

# Cultivo *in vitro* de diferentes genótipos de pinhão-manso (*Jatropha curcas L.*)

SILVA, Gabriel Henrique Ribeiro da  
NASCIMENTO, Daniela Defavari do

## Resumo

O uso das energias renováveis é uma das alternativas mais difundidas para enfrentar o aquecimento global. O biodiesel é uma das principais opções, em especial o uso da cultura do Pinhão-Manso (*Jatropha curcas L.*), espécie com forte resistência a seca e viável para pequenas propriedades rurais com mão-de-obra familiar. Um desafio a ser vencido é a produção e obtenção de mudas selecionadas a partir de plantas matrizes superiores, e o objetivo deste trabalho foi propor um protocolo para obtenção de mudas-clones e calos de variedades de pinhão-manso. Para isso, foram utilizados embriões de pinhão-manso, extraídos de sementes fornecidas pela EMBRAPA (253-II-4, 183-I-2 e 170-II-1) e doadas para a Fatec Piracicaba. Os embriões zigóticos foram extraídos das sementes em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de bisturi. A assepsia foi realizada com solução de hipoclorito de sódio comercial por 5 minutos, seguida de lavagem em solução de etanol 70% por 2 minutos. Os explantes foram enxaguados em água autoclavada e inoculados nos meios de cultura. Todos os tratamentos foram suplementados com sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>) e agente solidificante phytigel (2,4 g.L<sup>-1</sup>): T1 – 50% dos sais do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962); T2 – 50% dos sais do meio MS + 0,2mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,2mg.L<sup>-1</sup> de NAA; T3 – 50% dos sais do meio MS + 0,3mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,2mg.L<sup>-1</sup> de NAA; T4 – 50% dos sais do meio MS + 0,4mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,2mg.L<sup>-1</sup> de NAA. O pH dos meios foi aferido para 5,7±1 antes da autoclavagem por quinze minutos. O genótipo 253-II-4 apresentou melhor resultado para produção de calos, plantas e raízes, sendo o mais indicado para o cultivo *in vitro*, enquanto os genótipos 138-I-1 e 183-I-2 foram os que mais oxidaram e menos responderam à indução. A melhor formulação para induzir a germinação de embriões é T1, enquanto que T3 foi o meio que os genótipos desenvolveram mais calos.

**Palavras chave:** Pinhão-Manso; biodiesel; genótipo; explante.

## Abstract

The use of renewable energies is one of the most widespread alternatives to confront global warming. Biodiesel is one of the main options, especially the use of the *Jatropha curcas L.*, a species with strong resistance to drought and viable for small rural properties with family labor. A challenge to be overcome is the production and obtaining of selected seedlings from superior mother plants, and the objective of this work was to propose a protocol for obtaining cloned seedlings-clones and calluses of varieties of *Jatropha curcas*. For that, *Jatropha* embryos were used, extracted from seeds provided by EMBRAPA (253-II-4, 183-I-2 and 170-II-1) and donated for Fatec Piracicaba. The zygotic embryos were extracted from the seeds in a laminar flow chamber, with the aid of a scalpel. Asepsis was performed with a commercial sodium hypochlorite solution for 5 minutes, followed by washing in a 70% ethanol solution for 2 minutes. The explants were rinsed in autoclaved water and inoculated into the culture media. All treatments were supplemented with sucrose (30 g.L<sup>-1</sup>) and phytigel solidifying agent (2.4 g.L<sup>-1</sup>): T1 - 50% of the salts of the MS medium (MURASHIGE; SKOOG, 1962); T2 - 50% of the salts of the MS medium + 0.2mg.L<sup>-1</sup> of BAP + 0.2mg.L<sup>-1</sup> of NAA; T3 - 50% of the salts of the MS medium + 0.3mg.L<sup>-1</sup> of BAP + 0.2mg.L<sup>-1</sup> of NAA; T4 - 50% of the salts of the MS medium + 0.4mg.L<sup>-1</sup> of BAP + 0.2mg.L<sup>-1</sup> of NAA. The pH of the media was adjusted to 5.7 ± 1 before autoclaving for fifteen minutes. The genotype 253-II-4 showed the best result for the production of buds, plants and roots, being the most suitable for *in vitro* cultivation, while the genotypes 138-I-1 and 183-I-2 were the ones that most oxidized and least responded to induction. The best formulation to induce germination of embryos is T1, while T3 was the medium which genotypes developed more calluses.

**Keywords:** jatropha; biodiesel; genotype; explante.

### **Resumen**

El uso de energías renovables es una de las alternativas más extendidas para enfrentar el calentamiento global. El biodiesel es una de las principales opciones, especialmente el uso de Piñon-Manso (*Jatropha curcas* L.), una especie con fuerte resistencia a la sequía y viable para pequeñas propiedades rurales con mano de obra familiar. Un desafío a superar es la producción y obtención de plántulas seleccionadas de plantas de matriz superior, y el objetivo de este trabajo fue proponer un protocolo para obtener plántulas-clones y callosidades de variedades de *Jatropha*. Para este propósito, se extrajeron embriones de nuez física de semillas provistas por EMBRAPA (253-II-4, 183-I-2 y 170-II-1) y se donaron para Fatec Piracicaba. Los embriones cigóticos se extrajeron de las semillas en una cámara de flujo laminar, utilizando un bisturí. La asepsia se realizó con solución comercial de hipoclorito de sodio durante 5 minutos, seguido de lavado en solución de etanol al 70% durante 2 minutos. Los explantes se enjuagaron en agua esterilizada en autoclave y se inocularon en los medios de cultivo. Todos los tratamientos se complementaron con sacarosa (30 g.L<sup>-1</sup>) y agente solidificante de phytigel (2.4 g.L<sup>-1</sup>): T1 - 50% de las sales del medio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962); T2 - 50% de las sales del medio MS + 0.2mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0.2mg.L<sup>-1</sup> de NAA; T3 - 50% de las sales del medio MS + 0.3mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0.2mg.L<sup>-1</sup> de NAA; T4 - 50% de las sales del medio MS + 0.4mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0.2mg.L<sup>-1</sup> de NAA. El pH de los medios se midió a  $5,7 \pm 1$  antes de esterilizar en autoclave durante quince minutos. El genotipo 253-II-4 mostró el mejor resultado para la producción de callos, plantas y raíces, siendo el más adecuado para el cultivo in vitro, mientras que los genotipos 138-I-1 y 183-I-2 fueron los más oxidados y menos respondido a la inducción. La mejor formulación para inducir la germinación de embriones es T1, mientras que T3 fue el medio en el que los genotipos desarrollaron la mayor cantidad de callos.

**Palabras clave:** Piñon-Manso; biodiesel; genotipo; explante

## INTRODUÇÃO

O estímulo ao uso das energias renováveis, com destaque para os biocombustíveis em substituição aos combustíveis de origem fóssil, tornou-se uma das alternativas frente à questão do aquecimento global. Dentre essas destaca-se o biodiesel, principalmente com o uso da cultura de Pinhão-Manso (*Jatropha curcas L.*), apontado como planta de iminente sucesso no Brasil, em particular no que se refere à inclusão de pequenos agricultores.

O pinhão-manso chega à região semiárida como alternativa economicamente viável aos pequenos agricultores e grandes empresários. Espécie da família das Euforbiáceas, exigente em insolação e com forte resistência a seca, é uma cultura viável para pequenas propriedades rurais com mão de obra familiar, sendo mais uma fonte de renda e emprego para a região. Configura-se uma alternativa atraente para produção de óleo para fins energéticos. No entanto, um desafio a ser vencido é a produção e obtenção de mudas selecionadas de pinhão manso a partir de plantas matrizes superiores. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver cultivo in vitro para obtenção de mudas-clones e calos de variedades de pinhão-manso.

## REVISÃO DE LITERATURA

O centro de origem do pinhão-manso é incerto, mas acredita-se ser o México ou a América Central (HELLER, 1996). Foi introduzido nas ilhas de Cabo Verde em 1783, onde foi disseminado para todas as regiões tropicais, ocorrendo em vários países como Índia, Cabo Verde, Malásia, Tailândia e Filipinas, além de algumas regiões do Brasil (CORTESÃO, 1956).

No Brasil, o pinhão-manso adaptou-se às diferentes condições edafoclimáticas e sua distribuição geográfica ocorreu principalmente nos estados do Nordeste, Goiás e Minas Gerais (DRUMMOND et al., 1984; EPAMIG, 2003). No Nordeste, o pinhão-manso cresce espontaneamente, principalmente nas regiões mais secas do semiárido, sendo considerado uma opção agrícola por ser uma espécie com resistência à seca (ARRUDA et al., 2004).

A principal matéria-prima para produção de biodiesel são plantas oleaginosas, dentre as quais está o pinhão-manso. Sua utilização como matéria-prima vem sendo amplamente discutida e avaliada, podendo ser implantada em todas as regiões brasileiras (HEIFFIG; CÂMARA, 2006). Estima-se que existem cerca de 50 mil hectares plantados com pinhão-manso no Brasil, sendo 30 mil hectares controlados por grandes e médios produtores e 20 mil hectares cultivados por meio de agricultura familiar (DURÃES et al., 2009).

O ciclo produtivo do pinhão-manso muda de acordo com a forma de plantio, podendo ser propagado via sementes ou vegetativamente. Na propagação com sementes as plantas têm maior

variabilidade genética em relação à planta mãe e são mais vigorosas, mesmo que iniciem a produção mais tardiamente. Em condições adequadas de produção, a planta propagada por sementes pode alcançar cerca de 30 a 50 anos (CORTESÃO, 1956).

Segundo pesquisas realizadas por Jocker e Jepsen (2003), as sementes de pinhão-manso, quando armazenadas em temperatura ambiente, podem manter-se viáveis por pelo menos um ano. No entanto, não é recomendado um armazenamento prolongado porque as sementes oleaginosas são mais suscetíveis ao ataque de patógenos e pode ocorrer a rancificação dos ácidos graxos que compõem o óleo. Saturnino et al. (2005) explicam que a diminuição da capacidade germinativa, que ocorre durante o período de armazenamento à temperatura ambiente, é devido a um processo de deterioração que ocorre gradativamente durante o tempo de estocagem.

Algumas sementes não germinam mesmo quando colocadas sob condições ambientais favoráveis. Tais sementes são classificadas como dormentes, fenômeno que ao mesmo tempo que se constitui um mecanismo eficiente para garantir a sobrevivência e a perpetuação da espécie pode levar ao atraso e a desuniformidade na germinação, uma vez que as sementes apresentam algum tipo de restrição (CARDOSO, 2004; MARCOS FILHO et al., 1987).

A propagação vegetativa ou assexuada é uma técnica utilizada para reproduzir uma planta geneticamente idêntica à planta matriz. Isso ocorre porque as células contêm, em seus núcleos, a informação necessária para gerar uma nova planta (GRAÇA et al., 2000). É considerada a técnica de maior viabilidade econômica para o estabelecimento de plantios clonais, pois permite a multiplicação dos genótipos selecionados em curto período e a baixo custo (PAIVA; GOMES, 2005). Essa técnica faz com que ocorra a eliminação ou redução da fase juvenil das plantas cultivadas, possibilitando maior uniformidade e número de mudas produzidas a partir de uma planta matriz (BORÉM, 1997).

Como o pinhão-manso ainda não passou por processo de melhoramento intenso, a propagação assexuada é a solução para contornar o problema da desuniformidade genética. A utilização da reprodução vegetativa facilita o trabalho do melhorista, pois, uma vez identificada uma planta considerada superior, ela pode ser propagada, mantendo a sua identidade genética (BORÉM, 1997). O sucesso dessa técnica depende da facilidade de enraizamento de cada espécie, da qualidade do sistema radicular formado e do desenvolvimento posterior da planta (OLIVEIRA et al., 2001).

Técnicas modernas de biotecnologia, como a micropropagação, a manipulação genética e a biologia molecular, estão sendo utilizadas para o melhoramento genético de plantas, permitindo o desenvolvimento de novas variedades (PEREIRA, 2004). A micropropagação utiliza pequenos

fragmentos de tecido in vivo (explante) que são utilizados assepticamente em meio nutritivo, onde em cada fragmento de planta, ainda que pequeno (inclusive células individuais), permanecem todos os elementos que em condições apropriadas podem reconstruir todo o organismo (TORRES et al., 1998).

A primeira aplicação comercial da micropropagação foi feita por Morel no ano de 1960 ao multiplicar orquídeas. Mediante cultura de ápices caulinares e regeneração de protocormos, diminutas estruturas se diferenciavam e davam origem a embriões (CARVALHO et al., 2006).

No Brasil, a micropropagação vem sendo muito utilizada, permitindo um acesso mais rápido dos agricultores a mudas de melhor qualidade, especialmente das variedades tradicionais e as desenvolvidas pelos programas de melhoramento genético. A técnica envolve o crescimento in vitro a partir de gemas (ápices caulinares ou florais), nos quais é induzida a formação de novas gemas em condições controladas de cultivo.

Além da produção de mudas em qualquer época do ano e com economia de tempo e espaço, as principais vantagens da micropropagação incluem a uniformidade no crescimento das mudas, o que permite a uniformização do plantio e sincronização da colheita, e a obtenção de plantas com características genéticas idênticas à matriz, evitando a disseminação de pragas e doenças.

Um dos princípios básicos para o sucesso da micropropagação depende, em parte, de medidas de controle e prevenção da contaminação microbiana (LEIFERT et al., 1994; SILVA et al., 2003) devido a essa técnica proporcionar um ambiente favorável para o crescimento de bactérias, leveduras e fungos (DANTAS et al., 2002). Os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultivo, eliminando no meio metabólitos tóxicos, podendo ocasionar a morte da plântula (PEREIRA et al., 2003).

Na desinfestação do explante, a maior dificuldade é obter a descontaminação sem conduzi-los à morte quando isolados. Para isso, várias substâncias com ação germicida são utilizadas na desinfestação dos explantes. Os mais comuns são o etanol e os compostos a base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e de cálcio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Diversos fatores são determinantes, entre eles a concentração dos agentes desinfetantes, o tempo de exposição dos explantes, que pode variar muito os índices de contaminação de acordo com a espécie, e a sensibilidade do tecido a ser desinfetado (CHAVES et al., 2005; FERREIRA et al., 2009).

Segundo Fermino Júnior et al. (2009) o sucesso da micropropagação tem como ponto de partida a recomendação de um protocolo de assepsia e estabelecimento in vitro com o maior número de explantes assépticos, menor produção de compostos fenólicos (oxidação) e maior

sobrevivência dos explantes para as etapas seguintes. Mudanças micropropagadas tendem a sobreviver mais no campo e crescer mais rapidamente nos primeiros estágios de desenvolvimento, do que as mudas convencionais.

A técnica de micropropagação tem como principais vantagens a multiplicação rápida de indivíduos e a possibilidade de conservação de germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade (ECHEVERRIGARAY et al., 2001). Pode ser dividida em três fases: a primeira é a etapa de estabelecimento do cultivo inicial ou primário; a segunda é de multiplicação das brotações; e a terceira é a do enraizamento (MURASHIGE, 1974). Uma etapa anterior ao isolamento, que compreende a seleção da planta-matriz fornecedora de explantes e pré tratamentos para promover uma determinada resposta *in vitro*, pode ser considerada como mais uma fase desse processo e outra posterior ao enraizamento, denominada aclimatização, que compreende a transferência para o meio ambiente (KRIKORIAN, 1991).

Para o crescimento e desenvolvimento da planta *in vitro* utiliza-se meio de cultivo constituído de água, sais inorgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e fitorreguladores (GUERRA; NODARI, 2006). Essas substâncias suprem as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células (ARAUJO et al., 2005). O crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e balanço dos reguladores de crescimento existentes no meio de cultivo, principalmente auxinas e citocininas (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

As citocininas são utilizadas para quebra da dominância apical dos brotos e aumento da taxa de multiplicação. Desse modo, obtém-se grande número de brotações por meio do crescimento de meristemas laterais (SRISKANDARAJAH et al., 1982). Entre as citocininas o BAP (6-benzilaminopurina) tem sido muito eficiente na multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias em diversas espécies (HU; WANG, 1983). Para multiplicação em meio de cultivo, em geral, suas concentrações variam de 0,1 a 5 mg.L<sup>-1</sup> (TOMBOLATO; COSTA, 1998).

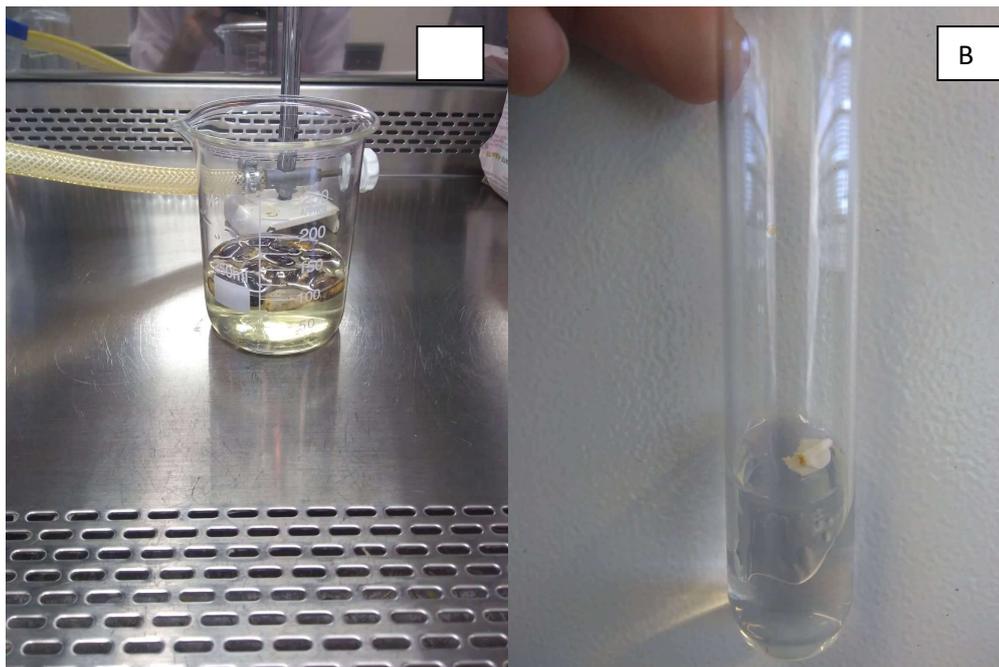
## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados embriões de pinhão-manso, extraídos de sementes fornecidas pela EMBRAPA e doadas para a Fatec Piracicaba. Esses genótipos são codificados pelas seguintes nomenclaturas: 253-II-4, 183-I-2 e 170-II-1.

Os embriões foram coletados das sementes em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de bisturi, e armazenados em recipientes com água até coletar todo o material. No laboratório, as sementes obtidas foram lavadas com detergente neutro durante cinco minutos e transferidas para recipiente com água destilada autoclavada. Após a lavagem, as sementes foram levadas para a

câmara de fluxo laminar para realização da assepsia com solução de hipoclorito de sódio comercial por cinco minutos, seguida de lavagem em solução de etanol 70% por dois minutos (Figura 1a). Os explantes foram, então, enxaguados em água autoclavada e inoculados nos meios de cultura (Figura 1b).

**Figura 1. (a) Assepsia de sementes e; (b) Inoculações de embriões de pinhão-mansão**



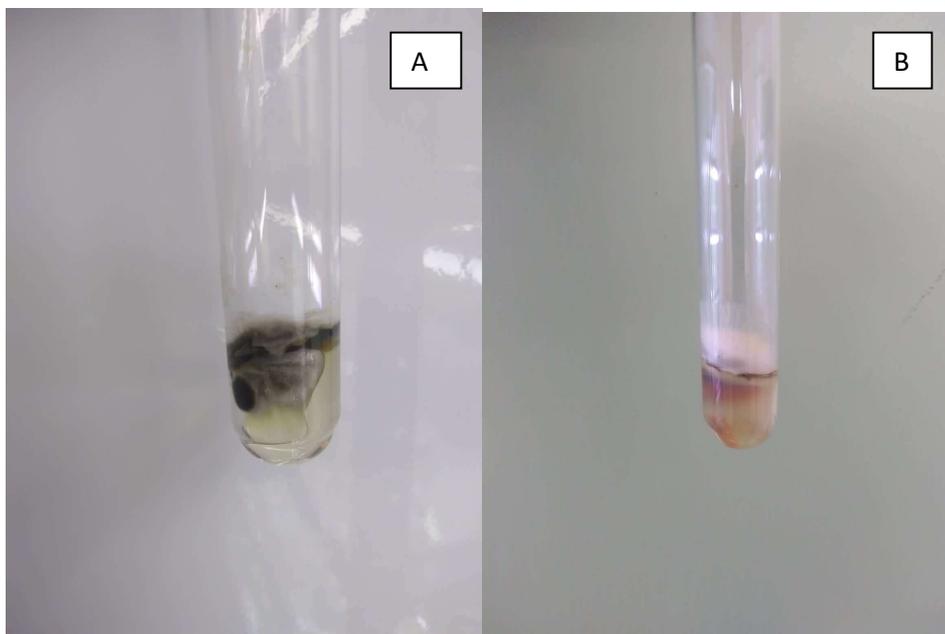
Fonte: Autores.

Os tratamentos foram baseados em ensaios pilotos (SOUZA et al., 2017; SOUZA; NASCIMENTO, 2018) para a germinação in vitro dos embriões de pinhão-mansão, e com isso foi realizado os seguintes tratamentos: T1 – 50% dos sais do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962); T2 – 50% dos sais do meio MS + 0,2mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,2mg.L<sup>-1</sup> de NAA; T3 – 50% dos sais do meio MS + 0,3mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,2mg.L<sup>-1</sup> de NAA; T4 – 50% dos sais do meio MS + 0,4mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,2mg.L<sup>-1</sup> de NAA. Todos tratamentos foram suplementados com sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>) e agente gelificante phytigel (2,4 g.L<sup>-1</sup>). O pH foi aferido para 5,7±1 antes da autoclavagem (esterilização) a 120°C e 1 Kgf.cm<sup>-2</sup> por quinze minutos. A incubação foi realizada em sala climatizada de crescimento com temperatura 25 ± 3 °C, sob fotoperíodo de 16 horas de luz.

As variáveis avaliadas foram o percentual de embriões de pinhão-manso germinados e desenvolvidos, determinados através da avaliação visual do desenvolvimento e formação de raízes e partes aéreas.

Os explantes foram avaliados a cada 15 dias, contados da inoculação. Nesse período também foram verificadas as possíveis contaminações dos explantes. Em caso de contaminação (Figura 2(a) e (b)), os explantes foram descartados. Os tubos contaminados foram submetidos à autoclavagem a 120°C e 1 Kgf.cm<sup>-2</sup> por 15 minutos para eliminação por completo dos microrganismos em desenvolvimento. Todo o conteúdo dos tubos foi descartado.

Figura 2 (a) e (b): Exemplos de contaminação



Fonte: Autores.

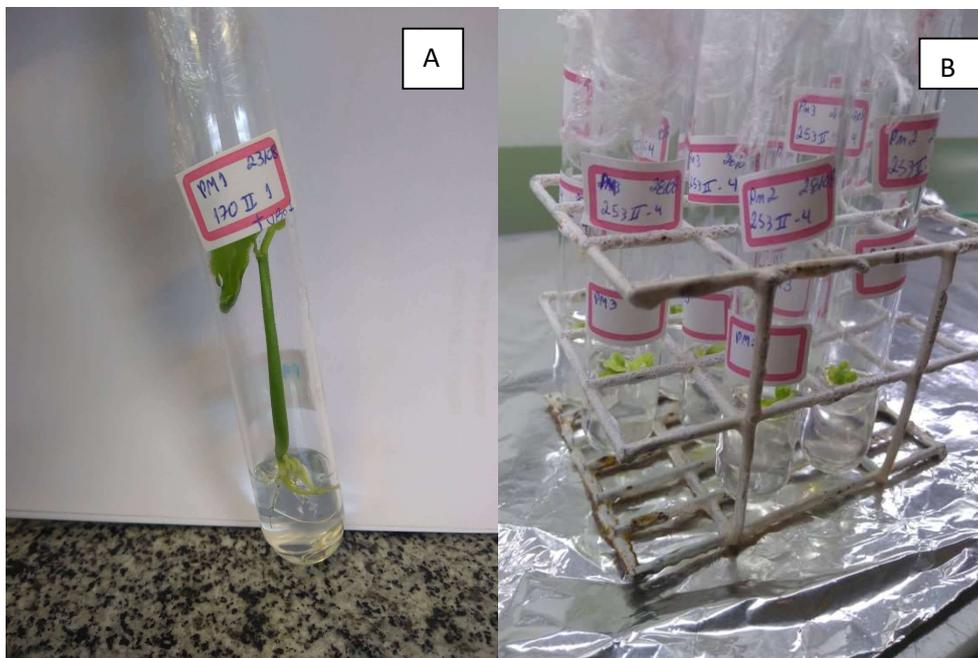
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas inoculações de embriões em três datas diferentes, que geraram cerca de 48 tubos de ensaio, e mais três inoculações de explantes diferentes (folhas, segmentos de caule e segmentos de raiz, provenientes de plantas germinadas em meio T1, que geraram cerca de 70 tubos. A taxa de contaminação nesse procedimento foi muito baixa, menor que 10%, indicando que o processo de assepsia das sementes e manipulações foram adequados.

Nove dias após inoculação dos embriões, notou-se que a germinação do genótipo 170 II 1 em meio de cultura T1 foi mais acelerada que os demais genótipos e meios, com caules já formados

e perto de dois a três centímetros, além da ausência de quaisquer sinais de contaminação (Figura 3 a e b).

**Figura 3. Comparação do meio T1 (a) com os demais (b)**



Fonte: Autores.

Esse mesmo genótipo (170 II 1), quando inoculado em meio T2, apresentou germinação dos embriões - ainda que um pouco mais lento que em T1 -, não apresentando raiz em nenhum dos frascos. Em meio T3, o desenvolvimento dos embriões se mostrou similar ao ocorrido em meio T1, com caules em torno dos três centímetros, folhas verdes e raízes. Nenhum apresentou sinal de contaminação e um dos tubos, neste meio T3, apresentou início de formação de calo após 30 dias de inoculação.

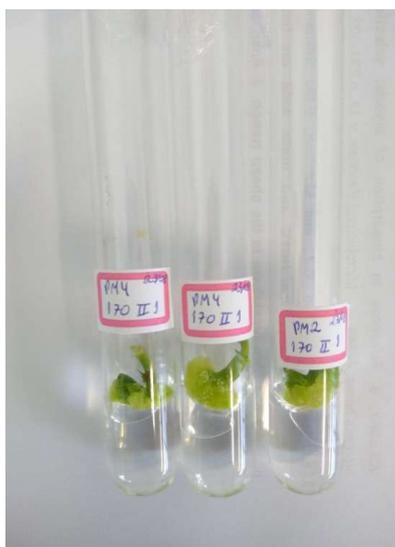
Já embriões do genótipo 183 I 1 inoculados em meio T1 apresentaram crescimento mais lento em comparação ao genótipo 170 II 1 no mesmo T1, com poucas folhas, caules com menos de um centímetro e sem calos nem raízes. No meio T2, os embriões desse genótipo (183 I 1) apresentaram um leve sinal de crescimento, com caules pequenos e sem raízes. Metade dos embriões 183 I 1 germinados em T3 apresentaram caules formados, sendo que um dos tubos apresentou crescimento um pouco mais lento que os demais. Nenhum aparentou sinal de contaminação. Apenas 50% dos embriões desse genótipo inoculados em T4 apresentaram sinais de crescimento, mesmo que devagar.

Os embriões do terceiro genótipo avaliado, 253 II 4, inoculados em qualquer das quatro formulações de meios (T1 a T4), apresentaram os piores resultados. Nenhum tubo apresentou sinal de crescimento ou contaminação 13 dias após a inoculação.

Nas observações, realizadas a cada 15 dias, foi constatado que não ocorreram grandes mudanças, apenas alguns tubos contaminados. T1 se manteve melhor, em termos de desenvolvimento do broto, em relação aos demais, que apresentaram crescimento um pouco mais lento em relação às suas datas de inoculação.

Ao final das observações, ficou evidente que o meio de cultura T1, sem adição de fitorreguladores, permitiu melhor germinação dos embriões, apresentando caule bem verde, folhas verdes e raízes (Figura 4). Além disso, o genótipo 253 II 4 teve melhores resultados em comparação aos demais, apresentando mais calos (meios T2, T3 e T4), mais plantas e raízes (meio T1), embora tenha sido o genótipo mais lento a iniciar, de fato, a germinação, o que corrobora com resultados obtidos por Souza e Nascimento (2018) ao avaliarem este genótipo. O genótipo 170 II 1 foi o que mais apresentou contaminações. Isso pode ter ocorrido devido a assepsia realizada de forma deficiente em algum momento, embora mesmo protocolo tenha sido seguido para todos, ou o genótipo pode ser mais suscetível à contaminação, já que Souza et al. (2017) relatam problemas de contaminação similar. Vale lembrar que esse genótipo apresentou germinação melhor e mais rápida logo após inoculação, porém praticamente todas as plantas obtidas acabaram contaminando com o passar do tempo.

**Figura 4: Meios do genótipo 170 II 1 com formação de calos em meios de cultura contendo fitorreguladore (T2, T3 e T4).**



Fonte: Autores.

Aproximadamente 30 dias após a inoculação, as plantas desenvolvidas nos meios de cultura T1 foram usadas como fonte de explantes (folhas, caules e raízes) para reinoculação nos tratamentos (T1 a T4). Os calos obtidos de embriões germinados em meios T2, T3 e T4 foram transferidos para meio T1, visando regeneração de plantas a partir dos calos.

Após 20 dias da reinoculação dos explantes, alguns frascos já apresentaram caules, raízes e folhas. Em uma das últimas observações, realizada quatro meses após inoculação dos embriões, as plantas se mostraram em constante desenvolvimento, algumas com caules de dois centímetros, folhas e caules bem verdes e raízes grandes. Os genótipos 170 II 1 e 253 II 4 apresentaram melhor crescimento. Com relação a formação de calos, o meio de cultura T3 foi o mais efetivo. Entretanto, os calos obtidos, quando transferidos para o meio sem fitorreguladores (T1), não tiveram capacidade regenerativa, evoluindo para oxidação e morte.

A tabela 1 a seguir, demonstra resumidamente o comportamento de cada genótipo em cada meio de cultura (tratamentos) avaliado.

## CONCLUSÃO

Sementes do genótipo 253-II-4 se sobressaíram em todas as etapas, provando estarem mais aptas do que demais genótipos para o cultivo *in vitro*.

Formulação de meio T1 – 50% dos sais do meio MS, é a mais adequada para germinação de embriões.

Os meios T2 – 50% dos sais do meio MS + 0,2m.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,2mg.L<sup>-1</sup> de NAA; T3 – 50% dos sais do meio MS + 0,3mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,2mg.L<sup>-1</sup> de NAA; e T4 – 50% dos sais do meio MS + 0,4mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,2mg.L<sup>-1</sup> de NAA, levam à formação de calos, sendo o meio T3 o mais efetivo para a calogênese.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J.S.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; LUIZ, J. M. Q.; PEREIRA, A. R.; FERREIRA, A. L.; MYIADA, L. Y. Influência de cinetina e ácido indolbutírico na indução de calos em anteras de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Cult. Micropropag.* v. 1, n. 2, p. 66-71. 2005.

ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, A. P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curca* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas*, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 789-799, 2004.

BORÉM, A. *Melhoramento de plantas: sistemas reprodutivos das espécies cultivadas (reprodução assexual)*. Viçosa: UFV, 1997. p. 36-37.

CARDOSO, V. J. M. Dormência: estabelecimento do processo. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F.. *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre-RS: Artmed, 2004. p. 95-108.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. *Fatores inerentes à micropropagação*. Campina Grande: Embrapa, 2006. p. 11-25. (Documentos, 148).

CHAVES, A. da C.; SCHUCH, M. W. ; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação in vitro de *Physalis peruviana* L. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, 2005.

CORTESÃO, M. *Culturas tropicais: plantas oleaginosas*. Lisboa: Clássica, 1956. 231p.

DANTAS, S.; OLIVEIRA, S.; CÂMARA, T. Contaminação microbiana no cultivo in vitro de plantas. In: LUZ, W. C. (org.) *Revisão anual de patologia de plantas*. 10. ed. Passo Fundo: RAPP, 2002. v. 10, p. 391-407.

DRUMMOND, O. A.; PURCINO, A. A. C.; CUNHA, L. H. S.; VELOSO, J. M. *Cultura do pinhão manso*. Belo Horizonte: Epamig, 1984. 99p.

DURÃES, F. O. M.; LAVIOLA, B. G.; SUNDFELD, E.; MENDONÇA, S.; BHERING, L. L. *Pesquisa, desenvolvimento e inovação em pinhão-manso para produção de biocombustíveis*. Brasília: EMBRAPA, 2009.

ECHEVERRIGARAY, S.; ANDRADE, L. B.; DELAMARE, A. P. L.; ZENI, A. L. B.; CARRER, R. Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Biotecnologia na agricultura e na agroindústria*. Guaíba: Agropecuária, p. 257-276, 2001.

FERMINO JUNIOR, P. C.; NAGAO, E. O.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento, germinação e multiplicação in vitro de teca (*Tectona grandis* L. f.) a partir de genótipos da Amazônia SulOcidental. *Scientia Forestalis*, Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 427-435, 2009.

FERREIRA, M. G. R.; SANTOS, M. R. A.; BRAGADO, A. C. R. Propagação in vitro de cupuaçuzeiro: desinfestação de explantes florais. *Saber Científico*, Porto Velho, v. 2, n. 2, p. 37- 44, 2009.

GEORGE, E. F. and SHERRINGTON, P. D. (1984). *Plant Propagation by Tissue Culture - Handbook and Directory of Commercial Laboratories*. Eastern Press.

GRAÇA, M. E. C.; COOPER, M. A.; TAVARES, F. R. CARPANEZZI, A. A. *Estaquia de erva-mate*. Curitiba: Embrapa Florestais, 2000, 6 p. (Circular Técnica, 18).

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

GUERRA, M. P; NODARI, R. O. *Apostila de Biotecnologia 1-Cultura de tecidos vegetal*. Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC (2006). 41 p.

HEIFFIG, L. S.; CÂMARA, G. M. S. Potencial da cultura do pinhão-manso como fonte de matéria-prima para o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel. In: CÂMARA, G. M. S.; HEIFFIG, L. S. (Coord.) *Agronegócio de Plantas Oleaginosas: matérias-primas para biodiesel*. Piracicaba: ESALQ/USP/LPV, 2006. p. 105 – 121.

HELLER, J. *Physic nut. Jatropha curcas L.* Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome. 1996.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). *Handbook of plant cell culture*. New York: MacMillan, p. 117-227, 1983.

LEIFERT, C.; MORRIS, C. E.; WAITES, W. M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems in vitro. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Netherlands, v. 13, n. 2, p. 139-183, 1994.

MARCOS FILHO, J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba-SP: Fealq, 2005. 495p.

MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25, 135 - 66.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 1, p. 473-479, 1962.

OLIVEIRA, M. C.; RIBEIRO, J. F.; RIOS, M. N. S.; REZENDE, M. E. *Enraizamento de estacas para produção de mudas de espécies nativas de matas de galeria*. Brasília: Embrapa Cerrados, 2001. 4 p. (Recomendação Técnica, 41).

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. *Propagação vegetativa de espécies florestais*. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 40 p.

PEREIRA, G. A. *Uso do gene xylA – xilose isomerase como agente de seleção na transformação genética de citros*. 2004. 38 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo- USP, Piracicaba, 2004.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagadas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

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

SILVA, J. T. S.; NHUT, D. T.; TANAKA, M.; FUKAI, S. The effect of antibiotics on the in vitro growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). *Scientia Horticulture*, Netherlands, v. 97, n. 3, p. 397-410, 2003.

SOUZA, B. F. de; FREGUGLIA, R. M. O.; NASCIMENTO, D. D. do. Avaliação de microrganismos contaminantes da micropropagação de pinhão manso. *Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente* (Online), v. 6, n. 1, p. 56-61, 2017.

SOUZA, B. F. de; NASCIMENTO, D. D. do. Cultivo in vitro de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). *Bioenergia em Revista: Diálogos*, v. 8, n. 1, p. 7 - 18, jan./jun. 2018.

SRISKANDARAJAH, S.; MULLINS, M. G.; NAIR, Y. Induction of adventitious rooting in vitro in difficult to propagate cultivars of apple. *Plant Science Letters*, Limerick, v. 24, n. 1, p. 1-9, 1982.

TOMBOLATO, A. F. C; COSTA, A. M. M. *Micropropagação de plantas ornamentais*. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 15-17. (Boletim Técnico, 174). 1998.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. M. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas: meios nutritivos*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, v. 1, p. 87-116. 1998.

1 SILVA, Gabriel Henrique Ribeiro da. Possui graduação em Tecnologia em Biocombustíveis pela Fatec Piracicaba Dep. “Roque Trevisan”. Experiência na área de Química.

2 NASCIMENTO, Daniela Defavari do. Possui graduação em Engenharia Agrônômica pela Universidade de São Paulo (1997), graduação em Licenciatura Em Ciências Agrárias pela ESALQ/USP (1998), mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela ESALQ/USP (2000) e doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela ESALQ/USP (2005). Especialista (MBA) em Agronegócios pelo PECEGE/ESALQ/USP (2012). Tem experiência na área de Agronomia, com ênfase em Bioquímica e Biologia Molecular, atuando principalmente nos seguintes temas: cultura de tecidos, micropropagação de plantas, clonagem gênica, transformação genética de plantas (Tabaco, Arabidopsis, Eucalipto e cana-de-açúcar), análises moleculares. Desde 2010 é professora concursada por prazo indeterminado para as disciplinas: Biotecnologia e Bioetanol do curso de Graduação em Biocombustíveis; e Biotecnologia e Bioquímica de Alimentos do curso de Graduação em Alimentos, todos da FATEC Piracicaba "Deputado Roque Trevisan".