos explantes.

Utilizando sulfato de adenina, Datta *et al.* (2007) obtiveram boa formação de calos em nós axilares de *Jatropha curcas* retirados de plantas com sete meses de idade. Culturas em meio MS suplementado com concentrações de 27,8 µM de sulfato de adenina e 22,2 µM de BA induziram calos na base dos explantes, porém, não corresponderam bem à indução de gemas, que era o objetivo principal do trabalho.

TABELA 26 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE TEXTURA DE CALOS *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS FONTES DE EXPLANTE E AS TEXTURAS DE CALOS DE *Jatropha curcas*.

FONTES DE EXPLANTE	TEXTURA	
	Compacta	Friável
Epicótilo	37,5 bA	14,5 bB
Hipocótilo	17 cA	11,5 aB
Raiz	29 bA	2,0 cB
Cotilédone	40,5 aA	0 dB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Cotilédones foram os explantes com maior porcentagem de formação de calos compactos e epicótilos foram os tipos de explante com maior porcentagem de formação de calos friáveis, quando comparados com os demais.

Soomro e Memon (2007), obtiveram calos compactos e friáveis utilizando explantes foliares e hipocótilos de *Jatropha curcas* germinados *in vitro* com idade de 4 dias. Os fitorreguladores utilizados foram 2,4-D, GA₃ e BA, em meio de cultura MS suplementado ou não com água de coco a 2% v/v. Todos os explantes foliares, independente da concentração dos fitorreguladores, forneceram calos compactos. O fitorregulador 2,4-D em meio MS suplementado com água de coco, independente das concentrações, formou calos friáveis. Porém, quando em combinação com os demais fitorreguladores, forneceu apenas calos compactos.

Brunetta *et al.* (2006), já citados anteriormente, trabalhando com epicótilos provenientes de plântulas germinadas *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla*) com 5 a 10 dias de idade inoculados em meio MS com diferentes concentrações de BAP (0, 0,25 mg/L, 0,50 mg/L e 1 mg/L) e ANA (0, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, e 4 mg/L), concluíram, após 40 dias que a textura dos calos variou significativamente de

acordo com os níveis de concentração de BAP. Baixas concentrações de BAP forneceram uma maior porcentagem de calos compactos. Já elevadas concentrações deste fitorregulador forneceram maior porcentagem de calos friáveis.

Com apresentação dos resultados, pode-se observar que a procedência Janaúba – MG apresentou as maiores porcentagens tanto para calos compactos quanto para friáveis, diferindo estatisticamente da procedência Santa Vitória – MG. Quanto às combinações de fitorreguladores, todas formaram calos do tipo compacto, com maior porcentagem apresentada pela combinação C4, que foi a única que não formou calos friáveis. A maior porcentagem de formação de calos friáveis para as combinações de fitorreguladores foi apresentada pela combinação C1, que diferiu estatisticamente dos demais. Quanto às fontes de explante, todas produziram calos compactos e apenas cotilédones não produziram calos friáveis.

Quanto à coloração de calos, estes adquiriram os três níveis de coloração, a saber, verde, creme e marrom, conforme se pode visualizar no Gráfico 17.

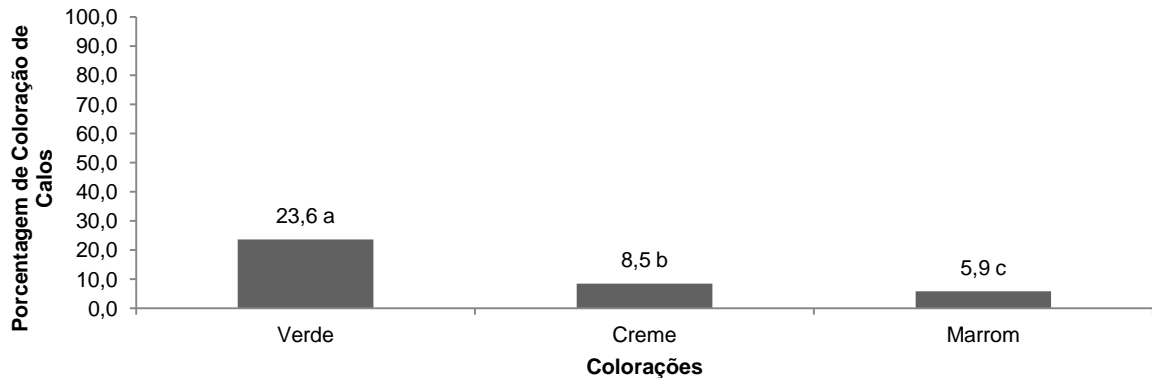


GRÁFICO 17 – PORCENTAGEM DE COLORAÇÃO DE CALOS *in vitro* APRESENTADA PELOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas*. Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Tanto a procedência Janaúba – MG quanto a procedência Santa Vitória – MG apresentaram a coloração verde nos calos como a mais evidente, conforme análise da Tabela 27, que as diferencia pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 27 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE COLORAÇÃO DE CALOS *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS COLORAÇÕES DE CALOS DE *Jatropha curcas*.

PROCEDÊNCIAS	COLORAÇÕES		
	Verde	Creme	Marrom
Janaúba – MG	30 aA	11 aB	8,5 aC
Santa Vitória – MG	17,3 bA	6 bB	3,25 bC

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A procedência Janaúba foi a que apresentou a maior porcentagem de todas as colorações, diferindo estatisticamente tanto entre as cores quanto entre as procedências.

Quanto à comparação das combinações de fitorreguladores, o resultado pode ser visualizado na Tabela 28.

TABELA 28 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE COLORAÇÃO DE CALOS *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E AS COLORAÇÕES DE CALOS DE *Jatropha curcas*.

COMBINAÇÕES	COLORAÇÕES		
	Verde	Creme	Marrom
C1 27,8 µM BAP + 0,5 µM de AIB	50 aA	3,1 cB	1,9 cC
C2 27,8 µM KIN + 0,5 µM de AIB	31,9 bA	13,7 bB	0 dC
C3 27,8 µM S.A. + 0,5 µM de AIB	1,2 eA	1,3 dA	0 dB
C4 27,8 µM S.A. + 2,3 µM de KIN + 0,5 µM de AIB	6,3 dC	22,5 aA	16,8 aB
C5 9,0 µM TDZ + 0,5 µM de AIB	28,8 cA	1,9 dC	10,6 bB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A combinação C1, composto de BAP e AIB foi o que apresentou a maior porcentagem de calos verdes.

Diferentemente, a maior porcentagem de calos nas cores creme e marrom foi apresentada pela combinação C4, composta de sulfato de adenina, KIN e AIB.

A comparação da interação entre fontes de explante e colorações pode ser visualizada na Tabela 29.

TABELA 29 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE COLORAÇÃO DE CALOS *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS FONTES DE EXPLANTE E AS COLORAÇÕES DE CALOS DE *Jatropha curcas*.

FONTES DE EXPLANTE	COLORAÇÕES		
	Verde	Creme	Marrom
Epicótilo	26 bA	16,5 aB	9,5 aC
Hipocótilo	19,5 cA	5,5 cB	3,5 cC
Raiz	17,5 dA	6,5 bB	7,0 bB
Cotilédone	31,5 aA	5,5 cB	3,5 cC

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Conforme Tabela 29, de todas as fontes de explante, as que apresentaram a maior porcentagem de calos verdes foram cotilédones, diferindo estatisticamente das demais cores. Epicótilos apresentaram a maior porcentagem tanto para calos de cor verde quanto marrom.

Machado *et al.* (2010), ao combinar diferentes quantidades de BAP e ANA para multiplicação de *Jatropha curcas*, obtiveram calos nas três colorações, ou seja, calos verdes, cremes e marrons.

Soomro e Memon (2007), ao trabalharem com explantes cotiledonares e hipocótilos de *Jatropha curcas* obtiveram calos de coloração verde, indo desde uma tonalidade mais clara até outra mais escura.

Reis *et al.* (2007), ao analisarem calogênese de *Schizolobium parahyba* com diferentes concentrações de BAP e AIB, obtiveram 100% dos calos de coloração bege.

Resume-se que a maioria dos calos formados obteve coloração verde nas procedências, combinações de fitorreguladores e fontes de explantes. A única combinação que apresentou a maioria dos seus calos de coloração creme foi a C4, composta de 27,8 μM de sulfato de adenina, 2,3 μM de KIN e 0,5 μM de AIB.

5.2.4 ANÁLISES QUANTITATIVAS

5.2.4.1 Número de Gemas

De acordo com a análise de variância para o número de gemas ou brotos, verifica-se que existiu interação entre os fatores testados no teste de F a 1% de probabilidade de erro ($p < 0,01$), conforme se pode visualizar na Tabela 30.

TABELA 30 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EFEITOS DAS PROCEDÊNCIAS, COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E FONTES DE EXPLANTE DE *Jatropha curcas* NO NÚMERO MÉDIO DE BROTOS FORMADOS POR EXPLANTE *in vitro*.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
Procedências	1	2,12	2,12	26,21**
Combinações entre Fitorreguladores	4	2797,67	699,42	8653,33**
Fonte de Explante	3	302,79	100,93	1248,72**
Proc. x Comb.	4	109,91	27,48	339,96**
Proc. x F. E.	3	167,71	55,9	691,64**
Comb. x F. E.	12	3837,16	319,76	3956,17**
Proc. x Comb. x F. E.	12	254,72	21,23	262,62**
Tratamentos	39	7472,08	191,59	3390,4**
Resíduo	120	9,7	0,08	
Total	159	7481,77		
C.V. (%)				5,79

** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F.

GL – graus de liberdade, SQ – soma de quadrados, QM – quadrado médio, Proc. – procedências. Comb. – combinações entre fitorreguladores, F. E. – fonte de explante, C. V. – coeficiente de variação experimental.

Os valores médios para o número de gemas formadas nos explantes em relação às procedências podem ser visualizados no Gráfico 18.

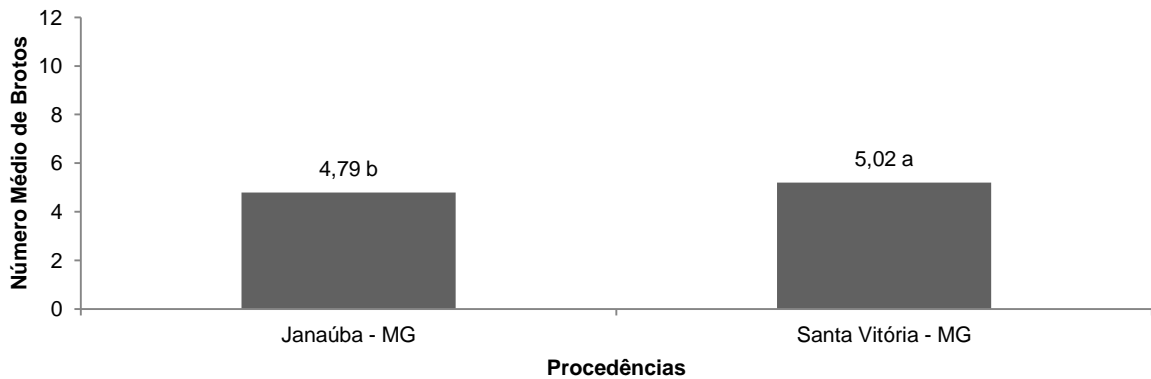


GRÁFICO 18 – NÚMERO MÉDIO DE BROTOS FORMADOS *in vitro* PELOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DAS PROCEDÊNCIAS.
Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A procedência Santa Vitória – MG, conforme Gráfico 18 apresentou uma maior média para a formação de brotos.

Quanto às combinações de fitorreguladores, suas comparações podem ser visualizadas no Gráfico 19.

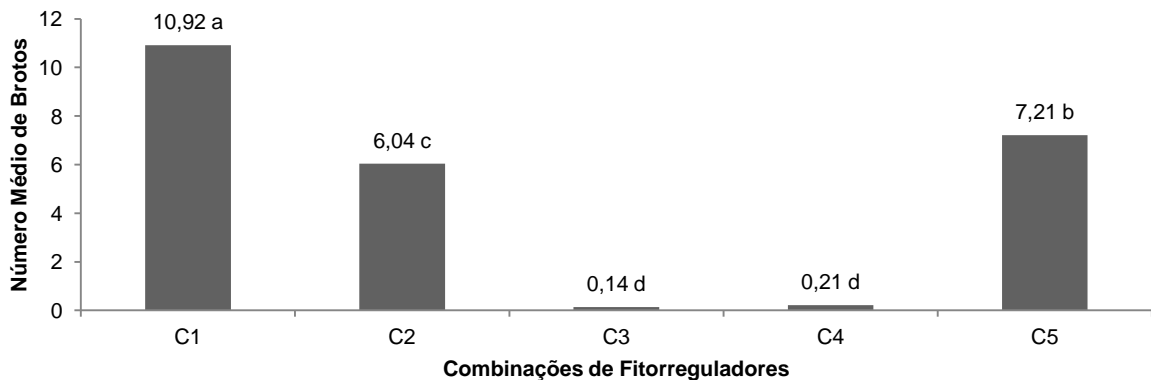


GRÁFICO 19 – NÚMERO MÉDIO DE BROTOS FORMADOS *in vitro* PELOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DAS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.
Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

A combinação C1, composta de meio MS adicionado de 27,8 μM de BAP e 0,5 μM de AIB foi a que apresentou maior média de formação de brotos, diferindo estatisticamente das demais.

A combinação C5, composta de meio MS adicionado a 9 μM de TDZ e 0,5 μM de AIB apresentou a segunda maior média de formação de brotos, seguida da combinação C2, composta de meio MS mais 27,8 μM de KIN e 0,5 μM de AIB.

Kalimuthu *et al.* (2007), inocularam *in vitro* explantes nodais de *Jatropha curcas* coletados de sementes germinadas com 25 a 27 dias de idade. O meio de cultura utilizado foi o meio MS com diferentes concentrações de BAP, KIN e AIA. Os melhores resultados foram obtidos quando baixas concentrações dos fitorreguladores KIN e AIA foram combinadas com altas concentrações de BAP, chegando a uma média de 35 brotos quando da combinação de 1,5 mg/L de BAP, 0,1 mg/L de KIN e 0,05 mg/L de AIA.

Carvalho *et al.* (2007), utilizando como explantes gemas apicais e eixos embrionários de *Ricinus communis*, inocularam-nos *in vitro* em meio MS utilizando BAP em diferentes concentrações (0 mg/L, 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,3 mg/L), adicionando em todos os tratamentos 0,05 g/L de GA₃ para alongamento dos brotos. Concentrações de BAP a 0,3 mg/L forneceram uma melhor formação de brotos para ambos os tipos de explantes, com uma média de 4,4 brotos, após 45 dias de incubação. Na ausência de BAP não houve formação de múltiplos brotos.

Ribeiro *et al.* (2010), utilizaram em seu experimento gemas apicais originadas de plântulas de *Ricinus communis* cultivadas *in vitro* com 20-25 dias de idade. Estas foram inoculadas em meio MS e suplementadas com diferentes quantidades de TDZ (0 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L e 10 mg/L), somando seis diferentes tratamentos. Os melhores resultados na proliferação *in vitro* foram atingidos na concentração de 0,5 mg/L de TDZ, com uma média de 16,9 brotos por explante. Ainda segundo estes autores, o TDZ fornece bons resultados na multiplicação em razão de aumentar a atividade da enzima fosfatase ácida, o que o torna biologicamente mais ativo.

Warakagoda e Subasinghe (2009), inocularam segmentos nodais de *Jatropha curcas* coletados de sementes germinadas *in vitro* em meio de cultura de Gamborg (B5) suplementado com diferentes concentrações de BAP (1 mg/L, 2 mg/L e 3 mg/L), KIN (1 mg/L) e ANA (1 mg/L e 2 mg/L), combinados em 12 diferentes tratamentos. O melhor resultado para indução de brotos foi encontrados

na combinação de 1 mg/L de BAP, 1 mg/L de KIN e 2 mg/L de ANA, com média de 6,6 brotos por explante.

Shah *et al.* (2010), utilizaram segmentos apicais de sementes de *Jatropha curcas* com 5 dias germinadas *in vitro*. Estes segmentos foram inoculados em meio MS com diferentes concentrações das citocininas BAP ou KIN, combinados ou não com a auxina AIB. Após aproximadamente dois meses, a melhor concentração para formação de múltiplos brotos foi encontrada com a concentração de 2 mg/L de BAP combinados com 0,75 mg/L de AIB, com média de 9,2 brotos por explante. Esta mesma concentração de BAP, porém sem adição de outros fitorreguladores, forneceu uma média de 5,2 brotos por explante. Os melhores resultados com KIN foram obtidos quando a concentração deste fitorregulador foi de 1 mg/L, com média de 3,06 brotos por explante. Explantes inoculados em meio MS sem adição de fitorreguladores não obtiveram formação de brotos.

Sujatha *et al.* (2005), extraíram explantes nodais e folhas de plantas de *Jatropha curcas* com 3 meses e inocularam em meio MS com diferentes concentrações dos fitorreguladores KIN (2,3 – 46,5 μm), BA (2,2 – 44,4 μm) e TDZ (2,3 – 45,4 μm), individualmente. Após um mês, os melhores resultados foram obtidos no tratamento com 23,2 μm de KIN, variando de 2 a 4 brotos por explante nodal, com média de 3,3 brotos por explante. O TDZ não respondeu bem à multiplicação, formando, no máximo, 1 broto por explante.

Já as combinações C3 e C4, ambas com adição de sulfato de adenina, não apresentaram resultados satisfatórios, sendo que suas médias não diferiram estatisticamente entre si.

Diversos autores, em contrapartida com os resultados deste trabalho, obtiveram sucesso na micropropagação quando utilizaram sulfato de adenina junto ao meio de cultura.

Shah *et al.* (2010), anteriormente citados, testaram o efeito de sulfato de adenina na micropropagação de segmentos nodais de *Jatropha curcas*. As concentrações testadas foram de 10 mg/L, 20 mg/L e 30 mg/L, combinados com 2 mg/L de BAP e 0,75 mg/L de AIB, pois, nas concentrações destes dois últimos fitorreguladores obtiveram os melhores resultados para formação de brotos. Com o sulfato de adenina, a média de formação de brotos aumentou aproximadamente 30%, indo de 9,2 brotos por explante (quando apenas com BAP e AIB) para 13,6 brotos por explante (BAP, AIB e sulfato de adenina).

Datta *et al.* (2007), obtiveram resultados favoráveis na proliferação de brotos obtidos de plantas de *Jatropha curcas* com sete meses de idade inoculadas *in vitro* em meio MS suplementado com 22,2 μM de BA e 55,6 μM de sulfato de adenina, com uma média de 6,2 brotos por explante nodal após 6 semanas. Os resultados foram ainda melhores quando estes explantes foram transferidos para meio de cultura MS com 2,3 μM de KIN, 0,5 μM de AIB e 27,8 μM de sulfato de adenina por mais quatro semanas, com número médio de brotos de 30,8 por explante.

Shrivastava e Banerjee (2008), inocularam *in vitro* nós axilares de *Jatropha curcas* retirados de plantas de 3 meses de idade. Para a multiplicação, os autores utilizaram BA e AIB, e a melhor concentração da combinação destes dois fitorreguladores para a multiplicação, a saber, 3 mg/L de BA e 0,1 mg/L de AIB, foi combinada com diferentes concentrações de sulfato de adenina (5 a 25 mg/L), glutamina (10 a 50 mg/L), arginina (0 a 15 mg/L) e ácido cítrico (5 a 25 mg/L). A melhor média de número de brotos foi obtida quando da combinação de 25 mg/L de sulfato de adenina, 50 mg/L de glutamina, 15 mg/L de arginina e 25 mg/L de ácido cítrico, com média de 10 brotos por explante. Apenas o meio de cultura MS com 3 mg/L de BA e 1 mg/L de AIB forneceu uma média de 6,9 brotos por explante, o que indica que a combinação destes com os outros fitorreguladores aumentou esta média.

Quanto às fontes de explantes, suas médias e comparações estatísticas podem ser visualizadas no Gráfico 20.

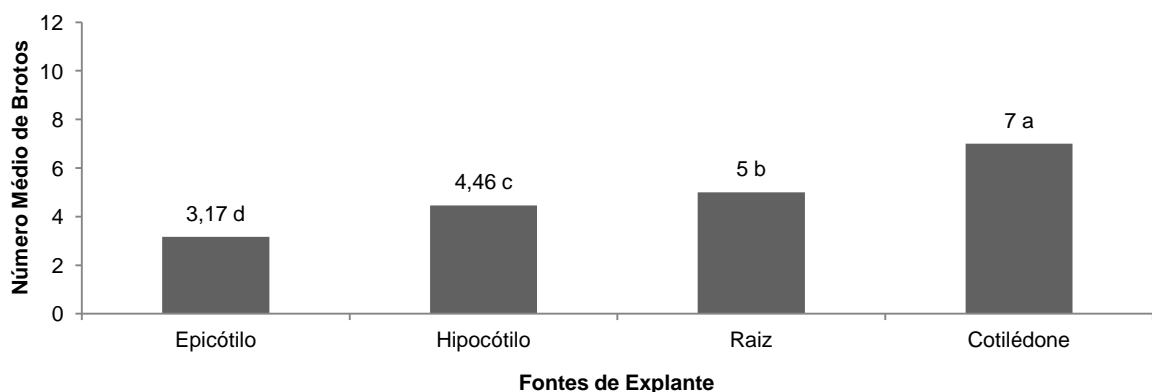


GRÁFICO 20 – NÚMERO MÉDIO DE BROTOS FORMADOS *in vitro* PELOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DAS FONTES DE EXPLANTE.

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Os cotilédones foram os explantes com maior média de formação de brotos, seguidos de raízes, hipocótilos e por último, epicótilos.

Diversos autores obtiveram sucesso com alguns destes tipos de explantes.

Rajore e Batra (2004), obtiveram sucesso no desenvolvimento de brotos de *Jatropha curcas* a partir de epicótilos, que foram inoculados em meio de cultura MS com diferentes concentrações de AIB e BA (0,1 mg/L de AIB e 0,2-0,7 mg/L de BA), obtendo os melhores resultados com as concentrações de 0,1 mg/L de AIB e 0,5 mg/L de BA.

Sujatha e Mukta (1996) testaram diferentes fontes de explantes na micropropagação *in vitro* de *Jatropha curcas*, tais como hipocótilo, pecíolos e explantes foliares, inoculados em meio MS com diferentes concentrações de zeatina, cinetina e belziladenina. Resultados satisfatórios foram encontrados com explantes de hipocótilos e pecíolos, independente das concentrações de fitorreguladores.

Kaewpoo e Te-chato (2006), extraíram embriões de sementes de *Jatropha curcas*, que germinaram *in vitro*. Os epicótilos destes explantes foram retirados e transferidos para meio MS com BA em concentração de 1 a 3 mg/L de BA. Após 30 dias, segmentos apicais, gemas axilares e hastes foram retiradas destes epicótilos e inoculados em meio MS com BA (0,5 mg/L) e AIB (0,05 mg/L, 0,1 mg/L e 0,25 mg/L). Todos estes explantes forneceram resultados satisfatórios, principalmente com as concentrações de 0,5 mg/L de BA e 0,25 mg/L de AIB, com uma média de 5,2 brotos por explante.

Outros autores como Sardana (1998), Rajore e Batra (2005) também obtiveram sucesso na indução de multiplicação *in vitro* de *Jatropha curcas* por explantes como hipocótilos, epicótilos, pecíolos e segmentos nodais.

A interação entre procedências e combinações entre fitorreguladores é apresentada na Tabela 31.

TABELA 31 – NÚMERO MÉDIO DE BROTO FORMADOS *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS DE *Jatropha curcas* E AS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.

COMBINAÇÕES	NÚMERO MÉDIO DE BROTO	
	Janaúba - MG	Santa Vitória - MG
C1 27,8 µM BAP + 0,5 µM de AIB	10,13 aB	11,71 aA
C2 27,8 µM KIN + 0,5 µM de AIB	7,30 bA	4,8 cB
C3 27,8 µM S.A. + 0,5 µM de AIB	0,2 dA	0,075 dA
C4 27,8 µM S.A. + 2,3 µM de KIN + 0,5 µM de AIB	0,22 dA	0,21 dA
C5 9,0 µM TDZ + 0,5 µM de AIB	6,08 cB	8,34 bA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Conforme Tabela 31, a interação entre a procedência Santa Vitoria – MG e a combinação C1 foi a que forneceu a maior média de formação de brotos. Também fica evidente que a combinação C5 (MS + 9 µm de TDZ + 0,5 µm de AIB) apresentou maior média que a combinação C2 (MS + 2,3 µm de KIN + 0,5 µm de AIB) para Santa Vitória – MG, e que, para Janaúba – MG estes resultados apresentaram-se ao contrário, sendo a média da combinação C2 significativamente superior que a da combinação C5.

A interação entre as procedências e as fontes de explantes é apresentada na Tabela 32.

TABELA 32 - NÚMERO MÉDIO DE BROTO FORMADOS *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE PROCEDÊNCIAS E FONTES DE EXPLANTE DE *Jatropha curcas*.

PROCEDÊNCIAS	FONTES DE EXPLANTE			
	Epicótilo	Hipocótilo	Raiz	Cotilédone
Janaúba – MG	3,81 aC	5,43 aA	4,59 bB	5,34 bA
Santa Vitória – MG	2,53 bD	3,5 bC	5,41 aB	8,65 aA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os cotilédones da procedência Santa Vitória – MG apresentaram o maior resultado, com média de 8,65 brotos por explante.

A interação entre combinações de fitorreguladores e as fontes de explantes é apresentada na Tabela 33.

TABELA 33 - NÚMERO MÉDIO DE BROTOS FORMADOS *in vitro* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES ENTRE FITORREGULADORES E AS FONTES DE EXPLANTE DE *Jatropha curcas*.

COMBINAÇÕES	FONTES DE EXPLANTE			
	Epicótilo	Hipocótilo	Radícula	Cotilédone
C1 27,8 µM BAP + 0,5 µM de AIB	2,29 cD	10,25 aC	18,56 aA	12,58 bB
C2 27,8 µM KIN + 0,5 µM de AIB	9,33 aB	10,58 aA	4,25 bC	0 cD
C3 27,8 µM S.A. + 0,5 µM de AIB	0,53 dA	0,025 cB	0,025 dB	0 cB
C4 27,8 µM S.A. + 2,3 µM de KIN + 0,5 µM de AIB	0,5 dA	0,37 cAB	0 dB	0 cB
C5 9,0 µM TDZ + 0,5 µM de AIB	3,13 bB	1,08 bD	2,16 cC	22,40 aA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De acordo com a Tabela 33, os cotilédones da combinação C5 foram os que apresentaram a maior média de formação de brotos quando comparados com os demais.

Kumar *et al.* (2010), testaram a organogênese direta de folhas cotiledonares de *Jatropha curcas* oriundas de três genótipos de sementes germinadas *in vitro* com duas semanas de idade. Os cotilédones foram inoculados em meio de cultura MS com diferentes concentrações das citocininas BAP ou TDZ. Os melhores resultados foram obtidos, para os três genótipos, quando da utilização de 9,08 µM de TDZ, com uma média de formação de brotos por explante de 92.1 ± 3.9 , 93.4 ± 3.6 e 92.5 ± 3.3 para cada genótipo. O melhor resultado para o fitorregulador BAP foi obtido quando a sua concentração no meio de cultura MS foi de 54.0 µM, com média de formação de brotos por explante de 45.1 ± 2.6 , 56.1 ± 2.7 e 50 ± 2.8 para cada genótipo.

Resume-se após apresentação destes resultados que, para todas as análises, a procedência Santa Vitória –MG, a combinação entre fitorreguladores C1 e explantes cotiledonares apresentaram o maior número médio de brotos por explante.

5.2.4.2 Tamanho das Gemas

De acordo com a análise de variância para o tamanho dos brotos, verifica-se que existiu interação entre os fatores testados no teste de F a 1% de probabilidade de erro, conforme se pode visualizar na Tabela 34.

TABELA 34 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EFEITOS DAS PROCEDÊNCIAS, COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E FONTES DE EXPLANTE DE *Jatropha curcas* NO TAMANHO DE GEMAS FORMADAS *in vitro*.

FUNÇÃO DE VARIACÃO	GL	SQ	QM	F
Procedências	1	0,55	0,55	90200,11**
Combinações entre Fitorreguladores	4	10,26	2,56	422062,85**
Fonte de Explante	3	3,14	1,05	172352,29**
Tamanhos	2	52,54	26,27	4324095,32**
Proc. x Comb.	4	1,91	0,48	78645,241**
Proc. x F. E.	3	0,23	0,08	12487,321**
Proc. x Tam.	2	5,42	2,71	445882,62*
Comb. x F. E.	12	7,04	0,59	965588,32**
Comb. x Tam.	8	23,02	2,88	473813,54**
F. E. x Tam.	6	4,35	0,73	119426,71**
Proc. x Comb. x F. E.	12	2,07	0,17	28358,87**
Proc. x Comb. x Tam.	8	7,55	0,94	155425,51**
Proc. x F. E. x Tam.	6	1,7	0,28	46684,652**
Comb. x F. E. x Tam.	24	10,33	0,43	70846,106**
Proc. x Comb. x F. E x Tam.	24	5,88	0,25	40343,067**
Tratamentos	119	136	1,14	188147,6**
Resíduo	360	0	0	
Total	479	13,6		
C.V. (%)				0,81

** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F.

GL – graus de liberdade, SQ – soma de quadrados, QM – quadrado médio, Proc. – procedências, Comb. – combinações entre fitorreguladores, F. E. – fonte de explante, C. V. – coeficiente de variação experimental

A seguir serão apresentadas as porcentagens médias dos tamanhos apresentados pelas procedências, combinações de fitorreguladores e fontes de explantes, todos em interação com o tamanho das gemas.

TABELA 35 – MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE BROTOS *in vitro* COM TAMANHOS PEQUENO, MÉDIO E GRANDE PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E OS TAMANHOS DE BROTOS DE *Jatropha curcas*.

PROCEDÊNCIAS	TAMANHOS		
	Pequeno	Médio	Grande
Janaúba – MG	0 bc	4,76 bB	95,25 aA
Santa Vitória – MG	10,64 aB	27,26 aB	62,1 bA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para as procedências, a maioria das gemas formadas foi de tamanho grande, principalmente para a procedência Janaúba – MG, conforme se pode visualizar na Tabela 35. Também se pode verificar que esta procedência não apresentou brotos de tamanho pequeno.

A Tabela 36 demonstra a interação entre as combinações de fitorreguladores e os tamanhos de gemas.

TABELA 36 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE BROTOS *in vitro* COM TAMANHOS PEQUENO, MÉDIO E GRANDE PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES ENTRE FITORREGULADORES E OS TAMANHOS DE BROTOS DE *Jatropha curcas*.

COMBINAÇÕES	TAMANHOS		
	Pequeno	Médio	Grande
C1 27,8 µM BAP + 0,5 µM de AIB	8,974 bB	2,564 eC	88,461 cA
C2 27,8 µM KIN + 0,5 µM de AIB	0 dC	7,353 cB	92,647 aA
C3 27,8 µM S.A. + 0,5 µM de AIB	14,286 aC	25,974 bB	59,74 eA
C4 27,8 µM S.A. + 2,3 µM de KIN + 0,5 µM de AIB	0 dC	37,5 aB	62,5 dA
C5 9,0 µM TDZ + 0,5 µM de AIB	3,333 cC	6,667 dB	90 bA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De acordo com a Tabela 36, a maior formação de gemas de tamanho pequeno ocorreu na combinação C3, composta dos fitorreguladores sulfato de adenina e ácido indol butírico. A maior formação de gemas de tamanho médio ocorreu na combinação C4, composta de sulfato de adenina, cinetina e ácido indol butírico. A maior formação de gemas de tamanho grande ocorreu na combinação C2, composta de cinetina e ácido indol butírico.

Kalimuthu *et al.* (2007) obtiveram tamanho de gemas de *Jatropha curcas* variando de 1,6 cm a 4,5 cm, ao utilizar 0,5 mg/L de BAP, 0,5 mg/L de KIN e 0,5 mg/L de AIA e 1,5 mg/L de BAP, 0,1 mg/L de KIN e 0,05 mg/L de AIA, após o período de 40 dias.

Shrivastava e Banerjee (2008), ao contrário, obtiveram além de bons resultados na multiplicação, bons resultados no tamanho das gemas dos explantes de *Jatropha curcas*, obtendo um máximo de 12±2,25 cm, com as quantidades de fitorreguladores de 3 mg/L de BA, 2 mg/L e de AIB, 25 mg/L de sulfato de adenina, 50 mg/L de glutamina, 15 mg/L de L-arginina e 25 mg/L de ácido cítrico.

Datta *et al.* (2007), utilizando explantes nodais de *Jatropha curcas* e os fitorreguladores BA e sulfato de adenina nas concentrações de 22,2 μM e 55,6 μM , respectivamente, obtiveram uma média de $2,0 \pm 0,18$ cm de tamanho médio de explantes após 4 a 6 semanas.

A Tabela 37 demonstra a interação entre fontes de explante e os tamanhos.

TABELA 37 - MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE BRODOS *in vitro* COM TAMANHOS PEQUENO, MÉDIO E GRANDE PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS FONTES DE EXPLANTE E OS TAMANHOS DE BRODOS DE *Jatropha curcas*.

FONTES DE EXPLANTE	TAMANHOS		
	Pequeno	Médio	Grande
Epicótilo	0 dC	14,583 aB	85,417 cA
Hipocótilo	3,704 cB	0 cC	96,296 aA
Raiz	6,977 bB	4,651 bC	88,372 bA
Cotilédone	12 aB	0 cC	88 bA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De acordo com a Tabela 37, os cotilédones foram os tipos de explante com maior porcentagem de brotos de tamanho pequeno. Os epicótilos foram os explantes com maior porcentagem de brotos de tamanho médio e os hipocótilos foram os explantes com maior porcentagem de brotos de tamanho grande.

Com a apresentação destes resultados, pode-se resumir que a maioria dos brotos de todas as procedências, combinações de fitorreguladores e fontes de explante apresentaram tamanho grande. As maiores porcentagens de brotos de tamanho médio e pequeno foram encontradas para a combinação C3, composta de 27,8 μM de sulfato de adenina e 0,5 μM de AIB. Explantes do tipo cotilédone apresentaram a maior porcentagem de brotos pequenos e os epicótilos a maior porcentagem de brotos médios.

5.2.4.3 Peso de Massa Fresca e Seca

A análise de variância para as variáveis peso de massa fresca e seca pode ser visualizada na Tabela 38. Nota-se que todas as fontes de variação e suas comparações foram significativas ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste de F ($p < 0,01$).

TABELA 38 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS EFEITOS DAS PROCEDÊNCIAS, COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES E FONTES DE EXPLANTE DE *Jatropha curcas* NO PESO DE MASSA FRESCA E PESO DE MASSA SECA DOS EXPLANTES.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	QM – MF	QM – MS	F – MF	F – MS
Procedências	1	4,99	0,008	20,72**	25,97**
Combinações entre Fitorreguladores	4	37,796	0,072	156,98**	226,59**
Fonte de Explante	3	20,856	0,074	86,02**	224,35**
Proc. x Comb.	4	6,613	0,017	27,47**	53,93**
Proc. x F. E.	3	5,253	0,015	21,82**	48,25**
Comb. x F. E.	12	3,326	0,004	13,81**	28,74**
Proc. x Comb. x F. E.	12	1,883	0,008	7,82**	25,02**
Tratamentos	39	8,294	0,021	34,45**	66,94**
Resíduo	120	0,241	0,0003		
Total	159				
C.V. (%)					28,47

** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F.

GL – graus de liberdade, SQ – soma de quadrados, QM – quadrado médio, C. V. – coeficiente de variação experimental, Proc. – procedências. Comb. – combinações entre fitorreguladores, F. E. – fonte de explante, MF – massa fresca, MS – massa seca.

Os Gráficos 21 e 22 demonstram as diferenças estatísticas entre as duas procedências para as variáveis massa fresca e seca.

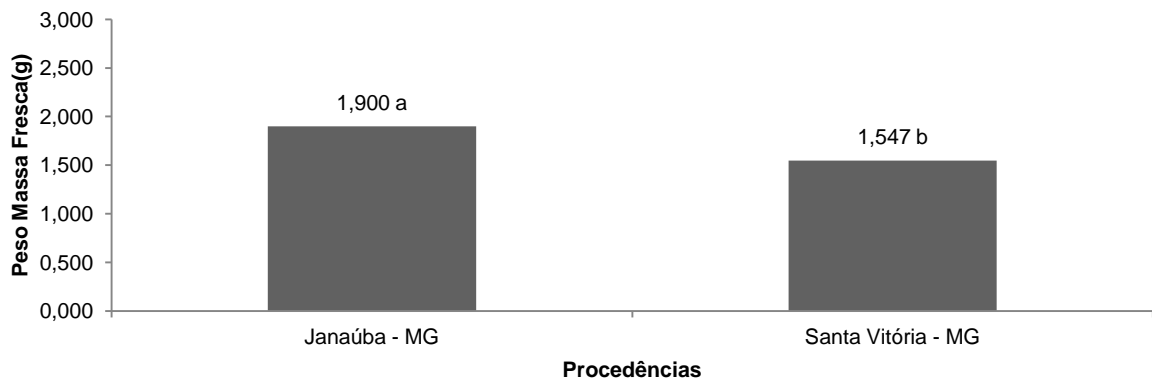


GRÁFICO 21 – PESO DE MASSA FRESCA DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DAS PROCEDÊNCIAS.
Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

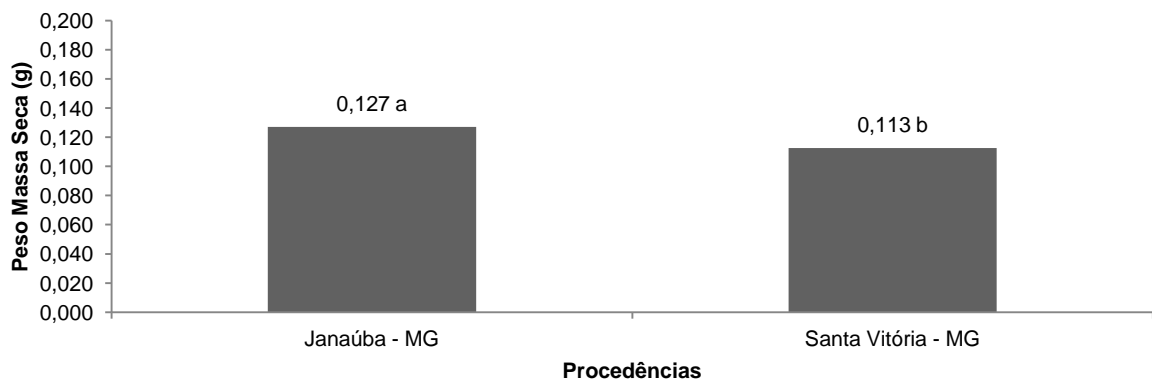


GRÁFICO 22 – PESO DE MASSA SECA DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DAS PROCEDÊNCIAS.
Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

De acordo com os Gráficos 21 e 22, tanto para peso de massa fresca quanto de massa seca as procedências apresentaram diferença estatística entre si, sendo que a procedência Janaúba – MG apresentou os valores mais elevados para as duas variáveis analisadas.

Os Gráficos 23 e 24 demonstram a diferença das variáveis massa fresca e massa seca para as combinações de fitorreguladores.

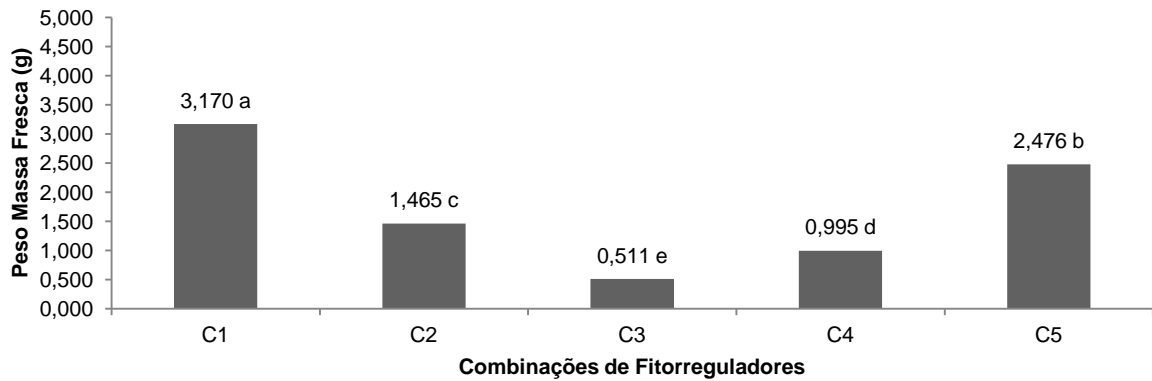


GRÁFICO 23 – PESO DE MASSA FRESCA DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DAS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

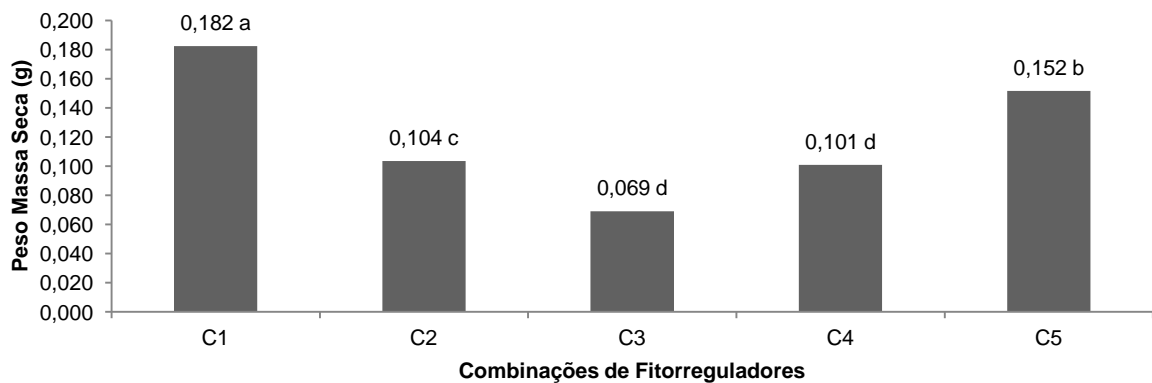


GRÁFICO 24 – PESO DE MASSA SECA DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DAS COMBINAÇÕES DE FITORREGULADORES.

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. C1 – MS + 27,8 μ M de BAP + 0,5 μ M de AIB, C2 – MS + 27,8 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C3 – MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 0,5 μ M de AIB, C4 - MS + 27,8 μ M de sulfato de adenina + 2,3 μ M de KIN + 0,5 μ M de AIB, C5 – MS + 9 μ M de TDZ + 0,5 μ M de AIB.

Nas comparações, nota-se que as variáveis massa fresca e seca apresentaram valores superiores na combinação C1, composta de meio MS com adição de 27,8 μ M de BAP e 0,5 μ M de AIB. Percebe-se também que os valores

decrecem igualmente, ou seja, na mesma ordem, sendo os menores expostos pela combinação, composta de 27,8 μM de sulfato de adenina e 0,5 μM de AIB.

Como o que variou no meio de cultura foi apenas a concentração dos fitorreguladores, o que pode ter acontecido para que a combinação C1 tenha apresentado os maiores resultados foi o maior desenvolvimento dos explantes com consequente aumento mais elevado da biomassa, visto que o tamanho dos explantes inoculados *in vitro* foi uniforme.

O fitorregulador também pode ter influenciado na maior absorção de líquidos pelo explante. Vieira *et al.* (2009), em experimento com *Saccharum* spp. constataram que a adição de BAP ao meio eleva a massa fresca pois, o meio de cultura com concentração de 0,2 mg/L apresentou maior ganho de massa fresca quando da comparação com o meio de cultura onde neste fitorregulador não foi adicionado.

Os Gráficos 25 e 26 demonstram as variáveis peso de massa fresca e seca para as diferentes fontes de explantes.

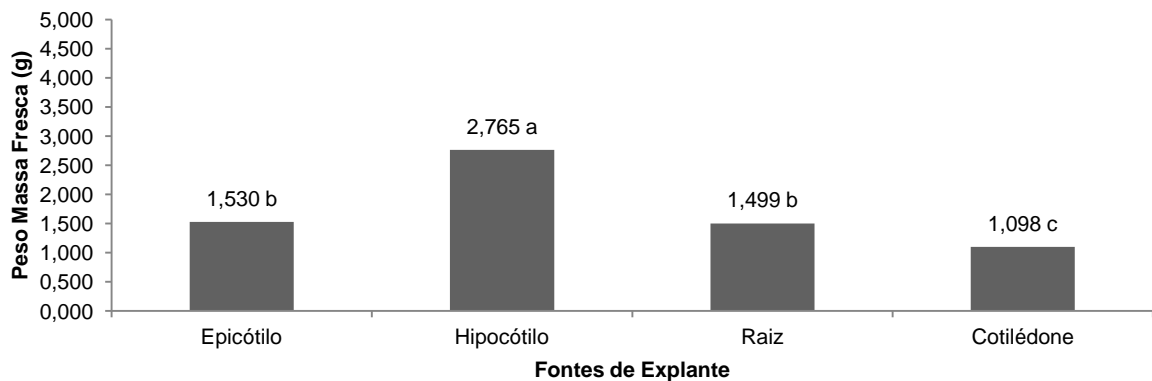


GRÁFICO 25 – PESO DE MASSA FRESCA DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DAS FONTES DE EXPLANTE.

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

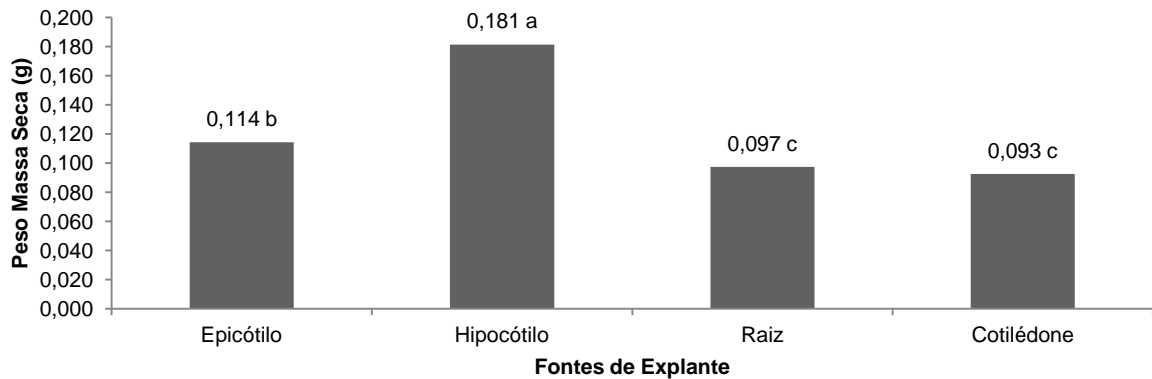


GRÁFICO 26 – PESO DE MASSA SECA DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DAS FONTES DE EXPLANTE.

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

As massas das diferentes fontes de explante indicam que houve diferença entre estas, e a fonte de explante com resultados mais elevados foi hipocótilo, seguido dos epicótilos, raízes e por último, cotilédones. Isto pode ter acontecido porque, visualmente, os hipocótilos apresentaram maior crescimento de biomassa e também, são mais grossos e maciços que as demais fontes de explante, fato que pode ter elevado estes valores.

As interações entre as fontes de variação serão apresentadas a seguir.

As Tabelas 39 e 40 apresentam, respectivamente, a interação entre procedências e combinações de fitorreguladores para massa fresca e para massa seca.

TABELA 39 - MÉDIAS DO PESO DE MASSA FRESCA DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS COMBINAÇÕES ENTRE FITORREGULADORES.

COMBINAÇÕES	PESO DE MASSA FRESCA (gramas)	
	Janaúba - MG	Santa Vitória - MG
C1 27,8 µM BAP + 0,5 µM de AIB	2,932 bB	3,407 aA
C2 27,8 µM KIN + 0,5 µM de AIB	1,445 cA	1,479 bA
C3 27,8 µM S.A. + 0,5 µM de AIB	0,578 dA	0,444 cA
C4 27,8 µM S.A. + 2,3 µM de KIN + 0,5 µM de AIB	1,101 cA	0,880 cA
C5 9,0 µM TDZ + 0,5 µM de AIB	3,429 aA	1,523 bB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 40 - MÉDIAS DO PESO DE MASSA SECA DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS COMBINAÇÕES ENTRE FITORREGULADORES.

COMBINAÇÕES	PESO DE MASSA SECA (gramas)	
	Janaúba - MG	Santa Vitória - MG
C1 27,8 µM BAP + 0,5 µM de AIB	0,174 aB	0,191 aA
C2 27,8 µM KIN + 0,5 µM de AIB	0,100 bA	0,101 bA
C3 27,8 µM S.A. + 0,5 µM de AIB	0,052 cB	0,070 cA
C4 27,8 µM S.A. + 2,3 µM de KIN + 0,5 µM de AIB	0,111 bA	0,094 bB
C5 9,0 µM TDZ + 0,5 µM de AIB	0,198 aA	0,105 bB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tanto para peso de massa fresca quanto para peso de massa seca, o maior valor apresentado foi para Janaúba – MG na combinação C5, composto de 9,0 µM de TDZ e 0,5 µM de AIB.

As Tabelas 41 e 42 apresentam a interação entre procedências e fontes de explantes.

TABELA 41 - MÉDIAS DO PESO DE MASSA FRESCA DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS FONTES DE EXPLANTE.

PROCEDÊNCIAS	PESO DE MASSA FRESCA (gramas)			
	Epicótilo	Hipocótilo	Raiz	Cotilédone
Janaúba – MG	1,569 aB	3,473 aA	1,567 aB	0,990 aC
Santa Vitória – MG	1,492 aB	2,058 bA	1,431 aB	1,206 aB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 42 - MÉDIAS DO PESO DE MASSA SECA DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS PROCEDÊNCIAS E AS FONTES DE EXPLANTE.

PROCEDÊNCIAS	PESO DE MASSA SECA (gramas)			
	Epicótilo	Hipocótilo	Raiz	Cotilédone
Janaúba – MG	0,122 aB	0,211 aA	0,099 aC	0,075 bD
Santa Vitória – MG	0,106 bB	0,151 bA	0,083 bB	0,110 aB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tanto para peso de massa fresca quanto para peso de massa seca, o maior valor apresentado foi para Janaúba – MG com a fonte de explante hipocótilo, o que reforça as análises anteriores, feitas separadamente.

As Tabelas 43 e 44 apresentam a interação entre fitorreguladores e fontes de explantes.

TABELA 43 - MÉDIAS DO PESO DE MASSA FRESCA DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES ENTRE FITORREGULADORES E AS FONTES DE EXPLANTE.

		PESO DE MASSA FRESCA (gramas)			
COMBINAÇÕES		Epicótilo	Hipocótilo	Raiz	Cotilédone
C1	27,8 µM BAP + 0,5 µM de AIB	1,651 bD	5,158 aA	3,328 aB	2,541 aC
C2	27,8 µM KIN + 0,5 µM de AIB	1,802 abB	2,808 bA	0,888 cC	0,360 bD
C3	27,8 µM S.A. + 0,5 µM de AIB	0,399 cB	1,072 dA	0,270 cB	0,303 bB
C4	27,8 µM S.A. + 2,3 µM de KIN + 0,5 µM de AIB	1,444 bA	1,865 cA	0,491 cB	0,180 bB
C5	9,0 µM TDZ + 0,5 µM de AIB	2,354 aB	2,924 bA	2,516 bAB	2,108 aB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 44 - MÉDIAS DO PESO DE MASSA SECA DOS EXPLANTES DE *Jatropha curcas* PARA A INTERAÇÃO ENTRE AS COMBINAÇÕES ENTRE FITORREGULADORES E AS FONTES DE EXPLANTE.

		PESO DE MASSA SECA (g)			
COMBINAÇÕES		Epicótilo	Hipocótilo	Raiz	Cotilédone
C1	27,8 µM BAP + 0,5 µM de AIB	0,114 bD	0,265 aA	0,163 aC	0,187 aB
C2	27,8 µM KIN + 0,5 µM de AIB	0,122 bB	0,18 bA	0,067 cC	0,045 cC
C3	27,8 µM S.A. + 0,5 µM de AIB	0,039 cB	0,131 cA	0,035 dB	0,039 cB
C4	27,8 µM S.A. + 2,3 µM de KIN + 0,5 µM de AIB	0,129 bB	0,169 bA	0,06 cC	0,045 cC
C5	9,0 µM TDZ + 0,5 µM de AIB	0,168 aA	0,161 bA	0,131 bB	0,147 bAB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados mais elevados para esta interação estão nos hipocótilos da combinação C1.

Observa-se que os resultados para massa fresca e massa seca mais elevados foram encontrados para a procedência Janaúba – MG, para a combinação entre fitorreguladores C1, composta de 27,8 µM de BAP e 0,5 µM de AIB e para explantes do tipo hipocótilos.

6 CONCLUSÕES

- A qualidade fitossanitária das sementes foi um fator relevante para o estabelecimento *in vitro* de *Jatropha curcas*;
- A procedência Janaúba – MG foi a que apresentou resultados superiores na maioria das análises realizadas neste estudo;
- Nas concentrações utilizadas neste trabalho, a citocinina 6-benzilaminopurina forneceu resultados superiores na multiplicação dos explantes, bem como na indução de calos;
- Explantes do tipo epicótilo apresentaram resultados superiores quanto à indução de gemas e de calos; quanto ao número de brotos por explante, cotilédones se mostraram superiores em relação às demais fontes de explante;
- A espécie *Jatropha curcas* necessita de mais pesquisas na área da micropropagação, com adequação das fontes e concentrações de citocininas e auxinas para o melhoramento da multiplicação dos seus explantes *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, A. L.; SILVA FILHO, J. CLETO da; GODOI, A. R. de; CARMO, C. de A.; EDUARDO, J. L. de P. Utilização de subprodutos da indústria do biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 260-268, 2008.

ANJOS, J. B. dos; DRUMOND, M. A.; MORGADO, L. B. Enxertia de pinhão bravo com pinhão manso. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE AGROENERGIA E BIOCOMBUSTÍVEIS, 1, Teresina, 2007. **Anais...** Teresina: EMBRAPA MEIO-NORTE, 2007.

ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. de M.; ANDRADE, A. B.; PEREIRA, W. E. SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, n. 2, p. 789-799, 2004.

AVELAR, R. C.; DEPERON JR., M. A.; CARVALHO, J. P. F. Produção de mudas de pinhão manso (*Jatropha curcas*) em tubetes. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 1, Brasília, 2006. **Anais...** Brasília: ABIPTI, 2006. p.137-139.

BRANDENBURG, W. A.; BINDRABAN, P. S.; CORRÉ, W.J. Claims facts on *Jatropha curcas* L. **Plant Research International**, Wageningen, outubro, 2007. 66p.

BRUNETTA, J. M. F. C.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L., FONSECA, E. de P. Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido α -naftalenoacético. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 71, p. 19-24, 2006.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P., FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v.1. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA CNPH, p. 183-260, 1998.

CAMPOS, R. A. S.; AÑEZ, L. M. M.; DOMBROSKI, J. L. D.; DIGNART, S. L. Micropropagação de *Jatropha elliptica* (Pohl) Müll. Arg. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 3, p.30-36, 2007.

CARGNIN, A. **Oleaginosas potenciais para produção de biodiesel: necessidade de cultivares melhoradas**. EMBRAPA Cerrados, 2007. Disponível em: <www.agrosoft.org.br> Acesso em 12/10/2010.

CARNEIRO, J. G. de A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais**. Curitiba: UFPR/FUPEF, 1995. 451p.

CARNEIRO, S. M. de T. P. G.; RAMOS, A. L. M.; ROMANO, E.; MARIANOWSKI, T.; OLIVEIRA, J. P. de. Ocorrência de *Phakopsora jatrophiicola* em pinhão manso no estado do Paraná. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 35, n. 1, 2009.

CARVALHO, J. M. F. C.; AIRES, P. S. R.; PIMENTEL, N. W.; SILVA, H.; SANTOS, J. W. dos. **Micropropagação *in vitro* de *Ricinus communis* L. utilizando a Citocinina 6-Benzilaminopurina**. Campina Grande: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 2007. 16p.

CARVALHO, J. M. F. C.; PIO, K. B.; SANTOS, J. W. dos; ALMEIDA, F. de A. C. Germinação e contaminação de sementes de mamoneira *in vitro* mediante quebra de dormência e desinfecção. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.6, n.1, p.483-490, jan-abr. 2002.

CASTRO, A. G.; CARVALHO, C. M.; CÂNDIDO, D. M. **Avaliação da germinação em viveiro da espécie *Jatropha Curcas* L. (pinhão manso) de distintas procedências**. Taubaté: Instituto Florestal de Taubaté, 2006.

COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. F. R. P.; ASSIS, A. M.; FONSECA, C. B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 253-258, 2004.

CORTESÃO, M. **Culturas Tropicais: Plantas Oleaginosas**. Lisboa: Livraria Clássica Editora, 1956. 234p.

COSTA, F. H. da S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. de. Efeito da interação entre carvão ativado e n6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 280-283, agosto, 2006.

COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. de P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 5, 2004.

DATTA, M. M.; JHA, T. B.; MUKHERJEE, P. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an importante biofuel plant. **Plant Biotechnology Reports**, Alemanha, v. 1, n. 3, p. 135-140, 2007.

DAVEY, M. R.; ANTHONY, P. **Plant Cell Culture: Essential Methods**. United Kingdon: Wiley Blackwell, 2010. 333 p.

DEORE, A. C.; JOHNSON, S. High-frequency plant regeneration from leaf-disc culture of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. **Plant Biotechnology Reports**, Tóquio, v. 2, n. 1, p. 7-11, 2008.

DHAR, U.; JOSHI, M. Efficient plant regeneration protocol trough callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. **Plant Cell Report**, Berlim, v. 24, p. 195-200, 2005.

DIAS, L. A. S.; LEME, L. P.; LAVIOLA, B. G.; PALLINI, A.; PEREIRA, O. L.; DIAS, D. C. F. S.; CARVALHO, M.; MANFIO, C. E.; SANTOS, A. S.; SOUZA, L. C. A.; OLIVIERA, T. S.; PRETTI, L. A. **Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 40p.

DIANESE, A. de C.; CARGNIN, A. **Ocorrência de *Oidium* sp. em pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) em Planaltina – DF**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2008. 15p.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de planta de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. galaxy, maxigala e mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 3, p.221-227, 2003.

ERIG, A. C.; VICENZI, M.; CHAVES, A.C.; *et al.* Desinfestação de explantes de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) visando o estabelecimento de plantas *in vitro*. **Revista Científica Rural**, Bagé, v.8, n.1, p.142-148, 2003.

FACT FOUNDATION. **The *Jatropha* Handbook: from Cultivation to Application**. Netherlands: Fact, 2010. 116 p.

FAIAD, M. G. R.; SALOMÃO, A. N.; CUNHA, R. da; PADILHA, L. R. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillet. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 19, n. 1, p. 14-17, 1997.

FARIAS, P. M. de. **Estudos preliminares do protocolo de micropropagação do pinhão manso (*Jatropha curcas*)**. Monografia. Instituto Ideal, Tubarão, 2008.

FOGG, H. G. W. **ABC do cultivo das plantas**. Rio de Janeiro: Martins Fontes, 1978. 147p.

FREIRE, F. C. O.; PARENTE, G. B. **As doenças das Jatrofas (*J. curcas* L. e *J. podagrica* Hook) no Estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 4p.

FREITAS, R. M. O. de; OLIVEIRA, M. K. T. de; DOMBROSKI, J. L. D.; CÂMARA, F. A. A.; SILVA NETO, R. V. da. Efeito dos tratamentos de oxidação em *Aloysia virgata*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 1, p. 151-154, 2009.

FLORES, R.; MALDAMER, J.; NICOLOSO, F. T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, 2006.

GALSTON, A. W.; PURVES, W. K. The mechanism of action of auxin. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 11, p. 239-276, 1960.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v.1. Brasília: Embrapa-SPI /Embrapa CNPH, p. 183-260, 1998.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Eversley: Exegetics, 1984. 709p.

GOUVÊA, P. M.; GOLDBACH, J. D.; FRANCISCON, L.; STACHEVSKI, T. W. Efeito das citocininas BAP, TDZ e CIN na indução de calos *in vitro* de *Schizolobium parahybum*. In: IX EVINCI, Colombo, 2010. **Anais...** Colombo, Embrapa Florestas, 2010.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de Biotecnologia 1 – Cultura de tecidos vegetais**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

GUIMARÃES, A. de S. **Crescimento inicial de Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.) em função de fontes e quantidades de fertilizantes**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba, 2008. 91p.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JÚNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices**. New York: Englewood Clippis, 2002. 880p.

HELLER, J. ***Jatropha curcas* L.: promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. Roma: IPGRI, 1996. 66p.

HILL, L. **Segredos da propagação de plantas**: cultive suas próprias flores, legumes, frutas, sementes, arbustos, árvores e plantas de interior. São Paulo: Nobel, 1996. 245p.

HU, C. Y., WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A., SHARP, W. R. **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, p.177-227, 1983.

HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.33, n.2, p.105-119, 1993.

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

KALIMUTHU, K.; PAULSAMY, S.; SENTHILKUMAR, R.; SATHYA, M. *In vitro* propagation of the biodiesel plant *Jatropha curcas* L. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Bangladesh, v. 17, n. 2, p. 137-147, 2007.

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

LEDO, A. da S.; LAMEIRA, O. A.; BENVADIS, A. K. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 604-607, 2002.

MACHADO, W.; CARNEIRO, A. A.; COELHO, F. T. da C. P. Influência de BAP e ANA na formação de calos de *Jatropha curcas* L. In: Inclusão Social e Energia, Campina Grande, 2010. **Anais...** Campina Grande, Embrapa Algodão, p. 270-275, 2010.

MACIEL, A. L. de R.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C. de; SILVA, A. B. da; DUTRA, L. F. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Obatã. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p.107-116, jan/fev, 2003.

MALAVOLTA, E. **ABC da Adubação**. São Paulo: Ceres, 1979. 172p.

MELO, B. de; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento de plântulas na cultura *in vitro* de embriões de guarirobeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, nov/dez, 2001.

MONTEIRO, A. C. B. de A.; NAKAZAWA, G. T.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUEZ, A. P. M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 571-573, 2000.

MORAIS, M. B. de; ALMEIDA, S. C. P. de; GURGEL, E. P.; MARINHO, M. J. de M.; SILVA, K. M. B. e; ALBUQUERQUE, C. C. de. **Influência do hipoclorito de sódio no controle da contaminação bacteriana em explantes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. Rio Grande do Norte: 62ª Reunião Anual da SBPC, 2010.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p, 135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A resied medium for rapid growth and bioassays with tabaccotissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 1962.

NASCIMENTO, A. da C.; PAIVA, R.; ABBADE, L. C.; VARGAS, D. P.; SOARES, F. P. Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess): efeitos do BAP e AIB. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Limoeiro, v. 3, n. 2, p. 20-26, 2008.

NEVES. W. dos S.; PARREIRA, D. F.; FERREIRA, P. A.; LOPES, E. A. Avaliação fitossanitária de sementes de pinhão manso provenientes dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. **Revista Trópica**, Chapadinha, v. 3, n. 2, p. 17-23, 2009.

NUNES, C. F.; SANTOS, D. N. dos; PASQUAL, M.; VALENTE, T. C. T. Morfologia externa de frutos, sementes e plântulas de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 207-210, 2009.

OLIVEIRA, R. P.; SILVEIRA, D. G.; SILVA, S. O. Efeito da desinfestação e do uso de meios indicadores de contaminação na micropropagação de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p.57-61, 2000.

OLIVEIRA, Y. de. **Micropropagação de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009. 92p.

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

PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997.

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

QUEIROZ, J. A. L.; MELÉM JÚNIOR, N. J. Efeito do tamanho do recipiente sobre o desenvolvimento de mudas de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 460-462, 2001.

RAJORE, S.; BATRA, A. Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas*. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, Nova Delhi, v. 14, p. 73-75, 2005.

RAZDAN, M. K. **Introduction to Plant Tissue Culture**. Enfield: Science Publishers, 2003. 367 p.

REIS, I. N. R. de S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C. Indução da Calogênese em Paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby) através da Adição de AIB e BAP. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 501-503, 2007.

RIBEIRO, C. S. N.; SILVA, H.; SANTOS, J. W. dos; CARVALHO, J. M. F. C. Efeito do tiadiazuron na micropropagação *in vitro* de dois genótipos de mamona via organogênese. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 4, p.366–371, 2010.

ROCHA, S. C.; QUOIRIN, M. Calogênese e rizogênese de mogno (*Swietenia macrophylla* King.) cultivados *in vitro*. **Ciência florestal**, Santa Maria, v. 14, n. 1, p. 91–101, 2004.

ROESE, A. D.; SILVA, C. J.; GOULART, A. C. P.; ABRÃO, J. S. **Ocorrência da ferrugem no Pinhão-Manso em Mato Grosso do Sul e efeito de alguns fungicidas no controle da doença.** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. 3p.

SAMBA, A. N. S.; DIALLO, B.; DIOP, M.; DIATTA, M.; SARR, A. S.; NGUER, M.; DIOUF, M. ***Jatropha curcas*: seed germination and propagation methods.** Senegal: 2011.

SARDANA, J. *In vitro* plantlet formation and micropropagation of *Jatropha curcas*. **Advances in Plant Science**, Nova Delhi, v. 11, 167-169, 1998.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A. de; SOUZA, V. C. de; DORNELAS, G. V. Controle de contaminação e oxidação na micropropagação do pau d'alho (*Gallesia gorazema* Moq). **Revista Agropecuária Técnica**, Areia, v. 25, n. 2, p.65-70, 2004.

SATO, M.; BUENO, O. de C.; ESPERANCINI, M. S. T.; FRIGO, E. P. A Cultura do Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.): Uso para fins combustíveis e descrição agrônômica. **Revista Varia Scientia**, Cascavel, v. 7, n. 13, p. 47-62, 2009.

SATURNINO, H. M. Cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, v. 26, n. 229, p. 44-78, 2005.

SHAH, P.; KHARE, N.; OREYA, S.; ARIF, M.; AHMED, Z. *In vitro* plant regeneration from microshoot in *Jatropha curcas*. **International Journal of Agriculture and Food Science & Technology**, Nova Delhi, v. 1, n. 1, p. 63-72, 2010.

SHRIVASTAVA, S.; BANERJEE, M. *In vitro* propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): Influence of additives. **International Journal of Integrative Biology**, v. 3, n. 1, 2008. p. 73-79.

SILVA, P. H. M. **Sistemas de propagação de mudas de essências florestais.** Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 2005.

SILVA, R. P. da; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. de A. A. Indução e cultivo *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja-azedá. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p.1331-1337, 2008.

SKIRVIN, R. M. Fruticulture crops. In: CONGER, B. V. **Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques**. Boca Raton: CRC Press, . p. 51-139, 1981.

SOOMRO, R.; MEMON, R. A. Establishment of callus and suspension culture in *Jatropha curcas*. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 39, n. 7, p. 2431-2441, 2007.

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

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

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2002. 719p.

TEIXEIRA, L. C. Potencialidades de Oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.26, n. 229, p.18-27, 2005.

VANZOLINI, S. MEORIN, E. B. K.; SILVA, R. A. da.; NAKAGAWA, J. Qualidade Sanitária e Germinação de Sementes de Pinhão Manso. **Revista Brasileira de Sementes**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 9-14, 2010.

VARRICCHIO, M. C. B. N.; ORMELEZ, E. G.; MOREIRA, C. B.; SILVA, S. da; KUSTER, R. M.; LAGE, C. L. S. Cultivo *in vitro* de *Euphorbia tirucalli* (aveloz), avaliação da constituição química do látex em diferentes condições de cultivo e teste de atividade larvicida e juvenilizante em *Aedes aegypti*. **Revista de Biologia e Farmácia**, Bodocongó, v. 2, n. 1, 2008.

VIANNA, V. F.; VEDOVATO, N. P. F.; TREVISOLI, H. U.; BIZARI, E.; DI MAURO, A. O. Estabelecimento de gemas apicais de pinhão manso em meio de cultura contendo BAP (6-benzilaminopurina). In: III Semana de Tecnologia do Curso de Biocombustíveis da Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, Jaboticabal. **Suplemento...** Jaboticabal: FATEC-JB, 2010. v. 1.

VIEIRA, R. A.; SILVA, C. M. da; SOUTO, E. R. de; HATA, F. T.; MACHADO, M. de F. P. da S.; MARCUZ, F. S. Diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e

cinetina na micropropagacao *in vitro* das variedades RB867515 e RB855156 de cana-de-açúcar. **Campo Digital**, Campo Mourão, v. 4, n. 1, p. 122-126, 2009.

VIEIRA JUNIOR, J. R.; FERNANDES, C. de F.; ROCHA, R. B.; RAMALHO, A. R.; MARCOLAN, A. L.; GUEDES, M. L. O.; REIS, N. D.; SILVA, D. S. G. da. **Ocorrência da ferrugem (*Phakopsora jatrophiicola*) em pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) no Estado de Rondônia**. Porto Velho: Embrapa, 2009.

WARAKAGODA, P. S.; SUBASINGHE, S. *In vitro* culture establishment and shoot proliferation of *Jatropha curcas* L. **Tropical Agricultural Research and Extension**, Ruhuna, v. 12, n. 2, p. 77-80, 2009.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 1 CD-ROM. (Embrapa Florestas. Documentos, 130).