

# **CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE PINHÃO MANSO (*JATROPHA CURCAS* L.)**

MARIANA C. **FRANCO**<sup>1</sup>; DANIELA A. **MARQUES**<sup>2</sup>; WALTER J. **SIQUEIRA**<sup>3</sup>

Nº 0900038

## **Resumo**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento *in vitro* de embriões de *J. curcas* cultivados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com sacarose a 3%; ágar a 0,7% e diferentes concentrações de água de coco (0, 60, 120, 220 mL L<sup>-1</sup>) e carvão ativado (0; 1,5; 2,5; 3,5 g L<sup>-1</sup>). Sementes de frutos secos foram descascadas, submetidas ao processo de assepsia e cortadas longitudinalmente para a extração dos embriões. Em seguida, os embriões foram inoculados nos diferentes meios de cultura e mantidos sob duas condições de luminosidade: 16 horas de luz/8 horas de escuro e escuridão completa. Sob 16 horas de luz, a combinação de 3,5 g/L de carvão ativado e 60 mL/L de água de coco promoveu maior desenvolvimento da parte aérea (comprimento de hipocótilo e epicótilo). No escuro, houve tendência de alongamento do hipocótilo e diminuição ou não desenvolvimento do epicótilo.

## **Abstract**

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* development of *J. curcas*'s embryos grown on MS medium (Murashige & Skoog, 1962) supplemented with sucrose to 3%, agar to 0.7% and different concentrations of coconut water (0, 60, 120, 220 mL L<sup>-1</sup>) and activated charcoal (0, 1.5, 2.5, 3.5 g L<sup>-1</sup>). Seeds of dried fruits were peeled, subjected to decontamination process and cut longitudinally for the extraction of embryos. Then, the embryos were inoculated in different culture media and kept under two light

1. Bolsista FUNDAG: Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Paulista, Campinas-SP, marianacrotti@ig.com.br

2. Orientador: Pesquisador, RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS/IAC, Campinas-SP

3. Colaborador: Pesquisador, RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS/IAC, Campinas-SP

condition: 16 hours light/8 hours dark and darkness complete. Under light condition, the combination of 3.5 g/L activated charcoal and 60 mL/L coconut water promoted further development of shoots (length of hypocotyl and epicotyl). Under dark condition, there was a tendency to elongation of hypocotyl and reduced or no development of the epicotyl.

## **Introdução**

O pinhão manso pertence à família Euphorbiaceae e é originária da América Central e do Sul (HELLER, 1996). Apresenta fruto capsular ovóide com diâmetro de 1,5 a 3,0 cm e trilocular, com uma semente em cada cavidade. Debaixo do invólucro da semente existe uma película branca cobrindo a amêndoa. Apresenta albúmen abundante, branco, oleaginoso, contendo o embrião provido de dois cotilédones. A semente de pinhão pesa de 0,551 a 0,797 g (ARRUDA, F.P. de. et al., 2004). Segundo PURCINO & DRUMMOND (1986), o teor médio de óleo das sementes é de 38%.

A espécie tem atraído grande interesse por sua fácil adaptação a solos semi-áridos e pela possibilidade do uso de seu óleo, de excelente qualidade, na substituição do diesel (SUJATHA et al 2005). Apesar de altamente promissora como fonte energética renovável, é uma planta ainda não domesticada e não há cultivar seguro para a expansão vigorosa dessa cultura. (MARQUES, D.A.; FRANCO, M.C.; SIQUEIRA, W.J., 2008). Por isso, atualmente, as instituições de pesquisas agropecuárias internacionais e nacionais, dentre estas o IAC, vêm depositando esforços para o desenvolvimento de cultivares que combinem: alta produtividade; porte compacto; uniformidade de maturação dos frutos; baixo teor de substâncias tóxicas no óleo e no resíduo de extração; resistência a estresses abióticos (seca, acidez do solo), estresses bióticos (pragas e doenças) e, especialmente, alto teor e qualidade do óleo. Por se tratar de planta perene, programas convencionais de melhoramento desta espécie poderão durar anos até a obtenção de uma nova cultivar. Técnicas de cultura de tecidos são bastante promissoras como auxiliar a programas de melhoramento genético de plantas perenes como o pinhão manso, principalmente na clonagem e multiplicação de materiais genéticos superiores garantindo uniformidade nos povoamentos e mantendo o ganho genético obtido na seleção (MARQUES, D.A.; FRANCO, M.C.; SIQUEIRA, W.J., 2008).

Segundo SATURNINO et al. (2005), a espécie se propaga por via seminal e vegetativa. Alta variabilidade genética com uso de sementes e baixa demanda de material vegetal com o uso de estacas são os principais fatores limitantes da expansão da cultura. Já a micropropagação *in vitro* permite a obtenção de mudas mais saudáveis e uniformes (SANTOS, et al, 2007). Sendo assim, é importante a condução de experimentos que possibilitem uma maior compreensão das condições de estabelecimento, desenvolvimento e cultivo *in vitro* de *J. curcas*. Estudos de suplementos nutricionais ou de fontes exógenas de hormônios em meios de cultura e de condições ambientais de desenvolvimento *in vitro* de embriões de *J. curcas* são essenciais para incremento da taxa de germinação dessa espécie, para estudos de resgate de embriões em híbridos interespecíficos com incompatibilidade pós-zigótica e para obtenção de plântulas com elevado potencial fisiológico e fitossanitário, as quais poderão ser utilizadas como fontes de explante assépticos para trabalhos posteriores de organogênese, embriogênese somática e transformação genética.

Este trabalho teve como objetivo verificar as condições ideais para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos, através da suplementação do meio de cultura com água de coco (0; 60; 120 e 220 mL L<sup>-1</sup>) e carvão ativado (0; 1,5; 2,5 e 3,5 g L<sup>-1</sup>) e da manutenção do material sob diferentes condições de luminosidade (16 horas de luz/8 horas de escuro e escuro total).

## **Material e Métodos**

O trabalho foi realizado no laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de P&D em Recursos Genéticos Vegetais/IAC. Frutos secos coletados de plantas selecionadas em campo de produtor foram armazenados em câmara fria à 5°C durante cinco meses. Após a retirada do tegumento, as sementes foram submetidas ao tratamento de assepsia: lavagem com detergente neutro e enxágüe em água corrente; imersão em álcool 70% (v/v) por 10 minutos e em hipoclorito de cálcio 2% (v/v) por 20 minutos, lavagem de quatro vezes em água destilada e autoclavada. Após descontaminação, os embriões foram extraídos com o auxílio de pinça e bisturi estéreis. As amêndoas foram cortadas longitudinalmente, iniciado o corte pela região oposta à micrópila visando evitar lesões nos embriões. Após a extração, os embriões foram inoculados em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de cultura MS suplementado com sacarose a 3%, ágar a 0,7% e combinação de água de coco (0; 60; 120 e 220 mL L<sup>-1</sup>)

e carvão ativado (0; 1,5; 2,5 e 3,5 g L<sup>-1</sup>) em fatorial 4x4, totalizando 16 tratamentos com três repetições cada e 3 tubos de ensaio por repetição. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes de ser autoclavado (120°C, 1,2 atm, 20'). Em cada tratamento, metade dos frascos foi mantida sob total escuro e a outra metade, sob 16 horas de fotoperíodo. Após 30 dias foram avaliados os seguintes parâmetros: comprimento de hipocótilo, comprimento de epicótilo, número e comprimento de raízes.

## **Resultados e Discussão**

A interação de carvão ativado (3,5 g/L) com água de coco (60 mL/L) (T8) promoveu maior desenvolvimento de hipocótilo (Figura 1) e epicótilo (Figura 2), sob condição de 16 horas de luz. Esta interação (T8) proporcionou também o aumento do comprimento e do número de raízes (Figura 3). Sob 16 horas de luz, verificou-se também, aumento do comprimento de raízes por plântula na concentração de 2,5 g/L de carvão ativado sem suplementação com água de coco (T3) (Figura 3).

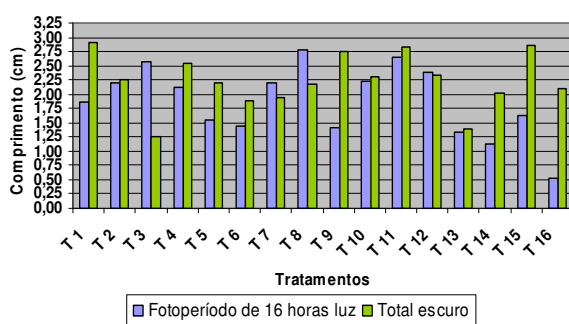
O efeito estimulatório da combinação de água de coco e carvão ativado pode ser explicado pelos elevados teores de glicose, frutose, sais minerais e hormônios vegetais fornecidos pela água de coco e necessários ao processo de formação e desenvolvimento da parte aérea das plântulas (NUNES ET al., 2008) e pela ação antioxidante; propriedade de adsorção de substâncias tóxicas liberadas pelos explantes e simulação da condição de escuro fornecida pelo carvão ativado, as quais favorecem um melhor enraizamento (GEORGE, E. F., 1996).

No escuro observa-se a tendência à diminuição ou não desenvolvimento do epicótilo (Figura 2) e ao alongamento do hipocótilo (Figura 1). O tratamento T5 (0 g/L de carvão ativado e 60 mL/L de água de coco), sob condição de escuro, foi o que mais promoveu o desenvolvimento do epicótilo (Figura 2).

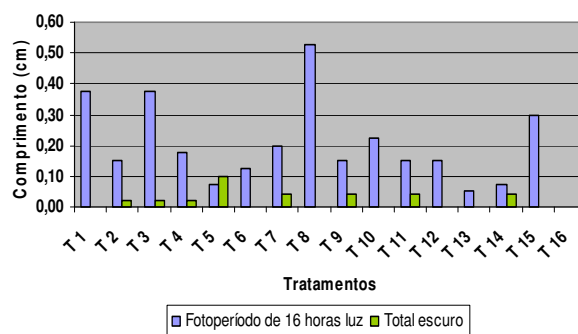
## **Conclusão**

A associação de carvão ativado e água de coco, principalmente nas concentrações de 3,5 g/L e 60 mL/L, respectivamente, proporciona melhor crescimento da parte aérea

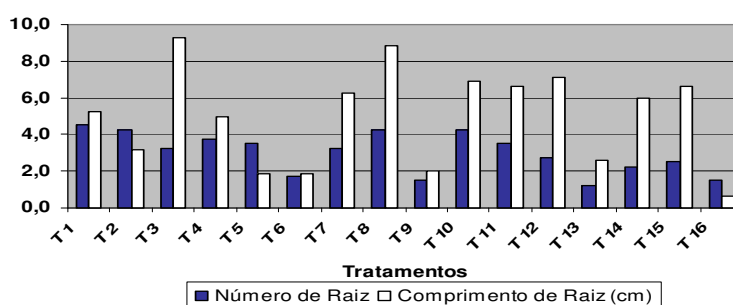
(hipocótilo e epicótilo) de embriões germinados *in vitro* e mantidos sob 16 horas de luz. Raízes das plântulas se desenvolvem bem em meio de cultura suplementado com carvão ativado, principalmente na concentração de 2,5 g/L sem suplementação de água de coco, sob 16 horas de luz. Sob escuro total observa-se o alongamento do hipocótilo em detrimento do encurtamento ou não desenvolvimento do epicótilo.



**FIGURA 1.** Efeito de água de coco e carvão ativado sobre comprimento de hipocótilo sob 16 horas de luz e total escuro: T1(0;0), T2(0;1,5), T3(0;2,5), T4(0;3,5), T5(60;0), T6(60;1,5), T7(60;2,5), T8(60;3,5), T9(120;0), T10(120;1,5), T11(120;2,5), T12(120;3,5), T13(220;0), T14(220;1,5), T15(220;2,5) e T16(220;3,5).



**FIGURA 2.** Efeito de água de coco e carvão ativado sobre comprimento de epicótilo sob 16 horas de luz e total escuro: T1(0;0), T2(0;1,5), T3(0;2,5), T4(0;3,5), T5(60;0), T6(60;1,5), T7(60;2,5), T8(60;3,5), T9(120;0), T10(120;1,5), T11(120;2,5), T12(120;3,5), T13(220;0), T14(220;1,5), T15(220;2,5) e T16(220;3,5).



**FIGURA 3.** Efeito de água de coco e carvão ativado sobre o número e comprimento de raízes sob 16 horas de luz: T1(0;0), T2(0;1,5), T3(0;2,5), T4(0;3,5), T5(60;0), T6(60;1,5), T7(60;2,5), T8(60;3,5), T9(120;0), T10(120;1,5), T11(120;2,5), T12(120;3,5), T13(220;0), T14(220;1,5), T15(220;2,5) e T16(220;3,5).

## Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da empresa Vigna Brasil.

## Referências Bibliográficas

ARRUDA, F.P. de. et al. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curca* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista brasileira de oleaginosas e fibrosas**, v.8, n.1, p.789-799, 2004.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part.2** –In Practice. 2.ed. Edington: Exegetics, 1996.1361p.

HELLER J. **Physic nut. *Jatropha curcas* L.**, 1996 IPGRI. 66 pp.

MARQUES, D.A.; FRANCO, M.C.; SIQUEIRA, W.J. Organogênese *in vitro* a partir de segmentos de hipocótilo em pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). In: **Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel**, 5, Varginha, Minas Gerais, 2008.

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

NUNES, C.F. et al. Diferentes suplementos no cultivo in vitro de embriões de pinhão-manso. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.43, n.1, p.9-14, 2008.

SANTOS, D.N. do; NUNES, C.F.; SANTOS, A.M. Efeito de diferentes concentrações do meio MS e BAP no desenvolvimento in vitro do pinhão-manso. In: **Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel**, 4, Varginha, Minas Gerais, 2007.

SATURNINO H.M.; PACHECO D.D; KAKIDA J; TOMINAGA N; GONÇALVES NP. **Cultura do pinhão-manso (*J. curcas* L.)**. Informe Agropecuário. V.26, 0. 44-78, 2005.

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

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