**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Avaliação morfogênica da micropropagação de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) sob indução de estresse oxidativo

Fabiane Aparecida Artioli-Coelho

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica
de Plantas

**Piracicaba
2013**

Fabiane Aparecida Artioli-Coelho
Licenciado em Ciências Biológicas

**Avaliação morfogênica da micropropagação de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) sob
indução de estresse oxidativo**

Orientador:
Prof. Dr. **MARCÍLIO DE ALMEIDA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica
de Plantas

**Piracicaba
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Artioli-Coelho, Fabiane Aparecida

Avaliação morfogênica da micropropagação de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) sob indução de estresse oxidativo / Fabiane Aparecida Artioli-Coelho. - Piracicaba, 2013.
109 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Cultura de tecidos 2. ERO 3. Morfogênese 4. Oleaginosa 5. Regulador de crescimento I. Título

CDD 633.85
A787a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"

*Aos meus pais, Laerte e Rosa, e à minha irmã, Tatiane,
exemplos de luta e caráter, por todo apoio e confiança.*

Dedico

*Ao meu marido, João Paulo, pelo amor incondicional,
companheirismo e por fazer a minha vida ainda mais feliz.*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pelo apoio.

Ao orientador e amigo Prof. Dr. Marcílio de Almeida, por me permitir a convivência junto de uma equipe especial e me presentear com seus ensinamentos, caráter e exemplo de profissional, meu agradecimento eterno.

À amiga e mãe científica, Dr^a. Cristina Vieira de Almeida, pelos ótimos momentos de conversas, conselhos, apoios e risadas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À empresa *InVitroPalm* Consultoria pelo auxílio financeiro.

Ao pesquisador Dr. Bruno Galvêas Laviola, da EMBRAPA Agroenergia, pela concessão das sementes de pinhão manso, pela gentileza, trocas de conhecimentos e amparo científico.

Ao Dr. Fernando Angelo Piotto, à Prof. Dra. Priscila Lupino Gratão e ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo pelo conhecimento fornecido, apoio científico, paciência e dedicação.

Aos membros da banca examinadora do presente trabalho, por aceitarem o convite, pelas contribuições e sugestões.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Maria Solizete Granziol Silva, pela paciência, competência, apoio e amizade.

Aos técnicos e amigos Eveline Calderan Meneghetti e José Roberto Romanini pela ajuda na execução do projeto, apoio, companheirismo e confiança.

Aos grandes amigos do Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, Erika, Eveline, Francisco, Gabriela, Germana, Gilvano, Katherine, Leandro, Lívia, Marília, Natalia, Priscilla, Rafaella e Raquel. Vocês foram essenciais, tornando o ambiente de trabalho ainda mais prazeroso e divertido.

Às minhas queridas amigas Amanda, Carla e Kamila, que me deram forças para seguir em frente e que foram responsáveis por uma fase maravilhosa da minha vida, apesar de muito difícil.

Aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado, sempre com muita paciência e carinho, meu agradecimento e reconhecimento por todo esforço e dedicação que tiveram na educação de suas filhas.

À minha irmã Tatiane que abriu as portas e me mostrou esse mundo maravilhoso do conhecimento e da pesquisa.

Um agradecimento mais que especial ao meu marido João Paulo, que sempre esteve junto nos momentos mais difíceis e desafiadores da minha vida, me dando forças para seguir em frente. Obrigada pela paciência, pela pessoa maravilhosa, por fazer parte de mim e me proporcionar tanta felicidade.

A todos que, de certa forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

*"A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original"*

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Aspectos gerais do pinhão manso.....	19
3.2 Potencial para produção de biodiesel	20
3.3 Aquecimento global.....	23
3.4 Diversidade genética do pinhão manso	25
3.5 Micropropagação do pinhão manso.....	27
3.5.1 Auxinas.....	31
3.5.2 Citocininas	32
3.5.3 Mecanismo de ação dos fitormônios	32
3.6 Estresse oxidativo	33
3.6.1 Controle enzimático do estresse oxidativo	35
3.6.2 Controle não enzimático do estresse oxidativo	36
3.6.3 Peroxidação lipídica	37
3.6.4 Estresse oxidativo e resposta morfogênica	38
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.2 Localização da área experimental.....	39
4.3 Material vegetal	39
4.4 Micropropagação	40
4.4.1 Remoção da testa (tegumento externo) e desinfestação das sementes	40
4.4.2 Germinação <i>in vitro</i>	40
4.4.3 Obtenção de explantes para a indução de resposta morfogênica.....	41
4.4.4 Testes de indução de resposta morfogênica	42
4.5 Análise morfofisiológica	42
4.6 Análise bioquímica e molecular	43
4.6.1 Coleta do material.....	43
4.6.2 Peroxidação lipídica	43

4.6.3 Determinação de proteínas.....	44
4.6.4 Extração enzimática	44
4.6.5 Atividade da catalase – CAT	44
4.6.5.1 Atividade em espectrofotômetro	44
4.6.5.2 Atividade em PAGE não desnaturante.....	45
4.6.6 Atividade da superóxido dismutase – SOD	45
4.6.7 Atividade da ascorbato peroxidase – APX	46
4.6.8 Perfil proteico em SDS-PAGE.....	46
4.7 Análise anatômica	47
4.7.1 Desidratação e emblocagem das amostras para análise anatômica.....	47
4.7.2 Cortes histológicos	47
4.7.3 Testes de coloração empregados para análise anatômica	47
4.8 Análise estatística dos dados	48
4.9 Resumo esquemático do material e método.....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 Análise morfofisiologia.....	51
5.1.1 Exsudado de compostos fenólicos e oxidação dos explantes	52
5.1.2 Intumescimento da base e formação de calos	56
5.1.3 Organogênese.....	60
5.1.3.1 Gemas adventícias.....	62
5.1.3.2 Raízes adventícias	67
5.2 Análise bioquímica e molecular.....	70
5.2.1 Quantificação de Malondialdeído (MDA) em espectrofotômetro	70
5.2.2 Quantificação de proteína em espectrofotômetro	72
5.2.3 Atividade da catalase (CAT) em espectrofotômetro e em PAGE não desnaturante.....	72
5.2.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD) em PAGE não desnaturante	75
5.2.5 Atividade da ascorbato peroxidase (APX) em espectrofotômetro	78
5.2.6 Perfil proteico em SDS-PAGE.....	79
5.3 Análise anatômica	81
5.3.1 Avaliação histoquímica.....	83
5.3.2 Avaliação histológica das respostas morfogênicas	88
6 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS.....	93

RESUMO

Avaliação morfogênica da micropropagação de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) sob indução de estresse oxidativo

As condições divergentes do ambiente *in vitro*, como elevadas concentrações de sacarose, de reguladores de crescimento, de substâncias tóxicas, quando comparadas com o ambiente *ex vitro*, refletem-se em um desequilíbrio da relação entre compostos antioxidantes versus compostos oxidantes, resultando em elevada formação de espécies reativas de oxigênio, culminando no estabelecimento de um estresse oxidativo *in vitro*. No entanto, mesmo sendo capazes de conduzir a morte celular, as espécies reativas de oxigênio atuam como importantes sinalizadoras do crescimento e desenvolvimento vegetal, por alterarem o padrão de expressão gênica, o metabolismo e a competência celular, sendo nesse aspecto considerado benéfico um nível moderado de estresse oxidativo para desencadear uma determinada rota morfogênica. Diante disso, o presente trabalho objetivou induzir o estresse oxidativo, suplementando o meio de cultura com reguladores de crescimento do grupo das citocininas e auxinas, com a finalidade de compreender a atuação deste evento nas respostas morfogênicas *in vitro* do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). Para tanto, utilizou-se sementes de pinhão manso de três procedências (CNPAC 101: Rio Verde, GO; CNPAC 115: Xambrê, PR e CNPAC 224: São Francisco do Glória, MG), as quais foram germinadas *in vitro* para a obtenção das plântulas e utilização do terço mediano do hipocótilo como explante nos experimentos de indução de estresse oxidativo *in vitro*. A análise morfofisiológica permitiu selecionar os tratamentos que induziram respostas organogênicas, que juntamente com o grupo controle, tiveram a quantificação da peroxidação lipídica, as atividades das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e ascorbato peroxidase, determinadas, assim como o estabelecimento do perfil proteico de cada tratamento e a realização de análises histológicas e histoquímicas. Os resultados evidenciaram que as respostas morfogênicas foram dependentes do tipo e combinação de regulador de crescimento presente no meio de cultura; e ficou evidente pela quantificação da peroxidação lipídica e das atividades das enzimas antioxidantes, que a ausência de regulador de crescimento no meio de cultura foi o principal indutor do estresse oxidativo, permitindo constatar que quanto mais suave o estresse oxidativo, mais promissoras eram as respostas organogênicas constatadas nos explantes hipocotiledonares. Desta forma, o maior nível de estresse oxidativo constatado no grupo controle, relacionou-se negativamente com a resposta morfogênica obtida neste grupo, quando comparado aos demais tratamentos que apresentaram um nível de estresse oxidativo mais ameno e, conseqüentemente, uma resposta morfogênica mais promissora. O perfil proteico evidenciou o padrão existente de algumas bandas, independentemente da procedência considerada, confirmando a proximidade genética dos diferentes acessos de pinhão manso no Brasil. As análises histológicas demonstraram a ocorrência de organogênese indireta, com o desenvolvimento de calos organogênicos, ao passo que nas análises histoquímicas somente a presença de lipídios não foi detectada, enquanto proteínas totais, compostos fenólicos e amido foram constatados em pelo menos um dos três materiais analisados, para as três procedências de pinhão manso. Os resultados obtidos possibilitaram estabelecer uma relação entre o estresse oxidativo *in vitro*, a resposta morfogênica e o efeito dos reguladores de crescimento presentes no meio de cultura, além do potencial sucesso de produção de pinhão manso pela cultura de tecidos.

Palavras-chave: Cultura de tecidos; ERO; Morfogênese; Oleaginosa; Regulador de crescimento

ABSTRACT

Morphogenic evaluation of physic nut (*Jatropha curcas* L.) micropropagation under oxidative stress induction

The environmental divergent conditions *in vitro* culture, such as high concentrations of saccharose, growth regulators, toxic substances, and others, when compared with the *ex vitro* conditions, reflected in an imbalance of antioxidants versus oxidant compounds relationship, resulting in an elevated formation of reactive oxygen species, which culminates in the establishment of an oxidative *in vitro* stress. However, even being able to conduce cell death, reactive oxygen species act as an important signaling of plant growth and development by altering the pattern of gene expression, cellular metabolism and cellular competence, being considerate beneficial in this context in which a moderate level of oxidative stress is required to trigger a morphogenetic route. Therefore, this study aimed to induce oxidative stress, supplementing the culture medium with growth regulators group of cytokines and auxin, with the purpose of understand the role of these event in vitro morphogenetic responses of physic nut (*Jatropha curcas* L.). Hence, were used physic nut's seeds of three provenances (CNPAC 101: Rio Verde, GO; CNPAC 115: Xambê, PR and CNPAC 224: São Francisco do Glória, MG), which were in vitro germinated to obtain the seedlings and the middle third of hypocotyls that was used as explant in experiments to induction in vitro oxidative stress. The morphophysiological analysis allowed to select the treatments that induced the organogenic responses, which along with the control group, had the quantification of lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase, determined as well as the establishment of the protein profile of each treatment and the realization of histological and histochemical analyses. The results showed that the morphogenic responses were dependent on the type and combination of growth regulators present in the culture medium; and with the lipid peroxidation quantification as well as antioxidant enzyme activities, it became evident that the oxidative stress was mainly caused by the absence of growth regulators in the culture medium, allowing noted that the softer oxidative stress, were the most promising responses organogenic found in hypocotyls. Thus, the higher level of oxidative stress observed in the control group correlated negatively with the morphogenic response obtained in this group when compared to the other treatments that showed a level of milder oxidative stress and, consequently, a more promising morphogenic response. The protein profile showed some band pattern, regardless of the provenances considered, confirming the low genetic distance between different accessions of *Jatropha* in Brazil. Histological analysis demonstrated the occurrence of indirect organogenesis, with the development of organogenic calli, whereas in histochemical analyzes only the presence of lipids was not detected while total proteins, phenolic compounds and starch were found in at least one of the three materials analyzed for the three provenances of physic nut. Taking together all the obtained data, it was possible to establish a relationship between oxidative stress, the morphogenic response in vitro and the effect of growth regulators in the culture medium as well as prove the potential success of the production of *jatropha* tissue culture.

Keywords: Tissue culture; ROS; Morphogenesis; Oilseed; Plant growth regulator

1 INTRODUÇÃO

Considerada uma planta “multiuso” devido às diversas funcionalidades, o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) destaca-se pelo potencial de produção de matéria-prima para a síntese de biodiesel.

Contudo, por ser uma planta alógama, a reprodução da espécie por sementes, resulta em plantios desuniformes, tornando um entrave para a produção da cultura. Além disso, impossibilita a garantia da qualidade do óleo.

Diante destes fatos, a micropropagação apresenta-se como uma alternativa à propagação do pinhão manso, possibilitando homogeneidade do material, bem como qualidade, produção de mudas em escala comercial, independente da época do ano, com economia de tempo e espaço.

A cultura de tecidos ou micropropagação baseiam-se no cultivo de órgãos, fragmentos de órgãos, tecidos ou células de plantas em um meio de cultura basicamente composto por reguladores de crescimento, macro e micronutrientes, vitaminas, água e carboidratos, para induzir uma resposta morfogênica. Porém estas condições contrapõem-se àquelas encontradas nas casas de vegetação e no campo, sendo as condições *in vitro* caracterizadas pela alta umidade do ambiente, elevada produção de gases e pela alta concentração de carboidratos e reguladores de crescimento, favorecendo muitas vezes um ambiente de estresse *in vitro*. Este estresse reflete-se na forma de estresse oxidativo, que é definido como um desequilíbrio na relação entre compostos antioxidantes versus compostos oxidantes, culminando com a formação elevada de espécies reativas de oxigênio.

Apesar do potencial em desencadear um estresse oxidativo, podendo conduzir as células à morte, as espécies reativas de oxigênio desempenham um papel importante na sinalização do crescimento e desenvolvimento das plantas, ao alterarem o padrão de expressão gênica, metabolismo celular e competência morfogênica, sendo benéfico e requerido um baixo nível de estresse oxidativo para desencadear uma determinada rota morfogênica.

A partir desse conhecimento, abrem-se as oportunidades de estudo sobre o efeito do estresse oxidativo na morfogênese *in vitro*, possibilitando responder qual o nível de estresse oxidativo requerido para se obter uma resposta morfogênica e, se realmente, este estresse é necessário para desencadear uma resposta.

Não obstante, o presente trabalho visou induzir o estresse oxidativo por meio da utilização de reguladores de crescimento do grupo das citocininas e auxinas, afim de elucidar

o papel deste evento nas repostas morfogênicas *in vitro* do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). Para tanto, estabeleceu-se as seguintes hipóteses:

- O uso de reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* promove respostas relacionadas à atividade de enzimas antioxidantes nas células alvo, atuando, portanto, como indutores do estresse oxidativo? Nesse sentido, auxinas e citocininas operam de forma análoga?
- A indução de estresse oxidativo, resulta em alterações estruturais e metabólicas na planta que podem ser evidenciadas por análises histológicas, histoquímicas e morfofisiológicas?
- As alterações detectadas quanto à atividade das enzimas antioxidantes podem estar associadas à procedência do pinhão manso, ao padrão morfogênico desenvolvido e a capacidade regenerativa dos tecidos cultivados *in vitro*?

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos dos reguladores de crescimento auxinas e citocininas, isolados e combinados, nas respostas morfofisiológicas, histológicas e histoquímicas durante o desenvolvimento de rotas morfogênicas *in vitro*, em três procedências de pinhão manso; e estabelecer uma correlação desses reguladores de crescimento com o estresse oxidativo.

2.2 Objetivos específicos

- I. Instigar, através de diferentes concentrações de reguladores de crescimento no meio nutritivo, respostas morfogênicas no cultivo *in vitro* do pinhão manso;
- II. Evidenciar, por meio de análises histológicas e morfofisiológicas, a capacidade e os padrões morfogênicos seguidos pelas procedências de pinhão manso em estudo;
- III. Verificar, através de análises da atividade enzimática, se os reguladores de crescimento empregados favoreceram modificações na resposta antioxidante dos materiais vegetais cultivados *in vitro*;
- IV. Averiguar, se as mudanças na atividade enzimática estão associadas à resposta morfogênica das procedências estudadas;
- V. Detectar, através de análises histoquímicas, alterações quantitativas em compostos fenólicos, lipídios, amido e proteínas totais das células, durante o desenvolvimento morfogênico; e se estas alterações estão relacionadas ao estresse oxidativo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos gerais do pinhão manso

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), pertencente à família Euphorbiaceae, é um arbusto perene, de origem não totalmente definida, provavelmente nativo da América Central, onde é amplamente distribuído, bem como na África e Ásia (BASHA et al., 2009) (Figura 1).

Figura 1 - Limites de cultivo do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) (30 °N, 35 °S)

FONTE: Integrated Crop Management, v. 8, Roma, 2010 (<http://www.fao.org/docrep/012/i1219e/i1219e.pdf>)

É uma espécie oleaginosa, monóica, de crescimento rápido, podendo atingir uma altura superior a cinco metros. Os frutos triloculares, do tipo cápsula ovóides, apresentam três sementes, cada uma em um lóculo, as quais apresentam teores variados de óleo (entre 33 e 38%), representando entre 53 e 79% do peso do fruto (DIAS et al., 2007).

Além da exuberante capacidade de produção de óleo vegetal, o pinhão manso é tolerante à seca, adaptado a solos de baixa fertilidade e apresenta capacidade de recuperação de áreas degradadas devido a profundidade de suas raízes (NUNES et al., 2008), com desenvolvimento satisfatório tanto nas regiões tropicais secas, como nas zonas tropicais úmidas, e ainda, em solos áridos e pedregosos, habitando desde o nível do mar até altitudes de 1.200 metros (DRUMOND et al., 2009). Apesar disso, a produtividade da cultura não está isenta da influência do local de plantio, dos métodos de cultivo e tratos culturais, da idade da planta e da disponibilidade de água e nutrientes (ARRUDA et al., 2004).

Trata-se de uma das únicas oleaginosas que não concorre diretamente com a agricultura de alimentos e que é compatível com o perfil da agricultura familiar (LAVIOLA et al., 2011).

Diante das diversas utilidades das sementes e de outras partes da planta de pinhão manso (Figura 2), tradicionalmente, a espécie é empregada na fabricação de óleo, sabão e diversos medicamentos (KOHLI et al., 2009).

Figura 2 - Os usos de *Jatropha curcas* L.

Fonte: Adaptado de Gubitz, Mittelbach e Trabi (1999); Jongschaap (2007); Achten (2008)

3.2 Potencial para produção de biodiesel

Atualmente, o pinhão manso configura-se como uma espécie oleaginosa com potencial para a produção de matéria-prima para a síntese de biodiesel, um combustível proveniente de matérias-primas vegetais ou animais, bem como de óleos utilizados na fritura.

A produção de biodiesel a partir do pinhão manso é um processo químico pelo qual as moléculas de óleo (triglicerídeos) passam por quebras das ligações químicas, nas quais são ligadas moléculas de metanol para formar o jatropha éster metílico. Um alcalóide, geralmente hidróxido de sódio (soda cáustica), é requerido para catalisar a reação. Como subproduto, tem-se a formação de glicerina (glicerol), a qual, após um processo de purificação pode ser

vendida para as indústrias de cosmético, farmacêutica e para produtos de confeitaria (BRITTAINE; LUTALADIO, 2010) (Figura 3).

Figura 3 - Esquema da produção de biodiesel

Fonte: Adaptado de Associação Brasileira de Engenharia Automotiva

O biodiesel do pinhão manso mostra-se como uma alternativa à utilização dos combustíveis fósseis, os quais, devido ao uso intensivo, têm promovido a emissão de gases de efeito estufa, com danosos impactos ambientais, como por exemplo, o aquecimento global.

Desta forma, visando um desenvolvimento sustentável, ambientalmente correto, socialmente justo e economicamente viável, o pinhão manso foi incorporado ao Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), graças a algumas características, tais como o elevado potencial de rendimento das sementes; por ser uma oleaginosa perene, dispensando a renovação anual de plantio; por ser uma espécie não alimentar, não concorrendo com a agricultura de alimentos; pelos espaçamentos adotados permitirem cultivos intercalares na fase inicial de estabelecimento, possibilitando a produção de energia e alimentos em uma área comum; é uma alternativa potencialmente interessante para agricultura familiar; possibilita a diversificação das atividades agrícolas tradicionais em algumas regiões, apresentando-se como mais uma opção de renda; e, além disso, o cultivo pouco mecanizável e altamente

dependente de mão-de-obra, amplia o fornecimento de empregos no campo (DURÃES et al., 2009).

O Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) é um dos principais responsáveis pelo incentivo à produção de biodiesel no Brasil, sendo um dos desafios do programa incentivar o uso de matérias primas que não concorram com o mercado de alimentos, visto que em 2005 o programa destacou a soja como principal matéria prima para a produção do biodiesel (MARTINS; FAVARETO, 2010). Neste contexto, o pinhão manso é uma das matérias primas que está sendo experimentada e considerada como promissora para o desenvolvimento de áreas pouco agricultáveis, como a região do semiárido brasileiro.

Diante das potencialidades apresentadas pelo pinhão manso, a cultura está sendo amplamente difundida e implantada nas regiões mais diversas do país, totalizando, aproximadamente, uma área de vinte mil hectares (DURÃES et al., 2009). A ampliação das fronteiras da cultura de pinhão manso é marcada pelos projetos de pesquisa em andamento no exterior, os quais, assim como os projetos brasileiros, contribuem para ampliar as informações sobre a tecnologia agrônômica e industrial dessa cultura, que ainda são escassas.

Visando uma maior competitividade ao biodiesel, o Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011, requereu uma mudança no rendimento do nível do óleo de 600 Kg/ha para valores que ultrapassem 5.000 Kg/ha (OLIVEIRA; RAMALHO, 2006). Neste sentido, considerando que as culturas tradicionais, como soja e mamona, apresentam um rendimento médio de 560 e 470 Kg/ha de óleo, respectivamente, o pinhão manso contrapõe-se a tais culturas pelo rendimento de 1.900 Kg/ha de óleo (Tabela 1).

Tabela 1- Produtividade média e o rendimento em óleo por hectare

Cultura	Produtividade média de grãos (Kg/ha)	Teor médio de óleo (%)	Rendimento médio em óleo (Kg/ha)
Soja	2.800	20	560
Dendê	15.000	26	4.000
Girassol	1.800	45	774
Algodão	1.900	19	361
Amendoim	2.400	45	788
Mamona	1.000	48	470
Canola	1.500	38	570
Pinhão manso	5.000	38	1.900

Fonte: Adaptado de Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA (2007)

Contudo, essa produção ainda pode ser muito otimizada, por meio de programas de melhoramento genético e também pelo aprimoramento do sistema de produção do pinhão

manso, sempre considerando que a quantidade e a qualidade do óleo é variável e fortemente dependente dos aspectos genéticos da planta e dos fatores ambientais.

Diante de tal relevância, o pinhão manso vem sendo utilizado, preferencialmente, como matéria-prima para o biodiesel, não apenas no Brasil, mas no mundo, sendo a Índia um dos países mais desenvolvidos em relação a produção dessa cultura (SALÉ, 2008). Um cenário que evidencia muito bem esta expansão do pinhão manso, é o fato de que em 2008, o pinhão manso foi plantado mundialmente em 900.000 ha, sendo 760.000 ha (85%) na Ásia, seguida pela África com 120.000 ha e América Latina com 20.000 ha. As previsões para 2015 são de 12,8 milhões ha de pinhão manso plantados. Na Ásia, o país detentor da maior produção será a Indonésia. Na África, Gana e Madagascar serão os maiores produtores. E o Brasil será o maior produtor da América Latina (BRITTAINE; LUTALADIO, 2010).

3.3 Aquecimento global

Não apenas o aumento nítido dos valores dos produtos petrolíferos e a natureza finita dos combustíveis fósseis são as razões para a busca de novas fontes e formas alternativas de energia. A consciência global sobre as alterações climáticas devido à emissão dos gases de efeito estufa (GEE), especialmente o dióxido de carbono (CO_2), para a atmosfera, é atualmente, um dos motivos que impulsiona os estudos com o biodiesel, aumentando cada vez mais a produção dessa bioenergia, sendo o Brasil, considerado no ano de 2009, o quarto maior produtor mundial (Tabela 2).

Tabela 2 - Produção mundial de biodiesel em 2009

	Milhões de Litros	%
Alemanha	2.859	16
França	2.206	12
Estados Unidos	2.060	11
Brasil	1.535	09
Argentina	1.340	07
Espanha	967	05
Itália	830	05
Tailândia	610	03
Bélgica	468	03
Polônia	374	02
Holanda	365	02
Áustria	349	02
China	338	02
Colômbia	330	02
Coreia do Sul	300	02
Índia	220	01
Outros	2.778	15
Total	17.929	100

Fonte: © Biofuels Platform (2010)

(<http://www.platforme-biocarburants.ch/en/infos/production.php?id=biodiesel>)

A necessidade de diminuir ou reverter o aquecimento global direciona para o uso de plantas cultivadas e não domesticadas para atender a exigência energética, contrapondo-se a utilização do petróleo e carvão mineral (BRITTAINE; LUTALADIO, 2010).

Com a absorção do CO₂, emitido no processo de combustão do biodiesel, pelas plantas durante o desenvolvimento da cultura, e a menor produção de partículas, hidrocarbonetos, óxidos nitroso e dióxido de enxofre, comparado com a combustão do diesel mineral, consegue-se reduzir os poluentes de combustão e de emissão do veículo, que são prejudiciais para a saúde humana (BRITTAINE; LUTALADIO, 2010), assim como para o meio ambiente.

Contudo, deve-se ressaltar que o desmatamento da vegetação natural para o plantio do pinhão manso apresenta um impacto negativo sobre o balanço dos gases de efeito estufa. Segundo Fargione et al. (2008), a conversão de florestas, turfeiras, savanas ou pastos para o cultivo de culturas de biocombustíveis, podem representar a emissão de 17 a 420 vezes mais CO₂ para a atmosfera, comparada com a emissão pelos combustíveis fósseis.

Isso ressalta o fato de que o cultivo de pinhão manso em terrenos degradados, com a mínima utilização de fertilizantes e irrigação, é a melhor forma para obter um impacto ambiental positivo (BRITTAINE; LUTALADIO, 2010).

3.4 Diversidade genética do pinhão manso

A espécie *Jatropha curcas* L., apresenta um genoma de 416 Mb, distribuídos em 11 pares de cromossomos ($2n=22$) (ABDELGADIR et al., 2009 apud ROSADO et al., 2010). Esta euforbiácea realiza, preferencialmente, polinização cruzada, um dos principais fatores que incita a variabilidade genética, elemento chave para principiar com sucesso um programa de melhoramento genético. No entanto, apesar dos estudos ainda serem escassos, estes evidenciam a baixa diversidade genética nas coleções de germoplasma da espécie (ROSADO et al., 2010).

De acordo com Rocha et al. (2012), o pinhão manso ainda é uma planta em domesticação e o melhoramento desta euforbiácea está em seus estágios iniciais. Segundo estes mesmos autores, saber sobre o controle genético da herança dos componentes de produção, torna-se essencial para estabelecer estratégias eficientes de seleção e desenvolvimento de variedades comerciais.

A análise da diversidade genética é definida como um processo pelo qual a variação genética existente entre populações, grupos ou indivíduos de um grupo, é examinada através de métodos específicos ou de uma combinação de métodos. Neste sentido, o desenvolvimento de marcadores bioquímicos e moleculares foi responsável por avanços qualitativos e quantitativos no que se refere aos estudos da estrutura populacional e do sistema reprodutivo de diversas espécies. Através dos marcadores é possível isolar as divergências em populações com genomas muito semelhantes (elevado grau de endogamia), bem como, identificar o sistema reprodutivo predominante (REIF; MELCHINGER; FRISCH, 2005).

Utilizando uma coleção de germoplasma de 192 acessos, os quais foram coletados em uma longa faixa territorial do Brasil, compreendendo os estados do Maranhão à Rio Grande do Sul (Figura 4), Rosado et al. (2010) realizaram um estudo sobre a diversidade genética do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.).

Figura 4 - Distribuição geográfica dos locais, nos quais os 192 acessos de pinhão manso foram coletados. Informações detalhadas sobre o município, o estado e o sistema de posicionamento exato global (GPS) (ROSADO et al., 2010)

O objetivo deste trabalho, segundo Rosado et al. (2010), foi avaliar a diversidade molecular desta coleção para descrever a extensão da diversidade molecular disponível no germoplasma que o Brasil detém; verificar possíveis padrões de diversidade genética que poderia ser explicado pela origem geográfica e detectar prováveis acessos duplicados. O método utilizado foi o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e microssatélites (Simple Sequence Repeats ou SSR), duas tecnologias de marcadores complementares. Ambos, os microssatélites e marcadores RAPD, mostraram claramente que uma diversidade genética muito limitada de *Jatropha curcas* L. está disponível no Brasil. Segundo os mesmos autores, relatos recentes sobre a diversidade de amostragem, com diferentes tipos de marcadores moleculares, têm corroborado com conclusões semelhantes a respeito de uma variação limitada nos recursos de germoplasma de *J. curcas* L. em diversos países. Outro resultado obtido pelo trabalho de Rosado et al. (2010), foi constatar a ausência de conexão entre diversidade genética e origem geográfica da *J. curcas* L. no Brasil. De acordo com estes autores, o dendrograma com base em coeficientes de similaridade genética, mostrou um elevado aglomerado de acessos com uma diversidade muito limitada entre eles, apesar da distância da origem geográfica de vários acessos, fato que sugere uma origem comum. Resultados semelhantes foram relatados por Basha e Sujatha (2007), quando observaram 42 acessos de *J. curcas* L. na Índia, com 83% destes dispostos em apenas dois grupos. Em um

estudo posterior, que compreendia 72 genótipos de *J. curcas* L. de diferentes regiões do mundo, Basha et al. (2009), evidenciaram apenas dois grupos, um composto por acessos da região da América Central, enquanto o outro, apresentava acessos de outras regiões do mundo.

Rosado et al. (2010) verificaram também que alguns acessos coletados nas mesmas localidades ou em regiões muito próximas, foram dispostos em grupos distintos, o que evidencia claramente que mesmo a modesta diversidade genética existente nesta coleção de germoplasma brasileiro, não pode ser relacionada com a origem geográfica. Desta forma, para os autores, isto sugere que desde a recente introdução, *J. curcas* L. tem experimentado uma ampla dispersão para regiões distantes, através da intervenção humana e, local por sementes, além da possibilidade da dispersão por propágulos. No entanto, os autores ressaltam que apesar da análise molecular ter apresentado uma base genética relativamente estreita, o fato dessa cultura ter sido cultivada com sucesso em todo território brasileiro, sugere que a espécie carrega uma elevada plasticidade fenotípica que lhe permite adaptar a uma grande variedade de ambientes. Como conclusão, os autores evidenciam que os resultados refletem uma ascendência comum, uma deriva e uma seleção intensiva do material cultivado, desde a introdução no Brasil.

Diante do exposto, a necessidade de enriquecer este recurso genético com novos acessos é urgente, particularmente, a partir do centro de origem das espécies, explorando a diversidade genética necessária para conduzir um programa de melhoramento para a cultura (ROSADO et al., 2010).

3.5 Micropropagação do pinhão manso

Considerando a viabilidade de propagação de pinhão manso via seminal e vegetativa (SATURNINO et al., 2005), a expansão da cultura tem sido limitada pela ausência de genótipos estáveis e pela baixa germinação das sementes (CARVALHO et al., 2010), resultando dessa forma em plantios desuniformes. Somando-se a isto, Mukherjee et al. (2011) numeram diversas desvantagens no cultivo *in vivo* do pinhão manso, como a produção incerta de frutos por um curto período de tempo (uma ou duas vezes por ano), não havendo uma produção ótima durante vários anos da cultura, tornando-a insustentável; potencial genético desconhecido das sementes, por se tratar de uma planta alógama, o que lhe confere problemas de cultivo por meio de sementes, devido a heterozigosidade e a dificuldade de uniformidade dos materiais de plantação; as práticas são sazonais e doenças associadas às sementes podem

ser transmitidas para as mudas; não é possível garantir a qualidade em termos de teor de óleo, porque a planta é heterozigótica e, por fim, a propagação por estacas oferece menor longevidade, resistência à seca e à doença, comparada com aquelas plantas propagadas a partir de sementes e, de acordo com Cortesão (1956), apesar das plantas advindas de estacas começarem a produzir no segundo ano, as plantas apresentam vida mais curta e sistema radicular mais fraco, além da necessidade de um volume de material muito elevado para a produção em escala comercial (SATURNINO et al., 2005). Assim, objetivando eliminar estes problemas, a propagação *in vitro*, ou micropropagação, mostra-se altamente promissora e alternativa.

Como uma das principais técnicas de multiplicação e propagação clonal, a cultura de tecidos ou micropropagação apresenta como vantagens a obtenção de plantas isentas de patógenos e vírus, resultando em plantas saudáveis e vigorosas; a possibilidade de multiplicação em escala elevada; o requerimento de um espaço físico reduzido comparado com os processos convencionais de multiplicação; a produção independente das condições ambientais; a conservação de espécies vegetais, através dos bancos de germoplasma *in vitro*; além de ser uma fase indispensável para a obtenção de plantas transgênicas. Não obstante, as mudas micropropagadas caracterizam-se pela maior sobrevivência no campo e pelo crescimento mais rápido nos primeiros estágios de desenvolvimento, quando se compara com as mudas convencionais (ALVES; LIMA; TRINDADE, 2005).

Apoiando-se no conceito de Haberlandt (1902) sobre a natureza totipotente das células vegetais, a micropropagação depende da dediferenciação e da determinação destas células em se rediferenciarem (Figura 5).

Figura 5 - Representação dos estágios da micropropagação
Adaptado de Christianson e Warnick (1988)

A capacidade de desdiferenciação, determinação e rediferenciação são totalmente dependentes do nicho celular, do genótipo, da juvenilidade e do estímulo indutivo e, são estes fatores que permitem estabelecer o sistema de regeneração direto das plantas, caracterizado pela ausência da fase de calos, ou indireto, marcado pela presença da fase de calos, a partir do qual, o tecido cambial das gemas adventícias se conecta.

A regeneração direta das plantas representa o método mais confiável para a multiplicação ou propagação clonal. Isto ocorre, pelo fato de que as plantas produzidas pelo método de organogênese direta devem apresentar maior estabilidade genética do que as produzidas através de calos, devido às variações somaclonais a que estão sujeitas.

Considerando o cultivo *in vitro* do pinhão manso, o meio de cultura mais utilizado para induzir e promover uma resposta morfogênica é o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), sendo reportado uma única vez a utilização do meio B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968) por Warakagoda e Subasinghe (2009).

Em relação aos reguladores de crescimento, os mais utilizados do grupo das citocininas são TDZ (tidiazuron) e BAP (6-benzilaminopurina), e das auxinas são o AIB (ácido indolbutírico) e ANA (ácido naftalenoacético) (MUKHERJEE et al., 2011), podendo ser utilizados isolados ou em combinação (Tabela 3).

Tabela 3 - Relação das pesquisas de micropropagação do pinhão manso (*J. curcas* L.)

Tipo de explante	Modo de regeneração	Meio de cultura	Referência
Nó	Organogênese direta	*BA (22,2 µM); CIN (2,3 µM) + AIB (0,5 µM) + Sulfato de adenina (27,8-55,6 µM)	Datta et al. (2007)
Nó e segmentos foliares	Multiplicação direta, regeneração de gemas adventícias	TDZ (2,3-4,5 µM), BA (4,4-44,4 µM), AIB (4,9 µM)	Sujatha, Makkar e Becker (2005)
Hipocótilo, pecíolo e disco foliar	Regeneração via brotações adventícias, enraizamento <i>in vitro</i>	BA (0,44-2,22 µM) + AIB (0,49-4,9 µM)	Sujatha e Mukta (1996)
Ápices caulinares	Organogênese, enraizamento <i>in vitro</i>	BAP (2,0 mg/L), AIA (0,5 mg/L), sulfato de adenina (25 mg/L), glutamina (100 mg/L)	Rajore e Battrra (2005)
Pecíolo	Indução direta de gemas	TDZ (2,27 µM), CIN (10 µM), BAP (4,5 µM), ANA (5,5 µM)	Kumar e Reddy (2010)
Disco foliar	Gemas adventícias	TDZ (2,27 µM), BAP (2,22 µM), AIB (0,49 µM)	Deore e Johnson (2008)
Nó	Regeneração direta de gemas	BA (3,0 mg/L) + AIB (1,0 mg/L) + Sulfato de adenina (25 mg/L) + Glutamina (50 mg/L) + L-arginina (15 mg/L) + Ácido cítrico (25mg/L)	Shrivastava e Banerjee (2008)
Embrião imaturo	Organogênese indireta	BA (1 mg/L) + CIN (0,5 mg/L) + AIB (0,25 mg/L) + 500 mg/L PVP + 30 mg/L Ácido Cítrico	Varshney e Johnson (2010)
Folha cotiledonar	Regeneração direta de gemas	TDZ (9,08 µM), CIN (10 µM), BAP (4,5 µM), ANA (5,5 µM)	Kumar, Vijay e Reddy (2010); Kumar et al. (2010)
Segmento nodal	Multiplicação de brotos	BAP (1,5 mg/L), CIN (0,5 mg/L), AIA (0,1 mg/L)	Kalimuthu et al. (2007)
Folha cotiledonar	Embriogênese somática	BAP (2,0 mg/L)	Qin et al. (2004)
Epicótilo	Organogênese direta e diferenciação de gemas a partir de calos	BA (0,2-0,7 mg/L) + AIB	
Ápice caulinar	Indução de gemas com formação de calo na base	BAP (2,5 µM), GA ₃ (0,5 µM)	Purkayastha et al. (2010)
Segmentos foliares	Embriogênese somática	CIN (2,3-9,3 µM), AIB (0,5-4,9 µM), Sulfato de adenina (13,6 µM)	Jha, Mukherjee e Datta (2007)
Epicótilo e hipocótilo	Organogênese direta e indireta	TDZ (0,25 mg/L), CIN (0,5 mg/L), AIB (0,25 mg/L)	Kaewpoo e Te-chato (2010)
Segmento foliar	Regeneração de embriões somáticos	Sais MS + vitamina B5 + BA (3,0 mg/L) + AIA (1,0 mg/L)	Sardana, Batra e Ali (2000)
Segmento foliar e hipocótilo	Calo e suspensão celular	2,4-D (0,5mg/L) + 2% leite de côco	Soomro e Memon (2007)
Gema axilar	Multiplicação de brotos	BAP (2,22 µM) + AIB (0,49 µM)	Thepsamran et al. (2007)

Fonte: Adaptado de Mukherjee et al. (2011)

*BA = 6-Benziladenina; CIN = Cinetina; AIB = Ácido Indolbutírico; TDZ = Tidiázuron; BAP = 6-Benzilaminopurina; AIA = Ácido 3-indolacético; ANA = Ácido naftaleno acético; GA₃ = Ácido Giberélico; 2,4-D = Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

3.5.1 Auxinas

Envolvida em todos os aspectos de crescimento e desenvolvimento da planta, a auxina, provavelmente, é o grupo de fitormônio mais estudado e conhecido (BENJAMINS; SCHERES, 2008).

Dentre os importantes papéis que as auxinas desempenham ao longo do ciclo de vida da planta, destacam-se o alongamento celular, fototropismo, geotropismo, dominância apical, diferenciação dos tecidos vasculares, extensibilidade da parede celular, embriogênese, síntese de etileno, desenvolvimento das gemas florais e dos frutos, partenocarpia, abscisão, bem como, indução dos processos rizogênicos com a formação de raízes laterais e adventícias (LUDWIG-MÜLLER, 2000; MÜLLER; WEILER, 2000; COOKE et al., 2002; HARTMANN et al., 2002; WOODWARD; BARTEL, 2005; ALABADÍ; BLÁZQUEZ, 2009; POLLMANN; DÜCHTING; WEILER, 2009; RUBIO et al., 2009; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os sítios sintetizadores de auxinas nas plantas são, principalmente, os meristemas apicais e as folhas jovens (TAIZ; ZEIGER, 2009) e graças aos avanços biotecnológicos, os quais tornaram possível a identificação dos componentes moleculares da biossíntese de auxina, foi revelada a existência de pelo menos duas vias de biossíntese separadas (BARLIER et al., 2000), uma dependente do precursor triptofano (Trp) e outra triptofano-independente.

A auxina sintetizada é transportada para tecidos específicos, onde desencadeia uma cascata de sinalização, culminando no desenvolvimento da planta. O transporte é único, já que apresenta direcionalidade, a qual é provida pela localização específica de uma maquinaria de efluxo e influxo de auxina (BENJAMINS; MALENICA; LUSCHNIG, 2005).

O uso das auxinas na cultura de tecidos de plantas tem sido constatado objetivando, principalmente, o enraizamento de plantas micropropagadas, visto que o controle do enraizamento adventício em propágulos ocorre, em especial, devido aos teores endógenos de auxinas (LI et al., 2009). Especificamente, na cultura *in vitro* de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), a auxina AIB (ácido indolbutírico) e ANA (ácido naftalenoacético), são as mais utilizadas, e geralmente empregadas em associação com as citocininas, o que, segundo Carvalho (1999), promove o desenvolvimento das gemas axilares, através da quebra da dormência apical.

3.5.2 Citocininas

As citocinas constituem uma classe de hormônios vegetais, que similarmente às auxinas, influenciam diversos aspectos de crescimento e de desenvolvimento da planta. Esta classe de hormônios vegetais mostra-se envolvida no desenvolvimento de numerosos processos de divisão e expansão celular, sendo crucial o papel desempenhado no desenvolvimento de diversos órgãos (GUPTA; RASHOTTE, 2012).

Tanto a citocinina, como a interação desta com outras vias de sinalização, regula o crescimento de órgãos essenciais à planta, incluindo raiz, caule, folha e flor (GUPTA; RASHOTTE, 2012). Além disso, apresentam uma influência direta na senescência foliar, na mobilização de nutrientes, na dominância apical, formação e atividade dos meristemas apicais, germinação de sementes e quebra de dormência das gemas (TAIZ; ZAIGER, 2009). Na cultura de tecidos de plantas, as citocininas são geralmente utilizadas em conjunto com as auxinas, visando à formação de gemas e raízes. Como principal estimulante da divisão celular, a citocinina promove um grande número de brotações por meio do crescimento de meristemas laterais, aumentando a taxa de multiplicação. Referente à utilização de citocininas na micropropagação de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), destacam-se as citoninas TDZ (tidiazuron) e BAP (6-benzilaminopurina).

3.5.3 Mecanismo de ação dos fitormônios

Os trabalhos evidenciam a importância dos fitormônios no desenvolvimento da planta, em especial das auxinas e das citocininas, ambas essenciais para a viabilidade das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A complexidade do envolvimento dos fitormônios em processos diferenciados ao longo do crescimento e desenvolvimento vegetal é refletida através da contribuição de síntese dos fitormônios, transporte e vias de sinalização, bem como pela diversidade de interações entre os fitormônios para controlar as respostas de crescimento (SANTNER; ESTELLE, 2009).

Diante dos múltiplos efeitos que exercem sobre o desenvolvimento das plantas, a sequência de três eventos, (i) percepção do sinal, (ii) transdução do sinal e (iii) resposta final, são suficientes para explicar, de forma geral, a magnitude da ação dos fitormônios.

A percepção do sinal refere-se à ligação do fitormônio a um receptor específico, o qual, normalmente, trata-se de uma proteína, localizada na membrana celular ou citoplasma,

que se liga com mensageiros químicos de forma específica e reversível. Uma mudança conformacional do receptor poderá ocorrer após a ligação do fitormônio, alterando-o para o estágio ativado, que desencadeará uma série de eventos bioquímicos e moleculares, caracterizando o evento de transdução do sinal, o qual culminará numa resposta característica. Apesar de décadas de estudo, apenas recentemente foram identificados os receptores para muitos dos fitormônios existentes, revelando novos mecanismos de percepção de sinais químicos e fornecendo uma ideia mais clara do controle hormonal sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal (SPARTZ; GRAY, 2008).

3.6 Estresse oxidativo

Devido o ambiente *in vitro* ser totalmente manipulado para a propagação da cultura vegetal, as plantas ou explantes, que são inoculados *in vitro* e que passam por sucessivos subcultivos, estão sujeitos às condições ambientais e culturais incomuns, contrapondo-se às condições de cultivo nas casas de vegetação e no campo (GASPAR et al., 2002). Dentre estas condições, destaca-se a alta umidade relativa no interior dos frascos; o acúmulo de gases, especialmente o etileno; concentrações elevadas de reguladores de crescimento, comumente representados pelas auxinas e citocininas; acúmulo de substâncias tóxicas; elevados teores de açúcar, entre outros.

Estes fatores incomuns do ambiente *in vitro* favorecem dois tipos de estresse, um benéfico para o desenvolvimento vegetal e outro com aspectos negativos sobre a morfogênese vegetal. Segundo Pinto et al. (2010), o estresse que confere um efeito benéfico para o desenvolvimento vegetal é caracterizado como um estresse suave e que ativa o metabolismo celular, promovendo a atividade fisiológica da planta e induzindo uma resposta defensiva ou adaptativa, diferindo do estresse que é provocado por qualquer condição desfavorável, seja pela intensidade ou duração, que afeta de forma negativa o metabolismo, o crescimento e o desenvolvimento vegetal.

O estresse *in vitro* reflete-se na forma de estresse oxidativo, que é definido como um desequilíbrio na relação entre compostos antioxidantes versus compostos oxidantes, culminando com a elevada formação de espécies reativas de oxigênio (ROS - reactive oxygen species) (PINTO et al., 2010), as quais atacam moléculas vitais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, promovendo distúrbios estruturais, metabólicos e fisiológicos em células, podendo conduzi-las à morte (BRAY; BAILEY; WERETILNYK, 2000).

As espécies reativas de oxigênio são produzidas naturalmente nas plantas, em especial pela cadeia transportadora de elétrons no cloroplasto e mitocôndria e pela fotorrespiração (DAT et al., 2000). São definidas como intermediárias da redução parcial do oxigênio, o qual se encontra com as camadas de elétrons desestabilizadas, formando os principais intermediários reativos: os radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), radicais hidroxilas ($OH^{\bullet}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SOARES; MACHADO, 2007), sendo os radicais altamente instáveis, tornando-os quimicamente muito reativos.

Apesar do potencial em desencadear um estresse oxidativo, podendo levar as células a morte, as espécies reativas de oxigênio desempenham um papel importante na sinalização do crescimento e desenvolvimento das plantas, ao alterarem o padrão de expressão gênica, metabolismo celular e totipotência. A partir desses conhecimentos, é benéfico e requerido um nível baixo de estresse oxidativo para desencadear uma determinada rota morfogênica (OBERT et al., 2005; BLAZQUEZ et al., 2009).

Segundo Bailey-Serres e Mittler (2006) e Mittler et al. (2004), ao longo da evolução, as plantas desenvolveram uma rede elaborada e eficiente de mecanismos de remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e passaram a utilizar estas moléculas tóxicas como mediadoras da transdução de sinal. Este fato tornou claro o papel duplo das ROS como compostos tóxicos, e como reguladoras chaves de muitos processos biológicos, tais como crescimento, ciclo celular, morte celular programada, sinalização hormonal, resposta celular aos fatores bióticos e abióticos e desenvolvimento (FOYER; NOCTOR, 2005; FUJITA et al., 2006 apud MILLER; SHULAEV; MITLER, 2008; MITTLER et al., 2004). Esta dualidade de papel é dependente de um delicado equilíbrio entre a produção e a eliminação das ROS, a qual é orquestrada por uma grande rede de genes, chamado “rede de gene ROS”, que inclui mais de 152 genes em *Arabidopsis* (MITTLER et al., 2004).

Mittler et al. (2011), apresentam várias possíveis vantagens do uso das ROS como moléculas sinalizadoras, sendo uma delas, a capacidade que a célula tem de rapidamente produzir e eliminar as diversas formas de ROS, de forma simultânea, além, de poderem ser utilizadas como sinais propagados a longas distâncias por toda a planta, ativando o mecanismo de produção autônoma de ROS nas células. Quanto a isso, foi recentemente relatado, que este sinal pode propagar a uma taxa de 8,4 cm/min em *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) (MILLER et al., 2009). Outra vantagem de sinalização pelas ROS são suas diferentes formas existentes, conferindo-lhes propriedades moleculares significativamente distintas (MITTLER et al., 2011).

3.6.1 Controle enzimático do estresse oxidativo

Foi a evolução de um mecanismo altamente eficiente das células das plantas que possibilitou a superação da toxicidade das espécies reativas de oxigênio (ROS), e sua utilização como sinalizadoras moleculares (BAILEY-SERRES; MITTLER, 2006).

Um destes mecanismos, que compõe o sistema antioxidante, é representado pelas enzimas, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), entre outras.

A SOD é uma metaloenzima que apresenta três isoformas de acordo com o metal com a qual se liga. Normalmente, as plantas apresentam as formas: Cu/Zn-SOD no citosol, Cu/Zn e/ou Fe-SOD no cloroplasto e Mn-SOD na mitocôndria (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; RESENDE; SALGADO, CHAVES, 2003; APEL; HIRT, 2004). Trata-se da primeira enzima a agir no sistema antioxidante da célula, catalisando a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir de radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) (OLMOS et al., 2003). O H_2O_2 pode ser acumulado nos tecidos, tornando-se tóxico e prejudicial ao atravessar as membranas celulares e promover a peroxidação lipídica (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). O H_2O_2 é então neutralizado pela ação da CAT, resultando em água e oxigênio estável. Isto ocorre desde que a concentração de H_2O_2 esteja em níveis elevados, caracterizando um estresse severo, caso contrário, a remoção de baixas concentrações de H_2O_2 é executada pela APX (ARORA; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002), a qual, por permitir o controle de H_2O_2 na ordem de micromolar (μM) e em localizações mais específicas do que a CAT, poderá ser responsável pelo controle dos níveis de ROS para efeitos de sinalização molecular (MITTLER, 2002). Neste sentido, a catalase (CAT) apresenta uma sensibilidade menor ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), visto que requer a ligação simultânea de duas moléculas de H_2O_2 no sítio ativo, quando comparada com a ascorbato peroxidase (APX).

A CAT é uma enzima tetramérica Fe porfirina, abundante nos peroxissomos. O número de isoenzimas da CAT é bastante variável, sendo caracterizada três isoenzimas da CAT geneticamente distintas em *Zea mays* (milho) (SCANDALIOS, 1994 apud FOYER; MULIUNEAUX, 1994) e duas em *Hordeum vulgare* (cevada) (SKADSEN; SCHULZE-LEFERT; HERBST, 1995), enquanto que em *Arabidopsis thaliana*, a CAT é codificada por uma família multigênica, representada por três genes que codificam subunidades individuais CAT1, CAT2 e CAT3, responsáveis, a princípio, pela formação de seis isoenzimas diferentes (FRUGOLI et al., 1996). Além da presença marcante nos peroxissomos, a CAT apresenta uma classe específica que está localizada nos tecidos vacuolares, onde, provavelmente, está

envolvida na proteção contra estresses ambientais (WILLEKENS et al., 1994). Entretanto, não há evidências da presença da CAT nos cloroplastos (ASADA, 1999) e apesar de ter sido encontrada na matriz mitocondrial de coração de rato, ainda não foi encontrada na mitocôndria vegetal (MOLLER, 2001).

A APX é uma heme peroxidase e, segundo Asada (1992), a família da peroxidase APX é composta por cinco isoformas diferentes, que inclui isoenzimas do tilacóide, estroma, citosol, peroxissomo e apoplasto (MIYAKE; ASADA, 1992; JIMÉNEZ et al., 1997).

Para estabelecer o nível fixo de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é indispensável o equilíbrio das atividades da SOD, APX e CAT (BOWLER et al., 1991). Caso isso falhe, mecanismos compensatórios são induzidos, como por exemplo, quando a atividade da CAT é reduzida em plantas e outras enzimas, como a APX, são super reguladas (VANDENABEELE et al., 2004).

3.6.2 Controle não enzimático do estresse oxidativo

Adicionalmente aos antioxidantes enzimáticos, as células também apresentam antioxidantes de baixo peso molecular, não enzimáticos, como glutathiona, ácido ascórbico, tocoferol e compostos fenólicos.

A glutathiona (GSH, L- γ -glutamyl-L-cistenyglycine) é um tripeptídeo, formado por glutamato, cisteína e glicina, muito abundante nos tecidos vegetais, verificada no citosol, retículo endoplasmático, vacúolo e mitocôndria (JIMÉNEZ et al., 1998).

A importância da glutathiona vai além da proteção celular contra a formação de espécies reativas de oxigênio, visto sua atuação na manutenção do balanço redox da célula, no transporte de aminoácidos e na regulação alostérica enzimática, utilizada pela GR (glutathiona redutase) (HENRIQUES et al., 2001 apud SERAFINI; BARROS; AZEVEDO, 2001).

O ácido ascórbico, segundo Blokhina, Virolainen e Fagerstedt (2003), é um dos antioxidantes mais potentes e estudados. Tem sido detectado na maioria dos tipos celulares de plantas, nas organelas e no apoplasto (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003). Sob condições fisiológicas, o ácido ascórbico existe principalmente na forma reduzida em folhas e cloroplastos (SMIRNOFF, 1996), e a concentração intracelular pode alcançar a taxa de milimolar, como por exemplo, a taxa de 20 mM no citosol e de 20-300 mM no estroma do cloroplasto (FOYER; LELANDIS, 1996). A capacidade de doar elétrons numa vasta variedade de reações não enzimáticas e enzimáticas, torna o ácido ascórbico, o principal componente desintoxicante na fase aquosa (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT,

2003), executando a limpeza de superóxido, radicais hiroxilas e do oxigênio singlete e reduzindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à água, por meio da reação ascorbato peroxidase (NOCTOR; FOYER, 1998). Além disso, o ácido ascórbico realiza uma série de funções não antioxidantes na célula, como regulação da divisão celular, a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular (LISO et al., 1988; SMIRNOFF, 1996) e o alongamento das células (DE TULLIO et al., 1999).

Conferindo proteção às membranas celulares, bem como apresentando outras funções que não antioxidantes, o tocoferol apresenta quatro isômeros (α -, β -, γ -, δ -), sendo que a atividade antioxidante relativa dos isômeros *in vivo* varia da seguinte forma: $\alpha > \beta > \gamma > \delta$. Isto ocorre devido ao padrão de metilação e a quantidade de grupos metil ligados ao anel fenólico da estrutura da cabeça polar do tocoferol (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003). Os tocoferóis são sintetizados apenas pelas plantas e algas, sendo observados em todas as partes da planta. Membranas de cloroplastos de plantas superiores contêm α -tocoferol como o isômero tocoferol predominante, o que lhes conferem elevada proteção contra os danos da fotooxidação (FRYER, 1992).

Já os compostos fenólicos, são compostos secundários muito abundantes nos tecidos vegetais, que graças às propriedades redutoras e estrutura química, desempenham uma função essencial na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na fase de iniciação, como na fase de propagação do processo oxidativo (SOUSA et al., 2007). De acordo com Chun et al. (2005), os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, em decorrência da ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias.

3.6.3 Peroxidação lipídica

A indução da peroxidação lipídica é decorrente da reação das espécies reativas de oxigênio (ROS) com ácidos graxos insaturados, com consequente peroxidação de lipídios de membranas essenciais da plasmalema ou de organelas intracelulares (SCANDALIOS, 1993), ocasionando alterações na funcionalidade e integridade das membranas, com possibilidade da ocorrência de danos irreversíveis. De acordo com Scandalios (2005), os danos peroxidativos da plasmalema podem levar ao extravasamento do conteúdo celular e dessecação rápida, já os danos às membranas intracelulares podem alterar a atividade respiratória na mitocôndria, motivar queda na pigmentação e perda na habilidade de fixação fotossintética de carbono nos cloroplastos. A peroxidação de membranas celulares pode culminar também no aumento da

permeabilidade da membrana plasmática, levando ao extravasamento dos íons K^+ e outros solutos, finalizando, possivelmente, com morte celular (CHAOUI et al., 1997).

A peroxidação lipídica apresenta-se como um dos efeitos mais danosos das espécies reativas de oxigênio (ROS) e como um indicativo desta produção, ou seja, a peroxidação dos lipídios das biomembranas é um dos principais indicadores da ocorrência do processo de estresse oxidativo. Desta forma, para averiguar a ocorrência da peroxidação lipídica, e consequentemente de estresse oxidativo, é frequentemente utilizado como indicador o malondialdeído (MDA), um dos vários produtos de baixo peso molecular formado através da decomposição de produtos da peroxidação lipídica (VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005; DEWIR et al., 2006).

3.6.4 Estresse oxidativo e resposta morfogênica

Trabalhos recentes têm investigado o papel do estresse oxidativo na morfogênese vegetal. Como exemplo, tem-se relacionado o aumento da atividade de enzimas antioxidantes com a resposta embriogênica dos tecidos somáticos, sugerindo que o aumento da atividade dessas enzimas estaria envolvido com o estresse oxidativo, o qual contribuiria para acelerar o processo de embriogênese somática (CUI et al., 1999; GANESAN; JAYABALAN, 2004; KONIECZNY et al., 2008; LIBIK et al., 2005).

O detalhamento do conhecimento sobre os fatores que afetam a diferenciação não é um fenômeno simples, mas saber como estes fatores interferem fisiológica e bioquimicamente no estado do explante em cada estágio de seu desenvolvimento, é essencial para o sucesso da regeneração de plantas na cultura de tecidos. Somando-se a isso, Carvalho, Silva e Camara (2009), ressaltam que as enzimas antioxidantes, possíveis marcadores bioquímicos, podem representar uma importante estratégia para a otimização e controle da morfogênese vegetal *in vitro*, favorecendo estudos básicos em biologia celular, bioquímica e fisiologia vegetal através da cultura de tecidos de plantas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.2 Localização da área experimental

Os experimentos referentes à micropropagação e anatomia foram executados no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, do Departamento de Ciências Biológicas, ao passo que as análises da peroxidação lipídica, enzimática e moleculares, foram realizadas no Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas, do Departamento de Genética, contando com a colaboração do Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo.

Ambos os laboratórios estão localizados na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) em Piracicaba/SP.

4.3 Material vegetal

Foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Agroenergia, por intermédio do pesquisador Dr. Bruno Galvêas Laviola, três procedências de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), coletadas na safra de 2009/2010, sendo cada procedência considerada uma única matriz (Figura 6).

Figura 6 - Detalhe das sementes de pinhão manso (*J. curcas* L.)

As procedências receberam as seguintes especificações:

- CNPAE⁽¹⁾ 101, origem: Rio Verde, GO;
- CNPAE 115, origem: Xambrê, PR;
- CNPAE 224, origem: São Francisco do Glória, MG.

⁽¹⁾Centro Nacional de Pesquisa de Agroenergia.

O armazenamento das sementes nos primeiros quatro meses ocorreu em temperatura ambiente, e após este período, foram acondicionadas sob refrigeração.

4.4 Micropropagação

O experimento de micropropagação consistiu em quatro etapas especificadas a seguir.

4.4.1 Remoção da testa (tegumento externo) e desinfestação das sementes

A testa das sementes foi removida através de choques mecânicos (Figura 7), seguida pela assepsia, que consistiu nos seguintes passos: imersão das sementes em água deionizada, acrescida com Tween 20 (uma gota para 100 mL de água deionizada) por um minuto, posterior imersão em álcool 70% (v/v) também por um minuto e, finalmente, a imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) 30% (v/v) (0,6% de cloro ativo) por vinte minutos. Todos os passos ocorreram sob agitação constante, sendo as sementes após a passagem pelo hipoclorito de sódio, lavadas por três vezes consecutivas em água deionizada e autoclavada, em câmara de fluxo laminar, para a remoção dos agentes desinfetantes.

Figura 7 - Detalhe da semente de pinhão manso (*J. curcas* L.) após a remoção da testa

4.4.2 Germinação *in vitro*

Após verificação prévia dos efeitos dos meios de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) na cultura *in vitro* de *J. curcas* L., o meio de cultura WPM foi definido como o meio nutritivo padrão para todos os testes avaliados no presente trabalho. Aos componentes básicos do meio WPM, adicionou-se 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar. O pH da solução foi ajustado para 5,8 (±1), antes da autoclavagem a 120 °C e 1,2 atm, durante 20 minutos.

Neste contexto, após o processo de assepsia, as sementes de pinhão manso foram inoculadas individualmente em frascos de vidro (5 x 12 cm), contendo 40 mL do meio de

cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980), isento de reguladores de crescimento (meio de germinação). As condições de cultivo foram controladas em uma sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de 25 ± 2 °C e irradiância de $42 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) (Figura 8).

Figura 8 - Detalhe das condições de germinação das sementes de pinhão manso (*J. curcas* L.)

4.4.3 Obtenção de explantes para a indução de resposta morfogênica

Decorrentes 30 dias de cultivo *in vitro* das sementes em meio de germinação (Figura 9A), a maioria das plântulas germinadas apresentavam 8 cm de comprimento (Figura 9B) e encontravam-se aptas para a coleta do terço mediano do hipocótilo (Figura 9C), explante utilizado nos testes de indução de resposta morfogênica. Desta forma, após testes preliminares de inoculação do terço mediano dos hipocótilos na posição horizontal e vertical no meio de cultura, os resultados destacaram a posição vertical como a mais promissora, sendo a base dos explantes, a partir desse momento, mantida em contato com o meio nutritivo WPM (Figura 9D) e submetida aos tratamentos, que diferiram entre si pela concentração e combinação de reguladores de crescimento do grupo das citocininas e auxinas.

Figura 9 - Cultivo *in vitro* de pinhão manso (*J. curcas* L.). **A)** Germinação de semente; **B)** Plântulas obtidas da germinação *in vitro* de sementes; **C)** Detalhes da subdivisão do hipocótilo; **D)** Terço mediano do hipocótilo utilizado como explante e introduzido no meio de cultura WPM

4.4.4 Testes de indução de resposta morfogênica

As reações ao estresse, consideradas como evidências para a indução das vias morfogênicas, foram instigadas através da suplementação do meio de cultura WPM com as citocininas, thidiazuron (TDZ) e 6-benzilaminopurina (BAP) e, com as auxinas, ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 3-indolacético (AIA), isoladamente ou em combinação de uma citocinina com uma auxina, resultando em nove tratamentos (Tabela 4), os quais foram aplicados em cada procedência de semente de pinhão manso, com 10 repetições, consistindo em um explante por repetição.

Tabela 4 - Diferentes concentrações e combinações dos reguladores de crescimento TDZ (tidiazuron), BAP (6-benzilaminopurina), AIA (ácido 3-indolacético) e ANA (ácido naftalenoacético) acrescidos isoladamente ou em combinação ao meio de cultura WPM, visando à indução de resposta morfogênica em explantes hipocotiledonares de terço mediano, de três procedências de pinhão manso (*J. curcas* L.)

Tratamentos	Reguladores de Crescimento (mg L ⁻¹)			
	TDZ	BAP	AIA	ANA
T1 (controle)	-	-	-	-
T2	1,0	-	-	-
T3	1,0	-	0,5	-
T4	1,0	-	-	0,5
T5	-	1,0	-	-
T6	-	1,0	0,5	-
T7	-	1,0	-	0,5
T8	-	-	0,5	-
T9	-	-	-	0,5

Nota: Sinal convencional utilizado:

- Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento

As transferências ocorreram em intervalos de 30 dias e as condições de cultivo foram as mesmas para a germinação *in vitro* das sementes.

4.5 Análise morfofisiológica

Visto a obtenção de resposta do material vegetal aos tratamentos após duas transferências (60 dias) de 30 dias cada para renovação do meio de cultura, mantendo-se as mesmas condições de cultivo, foram avaliados os parâmetros quantitativos, quanto ao número de gemas, número de folhas, nível reduzido, moderado e intenso de indução de calos e oxidação, e os parâmetros qualitativos, como presença ou ausência de gemas adventícias, de

calos, de exsudados de compostos fenólicos, de raiz, de oxidação e de entumescimento da base.

Estes dados foram obtidos com os materiais ainda nas condições *in vitro*, como forma de não estressá-los, evitando com isso alterações metabólicas, as quais influenciariam as análises bioquímicas e moleculares futuras.

4.6 Análise bioquímica e molecular

4.6.1 Coleta do material

A partir dos resultados obtidos das análises morfofisiológicas, amostras de quatro melhores tratamentos [T5 (BAP); T2 (TDZ); T3 (TDZ+AIA); T6 (BAP+AIA)] e o controle T1, que apresentaram respostas morfogênicas, especialmente formação de gemas adventícias, tiveram, aproximadamente, 1,8 g de material vegetal coletado e, imediatamente, congelado em nitrogênio líquido, permanecendo acondicionadas em freezer a -80 °C, até o início das análises.

4.6.2 Peroxidação lipídica

A peroxidação de lipídios foi avaliada através da produção de metabólitos reativos ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente o malondialdeído (MDA), baseado nos trabalhos de Heath e Packer (1968) e Buege e Aust (1978). Amostras (0,2 g) foram maceradas com 5 mL de TCA (0,1%) na presença de aproximadamente 20% (p/v) de PVPP. Após completa homogeneização, 1,4 mL foi transferido para tubo eppendorf para ser centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos. Do sobrenadante foi retirado uma alíquota de 0,5 mL, na qual foram adicionados 2 mL de TCA (20%) contendo 0,5 % de TBA. A mistura permaneceu em estufa a 95 °C por 30 min e, em seguida, foi resfriada em gelo. Após a mudança de cor, 1,4 mL da amostra foi transferida para tubo eppendorf para centrifugação a 10.000 rpm por 10 min, com o intuito de separar algum resíduo formado durante o aquecimento e também para clarificar a coloração. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 535 e 600 nm. A quantidade do MDA foi expressa em nmol/g de tecido fresco.

4.6.3 Determinação de proteínas

Por espectrometria a concentração de proteínas foi determinada a 595 nm (Lambda 40, Perkin Elmer), segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se o BSA (“bovine serum albumin”) como padrão. Os resultados foram expressos em mg proteína/mL.

4.6.4 Extração enzimática

Os passos seguintes foram conduzidos a 4 °C.

O material vegetal foi homogeneizado (2:1 volume de tampão/massa fresca) em mortar e pistilo, com 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5), contendo 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 3 mM de DL- ditioneitol e 5% (m/v) de PVPP insolúvel. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 30 min e o sobrenadante foi estocado, cuidadosamente, em alíquotas separadas a -80 °C, antes de fazer as análises da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e do perfil proteico.

4.6.5 Atividade da catalase – CAT

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada através de dois métodos: espectrofotometria e em PAGE não desnaturante.

4.6.5.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade da CAT foi determinada como descrito por Kraus, Mckersie e Fletcher (1995), com algumas modificações conforme Azevedo et al. (1998).

Em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer), a atividade da CAT foi determinada a 25 °C em solução de reação formada por 10 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25 µL de peróxido de hidrogênio (solução de 0,25%) preparada imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de 25 µL do extrato proteico à mistura de reação e a atividade enzimática foi determinada seguindo-se a decomposição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 1 minuto, através das alterações na absorbância a 240 nm em cubetas de quartzo. Os resultados foram expressos em µmol/minuto/mg de proteína.

4.6.5.2 Atividade em PAGE não desnaturante

Utilizou-se o sistema de eletroforese em PAGE não-desnaturante (12%). Foi utilizado o sistema Mini Protean II da Bio-Rad. O gel possuía espessura de 3 mm, altura de 6,5 cm e largura 7,3 cm. Para a confecção de um mini gel foi utilizado 6,0 mL de uma solução 40% de acrilamida (Sigma), 5 mL de tampão TRIS 3 M (hidroximetil)-aminometano (pH 8,9) e 9 mL de água destilada. Como catalisadores foram utilizados 38 µL de TEMED e 59 µL de persulfato de amônio (10%).

Após a polimerização desse gel de resolução (cerca de 30 min.), foi aplicado o gel de empacotamento segundo o protocolo: 1 mL de acrilamida, 2,5 mL tampão TRIS 500 mM, pH 6,7 e 5,5 mL de água. Para a polimerização foram utilizados 20 µL de TEMED e 100 µL de persulfato de amônio (10%).

A eletroforese foi realizada a 4°C em corrente constante de 15 mA/placa. O tampão de eletrodo foi TRIS 25 mM, pH 8,3, acrescido de 192 mM de glicina – 5 vezes concentrado, sendo diluído para 1 vez e reutilizado até 3 vezes. Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de CAT de fígado de boi – Sigma (2 unidades) e 30 µg de proteína dos extratos proteicos para cada tratamento.

A revelação para a atividade de CAT foi realizada após a lavagem do gel por 45 minutos em água deionizada (3 x 15 minutos) e incubação do mesmo por 10 minutos em solução de H₂O₂ (10 µL/50 mL/gel) à temperatura ambiente, com agitação suave e constante. Após este período, o gel foi rapidamente lavado em água deionizada e colocado por 10 minutos em uma solução de FeCl₃ 1% (p/v) e K₃Fe(CN)₆ 1% (p/v) sempre sob agitação suave. Em seguida, a solução foi retirada e o gel lavado com água. A fixação foi realizada com uma solução de ácido acético (7%) por 15 minutos. Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

4.6.6 Atividade da superóxido dismutase – SOD

Foi realizada a eletroforese em PAGE (8%) nas mesmas condições como descrito para CAT. Foi utilizado como padrão, duas unidades de SOD de fígado de boi (Sigma) e a concentração de proteínas das amostras foi de 62 µg. Após a separação das proteínas por eletroforese, a atividade de SOD foi determinada como descrito por Beauchamp e Fridovich (1971). Os géis foram lavados rapidamente em água deionizada e incubados no escuro a temperatura ambiente em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de

potássio, pH 7,8, 1 mM EDTA, 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM nitroblue tetrazolium e 0,3% TEMED. Ao final de 30 minutos, a mistura de reação foi removida, os géis enxaguados com água deionizada e colocados sob iluminação por alguns minutos até o desenvolvimento de bandas negativas sob fundo roxo. Nestas condições ocorre a fotoxidação do gel, propiciando a formação de uma coloração púrpura e as bandas correspondentes a atividade de SOD permanecem sem se fotoxidar, promovendo uma revelação negativa. A fotoxidação foi interrompida mergulhando o gel em uma solução de água deionizada e ácido acético (7%).

4.6.7 Atividade da ascorbato peroxidase – APX

A atividade da APX foi determinada em espectrofotômetro, seguindo o método de Nakano e Asada (1981), pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a 30 °C. O meio de reação foi composto por tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), 0,5 mM de ascorbato, 0,1 mM de EDTA, 0,1 mM de H₂O₂ e 100 µL de extrato enzimático, em um volume total de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição do ascorbato. O decréscimo na absorbância foi monitorado em intervalos de 10 segundos, até totalizar 60 segundos. Os resultados foram expressos em µmol/minuto/mg de proteína.

4.6.8 Perfil proteico em SDS-PAGE

Este procedimento foi conduzido como descrito por Laemmli (1970). Para a confecção de um mini gel de resolução (10% de acrilamida) foram utilizados 2,5 mL de uma solução 40% de acrilamida (Sigma), 2,5 mL de tampão TRIS 3 M (pH 8,9), 100 µL de SDS 10% e 5 mL de água destilada. Como catalisadores foram utilizados 19 µL de TEMED e 25 µL de persulfato de amônio (10%). O gel de empacotamento foi elaborado com 500 µL de acrilamida, 1,25 mL tampão TRIS 500 mM (pH 6,7), 50 µL de SDS 10% e 2,75 mL de água e polimerizado com 10 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônio (10%). A eletroforese foi conduzida a temperatura ambiente sob corrente constante de 15 mA/placa com tampão de corrida 5 vezes concentrado (25 mM Tris, pH 8,3, acrescido de 192 mM de glicina e 1% de SDS 10%). Foram aplicados 4 µL de padrão BenchMark - Protein Ladder (Invitrogen) e 30 µg de proteína de cada amostra experimental. Os géis foram corados com uma solução de Coomassie Blue (0,5 g de Coomassie Blue R-250 em 500 mL de solução descorante) por 12 horas e posteriormente repassados para a solução descorante (400 mL de metanol p.a. e 70

mL de ácido acético glacial em um volume final 1000 mL completado com água destilada) até a visualização das proteínas.

4.7 Análise anatômica

A análise anatômica das amostras dos tratamentos selecionados consistiu em análises histoquímicas (substâncias ergásticas) e histológicas, conforme descritas a seguir.

4.7.1 Desidratação e emblocagem das amostras para análise anatômica

Explantos hipocotiledonares do terço mediano, bem como folhas e raízes advindas de brotações dos cinco melhores tratamentos de indução de reposta morfogênica [T5 (BAP); T2 (TDZ); T3 (TDZ+AIA); T6 (BAP+AIA) e T1 (controle)], foram coletados e fixados em Karnovsky (1965) e posteriormente desidratados em série alcoólica-etílica crescente [10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 80, 90 e 100% (v/v)]. Em seguida, as amostras foram emblocadas em resina de hidroxietil metacrilato (Historesin, Leica, Heidelberg, Germany), seguindo as recomendações do fabricante.

4.7.2 Cortes histológicos

Após a completa secagem da resina de hidroxietil metacrilato, os blocos foram fixados em superfícies de madeira e secções longitudinais dos blocos contendo hipocótilos e, secções transversais dos blocos contendo raízes ou folhas, foram realizadas com espessura de 0,5 µm, em micrótomo rotativo manual.

4.7.3 Testes de coloração empregados para análise anatômica

A coloração, tanto para as análises histológicas como para a detecção de amido, compostos fenólicos e proteínas, ocorreu através do método de coloração dupla com PAS (Periodic acid/ Schiff reagent) e Naphtol blue Black (FISHER, 1968) e, para a detecção de lipídios, utilizou-se o Sudan Black B (PEARSE, 1968) (Tabela 5).

Tabela 5 - Testes histoquímicos para a identificação de componentes celulares específicos, baseado na coloração

Teste Empregado	Identificação dos Componentes	Coloração	Referência
PAS	Amido	(+)* Cor de rosa intenso à vinho	Fisher, 1968
PAS	Compostos fenólicos	(+) Laranja	Fisher, 1968
Naphtol blue Black	Proteínas	(+) Azul	Fisher, 1968
Sudan Black B	Lipídios	(+) Azul marinho à preto	Pearse, 1968

* Reação positiva

Posteriormente, realizou-se a montagem das lâminas histológicas com resina sintética (Entellan®), as quais foram visualizadas e fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2), sendo as imagens capturadas com câmera SONY.

4.8 Análise estatística dos dados

Dos resultados obtidos da análise morfofisiológica realizou-se uma análise exploratória dos dados, por meio de estatística descritiva, usando os dados de contagem transformados em percentuais.

Para a análise bioquímica e molecular, os dados quantitativos, que foram obtidos de três repetições independentes para MDA, atividade da CAT e SOD, foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade e erro. Os parâmetros dos modelos, tais como homogeneidade de variâncias e distribuição normal dos resíduos, foram verificados através do teste de Bartlett (BARTLETT, 1937) e Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965), respectivamente. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R versão 2.15.1 (2009).

A aplicação de métodos estatísticos rotineiros não é pertinente aos dados obtidos para as análises anatomicas (histológicas e histoquímicas) (HUTCHINSON; KRISHNARAJ; SAXENA, 1996).

4.9 Resumo esquemático do material e método

Cada etapa do material e da metodologia utilizada no desenvolvimento do presente trabalho está, resumidamente, esquematizada na Figura 10.

Figura 10 - Resumo esquemático do material e métodos utilizados no desenvolvimento do projeto “avaliação morfogênica da micropropagação de pinhão manso (*J. curcas* L.) sob indução de estresse oxidativo”

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O experimento de micropropagação consistiu a base do projeto de pesquisa para atender os objetivos e testar as hipóteses estabelecidas, resultando em quatro análises (morfofisiológica, bioquímica, molecular e anatômica) essenciais para a realização do que foi proposto.

Os resultados das análises encontram-se detalhados a seguir, bem como a discussão sobre o que foi constatado.

5.1 Análise morfofisiológica

O terço mediano dos hipocótilos de pinhão manso obtidos das plântulas germinadas *in vitro*, apresentaram respostas variadas de acordo com o tipo de regulador de crescimento presente no meio de cultura WPM (Figura 11).

Figura 11 - Variação das respostas morfogênicas do terço mediano dos hipocótilos de pinhão manso (*J. curcas* L.) aos diferentes tipos e combinações de reguladores de crescimento em meio de cultura WPM. **A)** Evidente ausência de reposta morfogênica, **B)** Gemas adventícias (seta) e calos nas regiões apical, mediana e basal (ponta da seta), **C)** Calos de coloração branca ao longo do hipocótilo (seta) e oxidação do tecido e do meio cultura (ponta da seta), **D)** Gemas adventícias formadas a partir de calos basais (seta) e oxidação do tecido e do meio de cultura (ponta da seta), **E)** Raízes adventícias (seta), **F)** Calogênese (seta)

As diferentes respostas morfogênicas presentes na Figura 11 corroboraram as afirmações de Skoog e Miller (1957), sobre as concentrações relativas entre auxina e citocinina influenciando a formação de calos e órgãos *in vitro*. Fato que, mesmo se tratando

de uma constatação que ocorreu na década de 50, trabalhos recentes reafirmam inteiramente os resultados obtidos por estes autores (PERES, 2002).

Como já é de conhecimento geral, a organogênese *in vitro* depende da fonte de explante, dos componentes do meio de cultura, das condições de cultivo e do estabelecimento de um balanço hormonal ideal, o qual se configura como o fator mais crítico para a obtenção de uma determinada resposta morfogênica (PERES, 2002), acontecimento claramente observado nos resultados obtidos no cultivo *in vitro* de explantes de terço mediano do hipocotilo de pinhão manso, tendo em vista a diversidade de resposta obtida por meio da alteração das concentrações e dos tipos de reguladores de crescimento adicionados ao meio nutritivo.

A seguir, são apresentadas as avaliações realizadas, referentes às variadas respostas dos explantes aos tratamentos.

5.1.1 Exsudado de compostos fenólicos e oxidação dos explantes

Com exceção do grupo controle (T1), representado pelo explante no meio de cultura WPM isento de reguladores de crescimento, os demais explantes hipocotiledonares de terço mediano de pinhão manso apresentaram exsudados de compostos fenólicos, imediatamente após a introdução do material no meio de cultura WPM suplementado com auxinas e/ou citocininas (Figura 12).

Figura 12 - Terço mediano de hipocótilo de pinhão manso (*J. curcas* L.) após 24h de cultivo. **A)** Hipocótilo sem a presença de exsudado de compostos fenólicos, representante do grupo controle (T1), **B)** Hipocótilo com exsudado de compostos fenólicos (seta) no meio de cultura WPM suplementado com reguladores de crescimento

Armazenados em grandes quantidades nos vacúolos, a liberação de compostos fenólicos podem ocorrer em resposta a danos físicos, representados pelas injúrias decorrentes

do preparo do explante, e às altas concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultura.

Como evidenciado na Figura 13, a exsudação de compostos fenólicos ocorreu independentemente da procedência da semente e, diante de tais resultados, pode-se estimar que os reguladores de crescimento, apresentaram influência direta sobre a liberação destes compostos pelos explantes, uma vez que no grupo controle não foi observado tal efeito.

Figura 13 - Percentagem de explantes das três procedências de pinhão manso (*J. curcas* L.) com exsudado de compostos fenólicos (T1 = controle, T2 = TDZ, T3 = TDZ + AIA, T4 = TDZ + ANA, T5 = BAP, T6 = BAP + AIA, T7 = BAP + ANA, T8 = AIA, T9 = ANA)

A presença de compostos fenólicos no ambiente *in vitro* pode promover o escurecimento e mesmo a morte dos explantes, devido à produção de substâncias tóxicas, resultantes das reações de oxidação de compostos fenólicos pelas enzimas polifenases (COSTA et al., 2006). Neste sentido, a liberação de compostos fenólicos representou o grande indicativo para a posterior ocorrência de oxidação dos explantes de pinhão manso, fato que, omitindo o grupo controle (T1), no qual os explantes da procedência CNPAE 115 e 224 não apresentaram oxidação, esta foi observada em todos os tratamentos, de todas as procedências de sementes, caracterizada pela quase totalidade dos explantes com algum grau de oxidação (Figura 14).

Figura 14 - Percentagem de explantes com oxidação das três procedências de pinhão manso (*J. curcas* L.) (T1 = controle, T2 = TDZ, T3 = TDZ + AIA, T4 = TDZ + ANA, T5 = BAP, T6 = BAP + AIA, T7 = BAP + ANA, T8 = AIA, T9 = ANA)

A Figura 15 evidencia a análise quantitativa dos níveis de oxidação verificados nos explantes das três procedências de pinhão manso.

Figura 15 - Níveis de oxidação em explantes das três procedências de pinhão manso (*J. curcas* L.). **A)** ausência de oxidação, **B)** oxidação reduzida, **C)** oxidação moderada, **D)** oxidação intensa

Como previsto, em decorrência da ausência de exsudados de compostos fenólicos, o menor grau de oxidação ocorreu no grupo controle (T1) para as três procedências de pinhão manso, enquanto que os demais tratamentos apresentaram respostas variadas, sendo possível identificar o T6 (BAP + AIA) como o tratamento que apresentou maior ocorrência de explantes com intenso nível de oxidação, considerando as três procedências (Tabela 6).

Tabela 6 - Frequência da ocorrência de oxidação dos explantes de pinhão manso (*J. curcas* L.) em função da procedência e do tratamento

Tratamento	Procedência	Percentual de explantes com oxidação (%)			
		Ausente	Reduzida	Moderada	Intensa
T1 (controle)	CNP AE 115	100,00	0,00	0,00	0,00
	CNP AE 101	85,71	14,29	0,00	0,00
	CNP AE 224	100,00	0,00	0,00	0,00
T2 (TDZ)	CNP AE 115	0,00	50,00	50,00	0,00
	CNP AE 101	0,00	53,33	46,67	0,00
	CNP AE 224	7,69	0,00	92,31	0,00
T3 (TDZ+AIA)	CNP AE 115	0,00	44,44	11,11	44,44
	CNP AE 101	5,88	23,53	52,94	17,65
	CNP AE 224	0,00	33,33	50,00	16,67
T4 (TDZ+ANA)	CNP AE 115	0,00	10,00	90,00	0,00
	CNP AE 101	0,00	5,88	94,12	0,00
	CNP AE 224	0,00	0,00	100,00	0,00
T5 (BAP)	CNP AE 115	0,00	20,00	80,00	0,00
	CNP AE 101	0,00	11,76	58,82	29,41
	CNP AE 224	0,00	18,18	36,36	45,45
T6 (BAP+AIA)	CNP AE 115	0,00	0,00	8,33	91,67
	CNP AE 101	0,00	6,67	46,67	46,67
	CNP AE 224	0,00	33,33	33,33	33,33
T7 (BAP+ANA)	CNP AE 115	0,00	0,00	92,86	7,14
	CNP AE 101	0,00	5,26	94,74	0,00
	CNP AE 224	0,00	0,00	100,00	0,00
T8 (AIA)	CNP AE 115	36,36	45,45	18,18	0,00
	CNP AE 101	6,25	25,00	25,00	43,75
	CNP AE 224	84,62	15,38	0,00	0,00
T9 (ANA)	CNP AE 115	0,00	33,33	0,00	66,67
	CNP AE 101	0,00	15,00	0,00	85,00
	CNP AE 224	0,00	100,00	0,00	0,00

Os explantes com oxidação podem exibir dificuldades de absorção de componentes do meio de cultura, devido à obstrução do tecido pela oxidação, resultando em inibição do crescimento e/ou morte dos explantes. Entretanto, ressalta-se que mesmo diante de explantes com oxidação intensa, no presente trabalho, ocorreram respostas aos tratamentos com formações organogênicas adventícias de raízes e gemas (Figura 16).

Figura 16 - Resposta morfogênica adventícia dos explantes de pinhão manso (*J. curcas* L.), sob elevada oxidação. **A)** Raízes adventícias (setas), **B)** Gemas adventícias

Apesar disso, no decorrer do cultivo, dificuldades foram encontradas para manter os explantes e as gemas adventícias vivas, culminando, na maior parte dos casos, com o descarte do material por inviabilidade.

5.1.2 Intumescimento da base e formação de calos

No segundo dia de cultivo dos explantes em meio de cultura, o terço mediano de hipocótilos de pinhão manso apresentaram-se com a base intumescida (Figura 17).

Figura 17 - Terço mediano de hipocótilo de pinhão manso (*J. curcas* L.) com a base intumescida (seta), após dois dias de cultivo

O intumescimento da base do hipocótilo foi constatado em todos os tratamentos para as três procedências de pinhão manso e, com exceção de alguns hipocótilos dos tratamentos T2 (TDZ) e T9 (ANA) para a procedência CNPAE 115, todos os explantes (100%) apresentaram a base intumescida (Figura 18).

Figura 18 - Percentagem de explantes com intumescimento da base das três procedências de pinhão manso (*J. curcas* L.) (T1 = controle, T2 = TDZ, T3 = TDZ + AIA, T4 = TDZ + ANA, T5 = BAP, T6 = BAP + AIA, T7 = BAP + ANA, T8 = AIA, T9 = ANA)

A ocorrência deste evento é comum em razão da absorção de água e dos demais constituintes do meio de cultura, associado ao efeito dos reguladores de crescimento, que promovem o alongamento e a própria divisão celular, resultando no intumescimento da base dos explantes.

Posteriormente ao intumescimento da base dos explantes, que provavelmente representa o processo inicial de calogênese, foi possível visualizar a formação dos calos (Figura 19).

Figura 19 - Calogênese na base do terço mediano do hipocótilo de pinhão manso (*J. curcas* L.)

Formado por um aglomerado celular indiferenciado ou com diferenciação reduzida, o calo pode ser induzido, crescer e tornar-se determinado, culminando na diferenciação organogênica indireta de gemas ou raízes adventícias, processos diretamente dependentes do

balanço hormonal endógeno e exógeno ao qual o explante foi submetido (SKOOG; MILLER, 1957).

A formação de calos na base dos explantes, apesar de representar um evento comum a todos os tratamentos das três procedências, destacaram-se os tratamentos T5 (BAP), T6 (BAP+AIA), T7 (BAP+ANA), T8 (AIA) e T9 (ANA) das três procedências, pela apresentação de mais de 80% dos explantes com formação de calos na base (Figura 20).

Figura 20 - Percentagem de explantes com formação de calos das três procedências de pinhão manso (*J. curcas* L.) (T1 = controle, T2 = TDZ, T3 = TDZ + AIA, T4 = TDZ + ANA, T5 = BAP, T6 = BAP + AIA, T7 = BAP + ANA, T8 = AIA, T9 = ANA)

A Figura 21 evidencia o agrupamento dos explantes em relação à quantificação dos calos formados nas três procedências de pinhão manso.

Figura 21 - Níveis de calogênese na base de explantes das três procedências de pinhão manso (*J. curcas* L.). **A)** ausência de calos, **B)** calogênese reduzida **C)** calogênese moderada, **D)** calogênese intensa

Para as três procedências de pinhão manso, os tratamentos T4 (TDZ + ANA) e T7 (BAP + ANA) foram os que apresentaram maior nível de calogênese na base dos hipocótilos (Tabela 7).

Tabela 7 - Frequência da ocorrência de formação de calos na base dos explantes de pinhão manso (*J. curcas* L.) em função da procedência e do tratamento.

Tratamento	Procedência	Percentual de explantes com formação de calo (%)			
		Ausente	Reduzida	Moderada	Intensa
T1 (controle)	CNP AE 115	60,00	40,00	0,00	0,00
	CNP AE 101	78,57	21,43	0,00	0,00
	CNP AE 224	100,00	0,00	0,00	0,00
T2 (TDZ)	CNP AE 115	0,00	0,00	100,00	0,00
	CNP AE 101	0,00	100,00	0,00	0,00
	CNP AE 224	7,69	0,00	92,31	0,00
T3 (TDZ+AIA)	CNP AE 115	0,00	44,44	0,00	55,56
	CNP AE 101	0,00	23,53	58,82	17,65
	CNP AE 224	0,00	41,67	33,33	25,00
T4 (TDZ+ANA)	CNP AE 115	0,00	0,00	0,00	100,00
	CNP AE 101	0,00	0,00	5,88	94,12
	CNP AE 224	0,00	0,00	0,00	100,00
T5 (BAP)	CNP AE 115	0,00	0,00	100,00	0,00
	CNP AE 101	0,00	11,76	0,00	88,24
	CNP AE 224	9,09	9,09	9,09	72,73
T6 (BAP+AIA)	CNP AE 115	0,00	0,00	100,00	0,00
	CNP AE 101	0,00	0,00	100,00	0,00
	CNP AE 224	0,00	16,67	83,33	0,00
T7 (BAP+ANA)	CNP AE 115	0,00	0,00	0,00	100,00
	CNP AE 101	0,00	5,26	0,00	94,74
	CNP AE 224	0,00	0,00	9,09	90,91
T8 (AIA)	CNP AE 115	27,27	72,73	0,00	0,00
	CNP AE 101	0,00	100,00	0,00	0,00
	CNP AE 224	61,54	38,46	0,00	0,00
T9 (ANA)	CNP AE 115	0,00	41,67	58,33	0,00
	CNP AE 101	0,00	10,00	90,00	0,00
	CNP AE 224	0,00	100,00	0,00	0,00

Os resultados apresentados na Tabela 7 evidenciaram o marcante efeito da associação da auxina ANA com as citocininas BAP e TDZ na indução da calogênese na base de hipocótilos de pinhão manso, independente da procedência.

Em relação à formação de calos nos ápices dos explantes hipocotiledonares (Figura 22), mesmo sendo observada em todos os tratamentos e em todas as procedências de pinhão manso, a calogênese foi reduzida e manteve-se desta forma por todo período dos experimentos até a sua finalização.

Figura 22 - Formação de calos nos ápices dos hipocótilos de pinhão manso (*J. curcas* L.) (setas)

Para as três procedências de pinhão manso, somente não foi visualizada a formação de calos na região mediana do hipocótilo no grupo controle (T1), enquanto que nos demais tratamentos, essa formação, apesar de presente, foi pouco expressiva (Figura 23), limitando-se a poucos hipocótilos de cada tratamento.

Figura 23 - Formação de calos na região mediana do explante de hipocótilo de pinhão manso (*J. curcas* L.) (setas)

5.1.3 Organogênese

Considerando as três procedências de pinhão manso, parte dos calos formados nos explantes hipocotiledonares do terço mediano se rediferenciaram em gemas ou raízes adventícias (Figura 24), caracterizando-se desta forma, como calos organogênicos. Cabe

destacar que apesar da Figura 24A aparentemente não evidenciar o desenvolvimento de calos no ápice do explante, este evento ocorreu e foi apresentado na Figura 22.

Figura 24 - Organogênese em hipocótilo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). **A)** Gemas adventícias apicais, **B)** Gemas adventícias basais, **C)** Gemas adventícias intermediárias, **D)** Rizogênese adventícia

De acordo com Cary et al. (2001), o processo de organogênese caracteriza-se pela habilidade (competência) celular em responder à incitação hormonal, sendo que a ausência de competência por parte do tecido vegetal resulta no insucesso da organogênese *in vitro*. Este insucesso pode estar atrelado a ausência de receptores para uma classe hormonal específica que induzirá o processo organogênico (CARY et al., 2001), bem como, por conta do próprio metabolismo hormonal do explante, o qual determinará o balanço hormonal endógeno por meio da síntese e ativação de enzimas que degradam citocininas (citocinina oxidase) e/ou pela atividade elevada de degradação oxidativa ou de inativação por conjugação à açúcares das auxinas (PERES; KERBAUY, 1999), e por fim, devido a elevada determinação do explante para formar um órgão específico (PERES, 2002). Neste sentido, pode-se dizer que o pinhão manso mostrou-se bastante responsivo aos estímulos indutivos, considerando os resultados obtidos no presente trabalho e em trabalhos que visavam a organogênese *in vitro* a partir de explantes variados (DATTA et al., 2007, RAJORE; BATTRA, 2005; SUJATHA; MUKTA, 1996; KUMAR; REDDY; 2010; DEORE; JOHNSON, 2008; VARSHNEY; JOHNSON, 2010; QIN et al., 2004; PURKAYASTHA et al., 2010; KAEWPOO; TECHATO, 2010, FEITOSA et al., 2013). Desta forma, os resultados conseguidos até o momento

potencializam a viabilidade de micropropagar o pinhão manso e proporcionar um impacto positivo em termos do cultivo *in vitro* dessa oleaginosa de grande interesse econômico.

5.1.3.1 Gemas adventícias

Para as três procedências de pinhão manso, o tratamento T5 (BAP) destacou-se pela maior percentagem de explantes com gemas adventícias, acompanhado dos tratamentos T2 (TDZ), T3 (TDZ+AIA), T6 (BAP+AIA) e T8 (AIA) (Figura 25). A ausência de gemas adventícias foi constatada na procedência CNPAE 101 nos tratamentos T7 (BAP+ANA) e T9 (ANA), bem como na procedência CNPAE 224 em relação ao tratamento T9 (ANA). Para a procedência CNPAE 115, apenas o tratamento T4 (TDZ+ANA) não induziu o desenvolvimento de gemas adventícias (Figura 25).

Figura 25 - Percentagem de explantes com desenvolvimento de gemas adventícias das três procedências de pinhão manso (*J. curcas* L.) (T1 = controle, T2 = TDZ, T3 = TDZ + AIA, T4 = TDZ + ANA, T5 = BAP, T6 = BAP + AIA, T7 = BAP + ANA, T8 = AIA, T9 = ANA)

Diante dos resultados, percebeu-se que a auxina ANA na concentração utilizada, tanto isolada, como em combinação com o TDZ ou BAP, não favoreceu a indução de gemas adventícias, independentemente da procedência do material vegetal.

Nos trabalhos publicados sobre micropropagação de pinhão manso, a auxina ANA foi utilizada para a indução de calos (MISRA et al., 2010; VARSHNEY; JOHNSON, 2010), para a multiplicação (WARAKAGODA; SUBASINGHE, 2009; SHRIVASTAVA; BANERJEE,

2008; KUMAR; VIJAY ANAND; REDDY, 2011) e alongamento de gemas adventícias (KUMAR; VIJAY ANAND; REDDY, 2011) e enraizamento de brotações (SINGH et al., 2010; VARSHNEY; JOHNSON, 2010; SHRIVASTAVA; BANERJEE, 2008; SUJATHA; MUKTA, 1996; KUMAR; VIJAY ANAND; REDDY, 2011; MAHARANA et al., 2012). Shrivastava e Banerjee (2008), visando a multiplicação de gemas adventícias, constataram que o segundo tratamento mais promissor caracterizou pela combinação de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BA e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA, resultando na formação de 5,89 gemas adventícias por nó, de plantas de pinhão manso com três meses de idade, porém, apesar do resultado satisfatório, a combinação de BA e ANA teve efeito positivo sobre a indução de calos, impedindo o crescimento das plantas.

Em relação ao aspecto quantitativo, o tratamento T5 (BAP), além de ter sido o melhor em relação ao número de explantes com gemas adventícias formadas (Figura 25), evidenciou para as três procedências de pinhão manso, a maior quantidade de explantes com número elevado de gemas adventícias (Tabela 8), corroborando os resultados de Feitosa et al. (2013), sobre a essencialidade da suplementação de BAP ao meio de cultura, para o desenvolvimento de brotações de pinhão manso, uma vez que na ausência deste regulador de crescimento, os calos não apresentaram qualquer desenvolvimento de brotos, o que confirma a interferência totalmente benéfica do BAP na formação e multiplicação da parte aérea e na indução de gemas adventícias (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Estes resultados contrapõem-se ao relato de Mukherjee et al. (2011) sobre o meio de indução suprimido com TDZ apresentar maior influência sobre a formação de brotos adventícios em pinhão manso, quando comparado com a utilização isolada do BAP, o qual acarretou apenas a indução de calos.

Tabela 8 - Frequência da ocorrência do número de gemas adventícias em função da procedência e do tratamento nos explantes de pinhão manso (*J. curcas* L.)

Tratamento	Procedência	Percentual de explantes que apresentaram gemas adventícias (%)			
		Ausente*	Pouca*	Moderada*	Intensa*
T1 (controle)	CNPAE 115	60,00	0,00	30,00	10,00
	CNPAE 101	85,71	0,00	14,29	0,00
	CNPAE 224	92,31	7,69	0,00	0,00
T2 (TDZ)	CNPAE 115	40,00	0,00	40,00	20,00
	CNPAE 101	40,00	0,00	40,00	20,00
	CNPAE 224	61,54	15,38	0,00	23,08
T3 (TDZ+AIA)	CNPAE 115	44,44	0,00	0,00	55,56
	CNPAE 101	58,82	0,00	23,53	17,65
	CNPAE 224	50,00	0,00	16,67	33,33
T4 (TDZ+ANA)	CNPAE 115	100,00	0,00	0,00	0,00
	CNPAE 101	70,59	0,00	5,88	23,53
	CNPAE 224	63,64	0,00	0,00	36,36
T5 (BAP)	CNPAE 115	10,00	0,00	40,00	50,00
	CNPAE 101	17,65	0,00	0,00	82,35
	CNPAE 224	27,27	0,00	27,27	45,45
T6 (BAP+AIA)	CNPAE 115	50,00	16,67	8,33	25,00
	CNPAE 101	46,67	0,00	13,33	40,00
	CNPAE 224	25,00	8,33	33,33	33,33
T7 (BAP+ANA)	CNPAE 115	92,86	0,00	7,14	0,00
	CNPAE 101	100,00	0,00	0,00	0,00
	CNPAE 224	90,91	0,00	9,09	0,00
T8 (AIA)	CNPAE 115	63,64	0,00	27,27	9,09
	CNPAE 101	37,50	0,00	18,75	43,75
	CNPAE 224	76,92	7,69	15,38	0,00
T9 (ANA)	CNPAE 115	91,67	0,00	8,33	0,00
	CNPAE 101	100,00	0,00	0,00	0,00
	CNPAE 224	100,00	0,00	0,00	0,00

*Nenhuma = 0; Pouca = 1; Moderada = 2-4; Elevada > 4

De fato, os trabalhos publicados evidenciaram que a utilização do TDZ foi de extrema eficiência na indução de elevada frequência de multiplicação em explantes de pinhão manso cultivados *in vitro*, sendo relatado pela primeira vez por Deore e Johnson (2008) e, posteriormente confirmado por vários outros trabalhos (KUMAR; REDDY, 2010; KUMAR; VIJAY ANAND; REDDY, 2011; KHURANA-KAUL; KACHHWAHA; KOTHARI, 2010;

KHEMKLADNGOEN et al., 2011), evidenciando que a presença do TDZ apresenta participação significativa na indução de gemas adventícias. Porém, como já mencionado, a resposta do material vegetal aos fatores indutores, depende de vários fatores, o que determina uma especificidade ímpar aos explantes, justificando o fato de um regulador ser ora considerado mais eficiente por um autor e ora menos por outro.

Portanto, a justificativa para o BAP ter sido mais promissor na indução de gemas adventícias em explantes hipocotiledonares do terço mediano de pinhão manso, para as três procedências consideradas, em relação ao uso do TDZ, além da especificidade de cada explante, pode também, segundo Peres (2002), estar relacionado ao fato do TDZ apresentar estrutura química diferente das citocininas BAP, CIN (cinetina), iP (isopentenil adenina) e Z (zeatina), o que lhe confere propriedades específicas, como inibir a enzima citocinina oxidase, comprometida na degradação de citocininas endógenas como Z, iP e seus derivados. Consequentemente, alterando o balanço hormonal endógeno.

Sujatha, Makkar e Becker (2005) notificaram diferenças nas respostas entre genótipos, fato que atribuíram às concentrações endógenas de hormônios. O presente trabalho, de forma similar, também constatou este fato, porém, cabe ressaltar que mesmo o explante tendo sido obtido de plântulas originadas de sementes, o que deveria apresentar elevado nível de diversidade genética por se tratar de uma espécie alógama, houve relativa padronização nas respostas entre os tratamentos das três procedências, corroborando desta forma com Rosado et al. (2010), sobre a disponibilidade de uma diversidade genética muito limitada de *J. curcas* L. no Brasil.

Nas análises do presente trabalho, a combinação do BAP e AIA em meio de cultura WPM, também se mostrou promissora para a indução de gemas adventícias em explantes hipocotiledonares do terço mediano para as três procedências distintas de pinhão manso (Tabela 9), semelhante ao observado por Rajore e Batra (2005) com os ápices caulinares de pinhão manso cultivados no meio de cultura MS suplementado com 8,87 μM (2 mg.L^{-1}) de BAP e 2,85 μM (0,5 mg.L^{-1}) de AIA, juntamente com sulfato de adenina, glutamina e carvão ativado, para obtenção de brotações. Também existem relatos do sucesso da indução direta de gemas adventícias em fontes de explantes, como epicótilo, hipocótilo e folhas cotiledonares, advindas de plântulas germinadas *in vitro*, ao utilizar a combinação de BAP e AIB (SUJATHA; MUKTA, 1996; QIN et al., 2004).

Em relação ao desenvolvimento das gemas adventícias formadas, dependendo do tratamento, observou-se uma resposta diferenciada, porém, similar em relação às procedências, com exceções de alguns casos pontuais. A Figura 26 mostra o número médio de

folhas por explante, evidenciando que nem todos os tratamentos que formaram gemas adventícias resultaram no desenvolvimento de brotos, caracterizados pelo alongamento e expansão da área foliar.

Figura 26 - Número médio de folhas por explante das três procedências de pinhão manso (*J. curcas* L.) (T1 = controle, T2 = TDZ, T3 = TDZ + AIA, T4 = TDZ + ANA, T5 = BAP, T6 = BAP + AIA, T7 = BAP + ANA, T8 = AIA, T9 = ANA)

A Figura 27 evidencia a formação de gemas adventícias, entretanto, destaca o não desenvolvimento dessas gemas, ou seja, não foram observados nem alongamento, nem expansão da área foliar, principalmente nas gemas adventícias apicais e medianas.

Figura 27 - Gemas adventícias de hipocótilo de pinhão manso (*J. curcas* L.)

Já aquelas gemas que se desenvolveram, possibilitando o isolamento do restante do material vegetal (Figura 28), foram cultivadas no mesmo meio de cultura WPM suplementado com os reguladores de crescimento que induziram a formação das gemas adventícias, como no meio de cultura WPM isento de reguladores de crescimento.

Figura 28 - Gemas adventícias com formação de raízes adventícias (setas) isoladas de hipocótilos de pinhão manso (*J. curcas* L.)

Os tratamentos avaliados, meio nutritivo isento e suplementado com regulador de crescimento, não foram promissores para o desenvolvimento das gemas adventícias isoladas, culminando, na maior parte dos casos, com formação de calos e/ou morte do tecido.

5.1.3.2 Raízes adventícias

A formação de raízes adventícias foi constatada, como esperado, essencialmente na presença das auxinas isoladas AIA e ANA, sendo os melhores tratamentos para as três procedências o T8 (AIA) e T9 (ANA), cabendo destacar o grupo controle (T1), isento de reguladores de crescimento, que apresentou expressivo percentual de explantes com raízes (Figura 29), o que permitiu inferir sobre a influência remanescente da auxina, proveniente das regiões sintetizadoras da plântula matriz, nos explantes, quando ainda eram parte integrante do hipocótilo como um todo.

Diante dos resultados, torna-se evidente que o uso isolado de auxinas sintéticas é recomendável, porém, não essencial para a indução de raízes adventícias em explantes hipocotiledonares do terço mediano de pinhão manso.

Figura 29 - Percentual de explantes que formaram raízes das três procedências de pinhão manso (*J. curcas* L.) (T1 = controle, T2 = TDZ, T3 = TDZ + AIA, T4 = TDZ + ANA, T5 = BAP, T6 = BAP + AIA, T7 = BAP + ANA, T8 = AIA, T9 = ANA)

Segundo diversos autores, a utilização de auxinas sintéticas propícia a conjugação entre o AIA endógeno e aminoácidos que causam a síntese de proteínas específicas, essenciais para a formação das raízes iniciais (GASPAR; HOFINGER, 1988; ONO; RODRIGUES, 1996; ASSIS; TEIXEIRA, 1998; ALOUFA, 2003).

Os trabalhos existentes abordam o enraizamento *in vitro* de brotações de pinhão manso e, neste contexto, apesar de não ter sido avaliado no presente trabalho, a utilização do AIB, isolado ou combinado com citocinina, apresentou os melhores resultados (GARG; KHATRI; GANDHI, 2011; VARSHNEY; JOHNSON, 2010; SINGH et al., 2010; SHRIVASTAVA; BANERJEE, 2008; KHURANA-KAUL; KACHHWAHA; KOTHARI, 2010; SUJATHA; MUKTA, 1996; MUKHERJEE et al., 2011). Uma excelente percentagem (90%) de enraizamento de brotações de pinhão manso foi conseguida através da combinação de três auxinas: AIB, AIA e ANA (KUMAR; VIJAY ANAND; REDDY, 2011). E o sucesso da utilização isolada do AIA foi reportado apenas em um trabalho (KALIMUTHU et al., 2007).

O tratamento T8 (AIA) foi o mais promissor e o que apresentou a menor quantidade de calos formados, mesmo quando comparado com o tratamento T9 (ANA). Entretanto, o inverso ocorreu em relação ao maior número de raízes formadas, fato constatado para as três procedências de pinhão manso (Figura 30).

Figura 30 - Rizogênese em hipocótilos de pinhão manso (*J. curcas* L.) cultivados em meio de cultura WPM. **A)** Rizogênese no hipocótilo da procedência CNPAE 101, suplementado com AIA (T8), **B)** Rizogênese no hipocótilo da procedência CNPAE 115, suplementado com AIA (T8), **C)** Rizogênese no hipocótilo da procedência CNPAE 224, suplementado com AIA (T8), **D)** Rizogênese no hipocótilo da procedência CNPAE 101, suplementado com ANA (T9), **E)** Rizogênese no hipocótilo da procedência CNPAE 115, suplementado com ANA (T9), **F)** Rizogênese no hipocótilo da procedência CNPAE 224, suplementado com ANA (T9)

Apesar da formação de raízes adventícias, estas apresentaram regiões escurecidas em todas as procedências ao longo do cultivo, caracterizando a oxidação do tecido (Figura 31), que segundo Sanket (2004), a necrose do tecido por oxidação é um problema grave para a cultura de tecidos do pinhão manso e requer a utilização de antioxidante.

Figura 31 - Formação de raízes em hipocótilos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). **A)** Raízes aos oito dias de cultivo, **B)** Raízes aos vinte dias de cultivo, com regiões escurecidas, evidenciando a oxidação do tecido

A partir dos resultados observados na análise morfofisiológica, as avaliações bioquímica, molecular e anatômica foram realizadas a partir dos materiais vegetais desenvolvidos nos tratamentos T5 (BAP), T2 (TDZ), T3 (TDZ+AIA) e T6 (BAP+AIA), uma

vez que estes tratamentos foram os que apresentaram o maior número de explantes com desenvolvimento de gemas adventícias, bem como, mais de quatro gemas adventícias formadas por explante, para as três procedências de pinhão manso, permitindo-se destacar a importância desses tratamentos à micropropagação da espécie. Desta forma, as análises seguintes referem-se apenas a estes quatro tratamentos, mais o grupo controle (T1).

5.2 Análise bioquímica e molecular

Através dessas análises, foi possível verificar o estresse oxidativo do material vegetal, associá-lo a resposta morfogênica obtida, aos reguladores de crescimento utilizados e a procedência do pinhão manso. Cumprindo com os objetivos estabelecidos e legitimando o título do presente trabalho.

5.2.1 Quantificação de Malondialdeído (MDA) em espectrofotômetro

Com base nos resultados obtidos, para as três procedências de pinhão manso, a quantificação de MDA foi estatisticamente superior para o grupo controle (T1) (Tabela 9).

Tabela 9 - Quantificação de MDA (malondialdeído) no material micropropagado de pinhão manso (*J. curcas* L.), expresso em nmol de MDA/g de tecido fresco

Tratamentos	Procedências		
	101 (Rio Verde-GO)	115 (Xambrê-PR)	224 (São Francisco do Glória-MG)
T1 (controle)	0,2080 Ab	0,1841 Ab	0,2538 Aa
T2 (TDZ)	0,0573 Bb	0,0528 Bb	0,1042 Ba
T3 (TDZ + AIA)	0,1182 Bb	0,0908 Bb	0,1311 Ba
T5 (BAP)	0,0791 Bb	0,0780 Bb	0,1647 Ba
T6 (BAP + AIA)	0,0595 Bb	0,0530 Bb	0,1409 Ba

Médias seguidas pela mesma letra *maiúscula nas colunas* não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas pela mesma letra *minúscula nas linhas* não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

O resultado obtido no grupo controle pode ser explicado por conta do estresse oxidativo, o qual é mensurado de forma indireta, pela quantificação do produto resultante do ataque do peróxido de hidrogênio aos lipídios de membrana, sendo um dos principais produtos deste ataque o malondialdeído (MDA) (DEWIR et al., 2006). Desta forma, a hipótese consiste no fato de que quanto maior a produção de MDA, maior a “tendência” em haver um expressivo nível de estresse oxidativo nas células.

Portanto, respeitando a hipótese de que quanto mais MDA, maior o nível de estresse celular, é evidente que o grupo controle (T1), independentemente da procedência, apresente maior nível de estresse em comparação aos demais tratamentos, se for considerado, que neste grupo, o explante hipocotiledonar do terço mediano foi cultivado totalmente livre de qualquer fonte de fitormônios e reguladores de crescimento. Ou seja, uma vez que o terço mediano do hipocótilo foi isolado do meristema apical, responsável pela síntese de auxinas, e do meristema basal, responsável pela síntese de citocininas, e inoculado em um meio de cultura sem qualquer regulador de crescimento presente, um fator de estresse, possivelmente, foi gerado pela ausência repentina do fornecimento do fitormônio, inicialmente disponibilizado pelas regiões apical e basal das plântulas, das quais foram excisados os explantes hipocotiledonares. Ao passo que os explantes dos demais tratamentos, apesar da mesma procedência e de serem igualmente isolados das regiões meristemáticas fornecedoras dos fitormônios, foram cultivados em meios de cultura suplementados com reguladores de crescimento, responsáveis por tentar suprir de forma exógena a ausência da fonte natural e, provavelmente, o estado inicial dos explantes foi mantido. Esta suposição está de acordo com a observação realizada por Silva et al. (2006), ao esclarecerem o objetivo da adição de reguladores de crescimento na fase de estabelecimento *in vitro*, como forma de suprir as possíveis carências dos teores endógenos de hormônios nos explantes isolados das regiões sintetizadoras da planta matriz. Somando-se a isto, deve-se considerar também que os reguladores de crescimento do grupo das citocininas, podem agir como antioxidantes não enzimáticos (MÝTINOVÁ et al., 2010), o que, mais uma vez, justifica a maior produção de MDA no grupo controle (T1) em relação aos demais tratamentos, os quais todos apresentavam um regulador de crescimento representante do grupo das citocininas.

Diante do exposto e constatado, a maior produção de MDA, indicando uma possível situação de estresse oxidativo celular acentuada dos explantes cultivados no meio de cultura isento de reguladores de crescimento (T1 = grupo controle), pôde ser relacionada com a resposta morfogênica observada neste grupo controle (T1), caracterizada pela menor percentagem de explantes com formação de gemas adventícias, quando comparado com os demais tratamentos (Figura 25), corroborando o efeito benéfico de um estresse oxidativo para a indução de uma resposta morfogênica, desde que seja um estresse moderado. Apesar disso, o efeito prejudicial sobre a formação das gemas adventícias nos explantes hipocotiledonares do terço mediano do pinhão manso e, conseqüentemente, sobre a micropropagação da espécie no grupo controle (T1), não chegou a representar um efeito inibitório.

Desta forma, pode-se inferir que a menor percentagem de explantes do grupo controle com desenvolvimento de gemas adventícias, deve-se tanto ao efeito do estresse, ocasionado pela falta do regulador de crescimento, como pela própria ausência deste, considerando o papel fundamental dos reguladores de crescimento na indução de respostas morfogênicas, como formação de gemas e raízes adventícias.

Em relação à observação de variação na produção de MDA pelas procedências, ressalta-se que a 224 (São Francisco do Glória – MG) apresentou maiores índices em todos os tratamentos quando comparada com as demais procedências 101 (Rio Verde – GO) e 115 (Xambrê – PR), justificando dessa forma, a provável atividade metabólica elevada na procedência 224.

5.2.2 Quantificação de proteína em espectrofotômetro

Diferenças estatisticamente significativas foram observadas no teor de proteínas solúveis totais, entre os tratamentos e as procedências de pinhão manso (Tabela 10), sendo os resultados obtidos empregados na quantificação das atividades das enzimas CAT e APX, e também utilizados para igualarem as proporções de proteínas nos géis.

Tabela 10 - Quantificação de proteína do material micropropagado de pinhão manso (*J. curcas* L.), expresso em mg de proteína/mL

Tratamentos	Procedências		
	101 (Rio Verde-GO)	115 (Xambrê-PR)	224 (São Francisco do Glória-MG)
T1 (controle)	0,1527 Bb	0,7071 Aa	0,6650 Aa
T2 (TDZ)	0,4452 Aa	0,3649 Ba	0,4721 ABa
T3 (TDZ + AIA)	0,1242 Ba	0,1721 Ba	0,3192 BCa
T5 (BAP)	0,1462 Ba	0,1635 Ba	0,1063 Ca
T6 (BAP + AIA)	0,1901 ABa	0,3426 Ba	0,2507 BCa

Médias seguidas pela mesma letra *maiúscula nas colunas* não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas pela mesma letra *minúscula nas linhas* não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

5.2.3 Atividade da catalase (CAT) em espectrofotômetro e em PAGE não desnaturante

Os resultados da atividade da CAT em espectrofotômetro evidenciaram que a maior atividade desta enzima antioxidante está relacionada com o maior nível de estresse, ou seja, pôde-se observar que quanto maior a produção de MDA para a maioria dos tratamentos apresentados na Tabela 9, maior a tendência de atividade da CAT (Tabela 11). Fato que

evidencia a propensão do sistema celular em evitar, de alguma forma, o estresse oxidativo, mantendo a atividade da CAT superior, onde o MDA é mais elevado.

Tabela 11 - Atividade da CAT (catalase) do material micropropagado de pinhão manso (*J. curcas* L.), expressa em $\mu\text{mol}/\text{minuto}/\text{mg}$ de proteína

Tratamentos	Procedências		
	101 (Rio Verde-GO)	115 (Xambrê-PR)	224 (São Francisco do Glória-MG)
T1 (controle)	56,37 ABa	49,46 Aa	115,40 Aa
T2 (TDZ)	102,68 Aa	22,08 Ab	19,02 Ab
T3 (TDZ + AIA)	22,45 Ba	44,89 Aa	26,77 Aa
T5 (BAP)	14,60 Ba	12,60 Aa	36,49 Aa
T6 (BAP + AIA)	33,91 ABa	40,59 Aa	44,03 Aa

Médias seguidas pela mesma letra *maiúscula nas colunas* não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas pela mesma letra *minúscula nas linhas* não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

Pela análise estatística dos dados da atividade da CAT (Tabela 11) fica mais uma vez evidente que as procedências de pinhão manso, apesar de obtidas de localidades diferentes, respondem muito similarmente aos tratamentos, o que sugere uma proximidade genética muito intensa entre si.

Com relação à avaliação do padrão de expressão da CAT em PAGE não desnaturante, pôde-se notar as semelhanças com a análise quantitativa em espectrofotometria, claramente identificadas pela expressão acentuada de isoformas da enzima no grupo controle (T1), para todas as procedências de pinhão manso (Figura 32). Nos materiais vegetais pertencentes à procedência CNPAE 101(Rio Verde – GO), cinco isoformas ativas da CAT foram constatadas, sendo que apenas uma destas isoformas ativas foi verificada em todos os tratamentos (Figura 32A). A isoforma I foi visualizada no grupo controle (T1) e de forma moderadamente mais intensa no tratamento T2 (TDZ), com perda da atividade nos demais tratamentos. A isoforma II apresentou uma expressiva atividade no grupo controle (T1), bem como, no tratamento T2 (TDZ), com constatação de uma redução de atividade para os tratamentos T3 (TDZ + AIA), T5 (BAP) e T6 (BAP + AIA), sendo assim, a única isoforma ativa em todos os tratamentos. A isoforma ativa III foi constatada nos tratamentos T2 (TDZ), T3 (TDZ + AIA) e T6 (BAP + AIA), porém, para estes dois últimos, de forma bastante reduzida. Já as isoformas IV e V foram verificadas, exclusivamente, no tratamento T6 (BAP + AIA) (Figura 32A). Para a procedência CNPAE 115 (Xambrê – PR), foram constatadas quatro isoformas ativas (Figura 32B), das quais, a isoforma I esteve ativa de forma pouco

intensa apenas no grupo controle (T1), enquanto que a isoforma II esteve ativa de forma bastante intensa no grupo controle (T1) e no tratamento T6 (BAP + AIA), com uma redução da atividade no tratamento T2 (TDZ) e perda da atividade nos tratamentos T3 (TDZ + AIA) e T5 (BAP), nos quais, nenhuma isoforma ativa foi constatada para esta procedência de pinhão manso. O mesmo comportamento da isoforma II repetiu-se para a isoforma III, enquanto que, a isoforma IV apresentou atividade apenas no tratamento T6 (BAP + AIA) (Figura 32B). O maior número de isoformas ativas da CAT foi observado na procedência CNPAE 224 (São Francisco do Glória – MG) (Figura 32C). A atividade da isoforma I foi constatada de forma bastante intensa nos tratamentos T2 (TDZ) e T3 (TDZ + AIA), com reduzida atividade no grupo controle (T1) e tratamento T6 (BAP + AIA), sendo constatada perda de atividade no tratamento T5 (BAP). Já a isoforma II apresentou-se ativa apenas no grupo controle (T1), enquanto que a isoforma III apresentou atividade apenas no tratamento T6 (BAP + AIA), no qual, também foi constatada a atividade da isoforma IV. Esta também esteve ativa no grupo controle (T1), com redução da atividade nos tratamentos T2 (TDZ) e T3 (TDZ + AIA) e com perda total da atividade no tratamento T5 (BAP). As duas últimas isoformas constatadas foram as isoformas V e VI, as quais estiveram ativas, exclusivamente, no tratamento T6 (BAP + AIA) (Figura 32C).

O aspecto geral da análise da atividade da CAT em gel revelou diferenças que, possivelmente, foram dependentes dos tratamentos, visto que fatores químicos, como altas concentrações de sacarose e reguladores de crescimento, são considerados agentes estressantes e interferem no cultivo *in vitro* (CARVALHO; SILVA; CAMARA, 2009). No entanto, algumas constatações em comuns foram identificadas, como por exemplo, o fato do tratamento T5 (BAP) não ter apresentado atividade de qualquer isoforma da CAT, nem para a procedência CNPAE 115 e nem para a procedência CNPAE 224, sendo que para a procedência CNPAE 101, a atividade das isoformas no tratamento T5 (BAP) foi muito reduzida quando comparada com os demais tratamentos (Figura 32). Esta constatação, teoricamente indica um nível de estresse inexistente ou reduzido, contudo a análise quantitativa da CAT (Tabela 11), assim como a quantificação do MDA (Tabela 9), provam que o tratamento T5 induziu sim um estresse oxidativo nos explantes hipocotiledonares do terço mediano de pinhão manso, porém, de forma muito suave, o que, provavelmente, fez com que o tratamento se destacasse em relação aos demais, tendo em vista que o estresse suave tem um efeito benéfico na morfogênese ao ativar o metabolismo celular, promover a atividade fisiológica e induzir uma resposta defensiva ou adaptativa (PINTO et al., 2010), que neste caso, para o tratamento T5 (BAP), culminou com a maior formação de gemas adventícias.

Figura 32 - Atividade da enzima catalase (CAT) em PAGE não desnaturante para as três procedências de pinhão manso (*J. curcas* L.) cultivadas em meio WPM **A)** CNPAE 101 (Rio Verde – GO), **B)** CNPAE 115 (Xambrê – PR) e **C)** CNPAE 224 (São Francisco do Glória – MG). Padrão de CAT bovino (P). T1 (grupo controle) – isento de regulador de crescimento; T2 – suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ; T3 – suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA; T5 – suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP; T6 – suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA. As setas indicam as respectivas isoformas identificadas em PAGE

5.2.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD) em PAGE não desnaturante

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em PAGE não desnaturante apresentou diversas isoformas da enzima, assim como, diferenças de atividades, em relação à

redução e ausência das mesmas, contudo, uma expressiva atividade da enzima antioxidante no grupo controle (T1) foi observada para as três procedências de pinhão manso (Figura 33), corroborando mais uma vez com o nível mais acentuado de estresse oxidativo do grupo controle em relação aos demais.

Realizando a análise da origem do material vegetal, constatou-se que a procedência CNPAE 101 (Rio Verde – GO) apresentou nove isoformas ativas da enzima SOD (Figura 33A). Analisando cada uma destas isoformas, a banda referente à isoforma I, apesar de ativa no grupo controle (T1) e no tratamento T5 (BAP) de forma pouco intensa, apresentou-se inexistente nos demais tratamentos, diferentemente do que ocorreu com as isoformas II, III, IV, V, VI e IX, as quais, apesar de haver diferenças de intensidade das bandas, estiveram ativas em todos os tratamentos. Já a isoforma VII, apresentou uma baixa atividade nos tratamentos T3 (TDZ + AIA), T5 (BAP) e T6 (BAP + AIA). Enquanto que a isoforma VIII apresentou atividade nos tratamentos T5 (BAP) e T6 (BAP + AIA), sendo muito mais expressiva neste último (Figura 33A). As isoformas ativas nos materiais vegetais da procedência CNPAE 115 totalizaram em sete (Figura 33B). A atividade da isoforma I pôde ser constatada no grupo controle (T1) e no tratamento T5 (BAP), não havendo atividade nos demais tratamentos. Já as isoformas II e VII, apesar de existir uma modesta diferença de intensidade das bandas entre alguns tratamentos, apresentaram-se ativas em todos estes. A isoforma III apresentou-se ativa no grupo controle, nos tratamentos T2 (TDZ) e T3 (TDZ + AIA), ocorrendo uma gradativa redução da intensidade das bandas no sentido do grupo controle (mais intensa) para o tratamento T3 (TDZ + AIA) (menos intensa). A atividade da isoforma IV foi constatada exclusivamente no grupo controle (T1) e de forma bastante moderada. De forma similar, observou-se a atividade moderada da isoforma V, no grupo controle (T1) e no tratamento T6 (BAP + AIA), sendo constatada a atividade da isoforma VI no tratamento T6 (BAP + AIA) (Figura 33B). Por fim, a procedência CNPAE 224, apresentou nove isoformas ativas da SOD (Figura 33). Destas, as isoformas I e II foram exclusivas e respectivamente constatadas, no grupo controle (T1) e no tratamento T6 (BAP + AIA). Entretanto, as isoformas III, IV e IX foram constatadas em todos os tratamentos, diferindo entre estes, somente pela intensidade das bandas. O grupo controle (T1), juntamente com os tratamentos T3 (TDZ + AIA) e T5 (BAP), apresentaram de forma pouco intensa a atividade da isoforma V e, apesar da atividade pouco intensa, as isoformas VI e VII foram constatadas em todos os tratamentos, exceto a VI no T6 (BAP + AIA) e a VII no grupo controle (T1). Já a isoforma VIII, foi constatada apenas no tratamento T6 (BAP + AIA) (Figura 33C).

Figura 33 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em PAGE não desnaturante para as três procedências de pinhão manso (*J. curcas* L.) cultivadas em meio WPM. **A)** CNPAE 101 (Rio Verde – GO), **B)** CNPAE 115 (Xambrê – PR) e **C)** CNPAE 224 (São Francisco do Glória – MG). Padrão de SOD bovino (P). T1 (grupo controle) – isento de regulador de crescimento; T2 – suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ; T3 – suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA; T5 – suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP; T6 – suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA. As setas indicam as respectivas isoformas identificadas em PAGE.

A análise qualitativa da atividade da SOD (Figura 33) ilustra que houve a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelos explantes hipocotiledonares do terço mediano de pinhão manso, cultivados nos diferentes tratamentos para as três procedências, justificando as atividades das enzimas CAT e APX, as quais convertem o H_2O_2 em H_2O e O_2 . A presença de bandas intensas (Figura 33), indicam uma elevada atividade da SOD, que como consequência promove um aumento da taxa de H_2O_2 no tecido, o que em última análise pode provocar a morte celular programada, escurecimento e necrose tecidual (MISRA et al., 2010), caso não ocorra um equilíbrio das atividades da SOD, APX e CAT (BOWLER et al., 1991) e demais antioxidantes não enzimáticos. Neste contexto, o trabalho desenvolvido por Misra et al. (2010), objetivou controlar o escurecimento e a necrose de brotações de pinhão manso desenvolvidas *in vitro*, por meio do efeito de antioxidantes adicionados ao meio de cultura. Para tanto, avaliaram-se as atividades das enzimas antioxidantes e constataram que o grupo

controle, caracterizado pelo meio de cultura MS suplementado com BA e AIB, sem adição de qualquer antioxidante, foi o que apresentou maior atividade da SOD e subsequentemente maior conteúdo de H_2O_2 , o que poderia conduzir ao dano oxidativo, uma resposta comum a muitos estresses.

Corroborando com o que foi observado no presente trabalho sobre o estresse mais intenso resultando em uma menor formação de gemas adventícias, o trabalho de Misra et al. (2010) claramente evidenciou que o grupo que apresentou maior nível de estresse, em relação aos demais tratamentos, foi prejudicado, sendo um dos primeiros a apresentar necrose das brotações, o segundo a apresentar a menor média para o número de folhas nas brotações, o que mais induziu calo e o primeiro a obter a menor média para o número de brotações e altura das mesmas. Estes resultados vão de encontro com as observações do presente trabalho, inferindo que o estresse severo deve ser combatido, visando viabilizar a micropropagação.

5.2.5 Atividade da ascorbato peroxidase (APX) em espectrofotômetro

A quantificação da atividade da enzima antioxidante APX mostrou-se muito variável, não sendo possível estabelecer um padrão de atividade (Tabela 12). Porém, os resultados da atividade da APX foram muito superiores aos encontrados para a atividade da CAT (Tabela 11), independentemente da procedência analisada.

Tabela 12 - Atividade da APX (ascorbato peroxidase) do material micropropagado de pinhão manso (*J. curcas* L.), expressa em $\mu\text{mol}/\text{minuto}/\text{mg}$ de proteína

Tratamentos	Procedências		
	101 (Rio Verde-GO)	115 (Xambrê-PR)	224 (São Francisco do Glória-MG)
T1 (controle)	1719,25 Ba	365,01 Ba	1145,72 Ba
T2 (TDZ)	432,90 Ba	2557,72 Ba	2155,13 Ba
T3 (TDZ + AIA)	4386,99 ABa	1600,77 ABa	5945,79 ABa
T5 (BAP)	5914,61 Aa	3434,99 Aa	5244,70 Aa
T6 (BAP + AIA)	3031,47 ABa	4117,14 ABa	5101,62 ABa

Médias seguidas pela mesma letra *maiúscula nas colunas* não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas pela mesma letra *minúscula nas linhas* não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

Considerando esta superioridade de atividade da APX em relação à atividade da CAT, cabe salientar que a remoção de baixas concentrações de H_2O_2 é executada pela APX (ARORA; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002), a qual, por permitir o controle de H_2O_2 na

ordem de micromolar (μM) e em localizações mais específicas do que a CAT, pode ser responsável pelo controle dos níveis de ROS para efeitos de sinalização molecular (MITTLER, 2002). Diante desta observação, pode-se dizer que a quantidade de peróxido de hidrogênio produzido não foi elevada o suficiente para destacar a atividade da CAT, pelo contrário, foi a APX que atuou mais ativamente na conversão do H_2O_2 em H_2O e O_2 .

5.2.6 Perfil proteico em SDS-PAGE

Possivelmente, devido ao papel dos reguladores de crescimento e das ROS como fatores importantes na ativação ou inibição da expressão gênica, relacionado ainda, à diversidade dos reguladores de crescimento e à produção de ROS que se diferencia na dependência do nível do estresse oxidativo de cada tratamento, diferenças foram constatadas no perfil proteico (Figura 34).

Exemplificando as alterações constatadas, foram observados os aparecimentos de bandas em relação ao grupo controle (T1), como a banda VI, da procedência CNPAE 101(Rio Verde – GO) (Figura 34A); as bandas IV, V e VI, da procedência CNPAE 115 (Xambrê – PR) (Figura 34B); e as bandas III e IV, da procedência CNPAE 224 (São Francisco do Glória – MG) (Figura 34C). Algumas expressões proteicas chamaram a atenção pela variação de intensidade das bandas, ora mais intensas, ora menos intensas, verificadas nos diferentes tratamentos de cada procedência. Como exemplos desta constatação, têm-se as bandas I, II, III, IV, V e VII, da procedência CNPAE 101(Figura 34A); as bandas I, II e III, da procedência CNPAE 115 (Figura 34B); e as bandas I e II, da procedência CNPAE 224 (Figura 34C).

Ao realizar uma análise geral, ou seja, considerando as três procedências de pinhão manso, foi possível verificar que o perfil proteico seguiu certo padrão entre as três diferentes procedências, o que se manifestou de forma muito clara no grupo controle (T1), em que se evidenciaram duas bandas com alta intensidade, que são igualmente observadas em todas as procedências (Figura 34). Contudo, ressalva-se que para afirmar realmente este fato, análises complementares deveriam ser realizadas. Assim, pôde-se apenas destacar alguns indícios, como o exemplo acima das duas bandas que apareceram no grupo controle (T1), demonstrando que o perfil proteico apresenta certos padrões, que são visualizados nas três diferentes procedências de pinhão manso.

Figura 34 - Perfil proteico em SDS PAGE para as três procedências de pinhão manso (*J. curcas* L.) cultivadas em meio WPM. **A)** CNPAE 101 (Rio Verde – GO), **B)** CNPAE 115 (Xambrê – PR) e **C)** CNPAE 224 (São Francisco do Glória – MG). Padrão BSA (P). T1 (grupo controle) – isento de regulador de crescimento; T2 –suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de TDZ; T3 – suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de TDZ + 0,5 mg L⁻¹ de AIA; T5 – suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP; T6 – suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP + 0,5 mg L⁻¹ de AIA. As setas indicam as respectivas isoformas identificadas em PAGE. O padrão de massa molecular (P) corresponde à albumina de soro bovino (BSA). As setas representam as alterações observadas

5.3 Análise anatômica

As estruturas anatômicas referentes às folhas e raízes adventícias desenvolvidas a partir do terço mediano dos hipocótilos de pinhão manso cultivados *in vitro*, apresentaram-se similares, com as mesmas particularidades, independentemente da procedência e dos tratamentos.

As folhas evidenciaram epiderme uniestratificada, em ambas as faces (adaxial e abaxial), recobertas por cutícula delgada, e anfiestomáticas, ou seja, com estômatos presentes em ambas às faces (Figura 35). Mesofilo com simetria dorsiventral, comum à maioria das eudicotiledôneas, composto por um estrato celular adaxial de parênquima clorofiliano paliçádico e de quatro a seis estratos celulares abaxial de parênquima clorofiliano lacunoso (Figura 35). Feixe vascular colateral e fechado presente entre o parênquima paliçádico e lacunoso (Figura 35C).

Figura 35 - Fotomicrografia do corte transversal do limbo foliar de brotações *in vitro* de pinhão manso (*J. curcas* L.). **A)** Aspecto geral do mesofilo dorsiventral, **B)** Detalhe da nervura central, **C)** Detalhe das células vasculares, estrutura típica de um elemento de vaso. Legenda: Epiderme abaxial (Ep. ab.), epiderme adaxial (Ep. ad.), elemento de vaso (EV), estômato (Es), feixe vascular (FV), floema (F), parênquima lacunoso (PL), parênquima paliçádico (PP), xilema (X)

A anatomia radicular evidenciou a presença de epiderme com parede delgada e uniestratificada, igualmente à exoderme; córtex formado por células parenquimáticas, caracterizadas pela fina espessura da parede e presença de espaços intercelulares, endoderme com estrias de Cáspari e periciclo com duas camadas, cilindro vascular sólido, triarco, sendo possível somente a observação dos pólos de protoxilema (Figura 36).

Figura 36 - Fotomicrografia do corte transversal de raiz adventícia de brotações *in vitro* de pinhão manso (*J. curcas* L.). **A)** Aspecto geral, **B)** Detalhe da endoderme, periciclo e feixe vascular. Legenda: Endoderme (En), epiderme (Ep), cilindro vascular (CV), córtex (Cox), periciclo (P), pólo de protoxilema (P. px.)

5.3.1 Avaliação histoquímica

A avaliação da presença das substâncias ergásticas ocorreu tanto nos explantes hipotiledonares de pinhão manso, como nas folhas e raízes desenvolvidas a partir destes.

A única reação negativa para a presença de substância ergástica, para todos os materiais e procedências de pinhão manso, foi constatada para lípidios totais, enquanto que a reação positiva para proteínas, com exceção ao grupo controle (T1) da procedência CNPAE 115, foi evidenciada em todas as demais procedências, em todos os materiais, sendo a única substância a apresentar esta característica (Tabela 13).

Em relação ao amido, apenas o tratamento T2 (TDZ), da procedência CNPAE 101, não evidenciou esta substância para nenhum dos materiais vegetais analisados. Os demais tratamentos, das três procedências, pelo menos um dos materiais apresentaram reação positiva para amido, através de uma quantidade reduzida ou moderada (Tabela 13).

Compostos fenólicos foram constatados em quantidades elevadas apenas para a folha do tratamento T5 (BAP), da procedência CNPAE 224, enquanto que para os demais materiais das três procedências, verificou-se uma quantidade reduzida ou moderada. Somente o grupo controle (T1) da procedência CNPAE 101, não apresentou esta substância para nenhum dos materiais analisados (Tabela 13).

Os resultados permitiram inferir que os reguladores de crescimento influenciaram a produção de substâncias ergásticas e, consequentemente, a reposta morfogênica dos explantes cultivados *in vitro*. Isto foi claramente comprovado pelo trabalho de Aly et al. (2008), sobre o efeito benéfico que os reguladores de crescimento apresentaram na síntese de ácidos graxos,

resultando, em consequência, na indução de embriões somáticos em jojoba. Nos resultados do presente trabalho, apesar da possibilidade de dois fatores que poderiam interferir na produção das substâncias ergásticas, a procedência e/ou o tratamento, como já descrito em resultados anteriores, as diferentes procedências pouco interferem nas respostas, devido a baixa diversidade genética de pinhão manso presente no Brasil, portanto, restando apenas o efeito dos tratamentos, que diferem somente em relação aos reguladores de crescimento utilizados isoladamente ou em combinação.

Tabela 13 - Caracterização histoquímica do hipocótilo e das folhas e raízes quando presentes, de pinhão manso (*J. curcas* L.) cultivado *in vitro*

			Amido	Compostos Fenólicos	Proteínas Totais	Lipídios Totais
Procedência 101 – Rio Verde/GO	T1 (controle)	Hipocótilo	+	-	+++	-
		Folha	-	-	++	-
		Raiz	-	-	+	-
	T2 (TDZ)	Hipocótilo	-	+	++	-
	T3 (TDZ+AIA)	Hipocótilo	-	+	++	-
	T5 (BAP)	Hipocótilo	+	+	++	-
		Folha	+	++	+	-
	T6 (BAP+AIA)	Hipocótilo	+	+	++	-
		Folha	+	++	+	-
Procedência 115 – Xambrê/PR	T1 (controle)	Hipocótilo	+	+	+++	-
		Folha	-	+	++	-
		Raiz	-	-	-	-
	T2 (TDZ)	Hipocótilo	+	+	+++	-
	T3 (TDZ+AIA)	Hipocótilo	++	+	++	-
		Raiz	+	-	+	-
	T5 (BAP)	Hipocótilo	++	+	+	-
		Folha	+	++	+	-
	T6 (BAP+AIA)	Hipocótilo	++	-	++	-
		Folha	+	+	+	-
Procedência 224 – São Francisco do Glória/MG	T1 (controle)	Hipocótilo	+	+	++	-
		Folha	-	-	+++	-
		Raiz	+	+	+	-
	T2 (TDZ)	Hipocótilo	+	+	++	-
	T3 (TDZ+AIA)	Hipocótilo	+	+	++	-
	T5 (BAP)	Hipocótilo	+	+	++	-
		Folha	+	+++	++	-
	T6 (BAP+AIA)	Hipocótilo	+	+	+++	-
		Folha	+	++	+	-

Nota: - = ausência da substância; + = presença da substância, sendo + = quantidade reduzida; ++ = quantidade moderada; +++ = quantidade elevada

As substâncias ergásticas foram localizadas especialmente em células especializadas denominadas idioblastos, identificados dispersos pelo tecido cortical, dérmico e vascular de hipocótilos, folhas e raízes de pinhão manso (Figura 37).

Na maioria dos casos, os idioblastos se caracterizaram por uma secreção de aspecto granulado e fortemente corado pelos métodos colorimétricos utilizados, semelhante ao observado no trabalho de Martins et al. (2013), com a espécie *Secondatia densiflora* (cipó-de-leite), quando verificaram a presença de idioblastos com aspecto granulado e denso em órgãos vegetativos e florais.

Idioblastos com aspecto granulado ocorreram principalmente nas células parenquimáticas e epidérmicas de hipocótilos e folhas de pinhão manso, sendo constatados com menor frequência nos tecidos vasculares e nas raízes (Figura 37). Já os idioblastos com secreção densa, apesar de presentes, ocorreram com menor frequência (Figura 37).

Figura 37 - Caracterização histoquímica de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.): **A)** Idioblastos amilíferos com secreção densa e granular (setas) em células parenquimáticas da nervura principal de folha, **B)** Detecção de amido em idioblastos, exclusivamente, com aspecto granular (setas), em secção longitudinal do hipocótilo. **C)** Detecção de amido no cilindro vascular de raiz (setas), **D)** Detecção de idioblastos amilíferos com aspecto granular (setas) e de compostos fenólicos com secreção densa (ponta da seta), presentes em elementos de vaso do hipocótilo, **E)** Detecção de idioblastos com secreção densa e granular de compostos fenólicos na epiderme e mesofilo (setas) de folha, **F, G, H)** Detecção de compostos fenólicos (setas) em secção longitudinal do hipocótilo, **I)** Detecção de idioblastos proteicos (setas) com aspectos granulares no mesofilo foliar, **J, K)** Detecção de proteínas totais (setas) em secção longitudinal do hipocótilo, **L)** Detecção de idioblastos proteicos (setas) no córtex de raiz

O elevado conteúdo proteico encontrado nas células dos materiais de pinhão manso, independentemente da procedência e do tratamento, confirma a importância que esta molécula orgânica possui nos seres vivos. Diante das variadas funções das proteínas, como estrutural, de regulação da expressão de genes, de transporte (citocromos), contrátil e enzimática, destaca-se o papel que possuem como componentes do citoesqueleto. Formado por uma complexa rede de proteínas, incrivelmente dinâmica, o citoesqueleto participa de eventos de plasticidade, transporte e sinalização celular, somando-se a isso, colabora na determinação da morfologia da célula (BRADY; COLMAN; BROPHY, 2003). Neste contexto, considerando que os hipocótilos de pinhão manso, assim como, as raízes e folhas originadas a partir destes explantes cultivados *in vitro*, estavam em intensa atividade celular, representada pelas numerosas divisões celulares visualizadas nos cortes histológicos, e que o citoesqueleto é essencial na separação de cromossomos durante a divisão celular (MONTEIRO; KANDRATAVICIUS; LEITE, 2011), papel desempenhado graças às proteínas que o compõe, justifica totalmente a presença marcante de proteínas em todos os tecidos avaliados. Desta forma, pôde-se estabelecer uma relação entre a elevada atividade metabólica de um tecido e a presença marcante de proteínas.

Em relação aos lipídios, por se tratar de uma espécie oleaginosa, inicialmente, foi surpreendente não detectá-los nos tecidos de pinhão manso, com exceção aos de fins estruturais, que foram visualizados, como os fosfolipídios. Entretanto, considerando que os lipídios, caracteristicamente, funcionam como moléculas armazenadoras de energia, não justificaria a reserva desta substância em um estágio de atividade celular intensa, com grande gasto de energia, como tipicamente encontravam os materiais vegetais cultivados *in vitro*. Certamente, em um estágio posterior, reservas de lipídios seriam evidenciadas. Esta mesma explicação, cabe para a presença reduzida e, em alguns casos, moderada a ausente, de amido nos diferentes tecidos de pinhão manso. O amido é um polissacarídeo constituído por moléculas de glicose, que também funciona como forma de estocagem de energia nos vegetais (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001), assim, como bem salientado no caso dos lipídios, os tecidos *in vitro* de pinhão manso encontravam-se em intensa atividade metabólica, sendo reduzida a possibilidade de armazenar energia, já que a exigência por esta era elevada, mesmo considerando-se a disponibilidade de carboidratos no meio de cultura. Por isso, em alguns casos, a não constatação de amido, ou então uma presença reduzida ou moderada.

Por fim, a presença dos compostos fenólicos, oriundos do metabolismo secundário, pode representar, posteriormente, um sucesso da espécie à aclimatização, já que uma de suas funções é a proteção contra herbívoros, insetos e fungos (TAIZ; ZEIGER, 2009), causas

comuns de baixa sobrevivência de plântulas durante o processo de aclimatização. Somando-se a isso, devido ao odor, cor ou sabor, os compostos fenólicos ajudam na polinização e na dispersão de sementes, atuando como atrativos (TAIZ; ZEIGER, 2009). Já a presença destas substâncias *in vitro* e a excreção para o meio de cultura podem ocasionar a oxidação do tecido, conforme já relatado nos resultados sobre “exsudado de compostos fenólicos e oxidação dos explantes”. Por outro lado, a presença de determinados compostos fenólicos nos tecidos, pode ser extremamente útil na sinalização de processos de crescimento e desenvolvimento celular (DEL RIO et al., 2006). Desta forma, as variedades de funções que podem ser exibidas pelos compostos fenólicos, devem-se a grande diversidade química desses metabólitos secundários.

5.3.2 Avaliação histológica das respostas morfogênicas

A organogênese, a partir de explantes hipotiledonares do terço mediano de pinhão manso (*J. curcas* L.), independentemente dos tratamentos e das procedências das sementes, ocorreu de forma indireta, caracterizada pela formação de calos morfogênicos. Resultados semelhantes foram encontrados utilizando explantes foliares (FEITOSA et al., 2013), cotilédones imaturos, eixos embrionários (VARSHNEY; JOHNSON, 2010) e folhas cotiledonares maduras (SUJATHA; MUKTA, 1996; KHURANA-KAUL; KACHHWAHA; KOTHARI, 2010). Entretanto, numericamente, a organogênese direta a partir de explantes variados é a que se destaca na micropropagação da espécie *J. curcas* L. (MUKHERJEE et al., 2011).

No presente trabalho, as análises histológicas da morfogênese *in vitro* de pinhão manso evidenciaram vários centros meristemáticos, definidos por aspectos marcantes como intensa atividade mitótica, resultando em células isodiamétricas com citoplasma densamente corados (Figura 38A, B, C, D). Os centros meristemáticos evidenciaram estágios de desenvolvimento variados (Figura 38E, F, G, H), resultando na formação de raízes (Figura 38I, J, K) e gemas adventícias (Figura 38N, P). As Figuras 38L, M evidenciam a presença de sistema vascular diferenciado e certificam que o processo de regeneração correspondeu à organogênese e não à embriogênese somática, que se caracteriza pela presença de sistema vascular fechado, ou seja, sem conexão com o sistema vascular do explante, o que é claramente notável na organogênese. Aglomerados celulares isolados envoltos por uma protoderme (Figura 38P) foram visualizados nos cortes histológicos, porém, talvez por conta do estágio de desenvolvimento, não foi possível identificar a estrutura formada.

Figura 38 - Cortes histológicos avaliando as respostas morfogênicas de pinhão manso (*J. curcas* L.). **A, B, C, D)** Centros meristemáticos visualizados nos explantes hipocotiledonares do terço mediano (setas e ponta das setas), **E, F, G, H)** Estágios de desenvolvimento variados dos centros meristemáticos nos explantes hipocotiledonares do terço mediano, **I, J, K)** Desenvolvimento de raízes adventícias (setas) e formação do sistema vascular conectando o órgão com o tecido do explante (ponta das setas), **L)** Formação do sistema vascular ao longo dos explantes e das gemas adventícias (setas), **M)** Detalhe do sistema vascular (elemento de vasos) (setas), **N, O)** Desenvolvimento de gemas adventícias com primórdios foliares (setas) e meristema apical (ponta da seta), **P)** Aglomerados celulares envolvidos por protoderme desenvolvida

A avaliação histológica da morfogênese *in vitro* de pinhão manso (*J. curcas* L.) apresentada neste trabalho é uma das poucas que existe e irá contribuir significativamente para a compreensão dos processos morfogênicos da espécie. No Brasil, a única publicação sobre o estudo histológico de *J. curcas* L. é de Feitosa et al. (2013) e somando-se a esta, existem poucos outros trabalhos publicados nesta área (KALIMUTHU et al., 2007, KHURANA-KAUL; KACHHWAHA; KOTHARI, 2010; VARSHNEY; JOHNSON, 2011).

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, exclusivamente para as condições de experimento descritas, concluiu-se que:

- ✓ O uso de diferentes concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultura induziu respostas morfogênicas variadas no cultivo *in vitro* do terço mediano de hipocótilos de pinhão manso (*J. curcas* L.);
- ✓ As análises executadas evidenciaram que os diferentes resultados obtidos, deveram-se principalmente aos tratamentos e muito pouco às procedências;
- ✓ A presença dos reguladores de crescimento não foi o principal indutor do estresse oxidativo, mas sim a sua ausência;
- ✓ As alterações na atividade das enzimas antioxidantes, possivelmente, estavam associadas às respostas morfogênicas, já que estas diferiram de acordo com o grau de estresse do material *in vitro*, especialmente, em relação ao desenvolvimento de gemas adventícias, que consistiu no parâmetro mais importante visando a micropropagação da espécie;
- ✓ As avaliações histoquímica e histológica tenderam a um mesmo padrão de resposta, independente dos tratamentos e das procedências de pinhão manso;
- ✓ A análise histológica evidenciou organogênese do tipo indireta por meio da formação de gemas adventícias com conexão vascular com o explante;
- ✓ O presente trabalho evidenciou processos importantes da morfogênese vegetal, como a influência do estresse oxidativo na resposta organogênica e a possibilidade de micropropagar a espécie *Jatropha curcas* L., visto os promissores resultados obtidos;
- ✓ Considerando a complexidade e os variados fatores que interferem na cultura de tecidos, o presente projeto compreendeu apenas uma pequena parte das muitas variáveis que interferem na morfogênese *in vitro* e que devem ser estudadas, a fim de elucidar ainda mais esse processo.

REFERÊNCIAS

- ABDELGADIR, H.A.; JOHNSON, S.D.; VAN STADEN, J. Pollinator effectiveness, breeding system, and tests for inbreeding depression in the biofuel seed crop, *Jatropha curcas*. In: ROSADO, T.B.; LAVIOLA, B.G.; FARIA, D.A.; PAPPAS, M.R.; BHERING, L.L.; QUIRINO, B.; GRATTAPAGLIA, D. Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germplasm collection of the biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brazil. **Crop Science**, Madison, v. 50, p. 2372-2392, 2010. DOI 10.2135/cropsci2010.02.0112.
- ACHTEN, W.M.J.; VERCHOT, L.; FRANKEN, Y.J.; MATHIJS, E.; SINGH, V.P.; AERTS, R.; MUYS, B. *Jatropha* bio-diesel production and use. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 32, p. 1063-1084, 2008. DOI 10.1016/j.biombioe.2008.03.003
- ALABADÍ, D.; BLÁZQUEZ, M.A. Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 409-417, 2009. DOI 10.1007/s11103-008-9400-y.
- ALOUFA, M.A.I. Enraizamento *in vitro* de plantas lenhosas: dificuldades e soluções. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 3-5.
- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1331-1341, 2002.
- ALVES, H.J.; LIMA, M.B.; TRINDADE, A.V. **Mudas micropropagadas**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia40/AG01/arvore/AG01_8_41020068054.htm>. Acesso em: 29 mar. 2012.
- ALY, M.A.M.; AMER, E.A.; AL-ZAYADNEH, W.A.; ELDIN, A.E.N. Growth regulators influence the fatty acid profiles of in vitro induced jojoba somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 93, p. 107-114, 2008. DOI 10.1007/s11240-008-9348-2.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARORA, A.; SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C. Low temperature and oxidative stress. **Current Science**, Columbus, v. 82, n. 2, p. 1227-1238, 2002.

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

ASADA, K. Ascorbate peroxidase- a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, p. 235-241, 1992.

_____. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 601-639, 1999.

ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, SPI; Embrapa, CNPH, 1998. v. 1, p. 261-296.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 280-292, 1998.

BAILEY-SERRES, J.; MITTLER R. The roles of reactive oxygen species in plant cells. **Plant Physiology**, Washington, v. 141, p. 311, 2006. DOI /10.1104/pp.104.900191.

BARLIER, I.; KOWALCZYK, M.; MARCHANT, A.; LJUNG, K.; BHALERAO, R.; BENNETT, M.; SANDBERG, G.; BELLINI, C. The SUR2 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 26, p. 14819-14824, 2000.

BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 160, p. 268-282, 1937.

BASHA, S.D.; SUJATHA, M. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCARmarkers. **Euphytica**, Wageningen, n. 156, p. 375-386, 2007. DOI 10.1007/s10681-007-9387-5.

BASHA, S.D.; FRANCIS, G.; MAKAR, H.P.S.; BECKER, K.; SUJATHA, M. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science**, Limerick, n. 176, p. 812-823, 2009.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVIC, I. Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 44, p. 276-282, 1971.

BENJAMINS, R.; SCHERES, B. Auxin: the looping star in plant development. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 443-465, 2008. DOI 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103805.

BENJAMINS, R.; MALENICA, N.; LUSCHNIG, C. Regulating the regulator: the control of auxin transport. **BioEssays**, Cambridge, v. 27, n. 12, p. 1246–1255, 2005. DOI 10.1002/bies.20322.

BIOFUELS PLATFORM. **Production of biofuels in the world in 2009**. Disponível em: <<http://www.platforme-biocarburants.ch/en/infos/production.php?id=biodiesel>>. Acesso em: 07 fev. 2012.

BLAZQUEZ, S.; OLMOS, E.; HERNÁNDEZ, J. A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, N.; FERNÁNDEZ, J. A.; PIQUERAS, A. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 97, n. 1, p. 49-57, 2009. DOI 10.1007/s11240-009-9497-y.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, Oxford, v. 91, n. 1, p. 179-194, 2003.

BOWLER, C.; SLOOTEN, L.; VANDENBRANDEN, S.; DERYCKE, R.; BOTTERMAN, J.; SYBESMA, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Manganese superoxide-dismutase can reduce cellular-damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 10, p. 1723-1732, 1991.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-259, 1976.

BRADY, S.; COLMAN, D.R.; BROPHY, P. Subcellular organization of the nervous system: organelles and their functions. In SQUIRE, L.R.; BERG, D.; BLOOM, F.E.; LAC, S.D.; GHOSH, A.; SPITZER, N. C. **Fundamental neuroscience**. Oxford: Elsevier, 2003. chap. 4, p. 61-91.

- BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1189-1197.
- BRITTAINE, R.; LUTALADIO, N. Jatropha: a smallholder bioenergy crop. **Integrated Crop Management**, Rome, v. 8, p. 1-90, 2010.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymology**, Pasadena, v. 52, p. 302-310, 1978.
- CARVALHO, J.M.F.C. **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: Embrapa CNPA, 1999. 39 p.
- CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, M.M.A.; CAMARA, T.R. **Mecanismos antioxidativos associados à embriogênese somática**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009. 25 p.
- CARVALHO, J.M.F.C.; ARRIEL, N.H.C.; LIMA, I.C.; ALVES, M.M.; MILANI, M. Avaliação de meios de cultivo para pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 4.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 1., 2010, João Pessoa. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 2011-2016.
- CARY, A.; UTTAMCHANDANI, S.J.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.A.; HOWELL, S.H.H. Arabidopsis mutants with increased organ regeneration in tissue culture are more competent to respond to hormonal signals. **Planta**, Berlin, v. 213, p. 700-707, 2001. DOI 10.1007/s004250100565.
- CHAOUI, A.; MAZHOUDI, S.; GHORBAL, M.H.; EL FERJANI, E. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidants enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, Clare, v. 127, p. 139-147, 1997.
- CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Organogenesis in vitro as a developmental process. **HortScience**, Alexandria, v. 23, p. 515-519, 1988.
- CHUN, S.S.; VATEM, D.A.; LIN, Y.T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 2, p. 809-816, 2005.

COOKE, T.J.; POLI, D.B.; SZTEIN, A.E.; COHEN, J.D. Evolutionary patterns in auxin action. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 49, n. 3/4, p. 319-338, 2002. DOI 10.1023/A:1015242627321.

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

COSTA, F.H.S.; PEREIRA, J.E.S.; PEREIRA, M.A.A.; OLIVEIRA, J.P. 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, ago. 2006.

CUI, K.; XING, G.; LIU, X.; XING, G.; WANG, Y. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. **Plant Science**, Oxford, v. 146, p. 9-16, 1999.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVÁ, E.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 57, p. 779-795, 2000.

DATTA, M.M.; MUKHERJEE, P.; GHOSH, B.; JHA, T.B. In vitro clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). **Current Science**, Columbus, v. 93, p. 1438-1442, 2007.

DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M.; CORPAS, F.J.; BARROSO, J.B. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes: production, scavenging, and role in cell signalling. **Plant Physiology**, Washington, v. 141, n. 2, p. 330-335, 2006.

DEORE, A.; JOHNSON, T.S. High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel. **Plant Biotechnology Reports**, Daejeon, v. 2, n. 1, p. 7-11, 2008. DOI 10.1007/s11816-008-0042-y.

DEWIR, Y.H.; CHAKRABARTY, D.; ALI, M.B.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia milii* hyperhydric shoots. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 93-99, 2006.

DE TULLIO, M.C.; PACIOLLA, C.; DALLA VECCHIA, F.; RASCIO, N.; D'EMERICO, S.; DE GARA, L.; LISO, R.; ARRIGONI, O. Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. **Planta**, Berlin, v. 209, p. 424-434, 1999.

DIAS, L.A.S.; LEME, L.P.; LAVIOLA, B.G.; PALLINI FILHO, A.; PEREIRA, O.L.; CARVALHO, M.; ANFIO, C.E.; SANTOS, A.S.; SOUSA, L.C.A.; OLIVEIRA, T.S.; DIAS, D.C.F.S. **Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível**. Viçosa: L.A.S. Dias, 2007. v. 1, 40 p.

DRUMOND, M.A.; SANTOS, C.A.F.; OLIVEIRA, V.R.; MARTINS, J.C.; ANJOS, J.B.; EVANGELISTA, M.R.V. Desempenho agrônomo de genótipos de pinhão manso no Semiárido pernambucano. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n. 1, p. 44-47, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n1/a402cr1403.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2013.

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 Agroenergia, 2009. 27 p.

FARGIONE, J.; HILL, J.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; HAWTHORNE, P. Land clearing and the biofuel carbon debt. **Science**, Washington, v. 319, p. 1235-1238, 2008.

FEITOSA, L.S.; COSTA, A.S.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; DIBAX, R.; BOTÂNICO, M.P.; BLANK, A.F. Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 370-377, 2013.

FISHER, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, Berlin, v. 16, p. 92-96, 1968.

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M. A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasma membranes of pea leaf mesophyll cells. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 148, p. 391-398, 1996.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**, Berlin, v. 17, p. 1866-1875, 2005. DOI 10.1105/tpc.105.033589.

FRUGOLI, J.A.; ZONGH, H.H.; NUCCIO, M.L.; McCOURT, P.; McPEEK, M.A.; THOMAS, T.L.; McCLUNG, C.R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 327-336, 1996.

FRYER, M.J. The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 15, p. 381-392, 1992.

FUJITA, M.; FUJITA, Y.; NOUTOSHI, Y.; TAKAHASHI, F.; NARUSAKA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. **Current Opinion in Plant Biology**, Cambridge, p. 436-442, 2006. DOI 10.1016/j.pbi.2006.05.014

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 50, p. 151-158, 1968.

GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Evaluation of haemoglobin (erythrogen): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, p. 181-187, 2004.

GARG, P.; KHATRI, P.; GANDHI, D. Plant tissue culture of *Jatropha curcas* L.: a review. **Imperial Journal of Pharmacognosy & Natural Products**, Cincinnati, v. 1, p. 2248-9754, 2011.

GASPAR T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J.F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology: application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 37, n. 3, p. 263-285, 2002. DOI 10.1023/A:1020835304842.

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v. 2, p. 117-131.

GATTAPAGLIA, 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: Embrapa, SPI; Embrapa, CNPH, 1998. p. 183-260.

GUBITZ, G.M.; MITTELBAACH, M.; TRABI, M. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Bioresource Technology**, Essex, v. 67; p. 73-82, 1999.

GUPTA, S.; RASHOTTE, A. Down-stream components of cytokinin signaling and the role of cytokinin throughout the plant. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, n. 5, p. 801-812, 2012. DOI 10.1007/s00299-012-1233-0.

HABERLANDT, G. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. **Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften in Wien Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse**, Wien, v. 1, p. 69-91, 1902.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JÚNIOR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 7th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 125, p. 189-198, 1968.

HENRIQUES, J.A.P.; DAFRÉ, A.L.; PICADA, J.N.; MARIS, A.F.; SALVADOR, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. v. 1, p. 227-252.

HUTCHINSON, M.J.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P.K. Morphological and physiological changes during thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) hypocotyl cultures. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 157, n. 4, p. 440-446, 1996.

JHA, T.B.; MUKHERJEE, P.; DATTA, M.M. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. **Plant Biotechnology Reports**, Daejeon, v. 1, n. 3, p. 135-140, 2007. DOI 10.1007/s11816-007-0027-2.

JIMÉNEZ, A.; HERNÁNDEZ, J.A.; DEL RÍO, L.A.; SEVILLA, F. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, p. 275-284, 1997.

JIMÉNEZ, A.; HERNÁNDEZ, J.A.; PASTORI, G.; DEL RIO, L.A.; SEVILLA, F. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 118, p. 1327-1335, 1998.

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

KAEWPOO, M.; TE-CHATTO, S. Study on ploidy level of micropropagated *Jatropha curcas* L. via flow cytometry. **Journal of Agricultural Technology**, Praha, v. 6, n. 2, p. 391-400, 2010.

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

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

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

KHURANA-KAUL, V.; KACHHWAHA, S.; KOTHARI, S.L. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in the medium. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 2, p. 369-372, 2010. DOI 10.1007/s10535-010-0066-3.

KOHLI, A.; POPLUECHAI, S.; RAORANE, M.; SYERS, K.J.; O'DONNELL, A.G. *Jatropha* as a novel non-edible oilseed plant for biodiesel. In: FERRY, N.; GATEHOUSE, A.M.R. (Ed.). **Environmental impact of genetically modified novel crops**. London: CAB International, 2009. chap. 14, p. 294-322.

KONIECZNY, R.; LIBIK, M.; TULEJA, M.; NIEWIADOMSKA, M. Oxidative events during *in vitro* regeneration of sunflower. **Acta Physiologiae Plantarum**, Poznan, v. 30, p. 71-79, 2008.

KRAUS, T.E.; MCKERSIE, B.D.; FLETCHER, R.A. Paclobutrazol induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 145, n. 4, p. 570-576, 1995.

KUMAR, N.; REDDY, M.P. Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of *Jatropha curcas*: a biofuel plant. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 156, n. 3, p. 367-375, 2010. DOI 10.1111/j.1744-7348.2010.00394.x.

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

_____. In vitro regeneration from petiole explants of non-toxic *Jatropha curcas*. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 1, p. 146-151, 2011.

KUMAR, N.; VIJAY ANAND, K.G.; SUDHEER PAMIDIMARRI, D.V.N.; SARKAR, T.; REDDY, M.P.; RADHAKRISHNAN, T.; KAUL, T.; REDDY, M.K.; SOPORI, S.K. Stable genetic transformation of *Jatropha curcas* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using leaf explants. **Industrial Crops and Products**, Oxford, v. 32, p. 41-47, 2010.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAVIOLA, B.G.; BHERING, L.L.; ALBRECHT, J.C.; MARQUES, S.S.; ROSADO, T.B. Caracterização morfo-agronômica do banco de germoplasma de pinhão manso. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 3, p. 371-379, 2011.

LI, S.W.; XUE, L.; XU, S.; FENG, H.; AN, L. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **The Botanical Review**, Bronx, v. 75, n. 2, p. 230-247, 2009. DOI 10.1007/s12229-009-9029-9.

LIBIK, M.; KONIECZNY, R.; PATER, B.; SLESIAK, I.; MISZALSKI, Z. Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, p. 834-841, 2005.

LISO, R.; INNOCENTI, A.M.; BITONTI, M.B.; ARRIGONI, O. Ascorbic acid-induced progression of quiescent centre cells from G1 to S phase. **New Phytologist**, Cambridge, v. 110, p. 469-471, 1988.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society**, Carlisle, v. 30, p. 421-427, 1980.

LUDWIG-MÜLLER, J. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 32, n. 2/3, p. 219-230, 2000. DOI 10.1023/A:1010746806891.

MAHARANA, S.B.; MAHATO, V.; BEHERA, M.; MISHRA, R.; PANIGRAHI, J. In vitro regeneration from node and leaf explants of *Jatropha curcas* L. and evaluation of genetic fidelity through RAPD markers. **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, v. 11, p. 280-287, July 2012.

MARTINS, F.M.; MASCARENHAS, A.A.S.; MACEDO, T.P.; CUNHA NETO, I.L. Estruturas secretoras em órgãos vegetativos e florais de *Secondatia densiflora* A.DC. (Apocynaceae – Apocynoideae – Odontadenieae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 13-24, 2013.

MARTINS, R.; FAVARETO, A. Biodiesel de pinhão manso? In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 48., 2010, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SOBER, 2010. p. 1-16.

MILLER, G.; SCHLAUCH, K.; TAM, R.; CORTES, D.; TORRES, M.; SHULAEV, V.; DANGL, J.L.; MITTLER, R. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 2, p. 1-11, 2009. DOI 10.1126/scisignal.2000448.

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

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 490-498, 2004. DOI 10.1016/j.tplants.2004.08.009.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUSUKI, N.; MILLER, G.; TOGNETTI, V.B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 300-309, 2011. DOI 10.1016/j.tplants.2011.03.007.

MIYAKE, C.; ASADA, K. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product the monodehydroascorbate radicals in thylakoids. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 33, p. 541-553, 1992.

MOLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 561-591, 2001.

MONTEIRO, M.R.; KANDRATAVICIUS, L.; LEITE, J.P. O papel das proteínas do citoesqueleto na fisiologia celular normal e em condições patológicas. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 17-23, 2011.

MUKHERJEE, P.; VARSHNEY, A.; JOHNSON, T.S.; JHA, T.B. *Jatropha curcas*: a review on biotechnological status and challenges. **Plant Biotechnology Report**, Daejeon, v. 5, p. 197-215, 2011. DOI 10.1007/s11816-011-0175-2.

MÜLLER, A.; WEILER, E.W. IAA-synthase, an enzyme complex from *Arabidopsis thaliana* catalyzing the formation of indole-3-acetic acid from (S)-tryptophan. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 381, n. 8, p. 679-686, 2000. DOI 10.1515/BC.2000.088.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Kopenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

MÝTINOVÁ, Z.; MOTYKA, V.; HASEL, D.; GAUDINOVÁ, A.; LUBOVSKÁ, K.; WILHELMOVÁ, N. Effect of abiotic stresses on the activity of antioxidative enzymes and contents of phytohormones in wild type and AtCKX2 transgenic tobacco plants. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 3, p. 461-470, 2010.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, p. 867-880, 1981.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 249-279, 1998.

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

OBERT, B.; BENSON, E.E.; MILLAM, S.; PRETOVÁ, A.; BREMNER, D.H. Moderation of morphogenetic and oxidative stress responses in flax *in vitro* cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 162, n. 5, p. 537-547, 2005.

OLIVEIRA, A.J.; RAMALHO, J. **Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011**. 2. ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Produção e Agroenergia; Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 110 p.

OLMOS, E.; MARTÍNEZ-SOLANO, J.R.; PIQUERAS, A.; HELLÍN, E. Early steps in oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 381, p. 291-301, 2003. DOI: 10.1093/jxb/erg028.

ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 83 p.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry theoretical and applied**. Boston: Little, Brown & Company, 1968. 998 p.

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

PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, Berlin, n. 18, p. 1002-1006, 1999.

PINTO, K.S.; FERREIRA, L.T.; RIBEIRO, A.M.; CAMARA, T.R.; WILLADINOS, L.G. Avaliação do estresse *in vitro* em cana-de-açúcar: variedade rb867515. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 10., 2010, Recife. **Anais...** Recife: UFRPE, 2010. p. 12-15.

POLLMANN, S.; DÜCHTING, P.; WEILER, E.W. Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by 'IAA-synthase' proceeds via indole-3-acetamide. **Phytochemistry**, New York, v. 70, n. 4, p. 523-531, 2009. DOI 10.1016/j.phytochem.2009.01.021

PURKAYASTHA, J.; SUGLA, T.; PAUL, A.; SOLLETI, S.K.; MAZUMDAR, P.; BASU, A.; MOHOMMAD, A.; AHMED, Z.; SAHOO, L. Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 1, p. 13-20, 2010. DOI 10.1007/s10535-010-0003-5.

QIN, W.L.; YI, W-D.; SHU-LIN, P.; YING, X.U.; LIN, T.; FANG, C. Plant regeneration from epicotyl explants of *Jatropha curcas*. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, Lucknow, v. 30, p. 475-478, 2004.

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

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Tradução de J.E.Kraus. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

REIF, J.C.; MELCHINGER, A.E.; FRISCH, M. Genetical and mathematical properties of similarity and dissimilarity coefficients applied in plant breeding and seed bank management. **Crop Science**, Madison, v. 45, p. 1-7, 2005.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

ROCHA, R.B.; RAMALHO, A.R.; TEIXEIRA, A.L.; LAVIOLA, B.G.; SILVA, F.C.G.; MILITÃO, J.S.L.T. Eficiência da seleção para incremento do teor de óleo do pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 1, p. 44-50, 2012.

ROSADO, T.B.; LAVIOLA, B.G.; FARIA, D.A.; PAPPAS, M.R.; BHERING, L.L.; QUIRINO, B.; GRATTAPAGLIA, D.. Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germplasm collection of the biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brazil. **Crop Science**, Madison, v. 50, p. 2372–2392, 2010. DOI 10.2135/cropsci2010.02.0112.

RUBIO, V.; BUSTOS, R.; IRIGOYEN, M.L.; CARDONA-LÓPEZ, X.; ROJAS-TRIANA, M.; PAZ-ARES, J. Plant hormones and nutrient signaling. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 361-373, 2009. DOI 10.1007/s11103-008-9380-y.

SALÉ, N.A.C. **Oportunidades e desafios para o comércio internacional de biocombustíveis da *Jatropha curcas* (pinhão-manso) produzido em países em desenvolvimento**. 2008. 139 p. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) – Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócios, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SANKET, T. **BioForum**: biology methods forums, botany and plant biology. 2004. Disponível em: <<http://www.protocol-online.org/forums/index.php?s=1597595bec3dace7b0ae14ee14a40ae2>>. Acesso em: 09 ago. 2013.

SANTNER, A.; ESTELLE, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. **Nature**, London, v. 459, p. 1071-1078, 2009. DOI 10.1038/nature08122.

SARDANA, J.; BATRA, A.; ALI, D.J. An expeditious method for regeneration of somatic embryos in *Jatropha curcas* L. **Phytomorphology**, New Delhi, v. 50, p. 239-242, 2000.

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, p. 44-74, 2005.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, p. 7-12, 1993.

_____. Regulation and properties of plant catalases. In: FOYER, C.H.; MULIUNEUX, P.M. (Ed.). **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 275-315.

_____. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, Ribeirão Preto, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, London, v. 52, p. 591-611, 1965.

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

SILVA, L.C.; SCHUCH, M.W.; SOUZA, J.A.; ERIG, A.C.; CORRÊA, L.E. Meio nutritivo, reguladores de crescimento e frio no estabelecimento in vitro de mirtilo (*Vaccinium ashei* reade) cv. Delite. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 405-408, 2006.

SINGH, A.; REDDY, M.P.; CHIKARA, J.; SINGH, S. A simple regeneration protocol from stem explants of *Jatropha curcas* - a biodiesel plant. **Industrial Crops and Products**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 209-213, 2010. DOI 10.1016/j.indcrop.2009.10.007.

SKADSEN, R.W.; SCHULZE-LEFERT, P.; HERBST, J.M. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two catalase isozyme genes in barley. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 29, p. 1005-1014, 1995.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, n. 11, p. 118-231, 1957.

SMIRNOFF, N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. **Annals of Botany**, London, v. 78, p. 661-669, 1996.

SOARES, A.M.S.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.

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

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA JR., G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 351-355, 2007.

SPARTZ, A.K.; GRAY, W.M. Plant hormone receptors: new perceptions. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 22, n. 16, p. 2139-2148, 2008. DOI 10.1101/gad.1693208.

SUJATHA, M.; MUKTA, N. Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 44, n. 2, p. 135-141, 1996. DOI 10.1007/BF00048191.

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**, Dordrecht, v. 47, p. 83-90, 2005. DOI 10.1007/s10725-005-0859-0.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Tradução de E.R. Santarém et al. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.

THEPSAMRAN, N.; THEPSITHAR, C.; THONGPUKDEE, A. **In vitro multiple shoot induction of physic nut (*Jatropha curcas*)**. Disponível em: <http://www.scisoc.or.th/stt/32/sec_f/paper/stt32_F_F0007.pdf>. Acesso em: 06 mar. 2012.

VANDENABEELE, S.; VANDERAUWERA, S.; VUYLSTEKE, M.; ROMBAUTS, S.; LANGEBAEELS, C.; SEIDLITZ, H.K.; ZABEAU, M.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, Oxford, v. 39, p. 45-58, 2004.

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

VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, p. 129-143, 2005.

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

WILLEKENS, H.; LANGEBARTELS, C.; TIRÉ, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN CAMP, W. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Of America**, Washington, v. 91, p. 10450-10454, 1994.

WOODWARD, A.W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 5, p. 707-735, 2005. DOI 10.1093/aob/mci083.