



## **EFEITO DE DOSES DE 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO E DE 6-BENZILAMINOPURINA NA FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE *JATROPHA CURCAS* L.**

Carlos Vinicius Sanches<sup>(1)</sup>, Enes Furlani Junior<sup>(2)</sup>, Aline Namie Suzuki<sup>(3)</sup>, Luiz Corrêa De Souza<sup>(4)</sup>, Heitor Pontes Gestal Reis<sup>(5)</sup>, Renata Capistrano Moreira Furlani<sup>(6)</sup>, Jéssica Pigatto De Queiroz Barcelos<sup>(7)</sup>.

### **RESUMO**

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta nativa da América do Sul e com ampla distribuição na América do Sul e Central, África e Ásia. A espécie é considerada promissora para a produção de biodiesel por seu elevado teor de óleo. A planta normalmente é propagada por sementes, mas também por estaquia de ramos. A micropropagação é uma técnica que permite obter de forma rápida grande quantidade de mudas a partir de um único indivíduo. O experimento foi conduzido no Laboratório de Micropropagação pertencente à Faculdade de Engenharia da UNESP, Campus de Ilha Solteira – SP. Foram utilizadas folhas jovens de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) retiradas diretamente de plantas cultivadas no campo da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da Faculdade de Engenharia da UNESP - Campus de Ilha Solteira com o objetivo de analisar os efeitos de doses de 2,4-D e BAP na formação de calos em explantes foliares. O experimento foi composto de nove tratamentos sendo eles: 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 3,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 3,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 3,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Todas as combinações dos reguladores vegetais 2,4-D e BAP foram eficientes na formação e desenvolvimento de calos em explantes foliares de pinhão-manso.

**PALAVRAS CHAVE:** Pinhão-manso, micropropagação, 2,4-D, BAP.

### **EFFECT OF DOSES OF 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID AND 6-BENZYLAMINOPURINE IN CALLUS FORMATION LEAF IN EXPLANTS OF *JATROPHA CURCAS* L.**

<sup>(1)</sup> Discente Curso de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Engenharia da UNESP/ Campus de Ilha Solteira – SP, Passeio Monção, nº 226 - CEP 15385-000 Ilha Solteira – SP e-mail: carlossanches91@gmail.com, <sup>(2)</sup> Prof. Titular Dr., Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Engenharia da UNESP / Campus de Ilha Solteira – SP, Passeio Monção, nº 226 - CEP 15385-000 Ilha Solteira - SP; <sup>(3)</sup> Discente Curso de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Engenharia da UNESP/ Campus de Ilha Solteira – SP, Passeio Monção, nº 226 - CEP 15385-000 Ilha Solteira - SP, <sup>(4)</sup> Prof. Titular Dr., Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Engenharia da UNESP / Campus de Ilha Solteira – SP, Passeio Monção, nº 226 - CEP 15385-000 Ilha Solteira - SP; <sup>(5)</sup> Discente Curso de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Engenharia da UNESP/ Campus de Ilha Solteira – SP, Passeio Monção, nº 226 - CEP 15385-000 Ilha Solteira – SP; <sup>(6)</sup> Doutorado - Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Engenharia da UNESP / Campus de Ilha Solteira / SP, Passeio Monção, nº 226 - CEP 15385-000 Ilha Solteira – SP; <sup>(7)</sup> Discente Curso de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Engenharia da UNESP/ Campus de Ilha Solteira – SP, Passeio Monção, nº 226 - CEP 15385-000 Ilha Solteira – SP.

Carlos Vinicius Sanches<sup>(1)</sup>, Enes Furlani Junior<sup>(2)</sup>, Aline Namie Suzuki<sup>(3)</sup>, Luiz Corrêa De Souza<sup>(4)</sup>, Heitor Pontes Gestal Reis<sup>(5)</sup>, Renata Capistrano Moreira Furlani<sup>(6)</sup>, Jéssica Pigatto De Queiroz Barcelos<sup>(7)</sup>.

## SUMMARY

The physic nut (*Jatropha curcas* L.) is a plant native to South America and widely distributed in South and Central America, Africa and Asia. The species is considered promising for the production of biodiesel by their high oil content. The plant is usually propagated by seeds, but also by cuttings of branches. Micropropagation is a technique that allows you to quickly lot of seedlings from a single individual. The experiment was conducted at the Laboratory of Micropropagation belonging to the Faculty of Engineering, UNESP, Ilha Solteira - SP. Campus Ilha Solteira with the purpose of analyzing the effects of doses - young leaves of physic nut (*Jatropha curcas* L.) taken directly from plants grown in the field of Finance Teaching and Research of the Faculty of Engineering, UNESP were used 2,4- D and BAP on callus formation in leaf explants. The experiment consisted of nine treatments which were: 2.5 mg L<sup>-1</sup> BAP and 0.5 mg L<sup>-1</sup> 2,4- D; 3.0 mg L<sup>-1</sup> BAP and 0.5 mg L<sup>-1</sup> 2,4- D; 3.5 mg L<sup>-1</sup> BAP and 0.5 mg L<sup>-1</sup> 2,4- D; 2.5 mg L<sup>-1</sup> BAP and 1.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4- D; 3.0 mg L<sup>-1</sup> BAP and 1.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4- D; 3.5 mg L<sup>-1</sup> BAP and 1.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4- D; 2.5 mg L<sup>-1</sup> BAP and 1.5 mg L<sup>-1</sup> 2,4- D; 3.0 mg L<sup>-1</sup> BAP and 1.5 mg L<sup>-1</sup> 2,4- D; 3.5 mg L<sup>-1</sup> BAP and 1.5 mg L<sup>-1</sup> 2,4- D. All combinations of plant growth regulators 2,4- D and BAP were efficient in the formation and development of callus on leaf explants of *Jatropha*.

**Key-words:** physic nut, micropropagation, 2,4-D, BAP.

## INTRODUÇÃO

No Brasil, devido à grande diversidade de espécies oleaginosas, pode-se produzir biodiesel a partir de diferentes óleos vegetais como soja, milho, amendoim, algodão, babaçu, pinhão-mansão e palma (FERRARI et al., 2005).

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) é uma planta nativa da América do Sul e com ampla distribuição na América do Sul e Central, África e Ásia. A espécie é considerada promissora para a produção de biodiesel por seu elevado teor de óleo (25 a 40%), superior ao da maioria das oleaginosas utilizadas no mercado de biocombustíveis (ARRUDA et al., 2004).

A utilização do pinhão-mansão, como matéria-prima para a produção de biodiesel, vem sendo amplamente discutida e avaliada, uma vez que esta é uma promissora cultura a ser implantada em áreas que não apresentem características edafoclimáticas favoráveis, favorecendo a distribuição do cultivo por todas as regiões brasileiras, permitindo a melhor execução do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel – PNPB (HEIFFIG; CÂMARA, 2006).

A planta normalmente é propagada por sementes, mas também por estaquia de ramos (SATURNINO et al., 2005). A micropropagação é uma técnica que permite obter de forma rápida grande quantidade de mudas a partir de um único indivíduo, além de possibilitar a conservação de germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade, sendo pois extremamente importante para agilizar trabalhos de melhoramento genético (ECHEVERRIGARAY et al., 2001). A multiplicação de plantas via micropropagação se baseia no potencial das células de dar origem a um novo indivíduo a partir de explantes, a chamada teoria da totipotência (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

## OBJETIVOS

Analisar os efeitos de doses de 2,4-D e BAP na formação de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Micropropagação pertencente à Faculdade de Engenharia da UNESP, Campus de Ilha Solteira – SP. Foram utilizadas folhas jovens de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) retiradas diretamente de plantas cultivadas no campo da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da Faculdade de Engenharia da UNESP - Campus de Ilha Solteira, localizada em Selvíria – MS, sem que houvesse tratamento prévio a base de fungicidas e bactericidas.

A instalação do experimento foi realizada em Agosto de 2011 e o mesmo foi composto por nove tratamentos: : 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 3,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 3,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 3,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D

As folhas foram lavadas com detergente neutro em água corrente e foram submetidas à desinfestação, dentro da câmara de fluxo laminar, nas seguintes etapas:

- 1) Lavagem com álcool 70% por cinco minutos, seguida de tríplice enxágue com água destilada e autoclavada;
- 2) Lavagem com 300 mL de solução de hipoclorito de sódio comercial (2,0 a 2,5% p/p) por quinze minutos, seguida de tríplice enxágue com água destilada e autoclavada.

Após a desinfestação, as folhas foram cortadas com o auxílio de bisturi em quadrados com cerca de 5 mm<sup>2</sup> para serem inoculados. Em todos os tratamentos foram utilizados meio MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,8 g L<sup>-1</sup> de fitagel, com pH ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem a 120 °C com 1 Kgf cm<sup>-2</sup> durante 20 minutos.

O estabelecimento foi realizado em sala de crescimento vegetal com temperatura 25 ± 1 °C, sendo mantidas sempre no escuro nos primeiros 5 dias após a inoculação. Os explantes foram avaliados 25 dias após a inoculação, sendo considerado o número de explantes vivos com calos como variável, cujo valor foi expresso em porcentagem. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com nove tratamentos, quatro repetições e cinco tubos por repetição. Os dados foram analisados no programa estatístico SISVAR, com as médias comparadas através do teste de Tukey a 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença significativa entre as interações do fito-hormônios 2,4-D e com BAP para qualquer uma das variáveis analisadas, tendo formação de calo em todos os tratamentos (tabela 1).

Os tratamentos T2 e T3 foram os que apresentaram menores taxas de desenvolvimento de calos, ambos com 90%. Os demais tratamentos apresentaram taxas acima de 95% (tabela 3). Menezes et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes em trabalhos realizados com pinhão-manso com diferentes

combinações de 2,4-D e BAP e relatam que, para a variável formação de calo, os melhores resultados foram obtidos com 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP combinados com 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D.

**Tabela 1.** Porcentagem de explantes foliares de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) tratados com BAP e 2,4-D com a presença de calos, vivos e com fungos, aos 28 dias após a inoculação.

Tratamentos	Explantes (%)		
	Vivos	Calo	Fungos
T1) 2,5 mg L <sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D	95	95	0
T2) 3,0 mg L <sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D	90	90	5
T3) 3,5 mg L <sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D	90	90	0
T4) 2,5 mg L <sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D	100	100	5
T5) 3,0 mg L <sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D	100	100	0
T6) 3,5 mg L <sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D	100	100	0
T7) 2,5 mg L <sup>-1</sup> de BAP + 1,5 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D	100	100	0
T8) 3,0 mg L <sup>-1</sup> de BAP + 1,5 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D	100	100	0
T9) 3,5 mg L <sup>-1</sup> de BAP + 1,5 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D	100	95	0

Santos et al. (2009), em experimento com diferentes balanços entre citocinina e auxinas, verificou que os calos cultivados com 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D tiveram desenvolvimento estrutural mais adequado. Resultado semelhante pode ser observado no trabalho realizado por Machado e Coelho (2010), no qual o meio MS suplementado com 1,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, apresentou melhores resultados para a indução de calos friáveis de pinhão manso. Para Feitosa et al. (2009) os melhores resultados para formação de calos em explantes foliares de pinhão-manso foram observados quando houve a interação entre 3,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 4,0 mg L<sup>-1</sup> da citocinina cinetina.

A tabela de análise de variância para explantes foliares de pinhão manso vivos e com calos (tabela 2) mostra que o valor de F (1,446) não foi significativo, pois P<0,223, isto indica que não houve diferença significativa entre os tratamentos para a variável avaliada.

**Tabela 2.** Tabela de análise de variância para desenvolvimento de calos em explantes foliares vivos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), aos 28 dias após a inoculação.

Fonte de Variação	p > F
Tratamento	0,223 ns
CV (%)	7,450

A influência da auxina no desenvolvimento de calos embrionários, via embriogênese somática, é notória tanto nos estudos básicos descritos por Murashige e Skoog (1962), quanto nos mais contemporâneos descritos por Torres et al., (1998), O'Connor-Sánchez et al. (2002), Carneiro et al. (2004), Coelho et al. (2005).

As citocininas são utilizadas para quebrar a dominância apical dos brotos, e aumentar a taxa de multiplicação. Entre as mais utilizadas, está a 6-benzilaminopurina (BAP). Oliveira et al. (2004) em experimento realizados com *Vigna unguiculata* L. observaram que a combinação de BAP e 2,4-D é eficiente na formação de calo.

A tabela de análise de variância para explantes foliares de pinhão-mansos vivos (tabela 3) mostra que o valor de F (1,909) não foi significativo, pois  $P < 0,100$ , isto indica que não houve diferença significativa entre os tratamentos para a variável avaliada.

**Tabela 3.** Tabela de análise de variância para explantes foliares vivos de pinhão-mansos (*Jatropha curcas* L.), aos 28 dias após a inoculação.

Fonte de Variação	p > F
Tratamento	0,100ns
CV (%)	6,570

As pequenas diferenças entre um tratamento e outro se deram por morte do explante por contaminação causada por fungos, já que as plantas são retiradas diretamente do campo, e não de uma casa de vegetação onde há maior controle da sanidade da planta matriz. Não houve contaminação bacteriana neste experimento.

**Tabela 4.** Tabela de análise de variância para explantes foliares de pinhão-mansos (*Jatropha curcas* L.) contaminados, aos 28 dias após a inoculação.

Fonte de Variação	p > F
Tratamento	0,549
CV (%)	424,260

Na tabela 4, a análise de variância para explantes foliares de pinhão-mansos contaminados, mostra que o valor de F (0,875) não foi significativo, pois  $P < 0,549$ , isto indica que não houve diferença significativa entre os tratamentos para a variável avaliada. Diversos autores recomendam o tratamento fitossanitário das matrizes, bem como a criação de um banco de matrizes em viveiros ou casa de vegetação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; LEIFERT; CASSELS, 1991).

### CONCLUSÕES

Todas as combinações dos reguladores vegetais 2,4-D e BAP foram eficientes na formação e desenvolvimento de calos em explantes foliares de pinhão-mansos.

Como todas as doses não diferiram estatisticamente entre si, é recomendável que se utilize a menor combinação delas, 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D combinado com 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, pois reduz o custo de implantação da cultura *in vitro*.

### LITERATURA CITADA

ARRUDA, F. P. et al. Cultivo de pinhão-mansos (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 789-799, 2004.

CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. Transformação genética de milho utilizando o bombardeamento de partículas. **Embrapa Milho e Sorgo**, 2004. 32, 44 p.

COELHO, G. T. C. P.; RESENDE, R. K. S.; TORGA, P. P.; PETRILLO, C. P.; CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; PINHO, R. G. V.; PAIVA, R.; PAIVA, L. V.

Embriogênese Somática de Linhagens Tropicais de Milho (*Zea Mays*) em Diferentes Concentrações de 2,4D. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 600, 2005.

FEITOSA, L. S. et al. Influência de diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e cinetina na indução de calos em explantes foliares de pinhão-manso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 17.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS; 4., 2009, Aracaju. **Anais...** Aracaju: [s.n.], 2009.

FERRARI, R.A.; OLIVERIA, V.S.; SCABIO, O.A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 19-23, 2005.

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

HEIFFIG, L. S.; CÂMARA, G. M. S. Potencial da cultura do pinhão-manso como fonte de matéria-prima para o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel. In: CÂMARA, G. M. S.; HEIFFIG, L. S. (Coords.) **Agronegócio de plantas oleaginosas: matérias-primas para biodiesel**. Piracicaba: ESALQ/USP/LPV, p. 105 – 12, 2006.

LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WRIGHT, S. M.; WAITES, B.; CHEYNE, V. A.; WAITES, W. M. Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Choisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.71, n.4, p.307-330, 1991.

MACHADO, W.; COELHO, G. T. C. P. Formação de calos embriogênicos friáveis em pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 4 e SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 1, 2010, João Pessoa. **Inclusão Social e Energia. Anais...** Campina grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 265-269.

MENEZES, T. S. A. et al. Influência de diferentes concentrações de BAP e AIA na micropropagação de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 17.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS; 4., 2009, Aracaju. **Anais...** Aracaju: [s.n.], 2009.

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

O'CONNOR-SÁNCHEZ, A.; CABRERA-PONCE, J. L.; VALDEZ-MELARA, M.; TÉLLEZ-RODRÍGUEZ, P.; PONS-HERNÁNDEZ, J. L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Transgenic maize plants of tropical and subtropical genotypes obtained from calluses containing organogenic and embryogenic-like structures derived from shoot tips. **Plant Cell Reporters**, New York, v. 21, n. 4, p. 302-312, Nov. 2002.

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F P.; SILVA, F. O. X. **Produção de mudas de amora-preta por meio de cultura de tecidos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 23p. (Sistemas de Produção, 6).

SANTOS, D. N. et al. Estabelecimento de explantes foliares de pinhão-manso em resposta a diferentes balanços entre citocininas e auxinas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 17.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS; 4., 2009, Aracaju. **Anais...** Aracaju: [s.n.], 2009.

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

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998. v. 1, p. 509