

INDUÇÃO E ANÁLISE HISTOLÓGICA DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae)

INDUCTION AND HISTOLOGICAL ANALYSIS OF CALLUS LEAF EXPLANTS OF *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae)

Luely Santos FEITOSA¹; Andréa Santos da COSTA²; Maria de Fátima ARRIGONI-BLANK³; Roberson DIBAX⁴; Marli Pereira BOTÂNICO⁴. Arie Fitzgerald BLANK⁵

1. Mestranda em Agroecossistema, Universidade Federal de Sergipe – UFS, São Cristóvão, SE, Brasil. luelyfeitosa@yahoo.com.br; 2. Doutoranda em Biotecnologia – RENORBIO - UFS, São Cristóvão, SE, Brasil; 3. Professora Doutora, Departamento de Engenharia Agrônômica - UFS, São Cristóvão, SE, Brasil; 4. Pesquisador da FAPITEC- DCR, São Cristóvão, SE, Brasil; 5. Pesquisadora da FAPITEC-DCR, São Cristóvão, SE, Brasil; 5. Professor Doutor. do Departamento de Engenharia Agrônômica - UFS, São Cristóvão, SE, Brasil

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de BAP e AIB sobre a formação de calos a partir de explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (acesso JCUFS-012), descrever a curva de crescimento e realizar análise histológica dos calos. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x4, com cinco concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹) e quatro de AIB (0,0; 0,5; 0,75 e 1,0 mg.L⁻¹). Durante o experimento, a curva de crescimento dos calos foi acompanhada e mensurada aos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 dias de cultivo. A análise histológica foi realizada a partir de calos crescidos em meio MS acrescido de 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 0,5 mg.L⁻¹ de AIB, após 60 dias de cultivo. A interação dos reguladores de crescimento BAP e AIB proporcionou a formação de calos compactos e posterior regeneração de brotações. Um maior número médio (6,2) de brotos por calo foi observado quando se adicionou ao meio de cultivo 1,65 mg.L⁻¹ de BAP. A curva de crescimento de calos apresentou cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, estacionária e desaceleração. Na análise histológica dos calos de *J. curcas* fica evidenciado a organogênese indireta pela formação de brotos adventícios, que apresentam conexão cambial com os tecidos dos calos.

PALAVRAS-CHAVE: Pinhão-manso. Regulador de crescimento. Calogênese.

INTRODUÇÃO

O gênero *Jatropha* consiste de aproximadamente 170 espécies, incluindo *J. curcas* L. (pinhão-manso), que se destaca por seu elevado potencial para a produção de óleo biocombustível. O pinhão-manso é uma planta oleaginosa, perene, pertencente à família Euforbiácea, ocorrendo praticamente em todas as regiões, desde o Nordeste até São Paulo e Paraná, de forma dispersa, adaptando-se as mais variadas condições edafoclimáticas (SEVERINO; LIMA; BELTRÃO, 2005; BELTRÃO, 2005).

Esta espécie ainda não está totalmente domesticada e a ocorrência de problemas relacionados à sua propagação por via seminal e vegetal tem sido frequente. Alguns fatores tem sido limitantes na expansão desta espécie como, plantio desuniforme através de mudas propagadas por sementes, perda do poder germinativo após alguns meses de armazenamento e a baixa demanda de estacas (SEVERINO et al., 2006; NUNES et al., 2008). A cultura de tecidos pode ser uma ferramenta para auxiliar na resolução desse problema.

A organogênese, uma das vias de regeneração de plantas *in vitro*, ocorre com a formação de gemas adventícias e pode ser indireta ou direta, dependendo da formação ou não de calos, respectivamente. O sucesso da regeneração *in vitro* depende de vários fatores, onde os reguladores de crescimento se destacam como os principais controladores da morfogênese.

Os principais reguladores de crescimento utilizados na organogênese são citocininas e auxinas (PERES, 2002). O efeito fisiológico de cada regulador depende da sua concentração no meio, sendo que cada parte da planta tem uma resposta diferente, às alterações das concentrações de auxinas e citocininas (POZO et al., 2005).

Para a definição de um sistema de regeneração via organogênese direta ou indireta é necessário o estabelecimento de protocolos otimizados para cada espécie devido às características genéticas que determinam respostas diferentes em cada cultura (CARVALHO et al., 2006). A formação de calos a partir dos explantes é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por

organogênese ou embriogênese somática indireta (VENTURIERI; VENTURIERI, 2004).

Entre os trabalhos relacionados à propagação *in vitro* de *Jatropha curca* L, pode-se citar Sujatha et al. (2005), obtiveram regeneração de brotos em explantes foliares em meio MS suplementado com 1,0–2,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) + 1,0 mg.L⁻¹ de ácido indolil butírico (AIB). Já Sujatha e Mukta (1996) testaram a regeneração de *Jatropha curcas* L. através de vários explantes em diferentes combinações de reguladores de crescimento, independente do tipo de explante a maior regeneração aconteceu em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com AIB na faixa de 0,5 mg.L⁻¹ a 1,0 mg.L⁻¹. Em explantes apicais desta espécie 2,0 mg.L⁻¹ BAP e 0,5mg.L⁻¹ de ácido indolil acético (AIA) promoveu o desenvolvimento dos mesmos (RAJORE; BATRA, 2005).

Estudos histológicos vêm sendo desenvolvidos em diversas espécies com o objetivo de caracterizar o processo e as vias de regeneração de plantas *in vitro* (ALVES; XAVIER; OTONI, 2004; DIBAX et al., 2010).

O estabelecimento da curva de crescimento de calos de uma determinada espécie é importante, pois identifica as distintas fases de crescimento do calo, podendo-se presumir assim o momento adequado de repicagem dos explantes potencializando sua morfogênese (SOARES, 2003).

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de BAP e AIB na formação de calos a partir de explantes foliares de *Jatropha curcas* L., determinar a curva de crescimento e realizar análise histológica dos calos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal do Departamento de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Sergipe (UFS) e a análise histológica foi realizada nos Laboratórios de Anatomia Vegetal da UFS e de Botânica da UFPR.

A fonte de explante utilizada foi o segmento foliar de folhas jovens (terceira folha no sentido ápice para base, com uma média de 9,4 cm de largura e 10,0 cm de comprimento) retirado de plantas matrizes da casa de vegetação, proveniente do acesso JCUFS-012 do Banco Ativo de Germoplasma de pinhão-manso, localizado na Fazenda Experimental "Campus Rural da UFS", São Cristóvão - SE. Estas plantas foram cultivadas em vasos contendo solo, areia e esterco na proporção de

1:1:1 (v/v/v) e pulverizadas com o fungicida Cercobin® (5%) dois dias antes da inoculação dos explantes.

Antes da inoculação, os segmentos foliares foram submetidos ao processo de desinfestação, em duas etapas. A primeira a compreendeu a imersão dos segmentos foliares em água corrente por trinta minutos. A segunda etapa ocorreu em câmara de fluxo laminar, na qual os segmentos foliares foram imersos em álcool etílico 70% por um minuto e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por cinco minutos sob agitação e lavados três vezes em água destilada e autoclavada. Estes foram seccionados em 1 cm² e inoculados em frascos de 250 ml, contendo 25 ml de meio de cultura MS. Após a inoculação os frascos foram acondicionados em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas de luz, temperatura de 25±2°C e intensidade luminosa de 60 mol.m⁻².s⁻¹ provenientes de luz fluorescente branca fria.

Os sais do MS foram utilizados e o meio adicionado de 30 g. L⁻¹ de sacarose e, 7 g. L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado a 5,8±0,1 e a esterilização realizada em autoclave a 121°C por 15 minutos a 1,05 atm.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x4, sendo cinco concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 mg. L⁻¹) e quatro de AIB (0,0; 0,5; 0,75 e 1,0 mg. L⁻¹) com quatro repetições, cada repetição constituída de quatro frascos contendo dois explantes cada.

Após 60 dias avaliou-se as variáveis: porcentagem de formação de calos (%) e número de brotos por calo. Os dados em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de (X/100). As médias foram submetidas à análise de variância pelo teste F e quando significativas a regressão polinomial foi aplicada.

Curva de crescimento de calos

Para a determinação da curva de crescimento de calos, explantes foliares com aproximadamente 1 cm² foram inoculados em meio MS acrescido com 1,0 mg.L⁻¹ BAP e 0,5 mg.L⁻¹ AIB. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob as mesmas condições do experimento anterior.

Estabeleceu-se a curva de crescimento dos calos através da determinação da matéria fresca (g) de cinco calos a partir do dia da inoculação (tempo 0), em intervalos de cinco dias durante 60 dias. O delineamento foi o inteiramente casualizado com 13 tratamentos, constituídos pelos intervalos de avaliação (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55,

60 dias). A curva foi plotada a partir da média de cinco repetições (calos) em cada tempo de determinação do peso de massa fresca.

Análise Histológica

Para a análise histológica do calo, utilizaram-se calos com 60 dias de cultivo em meio MS acrescido com 1,0 mg.L⁻¹ BAP e 0,5 mg.L⁻¹ AIB. Os calos foram fixados em FAA 50 (JOHANSEN, 1940) por 48 horas e transferidos para etanol 70%. O processamento das amostras foi realizado mediante a desidratação em série alcoólico-etílica e infiltradas em metacrilatoglicol (historresina Leica). As amostras foram seccionadas no sentido transversal na espessura de 5 µm com o auxílio de um micrótomo de rotação (LEICA RM2125) e coradas com azul de toluidina 0,05%, em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8) (O' BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964).

As lâminas permanentes foram montadas com resina sintética (Entelan®). As análises microscópicas e os registros fotomicrográficos foram realizados em microscópio da marca ZEISS

Axiolab®, com câmara digital fotográfica Sony Cyber-shot P200® acoplada. A captura das imagens foi realizada com o auxílio do software (IMAGE PROPLUS) e as escalas foram projetadas nas mesmas condições ópticas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa entre os reguladores de crescimento BAP e AIB para as variáveis analisadas. Todos os tratamentos com BAP e AIB formaram calos compactos, os quais variaram em tamanho de acordo com as combinações de suas concentrações. Verificou-se uma maior formação de calos com pontos de máxima de 1,9 mg.L⁻¹ e 1,87 de BAP com 0,79 e 0,72 mg.L⁻¹ de AIB e taxas de 99,28% e 99,82% de formação de calo respectivamente, representados por equações quadrática e cúbica (Tabela 1). Tanto na ausência do AIB e quanto do BAP notou-se pouca formação de calo, sugerindo que a interação dos reguladores proporcionou uma maior formação de calo.

Tabela 1. Porcentagem de formação de calo (%) em função da interação das concentrações de BAP e AIB.

BAP (mg.L ⁻¹)	AIB (mg.L ⁻¹)				Equação (Y)
	0,0	0,5	0,75	1,0	
0,0	0,0	3,1	0,0	0,0	ns
0,5	12,5	100,0	100,0	93,7	13,12+253,75x-175,00x ² R ² = 99,22
1,0	40,6	100,0	87,5	100,0	42,07+143,35x-89,77x ² R ² = 90,34
2,0	34,4	100,0	90,6	93,7	35,48+176,53x-121,59x ² R ² = 95,15
3,0	15,6	93,7	93,7	93,7	16,33+217,33x-142,04x ² R ² = 98,79
Equação (Y)	-1,54+ 48,67x- 14,43x ² R ² = 88,72	7,73+215,79x- 133,40x ² +23,7 1x ³ R ² = 93,80	6,07+210,91x- 136,66x ² - 25,41x ³ R ² = 88,76	19,97+102,1 3x-26,84x ² R ² = 73,94	
CV (%)	22,27				

Com relação ao número de brotações, verificou-se um incremento na multiplicação das brotações com ponto de máxima de 1,65 mg.L⁻¹ BAP (6,2 brotações por explante), representado por equação quadrática, quando os explantes foram cultivados em na ausência de AIB (Tabela 2). Observou-se ainda que no meio com 1,61 mg.L⁻¹ BAP + 0,55 mg.L⁻¹ AIB, obteve 6,9 brotações por explante, a regressão foi representada por equações quadrática e cúbica (Figura 1). Entretanto, verificou-

se uma tendência linear negativa quando explantes foram cultivados em meio com 3,0 mg.L⁻¹ BAP em todas as concentrações de AIB.

A suplementação do meio de cultura com a citocinina BAP foi essencial para o desenvolvimento de brotações neste trabalho. Na ausência de BAP, os calos não exibiram qualquer crescimento de brotos. Confirmando que o BAP está relacionado a formação e multiplicação de parte aérea e indução de gemas adventícias

(GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998). Resultados similares foram obtidos com inhame (*dioscorea alata*) onde a adição de 2 mg. L⁻¹ de BAP

promoveu a emissão de múltiplos brotos (SOUZA, 2002).

Tabela 2. Número de brotos por calo em função da interação das concentrações de BAP e AIB.

BAP mg.L ⁻¹	AIB mg.L ⁻¹				Equação (Y)
	0,0	0,5	0,75	1,0	
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ns
0,5	0,0	4,1	0,2	0,5	0,001+48,74x- 113,44x ² + 65,20x ³ R ² = 100
1,0	3,9	6,3	1,1	1,9	3,87+52,11x- 135,14x ² +81,03x ³ R ² = 100
2,0	8,4	6,1	3,6	3,7	8,47- 6,84x+1,84x ² R ² = 93,82
3,0	0,0	2,3	4,6	5,4	-0,084+5,62x R ² = 97,53
Equação (Y)	-1,79+9,66x- 2,92x ² R ² = 69,36	0,328+8,18x- 2,53x ² R ² = 97,74	- 0,302+1,75x- 0,02x ² R ² = 96,66	-0,17+1,99x- 0,04x ² R ² = 99,25	
CV (%)					38,88



Figura 1. Calo com brotações de *J. curcas* em meio MS suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 0,5 mg.L⁻¹ AIB.

Análise da curva de crescimento de calo

Houve diferença estatística entre os períodos de tempo em que os calos permaneceram em cultivo. Na curva de crescimento de calo de *J. curcas*, foram identificadas cinco fases: lag, exponencial, linear, estacionária e desaceleração (Figura 2).

O comportamento da curva de calos se dar em função da espécie em estudo e do explante

utilizado. Para cafeeiro não foram identificadas as cinco fases, somente três; lag, exponencial e linear, devido à baixa velocidade de crescimento de calos que essa espécie apresenta (SANTOS et al., 2003).

A curva de crescimento de calos inicia-se com a fase lag, período em que as células do explante se preparam para a divisão celular e produção de energia. Esta fase permaneceu de 0 a 15 dias, apresentou uma média de 0,213±0,0327g de

massa fresca. Esse resultado é semelhante aos obtidos com sangra d'água (*Cróton urucurana*

Baill.), (LIMA et al., 2007) e murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*) (NOGUEIRA et al., 2008).

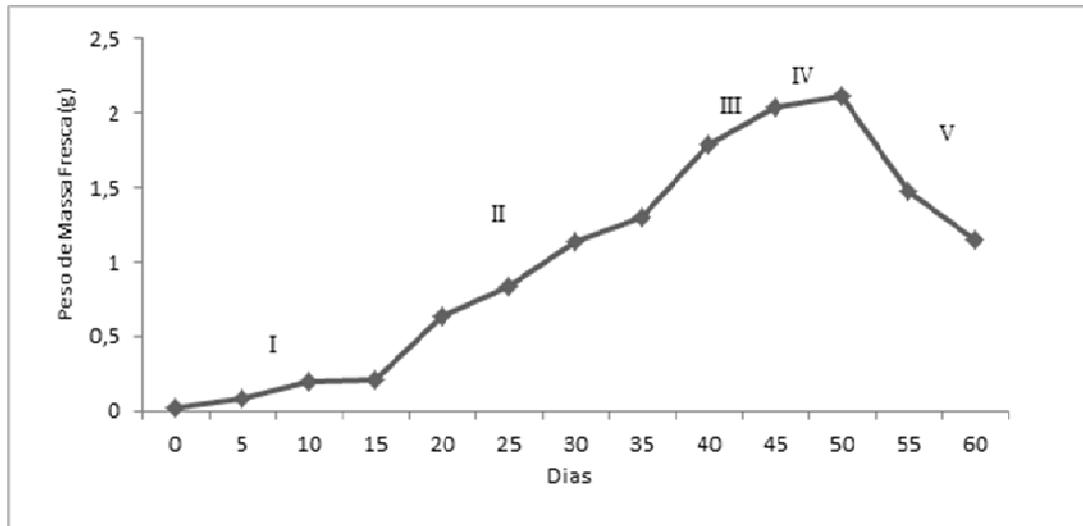


Figura 2. Curva de crescimento de calos formados a partir de segmento foliar de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) inoculados em meio MS suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 0,5 mg.L⁻¹ AIB. I- fase de crescimento lag, II- fase exponencial, III- fase linear, IV- fase estacionária, V- fase de desaceleração.

A fase exponencial, na qual se tem intensa divisão celular, foi verificada de 15 a dias com uma média de 1,295 ± 0,2761g de massa fresca. Em café (*Coffea canéfhora* L. cv. Apoatã) esta fase foi observada entre 28 a 63 dias (SANTOS et al., 2008). Já em murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) esta fase ocorreu entre 20 a 40 dias de cultivo (NOGUEIRA et al., 2008).

O período da fase linear, no qual os calos diminuem a divisão celular e aumentam a área celular, foi observado entre 40 a 45 dias após a inoculação apresentando valores médios de 2,038±0,4050g de massa fresca. Já em *Coffea canéfhora* L. cv. Apoatã esta fase ocorreu no período 63 a 70 dias (SANTOS et al., 2008).

A fase estacionária foi de 45 a 50 dias. Nesta fase provavelmente ocorre uma redução na divisão celular, no final desta deve-se iniciar o processo de repicagem. Em *Cróton urucurana* Baill observou-se entre 98 a 105 dias (LIMA et al., 2007). A fase de desaceleração ocorreu a partir de 50 dias. Em castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) de 60 a 67 dias (SERRA; PAIVA; PAIVA, 2000), murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss) de 60 a 80 dias (NOGUEIRA et al., 2008).

Análise histológica dos calos

As secções histológicas dos explantes mostraram a calogênese originada a partir das células do parênquima paliádico nos quais se

observa o formato clássico de um meristema, por sua dimensão e disposição das células, evidenciando características citológicas de células meristemáticas pela intensa atividade mitótica e devido à presença dos planos de divisão característicos, evidenciando o desenvolvimento de brotos (Figura 3. a). Resultados semelhantes foram obtidos por Dibax et al. (2010), em explantes de folhas cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*, onde ocorreu a formação de calogênese em regiões periféricas do tecido parenquimático, na posição subepidérmica, da face adaxial do explante.

Em *Jatropha curcas* L. houve a formação de três ápices caulinares, em diferentes estágios de desenvolvimento no calo (Figura 3 a). O aspecto geral dos ápices caulinares e dos primórdios foliares, bem como do sistema vascular diferenciado é observado na figura 3 c. Em detalhe na figura (3 d) observa-se no ápice caulinar a presença da protoderme, a de drusas no meristema fundamental e de elementos vasculares diferenciados que fazem conexão com o caule. Este estudo corrobora com os estudos realizados por Dibax et al. (2010) e Alves et al. (2004) em explantes de folhas para diferentes espécies, nas quais os autores conseguiram resultados positivos para obtenção da organogênese indireta, sendo o mesmo tecido avaliado neste trabalho, o mesofilo.

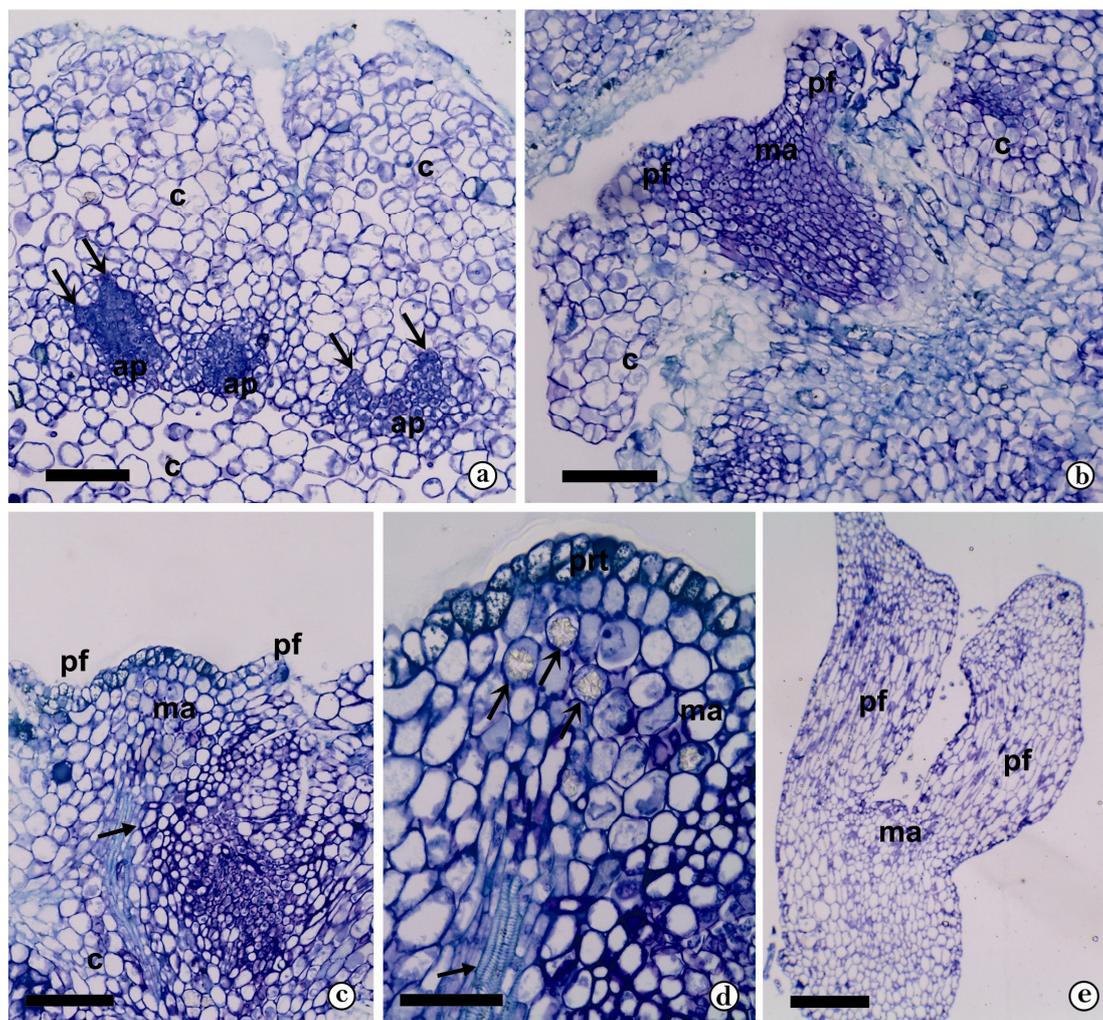


Figura 3. a-e. Seções histológicas de calos procedentes de explantes foliares de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), cultivados *in vitro* após 60 dias de cultivo. a) Calo com três ápices caulinares em diferentes estágios de desenvolvimento. b) Ápice caulinar e primórdios foliares em evidência. c) Ápice caulinar note-se elementos vasculares diferenciados, fazendo conexão com o calo. d) Detalhe do ápice caulinar evidenciando a protoderme e drusas (setas); detalhe dos elementos vasculares diferenciados (seta). e) Ápice caulinar desenvolvido e independente do calo. Barras: 50 μ m (d), 100 μ m (a, b, c), 300 μ m (e). ap: ápice caulinar; c: córtex; ma: meristema apical; pf: primórdio foliar.

CONCLUSÕES

Os reguladores de crescimento BAP e AIB podem ser usados para a formação de calos e regeneração de brotos adventícios de *J. curcas*.

Através da análise histológica em calos de *J. curcas* L. fica evidenciado a organogênese indireta pela formação de brotos adventícios, apresentando conexão cambial com os tecidos dos calos.

AGRADECIMENTOS

A UFS – Universidade Federal de Sergipe; ao NEREN – Núcleo de pós-graduação e estudos em recursos naturais, pelo espaço concedido. A CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Ensino Superior, pela concessão de bolsa de estudo à autora principal. Ao Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the effect of IBA and BAP on callus formation from leaf explants of *Jatropha curcas* L. (accession JCUFS-012), describing the growth curve and histological analysis of the callus.

The experimental design was completely randomized in a 5x4 factorial design with five concentrations of BAP (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 and 3.0 mg. L⁻¹) and four of IBA (0.0, 0.5, 0.75 and 1.0 mg.L⁻¹). During the experiment, the growth curve of the calli was monitored and measured at 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 days of cultivation. Histological analysis was performed from calli grown on MS medium supplemented with 1.0 mg.L⁻¹ of BAP and 0.5 mg.L⁻¹ of IBA after 60 days of cultivation. The interaction of the growth regulators BAP and IBA provided the formation of compact calli and subsequent regeneration of shoots. A higher number (6.2) of shoots per callus was observed when 1.65 mg.L⁻¹ of BAP was added to the culture medium. The growth curve of calli showed five distinct phases: lag, exponential, linear, stationary and deceleration. On histological analysis of callus *J. curcas*, indirect organogenesis was evidenced by the formation of adventitious shoots, that presented cambial connection with the callus tissue.

KEYWORDS: *Jatropha curcas*. Growth regulator. Callogenesis.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. C. S. C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 421-430, 2004.
- BELTRÃO, N. E. M. Agronegócio das oleaginosas no Brasil. In: SATURNINO, H. M. ; PACHECO, D. D. ; KAKIDA, J. ; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-78, 2005.
- DIBAX, R.; QUISEN, R. C.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Plant Regeneration from Cotyledonary Explants of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and Histological Study of Organogenesis in Vitro. **Brazilian Archives of Biology Technology**, Curitiba, v. 53 n. 2, p. 311-318, 2010.
- LIMA, E. C.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C. Avaliação bioquímica do desenvolvimento de calos *in vitro* a partir de segmentos foliares de sagra d'água (*Croton urucurana* Baill.). **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, n. 3, p.184-190, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-479, 1962.
- NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; LIMA, E. C.; SOARES, G. A.; OLIVEIRA, L. M.; SANTOS, B. R.; EMRICH, E. B.; CASTRO, A. H. F. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 44-48, 2008.
- NUNES, C. F. PASQUAL, M.; SANTOS, D. N.; CUSTÓDIO, T. N.; ARAUJO, A. G. Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-mansô. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 1, p. 9-14, 2008.
- O'BRIEN, T. T.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. **Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O**. Cambridge, v. 59, p. 368-373, 1964.
- PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biociência**, Brasília, v. 4, n. 25, p. 44-48, 2002.
- POZO, J. C. D.; LOPEZ-MATAS, M. A.; RAMIREZ-PARRA, E.; GUTIERREZ, C. Hormonal control of the plant cell cycle. **Biologia Plantarum**, Czech Republic, v. 123, p. 173-183, 2005.
- RAJORE, S.; BATRA, A. Efficient Plant Regeneration via Shoot Tip Explant in *Jatropha curcas* L. **Journal Plant Biochemistry & Biotechnology**, Índia, v. 14, p. 73-75, 2005.

- SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D.O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, n. 1, p. 22-29, 2008.
- SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arábica* L., cultivar RUBI. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 571-577, 2003.
- SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J. ; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44 –78, 2005.
- SERRA, A. G. P.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 4, p. 833-840, 2000.
- SEVERINO, L. S.; LIMA, R. L. S.; BELTRÃO, N. E. M. Germinação e Crescimento Inicial de Plântulas de pinhão manso em função do peso da semente. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. (Comunicado Técnico, 309).
- SOARES, G. de A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga Vera Willd. subsp. affinis* (DC) T. D. Penn]**. 2003. 90 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras - Lavras, 2003.
- SUJATHA, M.; MUKTA, N. Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 44, p. 135-141, 1996.
- VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazonica**, Amazônia, v. 34, n. 4, p. 507-511, 2004.