



**MARIA DO SOCORRO ROCHA**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, CRIOPRESERVAÇÃO E  
RESPOSTA À SALINIDADE DE ACESSOS DE PINHÃO MANSO**

**AREIA, PB.**

**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**MARIA DO SOCORRO ROCHA**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, CRIOPRESERVAÇÃO E  
RESPOSTA À SALINIDADE DE ACESSOS DE PINHÃO MANSO**

Tese apresentada à Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Sementes, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão

**AREIA, PB.**

**2010**

**MARIA DO SOCORRO ROCHA**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, CRIOPRESERVAÇÃO E  
RESPOSTA À SALINIDADE DE ACESSOS DE PINHÃO MANSO**

Tese apresentada à Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Sementes, para obtenção do título de “Doutor”.

**Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão

Orientador

---

Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho – EMBRAPA (Examinador)

---

Prof. Dr. Vera Lúcia Antunes de Lima – UFCG (Examinador)

---

Dr. Ailton Melo de Moraes – EMEPA (Examinador)

Ficha Catalográfica elaborada na Seção de Processos Técnicos da  
Biblioteca Setorial de Areia-PB, CCA/UFPB.  
Bibliotecária: Márcia Maria Marques CRB4 – 1409

L864c Rocha, Maria do Socorro

CARACRERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA,  
CRIOPRESERVAÇÃO E RESPOSTAS À SALINIDADE DE  
ACESSOS DE PINHÃO MANSO./ Maria do Socorro Rocha. – Areia,  
PB: PPGA/CCA/UFPB, 2010.

165f.: il.

Tese (Doutorado em Agronomia) pelo Centro de Ciências Agrárias da  
Universidade Federal da Paraíba.

Área de concentração: Sementes.

Orientador: Napoleão Esberard de Macedo Beltrão.

1. Criopreservação - germoplasma - oleaginosas. 2. Oleaginosas -  
criopreservação - germoplasma. 3. Salinidade - qualidade fisiológica. 4.  
Pinhão manso – *Jatropha curcas* L. 5. Criopreservação – eixo  
embrionário L. I. Napoleão Esberard de Macedo Beltrão (Orientador). II.  
Título.

CDU: 582.796:582.757(043.2)

*Com Carinho,*

*Ao meu filho **Luiz Felipe Rocha Marques** e aos meus queridos e saudosos pais **João Luiz Rocha** (In Memoriam) & **Severina Gomes Barbosa Rocha** (In Memoriam) . Hoje, mais que nunca, sinto falta dos seus afagos e de suas orientações para a vida. Sinto-me mais fraca e desprotegida. Busco, nas lembranças, forças para continuar minha vitória, que também foi sua. Pais são inspirações para eu ter continuado nesta batalha que é a vida.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela maravilha que é, e por demonstrar isto a cada momento de nossas vidas. Ele é o Senhor, foi ele quem nos fez, e não nós; somos povo seu e ovelhas do seu pasto. (Salmo 100,3).

A minha família, meu filho Luiz Felipe Rocha Marques, minhas irmãs Maria Sueli Rocha Lima, Maria Inês e Maria Ivone. Com imensa gratidão aos meus queridos pais João Luiz da Rocha e Severina Gomes Barbosa Rocha que, enquanto presentes, tudo fizeram para que eu chegasse onde hoje estou. Que Deus os tenha ao seu lado, papai e mamãe. Que Deus continue nos abençoando.

À Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, e a todos os professores que contribuíram para minha formação.

De modo especial, ao meu orientador: Prof. Dr. Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão, pela orientação, conselho, incentivo, compreensão, confiança, paciência e sobretudo, pela amizade, sou muito grata por tudo.

Ao Programa de Capacitação de Profissionais de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro no fornecimento de bolsa de pesquisa.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa do Algodão (Embrapa-Algodão), pelo fornecimento de sementes e por disponibilizar suas instalações durante a execução do trabalho. A Dra. Maria Isaura Pereira e a Dra. Edilma P. Gonçalves e a todos os seus funcionários, em especial a, pelo auxílio e amizade.

Ao Departamento de Engenharia Agrícola ao professor Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida e da EMEPA Dr. Ailton Melo de Moraes, pela liberação dos equipamentos necessários à realização do trabalho.

Aos colegas da Pós-Graduação: Catarina, Severina, Noelma, Corrinha, Felipe, Luciano, Marsola, Luciano, Severino, Cosme pela amizade e companheirismo.

Aos colegas de estágio na Embrapa Algodão: Maria José, Marlon, Fabiola, pela convivência e amizade.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO DE FIGURAS

## SUMÁRIO DE TABELAS

RESUMO GERAL	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	4

CAPÍTULO 1: Caracterização geral do aspecto morfofisiológico de acessos de pinhão manso, efeitos da salinidade no crescimento e nutrição mineral e criopreservação *in vitro* de eixos embrionários deste espécie...

2	Revisão de Literatura.....	7
2.1	Aspectos gerais.....	7
2.1.1	O pinhão manso.....	7
2.1.2	Origem e ocorrência.....	8
2.1.4	Importância econômica.....	10
2.1.4	Aplicações e usos do pinhão manso.....	12
2.1.5	O pinhão manso como fontes de energia alternativas no Brasil	13
2.1.6	Extensão da salinidade nos solos.....	15
2.1.7	Influencia do excesso de sais do solo na planta.....	15
2.1.7.1	Alterações bioquímicas.....	15
2.1.8	Estresse salino – O crescimentos de muda de pinhão manso	18
2.1.9	A qualidade da água de irrigação.....	19
2.2.0	Efeito da salinidade sobre as plantas.....	20
2.2.1	Efeito osmóticos.....	22
2.2.2	Efeito tóxico.....	23
2.2.3	Efeito específicos dos íons.....	24
2.2.4	Mecanismos de tolerância à salinidade.....	25
2.2.5	Solutos compatíveis.....	25
2.2.6	Exclusão de sal: homeostase iônica.....	27
2.2.7	Tolerância das plantas á salinidade.....	28
2.2.8	Salinidade e nutrição mineral.....	30
2.2.9	Nutrição mineral e crescimento de plantas em ambientes	



	salinos.....	31
2.3.0	Avaliação do estado nutricional.....	31
2.3.1	Vitrificação.....	34
2.3.2	Dessecações.....	35
2.3.3	Fatores que afetam a sobrevivência à criopreservação.....	36
2.3.4	Desidratação.....	37
2.3.5	Congelamento.....	38
2.3.6	Descongelamento.....	39
2.4.7	Regeneração.....	39
2.4.8	Criopreservação de Espécies Vegetais.....	40
	Referências Bibliográficas.....	44

CAPÍTULO 2: Caracterização física-química de sementes de seis acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.).....

	L.).....	61
1	Resumo.....	61
2	Abstract.....	62
3	Introdução.....	63
4	Material e Métodos.....	64
4.1	Material vegetal e procedimento para obtenção da caracterizar físico-quimicamente das sementes.....	64
4.1.2	Método de caracterização físico-quimicamente.....	66
4.1.3	Caracterização físico-química.....	67
4.1.4	Procedimento estatístico.....	68
5	Resultados e discussão.....	68
5.1	Variáveis sementes.....	68
5.1.1	Sementes inteiras, albumens em função das características físico-química.....	68
5.1.2	Teor de água.....	69
5.1.3	Lipídios.....	70
5.1.4	Proteínas.....	71
5.1.5	Carboidratos.....	72
5.1.6	Cinzas.....	73

6	Conclusões.....	75
	Referências.....	76
	CAPÍTULO 3: Estresse salino sobre o crescimento de mudas de acessos pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> L.).....	79
1	Resumo.....	79
2	Abstract.....	81
3	Introdução.....	82
4	Material e Métodos.....	84
4.1.1	Localização do experimento.....	84
4.1.2	Tratamento.....	84
4.1.3	Substrato.....	85
4.1.4	Genótipo (acessos).....	87
4.1.5	Material do solo.....	87
4.1.6	Unidades experimentais.....	87
4.1.7	Controle de pragas.....	87
4.1.8	Irrigação.....	87
4.1.9	Plantio.....	88
4.2.0	Germinação.....	88
4.2.1	Característica de crescimento inicial.....	89
4.2.2	Altura da planta (cm).....	89
4.2.3	Diâmetro caulinar.....	89
4.2.4	Área foliar.....	89
4.2.5	Peso da fitomassa aérea.....	90
4.2.6	Peso das raízes.....	90
4.2.7	Delineamento experimental e tratamentos.....	90
5	Resultados e discussão.....	90
5.1	Germinação.....	90
5.1.2	Valores primários da análise do crescimento não destrutiva.....	92
5.1.3	Número de folhas (NF).....	94
5.1.4	Altura de planta (AP).....	96
5.1.5	Área foliar (AF).....	97
5.1.6	Diâmetro do Caule (DC).....	99

5.1.7	Fitomassa seca da parte aérea (FSPA) 105 DAS.....	100
5.1.8	Fitomassa seca total raiz (FSTR).....	102
6	Conclusões.....	105
	Referências.....	106

	CAPÍTULO 4: Efeito do estresse salino sobre nutrição mineral e o crescimento de mudas dos acessos pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> L.).....	110
--	--	-----

1	Resumo.....	110
2	Abstract.....	111
3	Introdução.....	112
4	Material e Métodos.....	113
4.1.1	Localização do experimento.....	113
4.1.2	Tratamentos.....	113
4.1.4	Matéria Seca.....	113
4.1.4	Variáveis analisadas.....	114
4.1.4.1	Análise do tecido vegetal.....	114
4.1.4.2	Macronutrientes.....	114
4.1.4.3	Micronutrientes.....	114
4.2	Análise estatística.....	114
5	Resultados e discussão.....	115
5.1	Efeito dos níveis de salinidade da água de irrigação na composição química de folha.....	115
5.1.2	Macronutrientes.....	115
5.1.3	Nitrogênio – N (folhas).....	117
5.1.4	Sódio e relação sódio/ potássio (Na/K).....	119
5.1.5	Micronutrientes.....	119
5.1.6	Manganês e zinco.....	120
5.1.7	Cobre e boro.....	121
6	Conclusões.....	123

	Referências Bibliográficas.....	124
	CAPÍTULO 5: Criopreservação de eixos embrionários de zigóticos de pinhão manso.....	128
1	Resumo.....	128
2	Abstract.....	128
3	Introdução.....	130
4	Material e Métodos.....	131
4.1	Material vegetal e procedimentos para excisão dos eixos embrionários.....	131
4.2	Exposição ao nitrogênio líquido.....	131
4.3	Avaliação da sobrevivência.....	132
4.4	Procedimento estatístico.....	132
5	Resultados e discussão.....	133
6	Conclusões.....	141
	Referências.....	142
	CAPÍTULO 6: Criopreservação de explantes de pinhão manso ( <i>Jathopa curcas</i> L.) pelos métodos da vitrificação.....	145
1	Resumo.....	145
2	Abstract.....	147
3	Introdução.....	148
4	Material e Métodos.....	149
4.1	Material vegetal e procedimento para obtenção dos explantes embrionários.....	149
4.2	Método da Vitrificação.....	150
4.2.1	Procedimento estatístico.....	151
5	Resultados e discussão.....	152
5.1	Vitrificação.....	152
6	Conclusões.....	158
	Referências .....	159

## SUMÁRIO

## SUMÁRIO DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

Figura 1	Sementes com e sem tegumento (A) semente inteira e o Albúmen (B) do pinhão manso.....	66
Figura 2.	. Sementes de pinhão-manso: inteiras (A) e albumens (B), Sementes depois de ser triturado: inteiras (C) e só albumens (D), Campina Grande- PB, 2008.....	67
Figura 3.	Extrator Soxhlet.....	67

### CAPÍTULO 3

Figura 1.	O Pinhão manso aos 5 dias (A), 30 dias (B) Emergência casa de vegetação da Embrapa. Campina Grande-PB, 2008.....	88
Figura 2.	Número de dias para emergência - NDE (A), índice de velocidade de emergência - IVE (B) e porcentagem de germinação – PG (C) em relação a salinidade de irrigação aos 30 DAS dos acessos de pinhão manso Garanhuns (A1), Itaporanga (A2) e Novo Cruzeiro (A3).....	92
Figura 3.	Número de folhas dos três acessos do pinhão manso (A1=Garanhuns, A2=Itaporanga e A3= Novo Cruzeiro) na presença de concentração salinidade de água de água de irrigação função de cinco períodos de avaliações.....	96
Figura 4.	Altura da planta em níveis de condutividade elétrica,	

função dos quatro períodos, 30, 45, 60 e 90 dias de avaliações dos três acessos do pinhão manso, Garanhuns (A1), Itaporanga (A2) e Novo Cruzeiro (A3)... 97

Figura 5. Altura da planta em níveis de condutividade elétrica, função dos quatro períodos, 30, 45, 60 e 90 dias de avaliações dos três acessos do pinhão manso, Garanhuns (A1), Itaporanga (A2) e Novo Cruzeiro (A3).. 99

Figura 6. Diâmetro de caule condutividade elétrica, função dos quatro períodos: 30, 45, 60 e 90 dias de avaliações dos três acessos pinhão manso Garanhuns (A1), Itaporanga (A2) e Novo Cruzeiro (A3)..... 100

Figura 7. Fitomassa da parte aérea em relação condutividade elétrica da água de irrigação dos três acessos pinhão manso, Garanhuns (A1), Itaporanga (A2) e Novo Cruzeiro (A3), aos 105 dias..... 102

Figura 8. Fitomassa total da Raiz em relação condutividade elétrica da água de irrigação dos três acessos pinhão mansa, Garanhuns (A1), Itaporanga (A2) e Novo Cruzeiro (A3) aos 105 dias..... 104

#### CAPÍTULO 4

Figura 1. Folhas dos acessos de pinhão manso (A), material dos três acessos antes da secagem (B)..... 114

Figura 2. As equações que representam os macronutrientes nas folhas do pinhão manso por diferentes níveis de

	condutividade elétrica: nitrogênio - N (A), fósforo – P (B), potássio – K (C), cálcio – Ca (D), magnésio – Mg (E) e enxofre – S (F) os acessos Garanhuns (A1), Itaporanga (A2) e Novo Cruzeiro (A3) aos 105 dias.....	118
Figura 3.	Os teores de sódio e potássio e sódio em função condutividade elétrica da água de irrigação (CEa) dos acessos de pinhão manso aos 105 dias.....	119
Figura 4.	Concentração de manganês – Mn (A), zinco – Zn (B), em função salinidade da água de irrigação (CEa) dos acessos de pinhão manso Garanhuns (A1), Itaporanga (A2) e Nova Cruzeiro (A3) aos 105 dias.....	121
Figura 5.	Teores de Cobre (A), Boro (B) em função salinidade da água de irrigação (CEa) dos acessos de pinhão manso, Garanhuns (A1), Itaporanga (A2) e Novo Cruzeiro (A3) aos 105 dias.....	122

## CAPÍTULO 5

Figura 1.	Teor de água, em porcentagem, de eixos embrionários oriundos de sementes do pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> L.) acessos Garanhuns e Itaporanga, submetidas a dessecação em câmara de fluxo laminar. João Pessoa, PB, 2009.....	135
Figura 2.	Porcentagem de regeneração de eixos embrionários do pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> L.) acessos Garanhuns e Itaporanga, em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e sob o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) ao 60 dias João Pessoa, PB, 2009.....	136
Figura 3.	Número de raízes emitidas por eixos embrionários do pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> L.) acessos Garanhuns	

	(A1) e Itaporanga (A2), em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar, sob o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) João Pessoa, PB, 2009.....	138
Figura 4.	Comprimento de plântula emitidas por eixos embrionários do pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> L.) em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar, sob o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) João Pessoa, PB, 2009.....	139

## CAPÍTULO 6

Figura 1.	Criopreservação de explantes do pinhão manso pelo método da vitrificação, João Pessoa, PB, 2009.....	151
Figura 2.	Regeneração de explantes de pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> L.) cultivados <i>in vitro</i> , em função da concentração do dimetilsulfóxido (DMSO), usado como crioprotetor. João Pessoa, PB, 2009.....	154
Figura 3	Número de brotos emitidos por explantes do pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> L.) cultivados <i>in vitro</i> , em função da concentração do dimetilsulfóxido (DMSO), usado como crioprotetor. João Pessoa, PB, 2009.....	155
Figura 4.	Comprimento de brotos emitidos por eixo embrionário do pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> L.) cultivados <i>in vitro</i> , em função da concentração do dimetilsulfóxido (DMSO), usado como crioprotetor . João Pessoa, PB, 2009 .....	157



## TABELAS

Página

### CAPÍTULO 1

Tabela 1.	Valores de salinidade limiar para algumas culturas.....	29
-----------	---	----

### CAPÍTULO 2

Tabela 1.	Origem (procedência) das sementes coletadas.....	65
-----------	--	----

Tabela 2.	Resumos das análises da variância (Quadrados médios) das variáveis, teor de água, lipídios, proteínas, carboidratos e cinzas das sementes com tegumento e só albúmen Campina Grande, PB, 2008.....	69
-----------	--	----

Tabela 3.	Interação entre fatores acessos e tipo de sementes (inteiras e albumens,) dos valores médios de teor de água das sementes de pinhão manso, de seis localidades respectivamente diferentes, Campina Grande- PB, 2008.....	70
-----------	--	----

Tabela 4	Interação entre fatores acessos e tipo de sementes (inteiras e albumens) dos valores médios de lipídio das sementes de pinhão manso, de seis localidades diferentes, Campina Grande- PB, 2008.....	71
----------	--	----

Tabela 5	Interação entre fatores acessos e tipo de sementes (inteiras e albumens) dos valores médios das proteínas das sementes de pinhão manso, de seis localidades, Campina Grande- PB, 2008.....	72
Tabela 6	Interação entre fatores acessos e tipo de sementes (inteiras e albumens) dos valores médios dos carboidratos das sementes de pinhão manso, de seis localidades diferentes, Campina Grande- PB, 2008.....	73
Tabela 7	Interação entre fatores acessos e tipo de sementes (inteiras e albumens) dos valores médios das cinzas das sementes de pinhão manso, de seis localidades diferentes, Campina Grande- PB, 2008.....	74

### CAPÍTULO 3

Tabela 1.	Dados meteorológicos da estação do INMET (EMBRAPA-CNPA) referentes ao período de janeiro a julho de 2008....	84
Tabela 2.	Valores Cátions e anions da água irrigada dos períodos de janeiro a julho de 2008.....	85
Tabela 3.	Volume em $\text{g.L}^{-1}$ da solução de NaCl na concentração de $200\text{g.L}^{-1}$ necessário para obtenção de 1L de água do respectivo tratamento a parti da água da cisterna da Embrapa Algodão.....	86
Tabela 4.	Características físico-hídricas e químicas do solo utilizado na pesquisa. Embrapa Algodão Campina Grande, PB, 2008.....	86
Tabela 5.	Resumos das análises de variâncias do número de dias	

	para emergência (NDE), índice de velocidade de emergência (IVE) e porcentagem de germinação (PG) por concentração salina nos acessos de pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> L.) submetidos a um período de 30 DAS Campina Grande, PB, 2008.....	91
Tabela 6.	Resumos das análises das variâncias (Quadrados médios) pinhão manso das variáveis, número de folhas por plantas (NF), altura de planta em cm (AP), área foliar (AF) e diâmetro de caule em cm (DC) aos 30, 45, 60 e 90 DAS Campina Grande, PB 2008.....	93
Tabela 7.	Resumos das análises de variância dos quadrados médios fitomassa seca da parte aérea total (FSPA) de pinhão manso 105 DAS, Campina Grande, PB 2008.....	101
Tabela 8.	Resumos das análises de variância dos dados dos quadrados médios de fitomassa seca raízes (FSR) e de pinhão manso aos 105 DAS Campina Grande, PB 2008.....	103

#### CAPÍTULO 4

Tabela 1.	Resumo dos quadrados médios para teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), sódio (Na) e redução sódio/potássio (Na/K) encontrados nas folhas dos acessos de pinhão manso aos 105 DAS. Campina Grande- PB 2008.....	116
Tabela 2.	Resumo da análise da variância (Quadrados médios) pinhão manso das variáveis, número de folhas por plantas (NF), altura de planta em cm (AP), área foliar (AF) e diâmetro de caule em cm (DC) aos 30, 45, 60 e 90 DAS. Campina Grande- PB 2008.....	120

## CAPÍTULO 5

Tabela 1. Resumos das análises de variância da regeneração, comprimento de plântula e número de raízes emitidas por eixos embrionários de dois acessos do pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> L.), submetidos a dessecação e ao armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C), João Pessoa PB, 2009.....	134
---	-----

## CAPÍTULO 6

Tabela 1. Resumos das análises de variância da regeneração, número e comprimento de brotos emitidos por eixos embrionário ( <i>Jatropha curcas</i> L.), submetidos ao processo da vitrificação. João Pessoa, PB, 2009.....	153
--	-----

**CARACTERIZAÇÃO GERAL DO ASPECTO MORFOFISIOLÓGICO DE  
ACESSOS DE PINHÃO MANSO, EFEITOS DA SALINIDADE NO  
CRESCIMENTO E NUTRIÇÃO MINERAL E CRIOPRESERVAÇÃO IN VITRO  
DE EIXO EMBRIONÁRIO DESTA ESPÉCIE**

**RESUMO GERAL**

ROCHA, Maria do Socorro. CARACTERIZAÇÃO GERAL DO ASPECTO MORFOFISIOLÓGICO DE ACESSOS DE PINHÃO MANSO, EFEITOS DA SALINIDADE NO CRESCIMENTO E NUTRIÇÃO MINERAL E CRIOPRESERVAÇÃO IN VITRO DE EIXO EMBRIONÁRIO DESTA ESPÉCIE  
Areia: UFPB/CCA, 2010, p. 1-162 (Tese - Doutorado em Agronomia)

Entre as espécies que estão sendo prospectadas para produção de biodiesel, o pinhão manso (*Jatropha curcas*) tem se destacado como uma planta oleaginosa com as qualidades necessárias para a produção de biodiesel. Planta perene da família das Euforbiáceas, resistente às condições adversas de clima e solo cujo potencial para produção de óleo tem sido considerado elevado. Nos últimos anos, muitas pesquisas têm surgido em torno da cultura, com o propósito de conhecê-la melhor, pois pouco se sabe a respeito das exigências agronômicas da planta. Mediante a necessidade de conhecimento para ampliação do cultivo dessa espécie, objetivou-se com este trabalho verificar e quantificar: caracterização geral do aspecto morfofisiológico de acessos de pinhão manso; a salinidade e criopreservação de eixo embrionário; caracterização físico-químico de sementes de seis acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L); estresse salino sobre o crescimento de mudas de pinhão manso (*Jatropha curcas* L); efeito do estresse salino sobre nutrição mineral de mudas de pinhão manso (*Jatropha curcas*); criopreservação de eixos embrionários de zigóticos de pinhão manso e criopreservação de explantes de pinhão manso (*Jathopha curcas* L.) pelos

métodos da vitrificação. Vários experimentos sobre os assuntos retro mencionados foram conduzidos, e as principais conclusões foram: Os acessos testados foram diferentes entre si, destacou-se os acessos Banavit e o Garanhuns com maiores teores de óleo, inferior a 30% no albúmen. No tocante os efeitos do sal, a condutividade elétrica ao aumentar, reduziu negativamente a germinação e o crescimento inicial do pinhão manso, com diferença entre os genótipos estudados. A salinidade, expressa em condutividade elétrica, reduziu ao aumentar, as concentrações de P, K, Ca, Mg e S nas folhas de pinhão manso. Os eixos embrionários de pinhão manso foram melhor preservados com 8 a 12% de umidade e o acesso Garanhuns não teve uma viabilidade comprometida pela sacarose (0,1 a 0,5 M), porém foi reduzido, via eixo embrionário e eixo com cotilédones pelo dimetilsulfóxido com concentrações inferiores a 7,0 %.

ROCHA, Maria do Socorro. GENERAL CHARACTERIZATION OF MORFOFISIOLÓGICO ASPECT OF REQUESTS OF CHESTNUT MEEK, EFFECTS OF SALINITY ON GROWTH AND NUTRITION AND CRYOPRESERVATION IN VITRO OF EMBRYONIC AXIS OF THIS KIND , Sand: UFPB / CCA, 2010. p 1-163. (Thesis - Doctorate in Agronomy).

### **ABSTRACT**

Among species that are being prospected for biodiesel production, the *Jatropha* has been outstanding as an oleaginous plant with essential qualities in biodiesel production. Perennial plant of the Euphorbiaceae family resistant to the adverse climate and soil conditions whose oil production's potential has been considered high. In the last years, a lot of researches had appeared around the crops for a better comprehension, once there's a lack of information regarding the agronomic plant requirements. By knowledge necessity for farming enlargement of that species, this work addressed to verify and to quantify, characterization of the general aspect morphophysiological access pine meek, salinity and criopreservao axis embrionrio;. physico-chemical characterizations of seeds of six accessions of pine meek *Jatropha* salinity on the growth of pine seedlings *Jatropha*; effect of salinity on mineral nutrio pine seedlings *Jatropha*; criopreservao axle embrion Pine Rivers zigticos criopreservao meek and gentle pine explants *Jathopha*. by the methods of glazing. Several experiments on matters back mentioned were conducted, and the main conclusion were: The requests sampled were different

between themselves, underlined-if the requests Banavit and Garanhuns with higher levels of oil, less than 30% in albumen. As regards the effects of salts, electric conductivity the increases, reduced negatively the germination and initial growth of chestnut meek, with difference between the genotypes studied. The salinity, expressed in electric conductivity, reduced the increase, the concentrations of P, K, Ca, Mg and S leaf of chestnut meek. The embryonic axis of chestnut meek were better preserved with 8 to 12% of humidity and access Garanhuns viability was not compromised by means of sucrose (0.1 to 0.5 M), put was reduced, via embryonic axis and axle with cotiledôneas by dimethylsulfoxide with concentrations of less than 7,0 %.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Pinhão manso, *Jatropha curcas* L., (Euphorbiaceae) tem despertado muito interesse em nível internacional e no Brasil por ser perene e ter um bom desempenho para produção de biodiesel e outras aplicações. Embora se tenha esse potencial de produção, existe deficiência de informações tecnológicas, tanto agronômicas, quanto genéticas. Esta falta de informação limita o aumento de competitividade e, por conseqüência, seu plantio em grandes áreas representa um investimento de alto risco. As informações sobre o impacto do nível de salinidade na cultura são escassas, embora se constate o plantio do pinhão manso em grandes extensões no solo de várias regiões, como se tem observado em outros países onde essa cultura é cultivada em áreas maiores, como China, Índia, Filipinas, Malásia, Nicarágua e Honduras (SATURNINO et al. 2005) . O pinhão manso é praticamente desconhecido como cultura no Brasil, apesar de se encontrar disseminado por vários estados brasileiros como cerca viva, e como o óleo matéria prima para produção de sabão e iluminação de lamparinas e com medicamentos. Pouquíssimos levantamentos sobre níveis salinos e crioconservação têm sido realizados, na maioria das vezes como simples constatações de ocorrência. “Jatropha World Congress”, (2008).

Poucos dados científicos existem sobre os níveis de salinidade, o que poderá afetar o crescimento do pinhão manso; portanto, há necessidade de investigação em pesquisas nesta área. Não se conhece quase nada da bioquímica e da fisiologia desta planta, e até alguns aspectos agronômicos devem



ser melhor investigados, pois ela tem elevada variabilidade natural, possuindo grande diversidade genética, podendo ter, possivelmente, também, elevada alogamia. Não existem cultivares definidas e há a necessidade urgente da definição, depois de escolher e caracterizar matérias promissoras, de definir os passos tecnológicos para a composição de pelo menos dois sistemas de produção para esta cultura, um para condições de sequeiro no sem-árido e outro para condições de irrigação com níveis de salinidade e criopreservação pelo período indeterminado. Trata-se de uma espécie caducifólia, e apesar de resistente à seca, pode ter a produtividade comprometida, em regiões com precipitações pluviais abaixo de 600 mm / ano (SATURNINO et al . 2005), o que frequentemente ocorre no semi-árido brasileiro, conforme os dois trabalhos de revisão de literatura nacionais mais, recentes sobre a cultura do pinhão manso, que são os de Arruda et al. 2004 e Saturnino et al. 2005.

As plantas frequentemente se encontram sob situação de estresses, ou seja, sob condições externas que afetam desfavoravelmente seu crescimento (foliar, caulinar), desenvolvimento e produtividade.

Os estresses nutricionais mesmo sob condições normais, em solos naturais, são quase sempre, uma norma e não exceção. As plantas, usualmente, portanto, podem ficar sujeitas a condições de disponibilidade sub ou supra-ótima em definidos essenciais (macro ou micronutrientes) ou não-essenciais (Al, Na, Cl ou algum metal pesado), com limitação ou redução do seu crescimento e, ou modificação do desenvolvimento vegetal (VIERA e CARDOSO, 2003).

Tradicionalmente, as espécies vegetais vêm sendo conservadas *ex situ*, como plantas vivas mantidas em coleções de germoplasma a campo que, no entanto, apresentam uma série de problemas, como erosão genética das espécies e variedades, devido a pouca adaptação às condições ambientais desses locais, ataque de pragas e doenças, além de envolverem um grande custo financeiro e de mão-de-obra. Uma outra forma de conservação de germoplasma é por meio da manutenção de sementes, principal via de propagação das espécies de plantas superiores, em câmaras fria, com controle de temperatura e umidade relativa. Essa técnica apresenta-se mais adequada; contudo, não garante a conservação a longo prazo, exigindo espaço físico apropriado e avaliações periódicas da viabilidade do material armazenado; assim, o desenvolvimento de técnicas alternativas de conservação, a longo prazo dos recursos genéticos,

apresentam grande importância para os avanços do melhoramento vegetal (VERTUCCI ET al. 1991).

A biotecnologia moderna apresenta novas possibilidades para a conservação de recursos genéticos de espécies vegetais, usando-se técnicas de conservação *in vitro*, sob crescimento lento, ou crioconservação, que vêm tornando-se imprescindíveis para a conservação *ex situ* e, ainda, o intercâmbio de germoplasma das espécies propagadas vegetativamente, que se degradam rapidamente no armazenamento. Estas são, em particular, espécies oleaginosas de comprovada importância econômica para o País. Apresentam sementes muito susceptíveis a danos fisiológicos devido à instabilidade química dos lipídios, que se deterioram mais rapidamente durante o armazenamento convencional, aliado à presença de microrganismos que contribuem na aceleração desse processo, exigindo avaliações periódicas do material vegetal, para evitar eventuais perdas da variabilidade genética, principalmente, quando mantidas em bancos de germoplasma (TONG et al. 2006).

À procura de solução para os problemas referenciados, buscou-se definir metodologias viáveis e simplificadas de conservação a longo prazo, do germoplasma do pinhão manso, por meio da crioconservação. Para tanto, fez-se necessária a elaboração e avaliação de protocolos que permitissem o alcance do objetivo proposto.

**GERAL DO ASPECTO MORFOFISIOLÓGICO DE ACESSOS DE PINHÃO  
MANSO, EFEITOS DA SALINIDADE NO CRESCIMENTO E NUTRIÇÃO  
MINERAL E CRIOPRESERVAÇÃO IN VITRO DE EIXO EMBRIONÁRIO DESTE  
ESPÉCIE**

**CAPÍTULO 1**

ROCHA, Maria do Socorro. CARACTERIZAÇÃO GERAL DO ASPECTO MORFOFISIOLÓGICO DE ACESSOS DE PINHÃO MANSO, EFEITOS DA SALINIDADE NO CRESCIMENTO E NUTRIÇÃO MINERAL E CRIOPRESERVAÇÃO *IN VITRO* DE EIXO EMBRIONÁRIO DESTE ESPÉCIE ,  
Areia: UFPB/CCA, 2010, p.7-60, (Tese - Doutorado em Agronomia)

**2 Revisão de Literatura**

**2.1 Aspectos gerais**

**2.1.1 O pinhão manso**

A família Euphorbiácea, com cerca de 317 gêneros e 8.000 espécies, distribui-se principalmente nos trópicos e subtropicais (CRONQUIST, 1981). Entre essas espécies, existe a *Jatropha curcas* L., cujo nome tem a sua origem associado às suas propriedades medicinais (SATURNINO et al. 2005).

*Jatropha curcas* L. é um arbusto, de crescimento rápido, cuja altura varia frequentemente de dois a três metros, podendo alcançar até cinco metros. As folhas são decíduas, alternadas e sub-opostas, filotaxia em espiral, cada folha dista 105° da próxima, os pecíolos são longos e esverdeados, dos quais partem as nervuras divergentes, e no final da época seca ou durante a estação fria, as folhas caem, em parte ou totalmente (SATURNINO et al. 2005). O diâmetro do tronco pode chegar a 20 cm, possui poucas ramificações, caule liso, de lenho mole e medula desenvolvida, mas pouco resistente; floema com longos canais que se estendem até as raízes, nos quais circula o látex, suco leitoso que corre com abundância em qualquer ferimento (ARRUDA et al. 2004). As flores da espécie são pequenas, amarelo-esverdeadas e o fruto é uma cápsula com três sementes escuras e lisas (MARTINS et al. 2008). A semente do pinhão manso pesa de 0,48 a 0,72g e fornece de 50 a 52 % de óleo extraído com solventes e 32 a 35 % em caso de extração por trituração e aquecimento da amêndoa (BRASIL, 1992). O gênero *Jatropha* apresenta polinização entomófila (SATURNINO et al. 2005), o que aumenta a probabilidade de ocorrência de estabilidade genética dentre das espécies porém promove a alogamia que pode ser elevada, dependendo das condições do ambiente .

### **2.1.2 Origem e ocorrência**

De acordo com a “Society for Rural Initiatives for Promotion of Herbals”, *Jatropha curcas* L. é uma espécie originária da América Central. Peixoto et al. (2004) julga que o pinhão manso seja oriundo da América do Sul, Brasil e ainda das Antilhas, e que foi introduzida em 1883, nas Ilhas do Arquipélago de Cabo Verde, alcançando depois a África e a Índia, e posteriormente, disseminada por todas as regiões tropicais, temperadas e, em menor proporção, nas regiões frias.

O pinhão manso tem centro de origem indeterminado, porém, a maioria dos relatos e estudos cita as Américas do Sul e Central como centros de origens prováveis, sendo encontrada de forma espontânea em quase todas as regiões

intertropicais, ocorrendo em maior escala nas regiões tropicais e em número bastante reduzido nas regiões temperadas (DUMENT, 1994; HELLER, 1996; GÜBITZ, 1999; SWOT, 2002; ARRUDA et al. 2004; SATURNINO et al. 2005). Segundo Brandenburg et al. 2007, a espécie está distribuída, principalmente, nas Américas, África e parte da Ásia; sendo largamente cultivada no México, Nicarágua, Tailândia e partes da Índia. No passado, o arquipélago de Cabo Verde foi importante produtor/ exportador das sementes da espécie para Portugal. Atualmente, cultivos têm sido promovidos por organizações governamentais e não-governamentais no sul da África, Brasil, Mali e Nepal e em outros países através da iniciativa privada.

O fato é que o pinhão manso é encontrado em quase todas as regiões intertropicais estendendo sua ocorrência à América Central, Índia, Filipinas e Timor, até mesmo às zonas temperadas (EPAMIG, 2008). Segundo esse mesmo autor, a espécie ocorre praticamente em todas as regiões do Brasil, sempre de forma dispersa e adaptando-se em condições edafoclimáticas variadas, propagando-se, sobretudo, nos estados do Nordeste, assim como em Goiás e, de modo geral, crescendo nos terrenos abandonados e não cultivados, não subsistindo, porém nos locais de densa vegetação, com a qual dificilmente consegue competir.

No Brasil, segundo Arruda et al. (2004) e Saturnino et al. (2005), sua distribuição geográfica é bastante vasta, devido à sua rusticidade, resistência a longas estiagens, sendo adaptável a condições edafoclimáticas muito variáveis, desde a região Nordeste, Sudeste e o estado do Paraná.

Atualmente, a região Nordeste é a mais indicada para a exploração dessa espécie. Com o efeito estufa, o aquecimento global e a escassez das reservas mundiais de combustível fóssil, o pinhão manso tem despertado interesse dos produtores, do governo e das instituições de pesquisa. Desta forma, com a possibilidade do uso do óleo de pinhão manso para a produção de biodiesel, abrem-se amplas perspectivas para o aumento das áreas de plantio com esta cultura no semiárido nordestino (ARRUDA et al. 2004).

Os avanços obtidos com o pinhão manso decorreram da exploração do germoplasma natural do pinhão manso por meio de métodos tradicionais de melhoramento genético. O uso das técnicas de biologia molecular sobre transferência de genes que controlam a expressão de várias espécies na

quantidade do tipo selvagens de pinhão manso para as cultivares futuras, já constitui um dos objetivos das empresas de biotecnologia que trabalham com pinhão manso no mundo, o que pode resultar em avanços tecnológicos e em economia de tempo e recursos na obtenção das futuras cultivares de pinhão manso (CÁCERES et al. 2010).

O homem tem externado grande interesse em encontrar métodos adequados de armazenamento para aumentar o tempo de conservação da qualidade das sementes. Condições capazes de mantê-las viáveis e vigorosas por longos períodos de tempo, tornando-se de grande importância para os três segmentos da cadeia do pinhão manso: produtores, beneficiadores (maquinistas) e indústria.

A semente é a principal via de propagação do pinhão manso. O tegumento é a estrutura externa que delimita a semente e provém do integumento do óvulo. Suas funções básicas são manter as unidades internas, protegendo a semente de danos mecânicos, microrganismos patogênicos, regular a reidratação, trocas gasosas e, sobretudo, a germinação. Sob o tegumento, aparece a amêndoa, formada pelo embrião e tecidos de reserva. A amêndoa é de natureza oleaginosa, com cerca de 25 a 40% de óleo, sendo o embrião é a parte vital da semente, com a função de reiniciar a divisão celular e de crescer. Como na maioria das espécies, o embrião da semente de pinhão manso é um eixo constituído de epicótilo, hipocótilo e radícula (VIEIRA e BELTRÃO, 1999). De acordo com Mauney (1984), na semente quiescente, o eixo primário consiste de radícula, hipocótilo e epicótilo pobremente desenvolvido. O epicótilo possui uma folha verdadeira inicial e o meristema apical que, após o crescimento e desenvolvimento inicial, origina a fitomassa aérea da plântula a qual possui dois cotilédones, que caracterizam o estágio inicial do crescimento.

O poder germinativo da semente está, em geral, relacionado à sua idade. Dependendo da umidade da semente e das condições ambientais (temperatura e umidade relativa) de armazenamento, o poder germinativo se conserva por longos períodos.

### **2.1.3 Importância econômica**

De acordo com Brandenburg et al. 2007, *Jatropha curcas* é uma planta com muitos atributos, múltiplos usos e considerável potencial, em especial, para prevenção e controle de erosão do solo (JONGSCHAAP et al. 2007), recuperação do solo e como cerca viva, principalmente, para incluir ou excluir os animais. Tong et al. (2006) acrescentam que a espécie também pode produzir sabão, cosméticos, pesticidas e medicamento anticancerígeno.

Outros aspectos positivos se referem à produção de óleo com a vantagem de armazenamento das sementes por longos períodos de tempo, sem os inconvenientes da deterioração do óleo por aumento da acidez livre, como acontece com os frutos de dendê, por exemplo (SLUSZZ e MACHADO, 2006). *Jatropha curcas* L. é uma espécie que tem uma grande vantagem em relação a outras culturas, pois ela se adapta a variadas condições externas, como por exemplo, solos contaminados por metais pesados (KOIWA et al. 2008).

O pinhão manso leva de três a quatro anos para atingir a idade produtiva, que se estende por 40 anos, e produz, no mínimo, duas toneladas de óleo por hectare, o que reflete de forma positiva para o cultivo da espécie (DAEY et al. 2007). Porém, depende das condições ambientais. No semiárido brasileiro, a produtividade em condições de sequeiro tem níveis baixos, menos de 300 kg de óleo/ha. Há diversos relatos do uso do óleo e sementes de pinhão manso em lamparina e candeeiro, por ser inodoro e ao ser queimado não produzir fumaça (SATURNINO et al. 2005).

Na medicina doméstica, aplica-se o látex da planta como cicatrizante, hemostático e purgante, as raízes são consideradas diuréticas e antileucêmicas e as folhas são utilizadas para combater doenças de pele. São eficazes também contra o reumatismo e possuem alto poder antisifilítico (ARRUDA et al. 2004). Nos grãos de pinhão manso são encontrados vários fatores, como a curcina (uma proteína) e ésteres de forbol.

A curcina já foi considerada a molécula responsável pela toxicidade do pinhão manso, conforme descrito em publicações científicas e protocolo de atendimento dos Centro de Intoxicação Toxicológica Brasileiros. É uma proteína capaz de inibir a síntese protéica *in vitro* de forma semelhante à ação da ricina da mamona sendo, porém, 1000 vezes menos tóxica. Isto se deve ao fato de que a porção tóxica da curcina não está ligada a uma proteína chamada lectina, através

de ligações de dissulfeto, que é quem promove a entrada na célula, necessária ao início da atividade citotóxica (MENDONÇA et al. 2009).

O pinhão manso é utilizado industrialmente no arquipélago de Cabo verde, em Angola, Guiné, Moçambique, Antilhas Britânicas, Filipinas, México, Porto Rico, Venezuela e El Salvador, sempre em consórcio com outras culturas (PEIXOTO, et al 2004). Porém, atualmente, a Índia vem se destacando na cultura do pinhão manso. Segundo Saturnino et al. (2005), esse país vem desenvolvendo um grande programa de pesquisa com essa espécie, entre outras oleaginosas, visando à produção de biodiesel.

No Brasil, com o advento do Programa Brasileiro de Biodiesel e o surgimento de grande demanda por óleos vegetais, o pinhão manso tem sido divulgado como uma alternativa para fornecimento de matéria prima. Esta escolha se baseia na expectativa de que a planta tenha baixo custo de produção e seja resistente ao estresse hídrico, o que seria uma vantagem significativa, principalmente na região do semiárido do país (BELTRÃO et al. 2007). A resistência ao estresse é significativamente reduzida (AQUINO et al. 2007). A utilização de fontes de água salinas também pode, dependendo de sua composição, alterar de forma negativa as propriedades físicas e químicas do solo (AQUINO et al. 2007). porém muito pouco conhecimento sobre tais assuntos existem com o pinhão manso e que necessitam de serem estudados e pesquisados.

#### **2.1.4 Aplicações e usos do pinhão manso**

Desde as primeiras notícias a respeito de uso do biodiesel, as perspectivas de uso têm sido bastante ampliadas, principalmente quando se pensa em matérias primas que não fazem parte da base alimentar humana ou animal. Essa possibilidade de uma fonte de energia que não é fonte de alimentos é bastante clara para o biodiesel resultante do pinhão manso, cujo potencial de produção de óleo é cerca de 4000 litros por cada tonelada de matéria prima segundo . (SATURMINO et al. 2005). A mamona é outro exemplo de matéria prima vegetal que não é utilizada para alimentação humana ou como ração animal, embora a quantidade de óleo extraído por tonelada de matéria prima seja da ordem de 300



a 500 litros por hectare, em condições de sequeiro (sem irrigação) nas condições de clima e de solos do semi-árido brasileiro.

Estes produtos possuem um grande potencial para a produção de energia limpa e sustentável e que foge da discussão atual a respeito da segurança alimentar, como ocorre no caso do etanol da cana-de-açúcar (BRASIL), do milho (EUA) ou outros produtos agrícolas. Cujas matérias - primas também podem ser utilizadas na alimentação humana. O biodiesel advindo do pinhão manso e o seu uso em motores de combustão interna em usinas de pequeno porte para a produção de biodiesel já é uma alternativa real para os pequenos e médios produtores, embora ainda precise de maior divulgação e esclarecimentos técnicos, bem como apoio financeiro. Um modelo de micro-usina de craqueamento de biodiesel pode ser encontrado em trabalho recente de Suarez (2006), cuja capacidade de produção diária é de 500 litros de ecodiesel. Outros esforços, ainda em fase de testes e não disponíveis comercialmente, têm sido feitos pela EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e a UnB – Universidade de Brasília, no sentido de desenvolverem projetos para mini-usinas voltadas para a agricultura familiar, capazes de produzir até 800 litros por dia de biodiesel de plantas oleaginosas (EMBRAPA, 2008).

### **2.1.5 O pinhão manso como fonte de energias alternativas no Brasil**

As tecnologias associadas ao uso de fontes alternativas e renováveis de energia, a exemplo da solar, eólica e biomassa, estão em estágios distintos de desenvolvimento, além de requererem ainda pesquisa básica e aplicada para se alcançar um nível de domínio mais avançado. Isto quer dizer que modelos experimentais ainda não estão consolidados e as possibilidades ainda são bastante vastas para aplicações de pequeno e médio porte, caso por exemplo da liquefação da biomassa e de biometanol de segunda geração, oriundo da hidrólise da celulose do bagaço da cana de açúcar.

O futuro do cenário brasileiro precisa de apoio governamental para mudar a sua matriz energética, tornando-a mais voltada a fontes alternativas, sendo possível aumentar grandemente as participações atuais: biomassa de 4% para 26%, eólica de quase zero para 20% e do gás natural 4% para 12% (greenpeace/Valor Econômico, 2008). O custo de 1 MWh proveniente da energia

eólica é de cerca de R\$180,00, enquanto que o da biomassa sai por R\$ 140,00. Em recente leilão da usina de Jirau, no rio Madeira no estado de Rondônia, o valor da energia elétrica da proposta vencedora foi R\$ 71,37. Isto mostra a relevância de apoio governamental e regulamentações legais visto que estas fontes ainda não possuem apelo comercial, apenas ambiental. Já há um bom tempo, diversos autores realizam avaliações e propostas para o uso de energias alternativas no Brasil, a exemplo de Palz (1981) e Bezerra (1982), cujas aplicações, em pequena escala e divulgação, continuam sendo realizadas ainda nos dias atuais. Em trabalho recente, Silva (2005) realizou uma avaliação que demonstrou a viabilidade do uso em pequenas e médias escalas da energia eólica nas regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil. Uma metodologia para avaliação preliminar do potencial eólico foi apresentada por Carvalho (2003). Outra linha de pesquisa, abordando o aproveitamento de energia solar também demonstra vastas possibilidades na região Centro-Oeste, especificamente, em estudo apresentado referente a dados coletados na UFGD – Universidade Federal da Grande Dourados, no estado de Mato Grosso do Sul, (SILVA et al 2008).

Não se pode deixar de mencionar o esforço de autores já tradicionais na área de energias alternativas e renováveis, cujos trabalhos, tanto na área técnica quanto de políticas públicas e sociais, buscam, frequentemente, divulgar as vantagens e consequências do uso sustentável da energia em suas mais diversas formas, como González- Benito et al. (2004), Goldenberg e Villanueva (2003) e Januzzi e Swisher (1997). Dentre outras idéias, destaca-se a busca por uma matriz energética nacional que seja composta por múltiplas fontes de energia, não mais que 15% de cada uma, de maneira a poder suportar mudanças sensíveis no cenário energético que possam comprometer os projetos futuros do Brasil.

Dentre as fontes virtualmente inesgotáveis de energia, podem-se mencionar as seguintes formas de aproveitamento da energia disponível na natureza: hidroelétrica (geração de energia elétrica, a partir do potencial hidráulico dos rios e cursos d'água), solar (como o próprio nome já diz, energia do espectro eletromagnético cuja fonte é o sol), eólica (energia cinética proveniente do vento, isto é, ar em movimento), maré-motriz (energia potencial devido à variação de alturas do nível dos mares e oceanos na maré baixa e alta), ondas (quantidade de movimento, em função da velocidade e altura das ondas), biomassa (produção de

energia térmica, a partir da queima de matéria orgânica de origem vegetal ou animal) e, ainda, a geotérmica (calor originário do interior do planeta, a exemplo de fontes de águas quentes ou áreas de rochas vulcânicas) Flowers et al, 2007.

Neste contexto de biomassa é que se encontram os biocombustíveis, dentre os quais se destacam no Brasil o Etanol da cana de açúcar e o Biodiesel à base de diversos produtos (soja, mamona, pinhão manso e outras fontes vegetais e animais). Os óleos vegetais, em especial o do pinhão manso poderá ser uma grande alternativa no Brasil e no mundo para a produção de biodiesel, sendo de elevado rendimento e de bom desempenho nos motores movidos a diesel, tendo uma composição de ácidos graxos boa para a produção de um produto de boa qualidade e que atende as especificações nacionais e internacionais (JONGSCHAAP et al. 2007).

#### **2.1.6 Extensão da salinidade nos solos**

Com base nos dados da FAO (2008), a área total dos solos salinos é de 397 milhões de hectares e de solos sódicos é de 434 milhões de hectares, que não são necessariamente aráveis, mas abrangem toda área afetada pelo sal, em nível mundial. Entre as terras irrigadas, dos 230 milhões de terras irrigadas no mundo, 45 milhões de hectares são afetados por sais (19,56%), (FAO, 2008).

No Brasil, embora a informação sobre as áreas salinizadas ainda não esteja bem definida, estima-se que 20 a 25 % das áreas irrigadas próximas aos rios e riachos intermitentes, principalmente nos solos aluviais, apresentam problemas de salinidade e/ou problemas de drenagem. Além dos solos salinos em áreas irrigadas, também existem grandes áreas afetadas por causas naturais no país (2,4% do total da área terrestre do Brasil). De acordo com uma sondagem feita para os solos dos Estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará, compostos de 110 milhões de hectares, as áreas salinizadas já foram estimadas em 9,1 milhões hectares, o que corresponde a 9% da região analisada (FAO, 2008).

A crescente perda de terras para uso agrícola, por causa dos problemas de aridez e/ou salinidade, torna difícil a tarefa de aumentar a produção alimentar, a fim de atender a demanda da população mundial (KOIWA et al. 2006).

## **2.1.7 Influência do excesso de sais do solo na planta**

### **2.1.7.1 Alterações bioquímicas**

Várias alterações bioquímicas são observadas nos vegetais cultivados sob estresse salino. Como exemplo temos variações na concentração de carboidratos solúveis totais (LACERDA et al. 2001), fenóis totais, glicina-betaína (ASHRAF e FOOLAD, 2007), clorofila (SANTOS, 2004). A variação na concentração de vários destes compostos orgânicos está geralmente relacionada a maior ou menor tolerância ao estresse.

A salinidade pode reduzir a concentração de carboidratos das folhas mais jovens, através do acúmulo de sais no citoplasma, após exceder a habilidade das folhas maduras de acumular os sais nos vacúolos (MUNNS, 2002). Como os carboidratos, entre outros compostos, são os substratos necessários para o crescimento do vegetal, todos os outros órgãos da plantas também têm seu crescimento afetado pela salinidade (PARIDA e DAS, 2005). Porém, a elevação nos teores de carboidratos solúveis totais nas folhas está ligada à finalidade de se manter o nível de água da folha e induzir um ajustamento osmótico na planta, visando ao equilíbrio osmótico da célula (LACERDA et al. 2001; KERBAUY, 2004), apesar de estudos relacionarem o papel dos carboidratos na osmorregulação das plantas submetidas à salinidade (TESTER e DAVENPORT., 2003), respostas ao aumento da salinidade ou da sua importância como osmólitos (ROLLETSCHKE e HARTZENDORF, 2000).

Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples, até outras com alto grau de polimerizações (BRAVO et al. 1998) e estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados aos açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT, et al. 1998). Os fenóis são compostos reconhecidos como potentes antioxidantes, que podem agir como redutores de oxigênio singleto, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais (STEONKUS, 2004). Em contrapartida, o excesso de fenóis pode atuar de forma negativa no desenvolvimento das plantas pela oxidação de compostos celulares. Porém, trabalhos com os compostos fenólicos relacionados com a tolerância à salinidade ainda são bastante limitados para se ter uma delimitação de valores referenciais.

A alteração na concentração de prolina nas plantas é relacionada a vários estresses abióticos, principalmente, aos estresses hídricos e salinos. O acúmulo de prolina livre é estudado em condições de estresse osmótico há mais de quarenta e cinco anos (KAVI KISHOR et al. 2005), e sabe-se que o teor de prolina varia de espécie para espécie e pode apresentar valores cem vezes maiores nas plantas submetidas à estresse, quando comparadas às plantas controles (SILVEIRA et al. 2007) e durante os estresses osmóticos, a prolina atua com um osmorregulador, além de ser uma grande fonte de carbono e nitrogênio (HARE e CRESS, 1997). Além disso, tem sido proposto, também, que a prolina pode funcionar como chaperonas moleculares para a estabilização das estruturas das proteínas, favorecer a estabilização do pH citosólico e auxiliar no equilíbrio redox das células estressadas (CARNIELLI, 2010). Alguns autores mostraram que a prolina pode atuar como sequestrador das espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas durante estresses (COIMBRAIA et al. 2005 ; BOHNERT e SHEN, 1999). A acumulação de prolina também pode influenciar na sinalização de respostas adaptativas aos estresses osmóticos (MAGGIO et al. 2003).

Variações na concentração de clorofila podem ocorrer, através da diminuição da sua síntese, devido à alteração do ácido aminolevulínico (ALA), que é o precursor da protoclorofila (que é convertido em clorofila quando expostas à luz), ou pela própria degradação da clorofila, através da enzima clorofilase (SANTOS, 2004). Esse último processo tem como primeiro passo a remoção de fitol pela clorofilase, primeira enzima que age na via de degradação da clorofila (FANG et al. 1998). No entanto, os dados sobre essa enzima sugerem que a sua atividade diminui com a senescência e anóxia (FANG et al. 1998), mas não há formações claras sobre o comportamento da enzima presente nas folhas sob condições de estresse salino.

As proteínas são encontradas em todas as partes das células, uma vez que são fundamentais sob todos os aspectos da estrutura e função celulares, e interações nos teores de proteínas podem representar um grande dano para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Alguns autores relatam que sob estresse salino, normalmente, há redução no conteúdo de proteínas das plantas estressadas, ou em virtude da síntese protéica ser prejudicada, ou pelo aumento da proteólise (PARIDA e DAS, 2005; SILVEIRA et al. 2007). A síntese protéica é prejudicada devido à exigência do íon potássio na ligação do tRNA aos

ribossomos, que necessita de altas concentrações desse íon para ocorrer (BLAHA e TRASER 2000), porém na salinidade, geralmente, a concentração de  $K^+$  tende a cair com o aumento da concentração do íon sódio. Isso porque não há transportadores específicos para o íon sódio, que compete com o íon potássio. Essa interrupção da síntese protéica parece ser um importante fator dos danos causados pelo excesso de íons sódio (TESTER e DAVENPORT, 2003). Porém, é importante salientar que também ocorre um aumento da síntese de uma ampla variedade de proteínas, em resposta ao estresse salino, as quais podem também atuar, principalmente na estabilização das membranas celulares e na sinalização de respostas ao estresse salino (TESTER e DAVENPORT, 2003).

### **2.1.8 Estresse salino – O crescimento de muda de pinhão manso**

As plantas, sob condições naturais, se encontram sob várias condições estressantes que afetam seu metabolismo desencadeando mudança bioquímica, celulares e fisiológicas para evitá-las. Dentre os fatores abióticos, o estresse nutricional parece ser um dos que mais afetam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Na maior parte das vezes, as plantas estão sujeitas à deficiência e, ou ao excesso de um ou mais minerais, isoladamente e, ou combinados, com diferentes intensidades. Como as plantas reagem a esses estresses nutricionais? Quais são os principais sistemas regulatórios das plantas e como eles permitem a algumas e outras sem algumas plantas tolerarem e outras não a esses estresses? A revisão da literatura relata que o conhecimento nesta área aumentou enormemente, especialmente nos últimos 20 anos. Entretanto, a maioria dos modelos sugeridos ainda é bastante especulativa, com mais indagações do que respostas postas definitivas para a explicação do problema,(COMBRAIA, 2005).

O estresse pode se manifestar em vários graus de severidade, com duração variável, combinados ou não, de modo contínuo ou alternados com momentos de normalidade. No que concerne às plantas, a intensidade do estresse vai depender do órgão ou do tecido alvo, do estágio de desenvolvimento da planta e do genótipo em questão. Levando em consideração estes fatores, o genótipo pode manifestar resistência ou tolerância ao fator estressante e vivendo,

às vezes, até crescendo, mesmo que em menores taxas; ou o genótipo pode manifestar susceptibilidade sofrendo redução do crescimento e, dependendo da intensidade do estresse, podendo chegar á morte da planta Lynch e Conery 2004.

Estresses nutricionais ocorrem mesmo sob condições normais, em solos naturais. O estresse nutricional é, quase sempre, uma norma e não exceção. As plantas, usualmente, portanto, podem ficar sujeitas a condições de disponibilidade sub-disponibilidade de elementos essenciais ou não essenciais (Al, Na, Cl ou algum metal pesado) em quantidades que são nefastas ao seu metabolismo, com limitação ou redução do seu crescimento, ou modificação do desenvolvimento vegetal (BRAY et al. 2000) .

### **2.1.9 A qualidade da água de irrigação**

Toda e qualquer água contém sais solúveis em quantidades e proporções variáveis, independentemente da sua origem. Assim, qualquer método de aplicação, mesmo sendo de excelente qualidade, quando não manejada corretamente, pode tornar-se um dos principais fatores responsáveis pelo processo de salinização do solo (NEPOMUCENO et al. 2001).

Deve-se considerar que a quantidade da água de irrigação é um dos importantes fatores do qual depende a agricultura irrigada. Entretanto, não é possível desenvolver um sistema de classificação universal que possa ser utilizado sob todas as circunstâncias (HOLANDA e AMORIM, 1997). Para o seu uso na agricultura irrigada, pode ser destacado, entre as características mais importantes, a concentração total de sais solúveis, a concentração relativa de sódio em relação ao cálcio e ao magnésio e, ainda, a presença de elementos traços (HOLANDA e AMORIM, 1997).

Os sais mais comuns e geralmente presentes na água de irrigação, em termos de cátions, são: sódio, cálcio, magnésio e potássio, sendo os cloretos, sulfatos, carbonatos e bicarbonatos os ânions mais frequentes Rhoades et al. 1992). Segundo Tanji (1990), outros constituintes como  $B > Sr > O_2 > Rb > F > Mo > Mn > Ba$  e Al também contribuem para limitar mais ainda o uso da água de irrigação.

A água do Nordeste brasileiro pode sofrer grande variação em termo de salinidade, de acordo com a sua fonte e estações, sendo estabelecido pela mesma, a seguinte ordem: açudes < rios < cacimbões < poços rasos. Em termos da presença de íons principais, a mesma apresenta a seguinte ordem:  $\text{Na}^+ > \text{Ca}^{++} > \text{Mg}^{++} > \text{K}^+$  para os cátions e  $\text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{SO}_4^-$  para os ânions. Foram observados ainda, grandes variações na composição da água em açudes, principalmente, entre o período da seca e o da chuva, Lynch e Clair, 2004.

Usualmente, a água de irrigação é classificada em relação a três parâmetros básicos, sendo o primeiro relacionado ao risco de salinidade, seguido de salinidade ou problemas relacionados à infiltração e, por último, o risco de toxicidade causado por íons específicos (AYERS e WESTCOT, 1999).

Medeiros e Gheyi (1994) enfatizam a necessidade de se desenvolver um sistema próprio de classificação de água para as condições brasileiras, como medida para se ter um prognóstico mais seguro do seu efeito quando usada na irrigação. Considerando a ausência de estudos nesta direção, a sugestão é que seja usada para classificação quanto à salinidade, a proposição do UCCC (University of Califórnia Committee of Consultants), nc.

Com respeito à salinidade e consequentes problemas de infiltração, e à toxidade iônica, as diretrizes apresentadas por Ayers e Westcot (1999).

### **2.2.0 Efeito da salinidade sobre as plantas**

Vários estudos têm sido feitos para avaliar o comportamento das culturas à salinidade, tendo em geral, se verificado que as plantas cultivadas apresentam maior sensibilidade, aos efeitos salinos em suas fases inicial do crescimento. Partindo desta constatação, torna-se imprescindível o conhecimento dos efeitos dos sais nas diferentes etapas do crescimento das culturas (AYERS e WESTCOL, 1999).

Durante o início, até a fase de germinação, por exemplo, uma redução na absorção de água pode limitar o crescimento do eixo embrionário, tendo em vista que a presença de água acelera os processos metabólicos. A absorção é feita em função das diferenças de potencial entre as sementes e o meio, pela sua redução a valores mais baixos do que os componentes de potencial total da água existente



no solo. A germinação é o processo compreendido desde a absorção de água inicial até a emergência de parte do embrião (BEWLEY e BLACK, 1999).

Os efeitos da salinidade sobre as plantas ocorrem devido às concentrações elevadas de sais na solução do solo, onde as raízes estão expostas, fato este responsável, geralmente, uma elevação do potencial osmótico do meio (LÄUCHILI e EPSTEIN, 1990).

O estresse salino induz a uma série de respostas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas que dependem de processos moleculares. Essas respostas variam amplamente dependendo do genótipo e da fase fisiológica da planta. Enquanto algumas espécies apresentam elevada tolerância à salinidade. Enquanto algumas espécies apresentam elevada tolerância à salinidade, outras são altamente susceptíveis. As plantas tolerantes a elevadas concentrações salinas são altamente susceptíveis. As plantas tolerantes a elevadas concentrações salinas são classificadas como halófitas, as quais requerem, para seu ótimo crescimento, elevadas concentrações de eletrólitos (tipicamente  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ). Algumas halófitas apresentam mecanismos de exclusão de  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  que envolvem glândulas secretoras e pelos vesiculares. As glicófitas apresentam redução no crescimento, quanto à salinidade supera 10 mM, enquanto que as halófitas crescem em ambientes, nos quais a concentração salina varia de 50 a 500 mM (ORCUTT e NILSEN, 2000). Vale salientar que a maioria das plantas cultivadas é glicófitas, com algumas poucas exceções, como o algodão e a tamareira.

De uma maneira geral, o estresse salino restringe o crescimento das plantas e níveis excessivamente elevados de salinidade causam necrose das células, tanto do sistema radicular, quanto da parte aérea. A manutenção do estresse e este conjunto de danos permanentes podem resultar na morte da planta.

O modelo bifásico de redução do crescimento, proposto por Munns e Termmat, identifica a diminuição do potencial osmótico como o primeiro fator de redução do crescimento e o efeito específico dos íons, como o segundo (MUNNS, 2002). Na primeira fase, o crescimento da planta é afetado pelos sais que estão no exterior da mesma e é regulado por sinalização proveniente da raiz, sobretudo pelo ácido abscísico (ABA). A segunda fase caracteriza-se pela redução do crescimento resultante do acúmulo de sais no interior da planta. A causa desta injúria é função da elevada quantidade de sal absorvida, que ultrapassa a

capacidade da planta de compartimentalizá-lo no vacúolo. Conseqüentemente, a concentração de sais aumenta no citoplasma e inibe a atividade de enzimas de várias rotas metabólicas (WILLADINO et al. 2004). Alternativamente à compartimentalização no vacúolo, os sais podem ser transportados para a parede celulares o que resulta, por sua vez, na desidratação da célula (MUHLING e LAUCHLI, 2002).

### **2.2.1 Efeitos osmóticos**

A presença de sais em excesso na solução do solo aumenta o potencial osmótico, podendo atingir limites em que a força de absorção das raízes são insuficientes para a absorção de água pelas plantas, ficando as mesmas incapacitadas de se desenvolverem ou mesmo de sobreviverem (MALAVOLTA et al. 2000).

Segundo Menguel e Kirkby (1987), as células do tecido radicular das plantas, sob condições salinas, não conseguem absorver água do substrato ou processam este mecanismo de forma deficiente, devido à inibição osmótica imposta pela elevada concentração de sais.

Algumas diferenças em relação ao crescimento das plantas, quando se faz comparação entre sais, indicam que além do efeito osmótico, ocorre também efeito iônico específico. Estudos realizados por Santos et al. (2007), mostram que os sais NaCl, Ca Cl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Ca<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O e Mg SO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O nas concentrações de 50, 100, 150, e 200 mmol.L<sup>-1</sup> prejudicaram a germinação de quatro espécies de gramínea.

Algumas espécies, entretanto, possuem mecanismo natural de defesa chamado de ajustamento osmótico, sendo capazes de promover aumento de seu potencial interno pela produção de ácidos orgânicos e açúcares (BENINCASA, 2003). Apesar de algumas espécies possuírem este mecanismo, o fato é que isso pode refletir de forma negativa, em relação ao desenvolvimento final da planta, já que parte desta energia é consumida durante esse mecanismo (DAKER, 1988)

Os solutos compatíveis, acumulados de forma proporcional às variações do potencial osmótico do meio, reduzem o potencial hídrico da planta, garantindo o fluxo contínuo da água no sistema solo da planta atmosfera. Essa redução no potencial hídrico, ou ajuste osmótico ocorre, tanto em halófitas, quanto em glicófitas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). O ajuste osmótico ocorre, através da síntese e acúmulo de solutos orgânicos no citoplasma, lúmen, matriz ou estroma das organelas ( SOARES e MACHADO, 2000; YEO, 1998), os quais equilibram a pressão osmótica dos íons (tipicamente  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) sequestrados no vacúolo. Esses solutos orgânicos são conhecidos como solutos compatíveis, uma vez que não inibem as reações metabólicas normais. Dentre os solutos compatíveis, destacam-se carboidratos, polióis, compostos de amônio quaternário e derivados de aminoácidos (HARNADEZ et al. 2000)

As halófitas utilizam, além de solutos compatíveis, os sais absorvidos do meio (sobretudo  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) para seu ajustamento osmótico. A habilidade de absorver e confinar  $\text{Na}^+$  para reduzir o potencial osmótico da parte aérea facilita a absorção e o transporte de água, reduzindo o custo metabólico decorrente da síntese de osmólitos. A excesso de sais no solo é apenas um dos estresses que as plantas podem estar submetidas, que podem ser bióticos e abióticos.

De acordo com a sua natureza estes estresses podem ser classificados em:

- a) Bióticos, quando resultantes da ação de outros organismos vivos.
- b) Abióticos, quando resultantes de excesso ou déficit de algum fator físico ou químico do meio ambiente. Entre as condições do ambiente que podem resultar em prejuízos à salinidade, luz excessivamente alta ou excessivamente baixa e suprimento inadequado de nutrientes minerais .

O estresse pode se manifestar em vários graus de severidade, com duração variável, combinados ou não, de modo contínuo ou alternados com momentos de normalidade. No que concerne às plantas, para o desenvolvimento da planta deve-se ser levados em consideração estes fatores, e um determinado genótipo pode manifestar resistência, sobrevivendo e, às vezes, até crescendo, mesmo que em maiores taxas; ou o genótipo pode manifestar resistência, sobrevivendo e, às vezes, até crescendo, na mesma idade, mesmo que em

menores taxas; ou o genótipo pode manifestar susceptibilidade, sofrendo redução do crescimento e, dependendo da intensidade do estresse, podemos chegar à morte da planta.(BENINCASA, 2003).

### **2.2.2 Efeito tóxico**

Altas concentrações de sais ao serem acumuladas nos tecidos das plantas, podem causar graves danos e reduzir os rendimentos das culturas, especialmente, àquelas mais sensíveis. Segundo Blaha (2000), estes sais quando absorvidos pelas plantas, podem provocar desbalanceamento nutricional ou efeito tóxico devido à presença em excesso de um ou mais íons causando exemplo bastante comum a toxidez causada por íons sódio, cloreto e boro (FAGERIA, 2002).

### **2.2.3 Efeitos específicos dos íons**

Não existem evidências de adaptação de enzimas a elevadas concentrações de sal, portanto, mecanismos de tolerância, em nível celular, envolvem a manutenção de baixos níveis de sais no citoplasma, através do sequestro desses para o vacúolo (MUNNS et al. 2002). A necessidade de deposição do Na<sup>+</sup> no vacúolo exige consumo energético de bombas protônicas que garantem esta compartimentalização (HARE e CRESS 1997). A presença deste mecanismo em várias espécies é evidenciado pelas elevadas concentrações salinas encontradas em folhas que mantêm seu funcionamento normal com concentrações salinas na ordem de 200 mM concentração que inibe a atividade enzimática *in vitro* (MUHLING, 2002 ).

As elevadas concentrações de íons específicos, sobretudo, Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>, podem provocar desequilíbrio nutricional nas plantas, sendo frequente a deficiência de íons como potássio, cálcio, magnésio, fosfato e nitrato (LAUCHLI e EPSTEIN, 1990). Dentre os efeitos mais estudados, destaca-se a redução das concentrações de K<sup>+</sup> em função do incremento da salinidade, sendo reconhecido como mecanismo de tolerância, de algumas plantas, a capacidade de algumas plantas de absorção seletiva de K<sup>+</sup> associada á extrusão de Na<sup>+</sup>.

Quando a concentração de  $\text{Na}^+$  eleva-se no citoplasma ocorrem alterações na absorção e no metabolismo do  $\text{Ca}^{+2}$ . O  $\text{Na}^+$  substitui o  $\text{Ca}^{+2}$  das membranas celulares, afetando a permeabilidade das mesmas (RENGEL, 1992). Nas paredes celulares, provavelmente, ocorre também este mesmo tipo de substituição (GREENWAY e MUNNS, 2000), resultando na redução de sua elasticidade (LEOPOLD, 2004).

#### **2.2.4 Mecanismos de tolerância à salinidade**

Os mecanismos de tolerância ocorrem em três níveis de organização: nível de planta inteira, nível celular e nível molecular.

Em nível de planta inteira, a tolerância depende da habilidade da planta em controlar o transporte de sal em cinco pontos específicos: 1 - Seletividade no processo de absorção pelas células das raízes; 2 - Carregamento do xilema preferencialmente com  $\text{K}^+$  mais do que com  $\text{Na}^+$ ; caule, pecíolo ou bainhas foliares; 4 - Pequena retranslocação de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  no floema, garantindo a ausência de translocação para tecidos da parte aérea em processo de crescimento e 5 – Excreção de sais através de glândulas ou pelos vesiculares, presentes apenas nas halófitas. A tolerância em glicófitas depende dos três primeiros mecanismos sendo que esses mecanismos sendo que esses mecanismos ocorrem em diferentes graus, em função da espécie e/ou cultivar (MUNNS, 2002).

#### **2.2.5 Solutos compatíveis**

O controle em nível celular baseia-se, como descrito anteriormente, na compartimentalização dos sais no vacúolo, evitando efeitos nocivos ao metabolismo, associado à síntese de solutos compatíveis. A síntese e o acúmulo desses solutos são uma resposta muito frequente das plantas submetidas em baixo potencial osmótico no meio externo. Os solutos compatíveis, além de garantirem o fluxo contínuo de água na planta, atuam como osmoprotetores,

protegendo macromoléculas como proteínas e lipídeos, assim como membranas, substituindo a água na superfície das mesmas e, lipídeos, assim como membranas, substituindo a água na superfície das mesmas e, portanto, favorecendo sua estabilização (TESTER, 2003). Os osmólitos, em geral, são compostos com carga elétrica não muito elevada, polares e altamente solúveis. Dentro os metabólitos que possuem função de osmólitos encontram-se os carboidratos (principalmente trealose, frutose, sacarose e frutanos, polióis (glicerol pinitol, sorbitol, manitol e ornitol), compostos de amônio quaternários ou derivados de aminoácidos (prolina, glicina, glicina, glicina-betaina, etc), e o  $K^+$  (SOARES E MACHADO, 2000). As rotas metabólicas que conduzem à síntese de osmólitos estão conectadas às rotas do metabolismo básico. As enzimas requeridas para essas extensões das rotas metabólicas são induzidas pelo estresse. Apesar da importância aparentemente evidente dos osmólitos, o significado da acumulação desses vários compostos permanece um tema em debate. Numa revisão, Greenway e Munns (2000) tende a um enfoque a favor da visão do osmólito como um dreno de poder redutor resultante de um distúrbio metabólico. O osmólito pode vir a ser mobilizado como fonte de carbono e nitrogênio uma vez que o estresse seja mitigado. Mais recentemente, novos argumentos baseados em análises bioquímicas e moleculares utilizando mutantes ou plantas transformadas vêm sendo introduzidos na discussão. Plantas transformadas que sintetizam e acumulam moderadamente uma variedade de osmólitos mostraram um aumento marginal na capacidade de tolerar o estresse. Os efeitos vistos com um modesto aumento em manitol, frutanos, trealoses, glicina-betaina e com um grande incremento em prolina indicam que a função puramente osmótica, na contribuição à tolerância ao estresse, pode não descrever completamente a função dos osmólitos, isto é, rota que leva à síntese de um osmólito particular pode ser mais importante do que acumulação per se osmólito das células (BOHNERT e SHEN, 1999; NUCCIO et al. 1999). O acúmulo de prolina é um exemplo. Sob estresse, o desequilíbrio entre a captura fotossintética da luz e a utilização do NADPH na fixação do carbono pode alterar o estado redox e levar à fotoinibição. A síntese de prolina, seguindo a ativação transcricional da P5CS (P5C sintetase) dependente de NADPH, poderia atuar como uma válvula protetora por meio da qual a regeneração do  $NADP^+$  proporcionaria o efeito protetor observado (EL-MORSY MILLET, 1996). É provável, também, que haja

mais de uma função para um osmólito em particular e, baseado em experimentos *in vitro*, dentre essas funções, destaca-se o papel na prevenção da produção de radicais livres ou no sequestro de espécies reativas de oxigênio (ROS- íon superóxido, peróxido de hidrogênio e os radicais hidroxila e peroxila) (MUHLING e LAUCHLI, 2002).

Em termos moleculares, uma vez produzidos pela célula, o sinal de estresse deve ativar uma fita de transdução que envia esta mensagem aos fatores de transcrição, ativar uma rota de transdução que envia esta mensagem aos fatores de transcrição, que regulam a expressão dos genes encarregados da resposta ao estresse. A perda do volume e da turgência celular ou a concentração de solutos altera a conformação de proteínas da parede celular e da membrana plasmática da célula vegetal, ativando rotas de transdução de sinais que dão lugar à expressão de determinados genes, transformando assim, o fenômeno físico do deficit hídrico em uma resposta bioquímica (ZHU e ZHENG 2007). Os processos na compreensão da transdução dos sinais indicam que a fosforilação reversível de proteínas tem um papel chave em muitos desses sinais. Ao menos dois tipos de proteínas quinases foram relacionadas em plantas: quinases dependentes de cálcio e quinases ativadas por nitógeno (MAPK). Em *Pisum sativum* (OsMAPK), por exemplo, 47% da sequência é idêntica a HOG ( High Osmolarity Glycerol reponse pathway) que responde ao estresse osmótico e dá lugar à atividade transcricional de genes como GPD1 (glicerol fosfato desidrogenase), implicando na biossíntese e acúmulo de glicerol (RODRÍGUEZ-PÉREZ, 2006). Em *Arabidopsis thaliana* foram identificados alguns elementos da rota metabólica do ABA (AB11, AB12, AB13 e ERA1) e se observou que o gene mutante *abi 1* causa insensibilidade ao ABA em toda a planta e inibe o acúmulo de prolina.

### **2.2.6 Exclusão de sal: homeostase iônica**

A elucidação dos mecanismos pelos quais ocorre a absorção de  $K^+$  e  $Na^+$  é essencial para o entendimento do crescimento da planta e a base funcional de absorção de cátions. Em nível molecular destacam-se os canais iônicos e os transportadores que regulam o movimento de sais através da membrana. Como

não existem transportadores específicos de  $\text{Na}^+$ , esse cátion é absorvido por competição, através de carregadores específicos de  $\text{Na}^+$ , esse cátion é absorvido por competição, por meio de carregadores de  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$  (MAGGIO et al. 2003). O  $\text{Na}^+$  pode também ser absorvido com a utilização de canais de cátion de baixa afinidade, os chamados canais não seletivos.

Existem já descritas seis famílias de genes relacionadas ao transporte de  $\text{K}^+$  e, dentre essas, quatro famílias são fortes candidatas a transportadores de  $\text{Na}^+$  transportadores HKT, transportadores KUP/HAK/KT e os canais CNGC e LCT1 (MAAS, 1990).

Não há evidência de que exista adaptação de enzimas com a presença de elevadas concentrações salinas (MUNNS, 2002), portanto, os mecanismos de tolerância em nível celular envolvem a manutenção do sal fora do citoplasma. O efluxo de  $\text{Na}^+$  do citoplasma ocorre, através do antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  associado a um gradiente de pH formado por meio da membrana (BLUMWALD e POOLE, 2000). Uma ATPase é a principal responsável pelo pH e o gradiente de potencial de membrana encontrado na membrana plasmática. Uma  $\text{H}^+$  - ATPase vacuolar gera um pH potencial de membrana através do tonoplasto. A atividade dessas bombas é necessária para o transporte secundário que resulta no efluxo de íons em plantas sob condições de estresse salina. O efluxo de  $\text{Na}^+$  do citoplasma é mediado por um produto de gene SOS1 (Salt Overly Sensitive1), que funciona como um transportador  $\text{Na}^+ = \text{H}^+$  do tipo antiporte. A compartimentalização vacuolar de  $\text{Na}^+$  resulta, em parte, da atividade de uma família de transportadores  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  do tipo antiporte, tal como o AtNHX1 identificado em *Arabidopsis*. Indivíduos transgênicos de *Arabidopsis*, com super expressão do gene que codifica AtNHX1, exibem acentuada tolerância ao sal (APSE et al. 1999).

Os mecanismos de absorção e extrusão de  $\text{Na}^+$  atuam simultaneamente e definem o grau de sensibilidade da planta à salinidade, Essas e várias outras evidências sugerem que a tolerância à salinidade é um carácter multigênico. Pesquisas em fisiologia da tolerância à salinidade sugerem a existência de vários sub-caracteres, os quais, por sua vez, podem ser um número específico genes (FLOWERS et al. 2007).

### **2.2.7 Tolerância das plantas à salinidade**



Existe uma grande variedade em termo de comportamento entre as culturas, em relação aos limites de tolerância à salinidade (AYERS e WESTCOT, 1999). Dentro de uma mesma espécie, pode haver variações entre genótipos e ainda, para um mesmo genótipo, o nível de tolerância pode variar entre fases de desenvolvimento (MAAS e HOFFMAN, 1977; MAAS, 1990). Todavia, a maioria das espécies é relativamente sensível à salinidade e quase todas as culturas são incapazes de tolerar condições permanentes de salinidade no solo (KRAMER e BOYER, 1995).

As halófitas, por exemplo, são plantas consideradas tolerantes à salinidade podem suportar cerca de até  $36\text{g} / \text{L}^{-1}$  ( $\text{CE} = 48,00 \text{ dS m}^{-1}$ ) em cloreto de sódio equivalente aproximadamente, mais da metade de concentração média da água no mar varia de  $30$  a  $45\text{g} / \text{L}^{-1}$ . O acúmulo de sais baixo potencial da água no solo faz com que estas espécies sejam capazes de tolerar níveis elevados de cloreto de sódio. Esta habilidade permite a estas plantas manter concentração salina no citoplasma em níveis moderados, permitindo a realização dos mecanismos enzimáticos, metabólicos e de hidratação de proteínas em nível celular (LIMA et al. 1997).

Ao contrário das plantas tolerantes, as espécies sensíveis tendem, em geral, a eliminar os sais no processo de absorção do substrato e, por não possuírem a capacidade de realizar o ajustamento osmótico, acabam sendo submetidas ao decréscimo de turgor, sofrendo assim, com o estresse hídrico provocado pelo processo de osmose (LIMA et al. 1997).

A tolerância de algumas espécies à salinidade é muito heterogêneo, pode variar oito ou mais vezes em relação a outros, além do fato de que dentro de uma mesma espécie possa existir ampla variação entre cultivares a fases fenológicas. A variação dessa tolerância relativa permite a ampliação do uso de águas de salinidade moderada e possibilita aumentar a faixa aceitável de água salinas para fins de irrigação. Na Tabela 1 estão contidos os valores de salinidade limiar para algumas espécies de plantas (AYERS e WESTCOT, 1991).

**Tabela 1.** Valores de salinidade limiar para algumas culturas.

Cultura	CEes ( $\text{dS m}^{-1}$ )	Cultura	CEes ( $\text{dS m}^{-1}$ )
Abacate	1,3	Feijão fava	1,6
Abobrinha	3,2	Laranja	1,7

Alface	1,3	Limão	1,7
Algodão	7,7	Melão	2,2
Amendoim	3,2	Milho	1,7
Arroz	3,0	Morango	1,0
Batata	1,7	Nabo	0,9
Batata-doce	1,5	Pimentão	1,5
Beterraba	4,0	Rabanete	1,2
Brócolis	2,,8	Repolho	1,8
Cana-de-açúcar	1,7	Soja	5,0
Cebola	1,0	Sorgo	4,0
Couve flor	2,5	Tomate	2,5
Espinafre	2,0	Pepino	2,5
Feijão	1,0	Vagem	1,5
Mamona	2,2	Uva	1,5

Fonte: Ayers e Westcot (1991)

### 2.2.8 Salinidade e nutrição mineral

O estresse salino em plantas pode ser decorrente do uso de água salinas ou sódicas e podem promover a redução do crescimento e / ou do desenvolvimento das plantas. O processo de salinização e seu desenvolvimento dos solos é comum nas regiões áridas e semi-áridas, e se dá pelo acúmulo predominante dos cátions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  e dos ânions  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ . Nessas regiões, é também comum a ocorrência de fontes de água com elevadas concentrações de sais e com elevadas concentrações de sódio, dois fatores que reduzem a qualidade desse recurso para utilização na agricultura. Como consequência desse processo tem-se a perda da capacidade produtiva dos solos e enormes prejuízos sócio-econômicos, (OPENSHAW, 2000).

As interações iônicas que afetam a disponibilidade, absorção e transporte de nutrientes são altamente complexas mesmo na ausência de salinidade e de outros estresses. A salinidade adiciona um novo nível de complexidade para a nutrição mineral das culturas, afetando atividade dos íons em solução e os processos de absorção, transporte, assimilação e distribuição. Essa complexidade é explicada pelas diferenças na concentração e na composição iônica dos meios salinos aos quais as plantas são submetidas, pelo número de nutrientes essenciais envolvidos e pelas diferentes respostas das plantas tanto em relação à salinidade como em relação à eficiência na aquisição de minerais do solo. Isso gera uma gama de interação que não podem ser facilmente explicadas. As dificuldades na interpretação dos resultados são aumentadas em face das

diferentes condições de cultivo utilizadas, do tempo de exposição ao estresse e do tipo tecido amostrado (FAHY et al. 2004).

Os resultados mais prováveis dos efeitos da salinidade na nutrição mineral podem ser a redução no crescimento e as alterações na qualidade do produto vegetal, como aumento no grau brix de frutos, acúmulo excessivo de sais em plantas forrageiras, acúmulo de nitrato (redução na assimilação do N) e de outros nutrientes, alterações na forma e no tamanho de frutos e redução na concentração de  $K^+$ . Por outro lado, é possível sugerir que a redução no crescimento e produtividade das plantas em meios salinos pode reduzir o requerimento de alguns nutrientes essenciais, ou seja, a quantidade de fertilizantes requerida por plantas cultivadas em solos não salinos. Isso pode acarretar a contaminação do lençol freático, visto que menor quantidade de nutrientes será absorvida e maior quantidade ficará disponível para lixiviação. Todos esses efeitos reforçam a necessidade de estudos sobre a nutrição mineral de plantas em áreas salinas, (FAGERIA, 2002).

### **2.2.9 Nutrição mineral e crescimento de plantas em ambientes salinos**

De acordo com a maioria dos autores, a salinidade reduz o crescimento das plantas em decorrência dos efeitos osmóticos, tóxicos e nutricionais. No entanto, alguns estudos mais específicos têm mostrado que a redução no crescimento é inicialmente afetada pelos efeitos osmóticos e posteriormente pelo acúmulo excessivo de íons tóxicos (MUNNS, 2002). Na verdade, a separação dos componentes do estresse salino não é fácil e, embora seja óbvio que o excesso de determinados íons influencia na aquisição de nutrientes pela planta, não se sabe, com certeza, se as alterações nos teores de nutrientes minerais contribuem para a redução no crescimento associada à salinidade, ou se são meras consequências da redução no crescimento.

Se partirmos da premissa de que a redução no crescimento é afetada pelos componentes osmóticos e tóxicos de estresse salino, então poderíamos sugerir que a redução na aquisição de minerais essenciais poderia ser apenas uma consequência do menor requerimento. Nesse caso, as plantas poderiam restringir a aquisição e o acúmulo de determinados elementos essenciais, reduzindo a atividade ou a expressão dos sistemas específicos de absorção. Nesse aspecto, a

redução na aquisição de alguns elementos minerais essenciais poderia representar um ajuste, visto que os sistemas de assimilação poderiam não estar funcionando adequadamente.

### **2.3.0 Avaliação do estado nutricional**

Na maioria das vezes, a folha é o órgão da planta onde as alterações fisiológicas devidas a distúrbios nutricionais se tornam mais evidentes. Por essa razão, quase sempre os diagnósticos nutricionais das plantas são feitos através das folhas pela técnica que, de forma ampla, se denomina como diagnose foliar. A diagnose foliar pode ser feita por meio da observação visual de sintomas de distúrbios nutricionais - diagnose visual ou através de procedimentos mais sofisticados que envolvem a análise química das folhas, Malavolta et al.(2000).

Em ambos os casos há necessidade de serem observados determinados princípios para que os resultados possam ser devidamente interpretados para garantirem recomendações apropriadas com resultado econômico para os produtores, Malavolta et al.(2000).

Os sintomas visuais são manifestações exteriores de eventos bioquímicos que ocorrem em nível molecular, celular e nos tecidos vegetais. Isso permite que os sintomas de deficiência ou excessos sejam reproduzíveis mesmo em espécies de plantas diferentes, uma vez que os processos bioquímicos exercem sempre funções específicas (MALAVOLTA et al. 2000). É evidente que há diferença de comportamento entre espécies, nem sempre havendo manifestação de sintomas de todos os nutrientes. Há espécies que são comuns deficiências de alguns nutrientes, enquanto em outras, os mesmos não se manifestam.

Segundo Malavolta et al.(2000), de forma bastante simplificada, os sintomas de deficiência mais comuns podem ser descritos como segue:

**Nitrogênio** - O principal indício da deficiência é uma coloração verde amarelada pálida nas folhas. A folha depois se torna amarela. Há redução no tamanho das folhas, menor crescimento das árvores que se tornam raquíticas.

**Fósforo** - Plantas pouco desenvolvidas, caules finos e pequeno número de folhas. As folhas deficientes apresentam um bronzeamento na parte inferior restrito em geral à metade distal da folha.

**Potássio** - Folhas com margens cloróticas que em seguida secam e tornam-se necróticas. A necrose progride para o centro das folhas.

**Magnésio** - Desenvolvimento de clorose nas regiões entre as nervuras. A clorose pode se espalhar para dentro das folhas, a partir das bordas formando uma espécie de espinha de peixe.

**Boro** - As folhas ficam retorcidas, coloração brilhante com nervuras aparentemente mais largas. Em plantas não ramificadas, não há diferenciação de lançamentos, formando o que se chama de escova de garrafa. Pode haver morte de gemas.

**Cobre** - Secamento da extremidade e depois das margens das folhas. Ocorre desfoliação precoce, a gema terminal morre e novos brotos laterais se desenvolvem.

**Zinco** - A lâmina foliar fica muito reduzida em relação ao seu comprimento. Há redução do tamanho dos internódios com a formação de tufos terminais de folhas tipo roseta.

**Ferro**- Os sintomas de deficiência ocorrem nas folhas mais novas, que se tornam de cor verde-amarelada ou amarelo-parda e com as nervuras principal e secundárias permanecem verdes, podendo ocorrer, ainda, a queda dessas folhas. No entanto, a exigência da bananeira quanto a esse micronutriente é muito pequena.

**Manganês**- Os sintomas de carência iniciam-se com uma clorose nas folhas II, III e IV e depois nas mais novas e mais velhas, com um amarelecimento das margens, que progride para a nervura principal, permanecendo verdes os espaços internervais, levando a morte prematura das folhas e, inclusive, a perdas elevadas na produção no caso de deficiência severa, causada, muitas vezes, pelo

excesso no uso da calagem ou quando da presença de solos com alto teor de matéria orgânica.

**Molibdênio-** O molibdênio é necessário para a formação da enzima nitrato redutase, que reduz o nitrato a amônio dentro da planta, O molibdênio intervém ainda, no metabolismo do fósforo. Ao contrário do que ocorre com o boro, ferro, cobre e zinco, a disponibilidade de molibdênio aumenta, à medida que se eleva o pH do solo.

**Cloro-** Em excesso provoca clorose e necrose foliar. A carência de cloro reduz o crescimento vegetal em mais de 50 % e provoca o aparecimento de folhas murchas por clorose e necrose, bem como o atrofiamento das raízes. Inicialmente, os sintomas acentuam-se nas zonas mais velhas das plantas. A carência de cloro é raríssima.

### 2.3.1 Vitrificação

As técnicas de criopreservação desenvolvidas mais recentemente, se baseiam na vitrificação. Vitrificação ou formação do estado vítreo é o processo através do qual a água sofre uma transição da fase líquida para o estado sólido amorfo e meta-estável (FAHY et al. 2004).

A vitrificação do citoplasma é obtida, experimentalmente, por meio da desidratação dos tecidos para um teor de umidade em que não existe água livre para a cristalização, antes de mergulhá-lo em nitrogênio líquido. Assim, a solução celular torna-se muito concentrada e pode passar pela transição de vitrificação quando a velocidade de congelamento apropriada for utilizada evitando, desse modo, a formação de gelo durante a exposição em temperatura subzero.

Vieira (2000) enfatiza que a desidratação pode ser obtida por evaporação da água ou por tratamento com uma solução altamente concentrada de crioprotetores químicos (solução de vitrificação) como o dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, glicerol, etileno glicol, propileno glicol, dentre outros. Primeiro, utilizam-se soluções com baixas concentrações para que haja entrada dos componentes permeáveis na célula e, em seguida, soluções concentradas de crioprotetores, para promover a vitrificação, para só então se transferir os frascos para o

nitrogênio líquido; entretanto, esses crioprotetores podem causar citotoxicidade e estresse osmótico, levando à morte das células ou modificando sua resposta morfo genética em cultura (KARTHA et al. 2000). Mais recentemente, açúcares, como a sacarose, trealose e glucose têm sido utilizados como substâncias crioprotetoras, porque elas são excelentes agentes vitrificadores e, além disto, não apresentam toxicidade para as células vegetais, nem mesmo quando se acumulam em grande quantidade, no citoplasma (WITHERS, 1991; YAMADA, 1993; DUMET et al. 1994). Açúcares mostram alta eficiência na estabilização das membranas celulares durante o congelamento, em comparação com os crioprotetores tradicionais. Seu efeito protetor está supostamente associado à vitrificação das membranas celulares no citoplasma (LEOPOLD, 2004; KOSTER, 1991), porém, o modo de ação dos açúcares na aquisição da tolerância à desidratação e ao congelamento ainda não é totalmente conhecido e uma correlação direta de causa e efeito também não foi demonstrada.

Em algumas situações, a imersão em nitrogênio líquido pode ser direta, desde que os ápices caulinares sejam pré-tratados em solução osmótica de concentração moderada, uma vez que a desidratação é necessária, antes de haver a vitrificação. Alternativamente, em uma estratégia relativamente nova, usa-se a desidratação celular pelo choque osmótico, com soluções muito concentradas e, depois, elas são mergulhadas diretamente dentro do nitrogênio líquido induzindo a vitrificação da suspensão celular eliminando, deste modo, a necessidade de se usar congeladores programáveis (SAKAI et al. 1991). Este método de vitrificação requer, usualmente, um período de pré-cultura em sequência, promovendo o endurecimento das células para resistir ao choque osmótico e alcançar altas taxas de sobrevivência, após congelamento. No entanto, o uso de aditivos osmoticamente ativos no meio de pré-cultura, é muito comum, as respostas para isto são variáveis entre espécies e os processos fisiológicos na relação para o endurecimento da célula não têm sido ainda investigado inteiramente.

### **2.3.2 Dessecação**

Como alternativa a vitrificação tem-se a desidratação celular induzida pelo congelamento antes da imersão em nitrogênio líquido, Dereuddre et al. (1990)

propuseram o processo de encapsulamento-dessecação, que se baseia na tecnologia desenvolvida para a produção de sementes artificiais, sendo possível, então, criopreservar ápices ou embriões somáticos encapsulados em alginato de sódio (3 a 5 mm), as quais são pré-cultivadas em um meio contendo altos níveis de sacarose (0,5 a 0,7 M) sob agitação, *overnight* (etapa de desidratação), desidratadas por exposição ao ar da câmara de fluxo laminar ou com sílica gel, colocadas em ampolas, imersos diretamente em nitrogênio líquido e lentamente descongelados. Há registros de coleções de gemas apicais e brotos encapsulados de pereira (*Pirus* spp.) (SCOTTEZ et al. 1992), batata-inglesa (*Solanum tuberosum* L.) (FABRE e DEREUDDRE, 1990), videira (*Vitis* spp.) (SAKAI, 1997) e embriões somáticos de cenoura (*Daucus carota* L.) (DEREUDDRE et al. 1991).

Dessecação oferece várias vantagens sobre as técnicas de criopreservação convencionais de congelamento lento, por exemplo, facilidade de manuseio de explantes de dimensões reduzidas, simplificação do meio crioprotetor, eliminação dos congeladores programáveis, sobrevivência independente da velocidade de congelamento e aumento no tamanho de explantes que sobrevivem à exposição ao nitrogênio líquido (BACHIRI et al. 1995). O encapsulamento protege a estrutura embebida e a torna resistente a tratamentos, que poderiam ser letais (PAULET et al. 1993).

### **2.3.3 Fatores que Afetam a Sobrevivência à Criopreservação**

O grande desafio para o criobiologista é realizar um congelamento sem a formação de cristais de gelo no interior das células. A formação de gelo no meio intracelular causa ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da semipermeabilidade e da compartimentação celular e, como consequência, as células entram em colapso e morrem (SANTOS, 2002).

Segundo Engelmann et al. (1997), a sobrevivência e a regeneração de material criopreservado dependem de numerosos fatores tais como: tamanho e estágio de desenvolvimento do material, desidratação, congelamento, descongelamento e regeneração. Os vários tecidos de uma planta apresentam diferentes níveis de tolerância à desidratação e isto resulta em sensibilidade diferente à exposição ao nitrogênio líquido. De modo geral, estruturas de tamanho



reduzido são mais apropriadas para o congelamento, uma vez que a desidratação e congelamento ocorrem de forma mais rápida e uniforme em estruturas menores. Material juvenil em estágio meristemático é mais apropriado porque suas células são pequenas e contêm citoplasma denso com poucos vacúolos contendo pouca água (ENGELMANN, 1991). Amostras podem ser coletadas de plantas produzidas *in vivo* ou *in vitro*, contudo, material produzido *in vitro* tem preferência em muitos casos porque os explantes já estão em condição asséptica e podem estar também, livres de patógenos.

Segundo Toribio e Celestino (2000), mais de quarenta gêneros e sessenta espécies de plantas lenhosas têm sido objeto, nos últimos dez anos, de intensos estudos para se obter protocolos viáveis de criopreservação. O passo mais crítico para obter um protocolo viável é reduzir o conteúdo de umidade do material a conservar e/ou evitar a formação de cristais de gelo. Em geral, as sementes, os embriões e os eixos embrionários se criopreservam, previamente à desidratação por ar. Os ápices e meristemas são submetidos a um processo de vitrificação, os calos e cultivos em suspensão se tratam com um processo em dois passos ou vitrificação. Stushnoff e Seufferheld (1995) esclarecem que a capacidade de tecidos vegetais sobreviverem à criopreservação depende da sua tolerância à desidratação e à temperatura do nitrogênio líquido. Por isso, o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação requer conhecimentos de mecanismos bioquímicos e biofísicos associados com a resposta dos tecidos à desidratação e ao congelamento.

#### **2.3.4 Desidratação**

As injúrias mecânicas sofridas pelas células durante a criopreservação advêm de dois fenômenos: o comportamento peculiar da água, que se expande ao congelar-se e a conformação dos cristais de gelo (VERTUCCI e FERRANT, 1995). Entretanto, evitar a formação desses cristais não é uma tarefa fácil, porque os sistemas experimentais usados na criopreservação (calos, embriões zigóticos e somáticos, gemas apicais e laterais, sementes e suspensões celulares) são sistemas hidratados com altos teores de água nas células, necessitando, portanto, que a água seja removida. Entretanto, a desidratação que, a princípio, parece uma solução simples, é uma etapa crítica, uma vez que a água tem muitas

funções biológicas nas células de organismos vivos, por ser um importante solvente, meio de transporte, resfriador (através da evaporação), um constituinte essencial e estabilizador da estrutura das macromoléculas e organelas (KRAMER e BOYER, 1995; VERTUCCI e FARRANT, 1995). Quando a água é removida das células, os solutos tornam-se mais concentrados, possivelmente aumentando a taxa de reações químicas destrutivas; alguns solutos podem cristalizar-se, mudando o potencial iônico e o pH da solução intracelular, alterando assim o *status* metabólico da célula (KRAMER e BOYER, 1995). Portanto, o sucesso de um protocolo de criopreservação depende da desidratação para um teor de água que seja baixo, o suficiente, para evitar a formação de gelo intracelular, mas não tão reduzido que cause injúria por desidratação.

### **2.3.5 Congelamento**

As injúrias causadas pelo congelamento são complexas, podendo ocorrer devido à desidratação excessiva ou à formação de gelo dentro das células. Nesses casos, ocorrerá rompimento das membranas, concentração de solutos no citoplasma em níveis tóxicos e desnaturação de ácidos nucléicos e membranas. Formação de gelo e as injúrias a ele associadas ocorrem de modo diferente, dependendo da espécie vegetal, estado de tolerância ao congelamento e as condições de congelamento. Portanto, a morte da célula é causada mais, provavelmente, por numerosos fatores em vez de um único mecanismo (SAKAI e LARCHER, 1987). Entretanto, parece ser um consenso geral que, injúria decorrente de congelamento é primariamente uma consequência de alterações na semipermeabilidade ou lises da membrana plasmática, resultando de desidratação induzida pelo congelamento (STEPONKUS, 2004). Isto é, o dano mais significativo causado pelo congelamento às células vivas está relacionado a déficit hídrico.

A membrana plasmática tem um papel central no comportamento celular durante os ciclos de congelamento/descongelamento. Embora todas as membranas celulares sejam vulneráveis à desestabilização induzida por congelamento, a membrana plasmática é da maior importância por ser a principal interface entre o meio extracelular e o citoplasma, agindo como uma barreira semipermeável e permitindo efluxo/influxo de água durante o ciclo de

congelamento/descongelamento (UEMURA e STEPONKUS, 1994). A membrana celular também previne a inoculação de gelo extracelular na solução intracelular. Portanto, a sobrevivência da célula durante o ciclo de congelamento/descongelamento é, essencialmente, uma consequência da estabilidade da membrana plasmática.

### **2.3.6 Descongelamento**

Semelhante ao que ocorre no congelamento, durante o descongelamento, também poderá ocorrer formação de cristais de gelo e, em consequência, as células podem ser danificadas pelos mesmos mecanismos já discutidos anteriormente. Segundo Santos (2000), o descongelamento rápido por imersão em água ou meio de cultura líquido a 35 – 40°C tem garantido melhores resultados. Nesta faixa de temperatura o descongelamento é rápido o bastante para evitar a fusão de micro-cristais formados no congelamento ou a formação de novos cristais pela água liberada pela vitrificação.

Há controvérsias quanto à velocidade de congelamento e descongelamento adequada para garantir a integridade do material quando exposto ao nitrogênio líquido. Stanwood e Bass (1981) sugerem que o congelamento rápido tende a promover um resfriamento mais uniforme de água subcelular e o descongelamento lento evita danos nos tecidos e células das sementes. Em contraste, Dumet e Benson (2000) propõem que o congelamento rápido resulte em formação de cristais de gelo intracelulares, o que é letal para as células e os tecidos das sementes. Por outro lado, o congelamento lento resulta em danos ou morte celular, porque ocorre uma desidratação osmótica extrema, quando a água intracelular movimenta-se para fora da célula compensando a água congelada dos componentes extracelulares.

### **2.3.7 Regeneração**

Para garantir o sucesso do protocolo de crioproteção, é necessário que o processo de regeneração propicie a recuperação da maior quantidade de células

vivas e que induza à formação de uma nova planta. Withers (1980) reforça afirmando que a cultura de tecidos de plantas *in vitro* pode contribuir em todas as etapas do processo de conservação de germoplasma, incluindo coleta, indexação para doenças, quarentena, multiplicação, caracterização, avaliação, armazenamento e distribuição.

A cultura de tecidos tem se tornado importante para o manejo das plantas cultivadas, principalmente na limpeza clonal e multiplicação de espécies herbáceas e arbustivas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). O método é aplicado na produção massa, economizando tempo e espaço; e obtenção de indivíduos com características genéticas idênticas à matriz ou favorecendo a variabilidade genética (OLIVEIRA et al. 1991). Avanços mais recentes incluem sua aplicação em espécies recalcitrantes (MOLINA e SCHOBERT, 1996) e medição do crescimento rítmico com base na época de excisão e posição da gema (EL-MORSY e MILLET, 1996).

Métodos de avaliação por coloração, tais como, teste de tetrazólio e de diacetato de fluorescência têm sido usados para avaliar a viabilidade de sementes, tecidos e células congeladas. É oportuno mencionar que estes métodos podem dar informação incorreta sobre a viabilidade. Células podem dar reação de coloração positiva imediatamente depois do descongelamento, mas eventualmente morrem em cultura. Em outros casos, células que foram parcialmente danificadas pelo congelamento e estão em estado de choque dão reação de coloração negativa, mas se recuperam e retomam crescimento após uma fase de repouso (BAJAJ, 1995). As células podem também apresentar coloração inadequada quando comparadas com controles, não sendo possível definir sua viabilidade. Portanto, a única evidência inquestionável da viabilidade do material submetido ao congelamento em nitrogênio líquido é a retomada do crescimento e a regeneração de um novo indivíduo.

### **2.3.8 Criopreservação de Espécies Vegetais**

O material mais apropriado para criopreservar é o de espécies que se propagam vegetativamente, podendo interessar a conservação de clones específicos com características de interesse. No caso de genótipos de álamo branco (*Populus Alba* L.), em que se desenvolveu um protocolo de

criopreservação de gemas axilares, utilizando a técnica de vitrificação, foram alcançadas porcentagens de sobrevivência de 90% (CACCAVALE et al. 1998). No entanto, Reed et al. (1998) de posse de diferentes genótipos de pera (*Pyrus L.*), submeteram seus ápices à criopreservação, através do método do congelamento lento ( $0,1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até  $-40^{\circ}\text{C}$ ) associado ao pré-tratamento com os crioprotetores DMSO a 5% por 48 horas e 1 mL de PGD (10% de polietileno glicol + 10% de glicose + 10% de DMSO), adicionado gradualmente em 30 minutos no interior de criotubos de 1 - 2 mL contendo 0,25 mL de meio líquido e então submetidos ao nitrogênio líquido, alcançando, após descongelamento, boa recuperação (>40%) em 61% dos genótipos avaliados.

Nem sempre a taxa de sobrevivência de explantes criopreservados coincide com sua capacidade de garantir regeneração. Vandebussche et al. (2000), empregando ápices de beterraba (*Beta vulgaris L.*), utilizaram-se do protocolo de vitrificação para criopreservação daqueles explantes, os quais foram pré-cultivados por 24 horas em meio com 0,3 M de sacarose ( $5^{\circ}\text{C}$ ) e, em seguida, mergulhados por 20 minutos em uma solução mista de 2 M de glicerol e 0,4 M de sacarose ( $20^{\circ}\text{C}$ ) e desidratados com PVS2 ( $0^{\circ}\text{C}$ ) por 20 minutos, prévio à imersão em nitrogênio líquido, obtendo taxas de sobrevivência na ordem de 60 a 100%, dependendo do clone empregado, no entanto, apenas 10 a 50% dos ápices conseguiram dar prosseguimento à regeneração. Já Gonçalves et al. (2009) criopreservando embriões imaturos de milho, após tratamento com DMSO (5 e 10%) e/ou glicerol (5%) durante 15 minutos ou 1 hora, empregando o congelamento lento, não obtiveram regeneração, depois do descongelamento em banho com água a  $40^{\circ}\text{C}$  ou pela secagem em ar a  $45^{\circ}\text{C}$ , por aproximadamente 1 minuto.

Na vitrificação, o crioprotetor empregado, isolado ou associado, assim como sua concentração, dependendo do explante empregado, pode influenciar na capacidade de regeneração após criopreservação. Uemura e Sakai (1980) avaliando a criopreservação de ápices de cravo (*Dianthus caryophyllus L.*), empregando o método da vitrificação com diferentes agentes crioprotetores, obtiveram elevada capacidade de regeneração, quando o DMSO foi empregado isolado ou associado com 5% de glicose, sacarose ou sorbitol. Kartha et al. (1979) avaliaram a criopreservação de meristemas de ervilha (*Pisum sativum L.*), através do seu pré-cultivo na presença de 5% de DMSO por 48 horas, obtendo

elevada sobrevivência (70%) quando submetidos a uma taxa de congelamento de  $0,6^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , após 1 hora em nitrogênio líquido.

Em estudos desenvolvidos por González-Benito et al. (1998) na obtenção de protocolos para espécies com sementes recalcitrantes, como é o caso do *Quercus* spp., buscou-se recuperar o crescimento de eixos embrionários de *Q. suber* e *Q. ilex* encapsulados em gotas de alginato. Na espécie tropical mutamba (*Guazuma critina* Mart.), obteve-se recuperação, através da imersão em nitrogênio líquido de explantes consistentes em agrupamentos de gemas adventícias, mediante tratamento prévio de vitrificação (MARUYAMA et al. 1989).

Avaliando a dessecação e criopreservação na germinação de sementes de diferentes cultivares de algodoeiro, González-Benito et al. (1998), verificaram que a germinação não foi afetada por nenhum dos tratamentos nas cultivares CNPA 5M e CNPA Precoce 1 e Coker 312; contudo, a viabilidade das sementes das cultivares CNPA 5M e CNPA Precoce 2 foi reduzida quando dessecadas e o teor de umidade baixou de 9,8 e 15,6% para 2,8 e 3%, respectivamente. Rocha (2004) avaliando o teor de água limite para a criopreservação de sementes de algodoeiro das cultivares BRS Verde, BRS 200, 6M Mocó e BRS 187-8H, concluiu estar entre 6 e 8% com base no peso fresco.

Almeida et al. (2002) avaliaram a criopreservação de sementes de mamona das variedades BRS Nordestina e pernambucana, afirmando estarem entre 4 a 10% do nível máximo de umidade para criopreservação e que, nesta faixa de umidade, as sementes de mamona podem ser mantidas tanto no vapor ( $-176^{\circ}\text{C}$ ) como na imersão ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) em nitrogênio líquido, sem afetar sua viabilidade.

Vários protocolos de criopreservação foram desenvolvidos para embriões zigóticos de um grande número de espécies, dentre as quais muitas são sementes recalcitrantes armazenadas. Isto não é o caso dos embriões somáticos, para os quais apenas um limitado número de estudos foram realizados até agora. Pesquisas realizadas na criopreservação de embriões abrangem na maior parte aspectos metodológicos e apenas uma limitada quantidade de trabalhos com o conhecimento dos mecanismos biológicos em relação à criopreservação. Vários métodos são empregados para o congelamento de embriões (ENGELMANN, 1997). Protocolos clássicos, incluindo pré-cultivo com crioprotetores e resfriamento lento, e desidratação (DEREUIDRE et al. 1991) são usadas para embriões somáticos. A maior parte dos embriões somáticos é congelada

rapidamente após dessecação parcial. Finalmente, uma nova técnica de dessecação chamada secagem rápida foi desenvolvida com embriões zigóticos de *Landolphia kirkii* (BERJACK et al. 2000). A secagem rápida é seguida pelo congelamento em taxas intermediárias (VERTUCCI et al. 1991) ou ultra-rápida (WESLEY-SMITHE et al. 1992).

Na atualidade, a criopreservação de eixos embrionários pode ser a metodologia mais apropriada para a conservação a longo prazo da diversidade genética das espécies vegetais, uma vez que os eixos podem resistir a condições que seriam letais para a semente inteira (BERJAK et al. 2000; SANTOS et al. 2002). Segundo Faiad et al. (2004), eixos embrionários podem tolerar teores de umidade por volta de 12% e subsequente congelamento em nitrogênio líquido e serem resgatados, após criopreservação, usando a cultura de tecidos, sendo que deles se originam plantas inteiras.

González-Benito et al. (2004) avaliando a dessecação e criopreservação de embriões de oliva (*Oliva europaea* L.), alcançaram elevada porcentagem de germinação (70%), regenerando plantas morfológicamente uniformes, quando dessecados para um teor de água de 3 - 10% prévio à imersão no nitrogênio líquido.

Eixos embrionários de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) foram bem sucedidamente criopreservados por Rhuntala et al. (1993), após dessecação para teor de água de 7% e tratamento com glicerol a 10%, empregando uma taxa de resfriamento de  $20^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$  até uma temperatura de pré-congelamento de  $-40^{\circ}\text{C}$ , garantindo elevada sobrevivência, após descongelamento rápido por meio da imersão em água a  $38-40^{\circ}\text{C}$  por 1 min.

González-Benito et al. (1998) afirmam que eixos embrionários de algodoeiro das cultivares CNPA Precoce 2 e Coker 312 resistiram a criopreservação quando dessecados por período superior a 30 minutos em sílica gel e alcançaram teor de água igual ou menor do que 19,4%.

## REFERÊNCIAS

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. Campina Grande UFPB, Estudo da FAO irrigação e drenagem v.3 n.1 p.218, 1991.

ALMEIDA, F. A. C.; MORAIS, A. M.; CARVALHO, J. M. F. C.; GOUVEIA, J. P. G. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.6, n.2, p.295-302, 2002.

APSE, M. P.; AHARON, G. S.; SNEDDEN, W. A.; BLUMWALD, E. **Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in Arabidopsis thaliana**. Science , v.85, n.1,1256-1258,1999.

AQUINO, J.; FRANCISCO, A. S.; PEREIRA, F.; AMARAL SOUTO, H. P. A **Forward tracking scheme for solving radionuclide adjective problems in unsaturated porous media**. International Journal of Nuclear Energy Science and Technology, v. 3, n. 2, p. 196–205, 2007.

ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, A. P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista de oleaginosas e fibrosas**, v. 8, n.2 , p. 789-799, 2004.



ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. **Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance**. Environmental and Experimental Botany, v.59, n.1, p.206-216, 2007.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade de água na agricultura**. 2.ed. Campina Grande: UFPB, v.2 , n.1, p. 153, 1999.

BACHIRI, Y.; GAZEAU, C.; HANSZ, F.; MORISSET, C.; DEREUDDRE, J. **Successful cryopreservation of suspension cells by encapsulation-dehydration**. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v.43, n.2, p.241-248,1995.

BAJAJ, Y. P. S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Cryopreservation of plant germplasm I. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, v.32, n.2, 1995. p.3-28.

BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, R. L. S.; QUEIROZ, W. N.; QUEIROZ, W. C. Ecofisiologia. In: AZEVEDO, D. M. P. de; BELTRÃO, N. E. M. (Ed.).O agronegócio da mamona no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília, DF: **Embrapa Informações Tecnológicas**. v.2, n.2, p. 45-72, 2007.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas (noções básicas)**. v.2, n.2, p.23, 2003.

BERJAK, P.; FARRANT, J. M.; MYCOCK, D. J.; PAMMENTER, N. W. Recalcitrant  
BERJAK, P.; WALKER, M.; MYCOCK, D. J.; WESLEY-SMITH, J.; WATT, P.; PAMMENTER, N. W. **Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos**. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application. Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, v.2, n.3, 2000, p.140-155.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds physiology of development and germination**, 2 ed. New York: Plenum press, v.2, n.2, p.445,1999.

BEZERRA, A. M. **Energia Solar: aquecedores de água**. Curitiba: Livraria Itaipu Editora, v.2,n.3, p.34, 1982.

BLAHA, K. P. TRAGER, T. **Hyperfinc**. *Interact.* v.14, n.1, 2000, p. 126-389.

BLUMWALD, E.; POOLE R. J. **Plant Physiol.** v.78 n.2 2000, 163–167.

BOHNERT, H. J.; SHEN, B. Transformation and compatible solutes. **Scientia Horticulturae**. v.78, p.237-260, 1999.

BRAVO, A.; SARABIO S.; LOPEZ L.; ONTIVEROS, H.; BRARCA, C.; ORTIZ, M. **Applied and Environmental Microbiology**, Woshengton, Berlin, v.64 n°12, p.495 – 497, 1998.

BRANDENBURG. W. A; BINDRABAN, P. S; CORRÉ, W. J. Claims an facts on *Jatropha curcas* L. **Plant Research International**, October,Cambridge, v.2, n.2, 2007, 66p.

BRAY, R. C.; SALO, P.T.; LO, I. K. Y.; ACKERMANN, P.; RATTNER, J. B.; HART, D. A. Normal ligament structure, physiology and function. **Sports Medicine Arthroscopy Review, Philadelphia**, Woshengton, v. 13, n.3, p. 127-135, 2000.

BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio. Secretária de Tecnologia Industrial. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais**. Brasília, STI/CIT, 1985, 364p. (Documentos, 16).

CÁCERES, D. R.; PORTAS, A. A.; ABRAMIDES, J. E. **Pinhão- manso** p.200,<  
[HTTP://www.infobibos.com/Artigo/2007\\_3 pinhaomanso](http://www.infobibos.com/Artigo/2007_3_pinhaomanso)> 17 Fev. 2010. acesso  
em: às 13:00 h

CARNIELLI, F. O combustível do futuro. **Boletim Informativo**, Belo Horizonte,  
v.29, n.1413, 2003. Disponível em: <[http://  
www.ufmg.br/boletim/bol1413/quarta.shtml](http://www.ufmg.br/boletim/bol1413/quarta.shtml)>. Acesso em: 20 mar. 2010 às 14:00  
h.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. v.1 Brasília: Embrapa  
Informação Tecnológica; Colombo/PR: Embrapa Florestas, p .1039, 2003.

COIMBRAIA H. S.; SCHUCH L. F. D.; VEITEINHEMER-MENDES M. C. A.;  
MEIRELES M. C. A. *Neorickettsia* (Ehrlichia) *risticii* no Sul do Brasil: *Heleobia* spp  
(Mollusca: Hydrobilidae) e *Parapleurolophocercous cercariae* (Trematoda:  
Digenea) como possíveis vetores. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 72, n. 3, p.  
325-329. 2005.

CRAMER, G. R.; LAUCHLI, A.; POLITO, V. S. **Displacement of Ca<sup>2+</sup> by Na<sup>+</sup>  
from the plasmalemma of root cells**. A primary response to salt stress. *Plant  
Physiology*, Berlin, v. 79, 1985, p. 207-211.

CROFT, B. A.; VAN DE BAAN H. E. **Ecological and genetic factors influencing  
evolution of pesticide resistance in tetranychid and phytoseiid mites**.  
*Expression Aprica Acarol*. Woshengton, v.4: 1998, 277-300.

CRONQUIST. **Antegrados system of classification of flowering plant  
columbium gift university**. Nevo Yuork, Estado Unidos America, v.2 n.1 p.1262,  
1981.

DAKER, A. A **Água na Agricultura: Irrigação e Drenagem**. 6.ed. v.3. Rio de  
Janeiro: Freitas Basto, 1984. 543p.

DAEY OUWENSK; G. FRANCIS, Y. J. FRANKEN. **Position paper on *Jatropha curcas*. State of the art, small and large scale project development.** Expert seminar on *Jatropha curcas* L. Agronomy and genetics, 26-28, March. Wageningen. Published by FACT Foundation v.2, n.3, p.7, 2007.

DELVALLÉE, I.; GUILLAUD, J.; BECKERT, M.; DUMAS, C. **Cryopreservation of immature maize embryos after freeze-hardening in the ear and *in vitro*.** Plant Science, Nevo Yuork , Estado Unidos America v.60, p.129-136, 1991.

DEREUDDRE, J.; BLANDIN, C.; HASSEN, N. Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 1. Effects of preculture. **Cryo-Letters**, Nevo Yuork, Estado Unidos America v.12, p.125-134, 1991.

DEREUDDRE, J.; SCOTTEZ, C.; ARNAUD, Y.; DURON, M. **Résistance d'apex caulinares de vitro-plants de poirier (*Pyrus communis* L. cv beurré Hardy), enrobes dans l'alginate, à une déshydratation puis à une congélation dans l'azote liquide: Effet d'um endurcissement préalable au froid.** Academic science Paris Serial, v.3, n.310, 1990,p. 317-323

DUMET, D. **Cryoconservation des massifs d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) par déshydratation-vitrification.** Etude du rôle du saccharose pendant le prétraitement. Thèse d'Université, Univ. Paris v.6, n.2 p.125, 1994.

DUMET, D.; BENSON, E. E. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. In: EGELMANN, F.; TAKAGI, H. **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application.** Japan International Research Center for Agricultural Science, tsukuba, Japan; International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy (JIRCAS/IPGRI).v.3, n.4, 2000. p. 43-56.

EL-MORSY, A. A., MILLET, B. Rhythmic growth and optimization of micropropagation: the effect of excision time and position of axillary buds on *in vitro* culture of *Citrus aurantium* L. **Annals of Botany**, London, v.78,n.6 p. 197-202, 1996.

EMBRAPA – **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 2008. *Vários*, <http://www.embrapa.br/>, informações da página web em 24 de Abril de 2010, às 12:30 h .

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review. **Euphytica**, London, v.57, n.6, p.227-243, 1991.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation methods. In Biotechnology and Plant Genetic Resources. Conservation and Use, **Ford-Lloyd**, B.V., Newbury, H.J. J.A. Callow, eds., CABI, Wallingford, UK, London, v.4, n.3, p.119-162, 1997.

EPAMIG, ( **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais**). Coletânea sobre pinhão-mansão. Disponível em: <[http://www.epamig.br/index.php?option=com\\_docman&task=cat\\_view&gid=](http://www.epamig.br/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=) espécies reativas de oxigênio. Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas, v.1, n. 1, p. 19, 2008.

FABRE J, DEREUDDRE J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of Solanum shoot-tips. **Cryo-Letters**, Nevo Yuork , Estado Unidos America, v.11, n.4, p.413- 426,1990.

FAGERIA, N. K. **Adubação e nutrição mineral da cultura de arroz**. Rio de Janeiro: Campus, v.2 n.6 p.236-239,2002.

FAHY G.M.; MACFARLANE DR, ANGELL C.A. MERYMAN HT Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, Nevo Yuork , Estado Unidos America v.21 n.67, 407-426, 2004.

FANG, Z.; BOUCOT, A.; COVACEVICH, V.; HERVÉ, F. Late Triassic fossils in the Chonos Metamorphic Complex, southern Chile. **Revista Geológica de Chile**, v. 25, n. 2, p.165-173,1998.

FAO: **Extent and Causes of Salt-affected Soils in Participating Countries**.  
FAO -Land and Plant nutrition management service. Disponível em:  
<http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/topic2.htm#top>. Acesso em: 10 mar. 2010.

FLOWERS, R. M., SHUSTER, D. L., WERNICKE, B. P., and Farley, K. A.,  
**Radiation damage control on apatite (U-Th)/He dates from the Grand Canyon region**, Colorado Plateau: Geology, v. 35,n.21, 2007, p. 447–450.

GOLDENBERG, J. E VILLANUEVA, L. D. **Energia, Meio Ambiente e Desenvolvimento**. Edusp, v.45, n.12, p.25, 2003.

GONÇALVES S. B.; MENDONÇA S.; LAVIOLA, B. G.Substância tóxica, alergênicas e antinutricionais presente no pinhão-mansão e seus derivados e procedimentos adequados ao manuseio. **Circular técnica**, Embrapa.v.1 p.1-7, 2009.

GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; CARVALHO, J. M. F. C.; PÉREZ, C. Effect of desiccation and cryopreservation on the germination of embryonic axes and seeds of cotton. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.1 , p.17-20, 1998.

GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; CLAVERO-RAMÍREZ, I.; LÓPEZ-ARANDA, J .M.  
The use of cryopreservation conservation of vegetatively propagated crops.  
**Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v.2, n.3, p.341-351, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. & CALDAS, L. S. Eds. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília. ABCTP/EMBRAPA-CNPH. 1990. 99-169 p.

GREENWAY, H.; MUNNS. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. Ann. **Revista Plant Physiol**.v.31 2000, p.149-190.

GÜBITZ, G. M. **Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L.** Bioresource Technology, Fayetteville, n.67, p.73-82, 1999.

HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation** v.21, n.2 1997, p.79-102.

HELLER, J. **Physic nut. *Jatropha curcas* L.: promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. 1 ed. Roma: IPGRI, 66 p. 1996.

HERNANDEZ, J.A.; JIMENEZ, A.; MULLINEAUX, P.; SEVILLA, F. **Tolerance of pea (*pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences**. Plant Cell Environmental, v. 23, p. 853–862, 2000.

HOLANDA, J. S.; AMORIM, J. R. A. **Qualidade da água para irrigação**. In **Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada: XXVI Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola**, Campina Grande, UFPB/SBEA, p. 137-169. 1997.

JANUZZI, G. M., SWISHER, J. N. P. **Planejamento integrado de recursos energéticos**. Campinas – SP, Editora Autores Associados,v.12 n.3, p.32,1997.

-----Jatropha world congress 2008.  
<http://www.saudibras.com.br/jatropha.html>.; acessos março 2010, às 24:00h.

JONGSCHAAP R. E.E.; CORRÉ W. J.; BINDRABAN P. S.; BRANDENBURG W. A. LAREN B. V. **The Netherlands: Plant Research International, Wageningen**,

**The Netherlands and Stichting Het Groene Woudt; Claims and Facts on *Jatropha curcas L.*** Global *Jatropha curcas* Evaluation, Breeding and propagation programmer. Reportv.24, n.12, p.158, 2007.

KARTHA, K. K.; LEUNG, N .L.; GAMBORG, O. L. Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration. **Plant Science Letters**, Nevo Yuork, Estado Unidos America v.15, p.7-16, 2000.

KAVI KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI LAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, S. S.; RAO, S.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. **Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance.** Current Science, v.88, n.23, p.424-438, 2005.

KERBAUY, G. B. Fisiologia vegetal. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan S.A**, v.4 p.123-146, 2004.

KOIWA, H.; SHADE, R .E.; ZHU-SALZMAN, K.; D'URZO, M .P.; MURDOCK, L .L.; BRESSAN, R .A.; HASEGAWA, P. M. **A plant defensive cystatin (soyacystatin) targets cathepsin L-like digestive cysteine proteases (DvCALs) in the larval midgut of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*).** FEBS Letts, v.471, n.2, p.67–70, 2008.

KOSTER, K. L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, v.96,n.23, p.302-304, 1991.

LACERDA, L. D.; SILVA, L. F. F.; MARINS, R. V.; MOUNIER, S.; PARAQUETTI, H. H. M.; BENAÏM, J. **Dissolved Hg concentrations and reactivity in mangrove waters from the Itacurussá Experimental Floresta, Brazil.** Wetlands Ecologists. Magnate. v.9, n.4, p.323-331, 2001.



LAUCHILI, A.; EPSTEIN, E. **Mechanisms of salt tolerance in plants**. California Agriculture, Berkely, v.38, n.10, p.18- 21, Oct.1990.

LEOPOLD, A. C. Coping with desiccation. In: ALSCHER, J. G.; CUMMING, J. R. (Eds) **Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**. New York, Wiley-Liss, v.24,n.4, p. 37-56, 2004.

LIMA, J. A. A.; VALE, C. C.; OLIVEIRA, V. B. **Viruses that infect cucurbits in the northeast of Brazil**. **Viruses**: Reviews e Research Journal of the Brazilian Society for Virology, São Paulo, v.2, n.1/2, p.202, nov. 1997.

LYNCH, M. AND CONERY, J. S. **The evolutionary demography of plicate genes**. In Genome Evolution (Meyer, A. and Van de Peer, Y. eds),v.1, n.3, p. 35–44, 2004.

MAAS, E. V. **Crop salt tolerance**. In: Tanji, K. K. (ed.) Agricultural salinity assessment and management manual. New York: ASCE, v.13, n.3, p. 262-304, 1990.

MAAS, E. V.; HOFFMAN, G. J. **Crop salt tolerance assessment**. **Journal of the Irrigation and Drainage Division**, ASCE, New York, v.103, n. 2, p.115-134, 1977.

MAGGIO, A.; RAIMONDI, G.; MARTINO, A.; PASCALE, S. Salt stress response in MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. **Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree**. *Journal of Agricultural Science*, Cambridge, v.128, n.4, p.331-322, 2003.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, A. S. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. V.3, n.13, 2000, 201p.

MARTINS M. V. D. C.; SKINOVSKY J, COELHO D. J. **Colecistectomia videolaparoscópica por single trocar access (SITRACC) – uma nova opção**.

Rev Col Bras Cir. [periódico na Internet] 2008; 36(2). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>. janeiro 2010 às 8:00h.

MARUYAMA, R.; OKA, T.; ANAI, H. **Video-assisted thoracoscopic treatment for spontaneous pneumothorax as two-day surgery**. *America Journal Surges*, v.180, p.171-173, 1989.

MAUNEY, J. R. **Anatomy and morphology of cultivated cottons**. In: KOHEL, R.J.; LEWIS, C. F. eds. *Cotton*. Madison, Wisconsin: América Society of Agronomy, v.15, n.2, p.59-81,1984.

MEDEIROS, J. F.; GHEYI, H. R. **A qualidade da água de irrigação**. Mossoró: ESAM,v.6, n.5, 1994. 60 p.

MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G. Uso potencial e toxidez da torta de pinhão-manso, **Comunicado Técnico**. Brasília, DF, v.11, n.5, , p.1-9, 2009.

MENGUEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. Ed.4 Ber, switzerland: lang druck, p.685 n.2,1987.

MOLINA, S. M.; SCHOBERT, C. Micropropagation of *Ricinus communis*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.147, n.6, p.270-272,1996.

MUHLING K. H.; LAUCHLI A. **determination of apoplastic Na<sup>+</sup> in intact leaves of cotton by *in vivo* fluorescence ratio-imaging**. *Functional plant biology* v.29, n.34, p.1491–1499, 2002.

MUNNS R. **Comparative physiology of salt and water stress**. *Plant, Cell and environment*. v.25, n.2, p.239–250, 2002.

NUCCIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; PAZIANI, S. F. **Volumosos suplementares –**

**(homoiohydrous) seeds: the enigma of their desiccation-sensitivity.** Seed Scienceev. 3, 2002, Lavras Anais.... Lavras: UFLA, v.3, n.3, p.193-232, 1999.

OLIVEIRA, E. T.; GROTHGE, M. T.; CONÇALVES, A. N. **Micropropagação de *Pinus tropicais*.** In: CROCOMO, O. J.; CHARP, W. R.; MELO, M. Biotecnologia para produção vegetal. Piracicaba: CEBETC/FEALQ. v.12, n.4,p.544-370,1991.

OPENSHAW, K. **A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise.** Biomass and Bioenergy Nevo Yuork , Estado Unidos America, v. 19, n.4, p. 1-15, 2000.

ORCUTT, W.; NILSON T. F. **Food ingestion of *Daphnia pulex* as a function of food concentration, temperature, animal's body length and hunger.** Archer Hydrobio Suplente v.48, n.23, p. 47-107, 2000.

PALZ, W. **Energias solar e fontes alternativas.** Edição Hemus, n.3 v.2, p.31, 1981.

PARIDA E.; DAS, D. M. **Selected nucleic acid precursorsin studies of aquatic microbial ecology.** Appl. Environ Microbial,v.12, n.3 p.89l-902, 2005.

PAULET, F.; ENGELMANN, F.; GLAZMANN, J.C. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Sacharum* sp.) hybrids using encapsulation-dehydration. **Plant Cell Reports**, v.12, n.12, p.525-529, 1993.

PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L.; REIGOSA, M. J. Allelopathy and abiotic stres. Allelopathy: **A physiological process with ecological implications.** Springer, Dordrecht, Holanda,v.13, n.3, p.171-209, 2006.

PEIXOTO, J. V.; FONSECA, C. C.; PAULA, T. A. R.; NEVES, M. T. D; RODRIGUES, S. S; BRESSAN, M. S; OSHIO, L. T. **Descrição anátomo-histológica do jejuno-íleo da capivara *Hydrochoerus hydrochaeris* com**

**ênfase na relação entre o número de células endócrinas e de plexos nervosos.** Anais do XIV Simpósio de Iniciação Científica, Viçosa, Brasil. CD-ROM 2004.

RANGEL, A. H. N. **Avaliação do desempenho produtivo de rebanhos da raça Jersey.** Lavras: ESAL, 1992. 70p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia).

ROCHA, M. S. **Crioconservação e cultivo *in vitro* de sementes de algodão colorido.** Campina Grande, 2004. 112p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, L. **Implicaciones fisiológicas de la osmorregulación en plantas.** Agronomía Colombiana, v. 24, n.2, p. 28-37, 2006.

RHOADES, J. D.; LOVEDAY J. **Salinity in irrigated agriculture.** In: Irrigation of agricultural crops, Madison, ASA/CSSA/SSSA. p.1089-1142, 1990.

ROLLETSCHEK, H. T. HARTZENDOR F. **Effects of salinity and convective rhizome ventilation on amino acid and carbohydrate patterns of *Phragmites australis* populations in the Neusiedler.** Sea region of Austria and Hungary. New Python. v.146, n.2, p.95-105, 2000.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y. P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry, 32. Cryopreservation of plant germplasm I.** Berlim, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, v.12, n.31 p.53-69, 1995.

SAKAI, A. Potentially valuable cryogenic procedures for cryopreservation of cultured plant meristems. In: RAZDAN, M. K.; COCKING. E. C. **Conservation of Plant Genetic Resources In Vitro: General Aspects.** Science Publishers Inc., Enfield, USA, v.1, n.2, p.53-66, 1997.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OYAMA, I. Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* of *brasiliensis* Tanaka) cooled to  $-196^{\circ}\text{C}$ . **Journal of Plant Physiology**. v.137, n.12, p.465-470,1991.

SANTOS, S.; FERRIRA JUNIOR, E. J.; PIRES, B.; NETTO, A. P. C. Efeito de diferentes adubações no desenvolvimento inicial de mudas de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). In: **5 Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel**. Varginha – MG, v.1, n.1, p.78-81, 2007.

SANTOS, C. V. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. **Scientia Horticulturae**, v.103, n.3, p. 93-99, 2004.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.12, n. (especial), p.70-84, 2000.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N.; MUNDIM, R. C. RIBEIRO, F. N. S. **Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café (*Coffea arábica* L.)**. SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação, Londrina, v.2, n.3, p.34, 2002.

SATURNINO, H. M.; Pacheco, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA N.; GONÇALVES, N. P. **Cultura do Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.)**. Informe Agropecuário, Brasil, v.26 n.229, p.44-78, 2005.

SCOTTEZ C.; CHEVREAU, E.; GODARD, N.; ARNAUD, Y.; DURON, M.; DEREUDDRE, J. Cryopreservation of cold-acclimated shoot tips of pear in vitro cultures after encapsulation-dehydration. **Cryobiology**, v.29, p. 691-700,1992

SILVA, R.; WALLENSTEIN, N.; RIEDEL, C. Seismic swarm activity during in the seismogenic Fogo-Congro area (Sao Miguel, Azores): **relocation and focal mechanisms (Poster). IAVCEI (International Association of Volcanology and Chemistry of the Earth's Interior)**. General Assembly, v.15, n.5, p.17 – 22, 2008.

SILVEIRA, J. A. G.; VIÉGAS, R. A.; ROCHA, I. M. A.; MOREIRA, A .C. O. M.; MOREIRA, R. A.; OLIVERIA, J. T. A. Proline accumulation and glutamine ynthase, **Botany**, v. 59, n.3, p. 276–282, 2007.

SLUSZZ, T.; MACHADO, J. A. D. Características das potenciais culturas matérias primas do biodiesel e sua adoção pela agricultura familiar. Campinas: **Agrener** CD, v.23, n.2, 2006.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. **Hydroxyl radical scavenging activity of compatible homoiohydrous) seeds**: the enigma of their desiccation-sensitivity. *Seed Science* , 3, 2002, Lavras. Anais... Lavras: UFLA, v.3,n.2, p.193-232,1999.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. **Defesa de plantas: sinalização química e solutes**. *Phytochemistry*, v. 28, n.1, p.1057-1060, 2000.

STANWOOD, P. C.; BASS, L. N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.9, n.4, p.423-437, 1981.

STEPONKUS, P. L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. **Annual Review of Plant Physiology**, v.35, n.2, p. 543-584, 2004.

STUSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of Apple (*Malus* species) Genetic Resources. In.: BAJAJ, Y.P.S. ed, **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, vol. 32, Cryopreservation of Plant Germplasm I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York,v.32, n.2 , p.87-101, 1995.

SUAREZ, F. F. *An empirical study of flexibility in manufacturing*. Sloan Management **Review**, New York, v.12, n.3 , p. 25–32, 2006.

SWOT, C. M. Case research in operations management. **International Journal of operations and production management**. New York, v.22, n.2, p.195-219, 2002.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na<sup>+</sup> Tolerance and Na<sup>+</sup> Transport in Higher Plants. **Annals of Botany**, New York, v. 91, n.3 , p. 503-527, 2003.

TONG, L.; SHU-MING, P.; WU-YUAN, D.; DAN-WEI, M.; YING, X.; MENG, X.; FANG, C. **Characterization of a new stearyl-acyl carrier protein desaturase gene from *Jatropha curcas***. Biotechnology Letters, v. 28, n.2, p. 657–662, 2006.

TORIBIO, M.; CELESTINO, C. E. **El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales**. Investigación Agraria, Madrid, v.12, n.2 , p.249-259, 2000.

UEMURA, M.; SAKAI, A. **Survival of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot apices frozen to the temperature of liquid nitrogen**. Plant and Cell Physiology, v.21, n.1, p.85-94,1980.

VERTUCCI, C. W.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W.; CRANE, J. Cryopreservation of embryonic axes of an homeohydrous (recalcitrant) seed in relation to calorimetric properties of tissue water. **Cryol-Letters**, New York, v.12, n.4, p.339-350, 1991.

VIEIRA, R. F.; CARDOSO, J. A. **Variação nos teores de nitrogênio mineral em solo suplementado com lodo de esgoto**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 38, n.1, p. 867-874, 2003.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v.3, n.14, p.18-20, 2000.

VIEIRA, R. M.; BELTRÃO, N. E. M. Produção de sementes do algodoeiro. *In*: BELTRÃO, N. E. M. (Org.). **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para a Transferência de Tecnologia, v.1, p.428-454, 1999.

WEISS, E.A. **Oil seed crops**. London: Longman, v.2 n.1, p.659, 1983.

WILLADINO, L; CÂMARA, T. Origen y naturaleza de los ambientes salinos. *In*: REIGOSA. M. J.; PEDROL, N.; SÁNCHEZ, A. **La ecofisiologia vegetal, una ciencia de síntesis**. Madrid, Espanha. Editora Thomsom, v.12, n.2, p.303-329, 2004.

WITHERS, L. A. In vitro conservation. **Biology Journal**. Linno companies, v.43, n.2, p.31-42, 1991.

WITHERS, L. A. Preservation of germplasm. **International Review of Cytology**, New York, v.11B, n.4, p.101-136, 1980

YAMADA, T. Cryopreservation of forage crops. *In*: **Cryopreservation of plant genetic resources, technical assistance activities for resources projects**. JICA, Japan, v.2, n.6, 1993.

YEO, R. K. Estudo de caso: **planejamento e métodos**. Bookman, v.3, n.5, 1998.

ZHU, C.; ZHENG, Y, J. I. A. Y. A theoretical study on activation of transcription factor modulated by intracellular  $Ca^{2+}$  oscillations. **Biophys Chem**, v.129, n.1, p.49-55, 2007.



# **CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE SEMENTES DE SEIS ACESSOS DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

## **CAPÍTULO 2**

ROCHA, Maria do Socorro. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE SEMENTES DE SEIS ACESSOS DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.)  
Areia: UFPB/CCA, 2010. p 61-78. (Tese - Doutorado em Agronomia)

### **1 RESUMO**

Objetivou-se com este trabalho avaliar as características químico-físicas de seis acessos de pinhão manso oriundos de diferentes unidades da Federação . Foram analisadas amostras de sementes trituradas (inteiras com tegumento e sem tegumento) onde se determinou segundo a metodologia oficial da AOCS os teores de proteínas, umidade, cinzas e lipídios. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (6 x 2), sendo seis acessos de deferentes estados (Banvit - MG, Garanhuns - PE, Janaúba - MG, Crateús - CE, Novo Cruzeiro – MG e Canto do Buriti - PI) e duas condições (sementes inteiras com tegumento) e sementes sem o tegumento (só o albumen), com quatro repetições. Verificou-se valor médio de umidade de 7,46% e de proteína de 16,11%. O rendimento em óleo nas sementes variou de 28,89 a 36,53%, com teor médio de

33,65%. Ocorreram diferenças entre os acessos devido a sua grande variabilidade mesmo dentro de cada acesso de mesma região, evidenciando a que há diferenças significativas entre os tipos , ou acessos desta espécie que existem no Brasil.

**Palavras-chave:** Lipídios, proteínas, cinzas, genótipos, localidades.

ROCHA, Maria do Socorro. **CHARACTERIZATION PHYSICIST-CHEMIST OF SEEDS OF SIX ACCESSES OF GENTLE PINE SEED (*Jatropha curcas* L.)**  
Areia: UFPB/CCA, 2010. p.61-78 (Tese - Doutorado em Agronomia)<sup>1</sup>

## 2 ABSTRACT

The objective of this work to evaluate the chemical and physical characteristics of 24 accessions of *Jatropha* come from different states were analyzed samples to physico-chemical composition of the powdered seeds (whole with husk and without husk) was determined according to the AOCS official method for the protein, moisture, ash and lipids. The completely randomized design in factorial (6 x 2) and six hits in deferent states (Banvit - MG, Garanhuns - PE, Janaúba - MG, Crateús - CE, Novo Cruzeiro - MG the Canto do Buriti - PI) with two conditions (whole seeds with seed coat) and seeds without the seed coat (only the albumen) with four replications and five variables (moisture, lipids, proteins, carbohydrates and ash). There was a mean value of 7.46% moisture and protein content of 16.11%. The oil yield in seeds ranged from 28.89 to 36.53% with an average content of 21.51% Differences between the approaches occurred due to its high variability even within the same access to regional.

**Key words:** lipids, protein, ash, genotypes, locality.

---

Orientador: Prof. Dr. Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão.

### 3 INTRODUÇÃO

O cultivo de plantas oleaginosas tem sido preconizado nos últimos anos, em virtude da necessidade de mudança na matriz energética, principalmente no que concerne à substituição dos combustíveis fósseis por combustíveis renováveis, como o biodiesel. No Brasil, várias são as plantas cujas sementes possuem óleo com potencial para emprego industrial, inclusive como combustível. Dentre essas, o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) tem sido apontado por vários especialistas como matéria-prima promissora para a produção de biodiesel, pois apresenta alto teor de óleo não comestível e de excelente qualidade físico-química em suas sementes, as quais atendem perfeitamente às normas da Agência Nacional de Petróleo (ANP) (MARQUES et al. 2007). Além disso, a espécie é perene e apresenta amplitude de adaptação adafoclimática, rápido crescimento, fácil propagação e rusticidade.

Somente nos últimos 30 anos, é que estudos agronômicos foram iniciados com a espécie, embora se trate de uma planta ainda não domesticada. Uma vez que surge como novidade e possível alternativa, desperta grande interesse, surgindo também muitas informações não confiáveis e até distorcidas sobre esta planta, tais como: produtividade elevadas (superiores a 12t/hectare) e teor de óleo elevado (SATURNINO et al, 2005). Não existem acessos definidos, e depois de se escolher e caracterizar materiais promissores para definir passos tecnológicos (HENNING, 2005).

O potencial produtivo na caracterização dos acessos está na dependência do equilíbrio de diversos fatores (PRIMAVESI e PRIMAVESI, 1971). Esses fatores

incluem os minerais básicos à nutrição da planta, a sua disponibilidade no solo, a absorção e metabolização por parte do vegetal. A adubação bem conduzida possibilita ganhos significativos de produtividade na maioria das plantas cultivadas. É um fator de produção que pode ser manejado, porém precisa ser conduzido tecnicamente para evitar uso desnecessário de determinados nutrientes, o que pode, em certos casos, até reduzir a produtividade. O balanceamento de proteínas presentes nas sementes deve ser ditado não apenas pela disponibilidade de elementos no solo e exigências da cultura, mas, também, pelo nível tecnológico empregado, pela rentabilidade da produtividade (TÁVORA, 1982) e a contribuição da matéria orgânica em função de substanciais modificações das suas propriedades físicas (KARAJ, 2008). A incorporação das sementes, como materiais orgânicos, afetou a disponibilidade de alguns componentes internos (MIELNICZUK, 1999).

Dessa forma, ante o exposto e com a intenção de enriquecer ainda mais as informações sobre as sementes do pinhão manso, objetivou-se com este trabalho: verificar e caracterizar físico-quimicamente as sementes do pinhão manso com tegumento e sem tegumento (casca mais albúmen), de seis diferentes acessos de diferentes locais.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material vegetal e procedimento para obtenção da caracterização físico-quimicamente das sementes**

O presente estudo foi realizado no laboratório de fisiologia do Centro Nacional de Pesquisa de Algodão (Embrapa-Algodão), em Campina Grande, PB. Utilizando-se sementes de seis acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), oriundas de cinco estados brasileiros (Banvit - MG, Garanhuns - PE, Janaúba - MG, Crateús - CE, Novo Cruzeiro - MG e Canto do Buriti - PI) foram avaliadas 24 amostras na safra de 2008, conforme Tabela 1 e Figura 1. Verificou-se uma mistura de sementes coletadas aleatoriamente em populações de pinhão manso de diferentes localidades. Elas foram selecionadas em cada localidade, com base

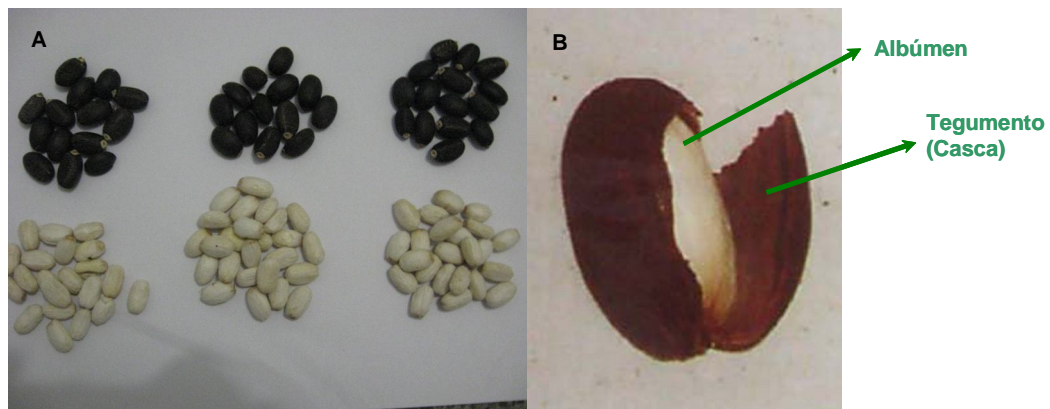
nas suas características de interesse agrícola, as sementes inteiras e sem o tegumento , somente com albúmen.

**Tabela 1.** Origem (procedência) das sementes coletadas.

<b>Amostra</b>	<b>Origem</b>
1	Banavit - MG – PC1
2	Banavit - MG – PC2
3	Banavit -MG – PC3
4	Banavit - MG – PC4
5	Garanhuns - PE – PC5
6	Garanhuns - PE – PC6
7	Garanhuns - PE – PC7
8	Garanhuns - PE – PC8
9	Janaúba - MG – PC9
10	Janaúba - MG – PC2
11	Janaúba - MG – PC3
12	Janaúba - MG – PC4
13	Crateús - CE – PC1
14	Crateús - CE – PC2
15	Crateús - CE – PC3
16	Crateús - CE – PC4
17	Novo Cruzeiro - MG – PC1

18	Novo Cruzeiro - MG – PC2
19	Novo Cruzeiro - MG – PC3
20	Novo Cruzeiro - MG – PC4
21	Canto do Buriti - PI – PC1
22	Canto do Buriti - PI – PC2
23	Canto do Buriti - PI – PC3
24	Canto do Buriti – PI– PC4

---

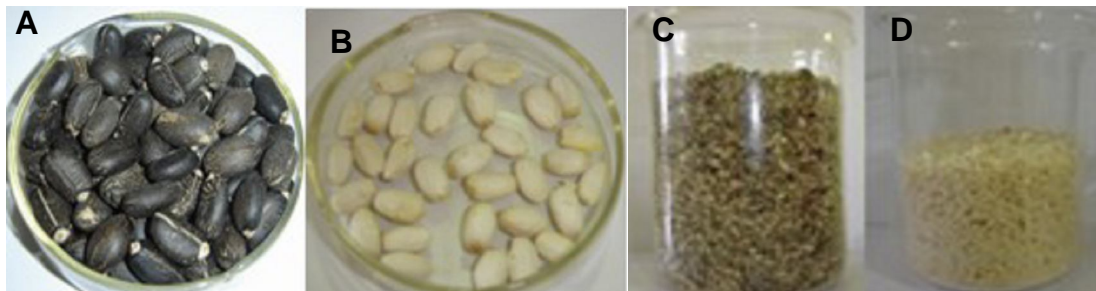


**Figura 1.** Sementes com e sem tegumento (A) semente inteira e o Albúmen (B) do pinhão manso.

#### **4.1.2 Método de caracterização físico-quimicamente**

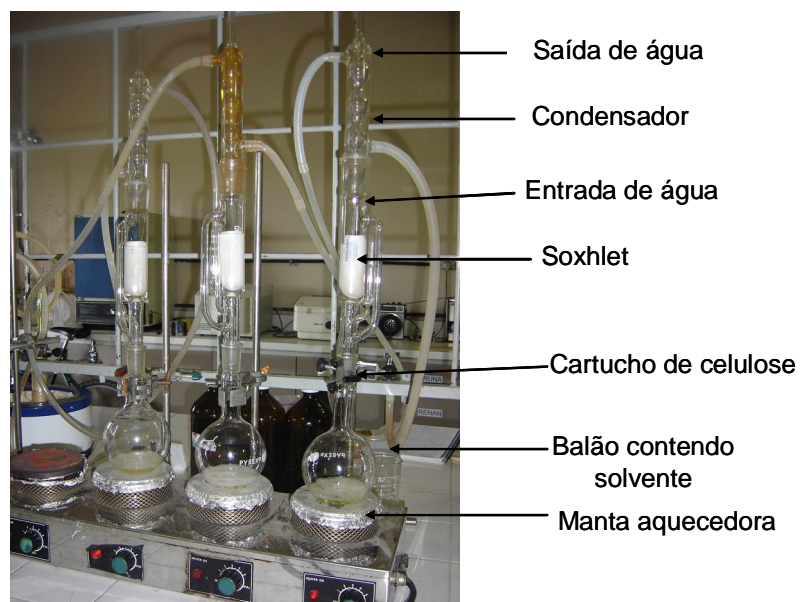
Inicialmente procedeu-se o tritramento das sementes inteiras e dos albumens (Figura 2), separadamente, com quantificação gravimétrica. Ambos foram caracterizados, segundo algumas normas do Instituto Adolfo Lutz, que compreendem umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos.

Efetou-se uma batelada de extrações do óleo, a partir das duas amostras semente e albúmen, usando um extrator de Soxhlet e hexano, (Figura 3) como solvente, com um tempo de 8 horas de extração e cerca de 200 g de amostra.



Fonte: Maria Rocha

**Figura 2.** Sementes de pinhão-manso: inteiras (A) e albumens (B), Sementes depois de ser triturado: inteiras (C) e só albumens (D), Campina Grande-PB, 2008.



Fonte: Maria Rocha

### **Figura 3. Extrator Soxhlet**

#### **4.1.3 Caracterização físico-química**

Foram avaliados: o peso médio e o teor de amêndoas e cascas das sementes. A composição centesimal das sementes trituradas foi determinada pelos métodos AOCS (FIRESTONE, 2006): para determinação do teor de proteínas; umidade; cinzas; lipídios e açúcares.

#### **4.1.4 Procedimento estatístico**

Os dados foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado, em esquema de análises fatorial (6 x 2) sendo seis acessos de diferentes estados (PE, MG, CE e PI), com duas condições (sementes inteiras com tegumento) e sementes sem o tegumento (só o albumen), com quatro repetições e cinco variáveis (umidade, lipídios, proteínas, carboidratos e cinzas). Para a feitura das análises de variância utilizou-se Programa ASSISTAT (SILVA, et al. 2008). Procedeu-se análise de variância dos dados obtidos, com comparações de média das variáveis estudadas, realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Variáveis sementes**

#### **5.1.1 Sementes inteiras, albumens em função das características físico-química**

As características físico-química das sementes do pinhão manso, via análise destrutiva, foram estimadas pelos valores das variáveis: umidade, proteína, carboidrato e cinzas, durante avaliação com quatro repetições com seis acessos de regiões diferentes. Na Tabela 2, tem-se os resumos das análises de variância dos dados onde de todas as variáveis avaliadas, denotando-se efeitos significativos a 1% de probabilidade com exceção para carboidratos na



interação dupla (A x TS) para as variáveis: Teor de água 5,39%, Lipídio 3,57%, Proteínas 8,12% e Cinzas 3,49% no nível de 5 % de probabilidade.

**Tabela 2.** Resumos das análises da variância (Quadrados médios) das variáveis, teor de água, lipídios, proteínas, carboidratos e cinzas das sementes com tegumento e só albúmen, Campina Grande-PB, 2008.

F. V.		Quadrados médios				
		G. L.	Teor de água	Lipídios	Proteínas	Carboidratos
Acessos (A)	5	14,99789**	65,12756 **	142,4462 **	78,37073 **	1,52059 **
Tipos de sementes (TS)	1	54,59200**	657,7861**	594,5984**	6986,841**	11,7315**
A X T	5	6,73569**	6,69868**	59,48,48**	69,66670*	0,11304**
Resíduo	36	7,71567	1,14592	4,19748	26,6404	0,02006
Total	47	170,97	1058,17	1755,34	8686,08	20,62170
CV (%)		5,39	3,57	8,12	27,83	3,49

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ); \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ); <sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq .05$ )

### 5.1.2 Teor de água

As sementes com albumens de pinhão manso foram observados valores menores de teor de água no acesso proveniente de Canto do Buriti - PI de 6,32% (Tabela 3). Houve comportamento diferenciado entre os genótipos, com e sem tegumento com a tendência de maior teor de umidade nas sementes inteiras com diferenças significativas entre os genótipos e tipo de semente, o que evidencia que possivelmente eles apresentaram tegumentos diferentes e com

capacidade de resistência a entrada de água de forma singular . Comportamento semelhante foi verificado para o teor de óleo das sementes, que pode variar de acordo com as características genéticas e também em função do meio ambiente. Penha et al. (2008) encontraram 10,82% de água nas sementes, Bicudo et al. (2007) verificaram 10,22% e Karaj et al. (2008) encontraram uma variação de 7,19 a 10,9% para grupos de sementes de menor e maior peso médio, respectivamente. Akbar et al. 2009, obteve entre 7,4 a 10,5% com sementes de pinhão manso Segundo NAKAGAWA (2000),

**Tabela 3.** Interação entre fatores acessos e tipo de sementes (inteiras e albumens,) dos valores médios de teor de água das sementes de pinhão manso, de seis localidades respectivamente diferentes, Campina Grande- PB, 2008.

Local	Teor de água (b.u.%)						
	Sementes	Inteiras		Albumens			
Banvit (A <sub>1</sub> )	8,72	a	A	9,39	c	A	
Garanhuns (A <sub>2</sub> )	6,63	c d	B	8,50	c	A	
Janaúba (A <sub>3</sub> )	7,52	b c	B	8,65	c	A	
Crateús (A <sub>4</sub> )	8,05	a b	B	10,51	b	A	
Cruzeiro (A <sub>5</sub> )	7,85	a b	B	13,48	a	A	
Canto do Buriti (A <sub>6</sub> )	6,32	d	B	7,35	d	A	
DMS <sub>colunas</sub> =			0,98	DMS <sub>linha</sub> =			0,69

\*Médias seguida pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 5.1.3 Lipídios

Observa-se, na Tabela 4, as médias da variável lipídio diferiram significativamente entre si, quando os acessos com sementes inteiras com Banvit 35,52%, Garanhuns 36,53% e Canto do Buriti 35,45% e nos albumens os acessos Banvit 30,22% e Garanhuns 28,36% maiores valores nas linhas menor orcentagem nas linhas os acessos Cruzeiro 28,89% menor nos albumens 21,25% já nas colunas diferenciaram entre sementes inteiras e os albumens

Quanto as médias do teor de lipídios no acesso Garanhuns, com 36,34 %, verificou-se maior o acesso, com 29,39% sementes inteiras nos Albumens nos acessos cruzeiro,Crateús e Banvit 7,85; 8,05 e 8,72 maior teor de água , e menor

a concentração o Canto do Buriti sementes inteiras com 7,35 já nos Cruzeiro, Crateús e Banvit 7,85 8,05 e 8,72 e menor Canto do Buriti 6,32% diferenciando dos outros acessos. O teor de lipídios obtido para as sementes inteiras (46,28 %) foi semelhante ao encontrado por Maia *et al.* (1991), que obtiveram variação de 45,18 % a 47,58 % quando pesquisaram amêndoas de diferentes localidades do Ceará. Este valor foi ainda, que foi de 46,5 %. Entretanto, resultados inferiores (42,25%) foram obtidos por Queiroga Neto (1993). Nas sementes, a média encontrada foi de 48,35 %. Comparando-se os valores obtidos para os albumens.

O trabalho de Cavalcante (1993) observou diferença superior, 44,52% de lipídios nos albumens e 57,20%. Franco (2002) encontrou 37 % para as sementes e 47,20% albumen, enquanto para Andrade (1994) a diferença foi inferior, 45,30% e 45,71% para a semente e o albumen, respectivamente. Nas sementes, a diferença nos teores de lipídios encontrados não se apresentou significativa. Os valores obtidos foram de 48,74 % para as sementes e 48,90 % albumens.

**Tabela 4.** Interação entre fatores acessos e tipo de sementes (inteiras e albumens) dos valores médios de lipídios das sementes de pinhão manso, de seis localidades diferentes, Campina Grande- PB, 2008.

Locais		Lipídios (%)					
		Sementes		Inteiras		Albumens	
Banvit	(A <sub>1</sub> )	30,22	a	B	35,52	a b	A
Garanhuns	(A <sub>2</sub> )	28,36	a b	B	36,53	a	A
Janaúba	(A <sub>3</sub> )	26,71	b c	B	31,74	c	A
Crateús	(A <sub>4</sub> )	24,53	c	B	33,80	b c	A
Cruzeiro	(A <sub>5</sub> )	21,25	d	B	28,89	d	A
Canto do Buriti	(A <sub>6</sub> )	26,44	b c	B	35,45	a b	A
		DMS <sub>colunas</sub> = 2,27		DMS <sub>linha</sub> = 1,61			

\*Médias seguida pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 5.1.3 Proteínas

Nota-se na Tabela 5, a superioridade estatística do acesso Garanhuns e do acesso Novo Cruzeiro, no tocante ao teor protéico das sementes e o albumen de pinhão manso. Com valores de 28,35 % e 25,20 % respectivamente nas sementes e de 35,75 % e 33,97 % com relação ao albumen nos acessos Novo Cruzeiro e Canto do Buriti, respectivamente. Menores percentuais foram verificados no acesso para sementes de Banavit (15,17 %) e no albumen foram

os acessos Banavit (24,47 %), Garanhuns (24,58 %) e Janaúba (24,55 %), como pode ser observado na Tabela 5., com valores próximos aos encontrados por Cavalcante (1993), Entretanto, para Cavalcante (1993), a perda de proteínas após a secagem foi significativa, sendo na ordem de 7,8 %, enquanto no presente trabalho foi de 1,58 %. Resultados similares foram apresentados por Andrade (1994) que observou também perda de proteínas significativa após a dessecação, com valores médios de 21,25 % na amêndoa e 20,56 % na tostada, representando um decréscimo médio de 3,2 %.

Quando se relacionou o teor protéico das sementes com albúmen, observou-se que a percentagem de redução de proteína nas sementes aumentou para 4,35 % nas linhas, porém, esta diferença continuou diferenciando o significado estatístico. Os maiores valores relacionados sementes inteiras de 28,35 % para os albumens e de 33,97 %. Sujatha e Prabakaran (2003), relacionando o teor protéico com o peso seco, quando estudaram 16 variedades de amêndoas, encontraram valores superiores que variaram de 36,55 a 43,16 %, semelhantes aos das amêndoas provenientes de quatro países africanos, 36,37 a 43,04 % Martínez-Herrera, (2006). Na verdade a variação existiu entre os acessos e também alguns tiveram comportamento diferenciado quando tiveram o tegumento removido, ou seja, somente com o albúmen.

**Tabela 5.** Interação entre fatores acessos e tipo de sementes (inteiras e albumens) dos valores médios das proteínas das sementes de pinhão manso, de seis localidades, Campina Grande- PB, 2008.

Locais	Proteínas (%)	
	Sementes	Albumens
Banvit (A <sub>1</sub> )	15,17 e B	24,47 c A
Garanhuns (A <sub>2</sub> )	28,35 a A	24,58 c B
Janaúba (A <sub>3</sub> )	17,80 de B	24,55 c A
Crateús (A <sub>4</sub> )	19,75 cd B	29,05 b A
Cruzeiro (A <sub>5</sub> )	25,20 ab B	35,75 a A
Canto do Buriti (A <sub>6</sub> )	23,88 bc B	33,97 a A
DMS <sub>colunas</sub> = 4,35		DMS <sub>Linha</sub> =3,08

\*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 5.1.4 Carboidratos

Encontram-se, na Tabela 6, os teores de carboidratos das sementes inteiras e albumens de seis regiões, com destaque para o Banvit 33,00% e Garanhuns 34,56% nas sementes inteiras, que apresentou valores superiores aos albumens, independente da região em que foram colhidas. Alguns autores também obtiveram resultados semelhantes a esses por Andrade (1994) e por Nagaraja e Nampoothiri 1996.

Os teores de carboidratos foram semelhantes nos acessos Banvit 33,00%, e Garanhuns 34,56% com maior porcentagem, para as sementes inteiras. Já para Banvit 28,50%, Garanhuns 26,00% e Janaúba 26,00% nos albumens. Comparando-se estes resultados, pode-se observar que após a verificação dos carboidratos, as sementes inteiras tiveram aumento significativo em nível de 1%. Estes dados não estão de acordo com os apresentados por Cavalcante (1993). Na verdade a casca tem mais carboidratos e assim tem-se a explicação das diferenças obtidas entre os tipos de sementes utilizadas na presente pesquisa..

**Tabela 6.** Interação entre fatores acessos e tipo de sementes (inteiras e albumens) dos valores médios dos carboidratos das sementes de pinhão manso, de seis localidades diferentes, Campina Grande- PB, 2008.

Local	Carboidratos (%)					
	Sementes	Inteiras		Albumens		
Banvit	33,00	a	A	28,50	a	B
Garanhuns	34,56	a	A	26,00	ab	B
Janaúba	28,00	bc	A	26,00	ab	B
Crateús	29,50	b	A	24,00	bc	B
Cruzeiro	26,50	c	A	23,00	c	B
Canto do Buriti	27,50	bc	A	25,00	bc	B
DMS <sub>colunas</sub> =		2,80		DMS <sub>linhas</sub> =		1,89

\*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 5.1.5 Cinzas

Na Tabela 7, constatou-se que maior porcentagem das cinzas foi nos acessos Janaúba 5,25% e Garanhuns 4,67% com maior porcentagem, para as sementes inteiras, e nos albúmens nos acessos Janaúba 4,31%, Garanhuns 3,30% e Cruzeiro 3,74% e menor quantidade de cinzas nas sementes inteiras (Banvit, Crateús, e Canto do Buriti (4,3; 4,2 3,6%) nos albumens: Garanhuns, Cratéus e Canto do Buriti (3,30; 3,25 e 3,05%). Diferenciou-se as medias dos acessos Janaúba 5,25% e Garanhuns 4,67% com maior porcentagem, para as sementes inteiras, nos albúmens nos acessos Janaúba 4,31% Garanhuns 3,30% e Cruzeiro 3,74% respectivamente., níveis superiores foram constata Há registros na literatura dados como os de Andrade (1994) de valores de 10,96 % e 10,55 %, respectivamente. A cinza representa o resíduo mineral , ou seja os elementos minerais que a planta absorveu do seu substrato durante sua vida ou um intervalo de tempo considerado.

**Tabela 7.** Interação entre fatores acessos e tipo de sementes (inteiras e albumens) dos valores médios das cinzas das sementes de pinhão manso, de seis localidades diferentes, Campina Grande- PB, 2008.

Local	Cinzas (%)					
	Sementes			Albumens		
			Inteiras			
Banvit	4,32	c	A	3,69	b	B
Garanhuns	4,67	b	A	3,30	c	B
Janaúba	5,25	a	A	4,31	a	B
Crateús	4,21	c	A	3,25	c	B
Cruzeiro	4,75	b	A	3,74	b	B
Canto do Buriti	4,04	c	A	3,02	c	B
DMS <sub>colunas</sub> =			0,30	DMS <sub>Linha</sub> = 0,25		

\*Médias seguida pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 6 CONCLUSÕES

1- O acesso Novo Cruzeiro com alto teor de proteína, o acesso de Garanhuns com excelente teor de lipídios e o acesso Januário em carboidratos se destacaram dos demais testados.

2- As sementes de pinhão manso apresentaram elevado conteúdo de umidade no acesso Novo Cruzeiro, com 13,55% e com menor teor de água, nos acessos do Januário 8,87%, Canto do Buriti 8,64% e Garanhuns 8,25%, ou seja houve variação no conteúdo de umidade entre os acessos testados .

3- Em relação ou conteúdo de lipídios verificou-se a maior porcentagem é Banavit (30% sementes inteiras e 35% albúmens), Garanhuns (29% e 32%) e Canto do Buriti (25 e 35%) e menor quantidade de lipídios no acesso de Novo Cruzeiro (20% e 29%).

4-Nas proteínas verificou-se a maior porcentagem: Novo Cruzeiro (25% sementes inteiras e 35% albúmens) e Canto do Buriti (25% e 35%) e menor porcentagem de proteínas: Banavit (15% e 25%).

5- Com relação ao teor de carboidratos verificou-se a maior porcentagem: Banavit (34% sementes inteiras e 29% albumens) e Garanhuns (36% e 25%) e menor porcentagem de carboidratos: Novo Cruzeiro (28% e 25%).

6- Nas cinzas constatou-se com maior porcentagem nos dos acessos Janaúba 5,25% e Garanhuns 4,67% com maior porcentagem, para as sementes inteiras, nos albumens nos acessos Janaúba 4,31%, Garanhuns 3,30% e Cruzeiro 3,74% e menor quantidade de cinzas: nas sementes inteiras (Banvit, Crateús, e Conto do Buriti (4,3; 4,2 3,6%) nos albumens: Garanhuns, Cratéus e Canto do Buriti (3,30; 3,25 e 3,05%).

## REFERÊNCIAS

AKBAR, E.; YAAKOB, Z.; KAMARUDIN, S. K.; ISMAIL, M.; SALIMON, J. **Characteristic and composition of jatropha curcas oil seed from malaysia and its potential as biodiesel feedstock**. Scientific Research, hiladelphia, v. 29, n. 3, p. 396-403, 2009.

ANDRADE, J. S. **Aspectos da industrialização da castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.)**. Fortaleza, 1994. 187p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Ceará.

BICUDO, T. C.; FREIRE, L. M. S.; ALBUQUERQUE, A. R.; DANTAS, M. B.; VASCONCELOS, A. F. F.; ROSENHAIM, R.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. G. Estabilidade e tempo de indução oxidativa do óleo de pinhão manso para produção de biodiesel. In: **CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE ECNOLOGIA DE BIODIESEL**, 2, 2007, Brasília. Anais... Brasília: ABIPTI/SETEC-MCT, 2007.

CAVALCANTE, J. F. M. **Une contribution a l'etude de la valuer nutritive de la noix de cajou (*Anacardium occidentale* L.) an Bresil**. Bélgica, 1993. 61p.



Dissertação (Mestrado em Sciences Naturelles Appliquees), Universite Catholique de Louvain.

FIRESTONE, H. P. S. K. B. E. **Dible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effects of roasting on antinutrient and toxic factor in seeds.** Plant Foods for Human Nutrition, Dordrecht, v. 52, p. 31-36, 2006.

FRANCO, R. M. B., ROCHA-EBERHRD, R. CANTUSIO, N. R. **Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil.** Journal Tropical Medical Institute. v.43, n.2, 109 -111, 2002.

HENNING, T. in IAU Symp., The Formation of Binary Stars, ed. H. Zinnecker R. D. Mathieu (**San Francisco: ASP**), p.567, 2005.

KARAJ, G.; KUMAR, A.; MARTHA, M. Water use efficiency and crop coefficients of dry season oilseed crops. **Agricultural Water Management, Amsterdam**, v. 87, n. 1, p. 73-82, 2008.

MAIA, G. A.; HOLANDA, L. F. F.; MARTINS, C. B. Características químicas e físicas da castanha de caju (*Anacardium occidentale L.*). **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.1, n. 1, p.39-46, 1991.

MARQUES RC, DÓREA JG, FONSECA MF, BASTOS WR, MALM O. Hair mercury in breast-fed infants exposed to thimerosal-preserved vaccines. **Europe Pediatric**. 2007;166:935–931.

MARTÍNEZ-HERRERA, J.; SIDDHURAJU, P.; FRANCIS, G.; DÁVILA-ORTÍZ, G.; BECKER, K. Chemical composition, toxic/ antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. **Food Chemistry**, Oxford, v. 96, 2006, p. 80-89.

MIELNICZUK, J., Matéria orgânica e a sustentabilidade de sistemas agrícolas. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O.(editores) **Fundamentos da matéria**

**orgânica do solo. Ecosistemas tropicais e subtropicais.** Porto Alegre, Genesis, 1999, p.1-8.

NAGARAJA, K. V., NAMPOOTHIRI, V. M. Chemical characterization of high-yielding varieties of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Plant Foods Hum. Nutr.**, Karnataka (Índia), n. 36, p. 201 - 206, 1986.

PENHA, M. N. C.; SILVA, M. D. P. MENDONÇA, K. K. M.; COSTA, J.F.; MACIEL, A. P.; SILVA, F. C. **Extração e caracterização física-química do óleo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.).** In : REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA. Campinas- SP, 60, 2008.

PRIMAVESI, A. M.; PRIMAVESI, A. Influência do cobre na nutrição do arroz (*Oryza sativa* L.). **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v.1, n.3, p.9-14, set. 1971.

QUEIROGA NETO, V. **Efeito do processamento térmico sobre propriedades funcionais de proteínas de amêndoas de castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.).** João Pessoa, 1993. 94p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba.

SATURNINO, H. M.; Pacheco, D. D.; KAKIDA, J. ; TOMINAGA N. ; GONÇALVES, N. P. Cultura do Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário, Brasil**, v.26 n.229 p.44-78 2005.

SUJATHA, M.; PRABAKARAN, A. J. New ornamental *Jatropha* hybrids through interespecific hybridization. **Genetic Resource Crop Evolution**, Dordrecht, v. 50, . 75-82, 2003.

TÁVORA, F. J. A. F. A. **A cultura da mamona.** Universidade Federal do Ceará Fortaleza, 111p. 1982.

## CAPÍTULO 3

### EFEITOS DO ESTRESSE SALINO SOBRE O CRESCIMENTO DE MUDAS DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.)

#### 1 RESUMO

ROCHA, Maria do Socorro. EFEITOS DO ESTRESSE SALINO SOBRE O CRESCIMENTO DE MUDAS DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) Areia: UFPB/CCA, 2010. p 79-107. (Tese - Doutorado em Agronomia)

O presente estudo foi conduzido em condições de casa vegetação da Embrapa Algodão em Campina Grande-PB, durante o período de janeiro a outubro de 2008, com o objetivo de estudar os efeitos da água de irrigação com diferentes níveis de sais em diferentes acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) nas fases de germinação e de crescimento dos acessos. Os tratamentos consistiram de cinco níveis de condutividade elétrica de água de irrigação – CEa (0,13;1,2 ; 2,4; 4,8 e 6,8 dS m<sup>-1</sup>), testados em três acessos de pinhão manso (Garanhuns-PE, Itaporanga-PB e Novo Cruzeiro-MG).O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados, em esquema fatorial 3 x 5, três acessos e cinco concentrações de NaCl com quatro repetições, totalizando 60 unidades experimentais . As águas de irrigação foram preparadas com NaCl. Nos acessos foram avaliados aos 30, 45, 60, 90 e 105 dias, após a semeadura (DIAS), as

variáveis: dias para germinação, percentagem de plantas germinadas, índice de velocidade de germinação, valores primários do crescimento (número de folhas, altura de planta, diâmetro do caule e área foliar) e no final as variáveis fitomassa verde da parte aérea, fitomassa seca da parte aérea, fitomassa seca das raízes e fitomassa seca total), e características do crescimento (taxa de crescimento absoluto, taxa de crescimento relativo, razão de área foliar, relação raiz parte aérea ) e teor de água na parte aérea da planta. A salinidade da água de irrigação afetou significativamente a porcentagem de plantas germinadas, índice de velocidade de germinação e prolongou o período de germinação. O aumento da salinidade da água irrigação reduziu significativamente o crescimento vegetativo (número de folhas, altura de planta, diâmetro do caule, área foliar, fitomassa verde da parte aérea, fitomassa seca parte aérea, fitomassa seca das raízes e fitomassa seca total), nos três acessos. O acesso de Garanhuns-PE apresentou-se mais tolerante á salinidade, em termo de porcentagem de germinação, altura da planta e diâmetro do caule.

**Palavras-chave:** irrigação, condutividade elétrica, germinação e aérea foliar.

## 2 ABSTRACT

ROCHA, Maria do Socorro. SALINE STRESS ON THE GROWTH OF SEEDLINGS OF *Jatropha* SEED Areia: UFPB/CCA, 2010. p.79-107. (Thesis - Doctorate in Agronomy).

This study was conducted in conditions of house vegetation Embrapa Cotton in Campina Grande-PB, during the period from January to October 2008 with the aim of studying the effects of water to irrigate navels with different salts in different accessions of pine curcas (*Jatropha curcas* L.) stages of growth germinae accessions. The treatments consisted of five navels electric conductivity of water Irrigation - CEa (0.13, 1.2, 2.4, 4.8 and 6.8 dS m<sup>-1</sup>) tested in three bouts of gentle pine (Garanhuns-PE, and PB-Itaporanga Novo Cruzeiro-MG). The experimental design was randomized blocks in factorial 3 x 5, three hits and five of Concentration NaCl with four Repeatability, totaling 60 experimental units. The Irrigation waters were prepared with NaCl. Accessions were evaluated at 30, 45, 60, 90 and 105 days, APSA sowing daiy, the varies: germination days, percentage of germinated plants, speed germination index, values primaries growth (Numbers of leaves, plant height, diameter of stem and leaf area) and in the final part of the green biomass varies area, dry mass of the party area, biomass reasons of drought and total dry matter), and growth characteristics (absolute growth rate,

relative growth rate, leaf area for reasons relating root part area) and water content in the area of the plant. The salinity of water Irrigation significantly affected the percentage of germinated plants, index of speed germination prolonged period of germination. The increased salinity of water Irrigation significantly reduced vegetative growth (Numbers of leaves, plant height, diameter of stem, leaf area, dry weight of green part area, dry mass party area , dry mass of the reasons and total dry matter) in three hits. Access to Garanhuns-PE was more salt tolerant in terms of percentage of germination, plant height and diameter of the stem.

**Key words:** irrigation, electrical conductivity, germination and aerial leaves.

### 3 INTRODUÇÃO

Os fatores ambientais que afetam o crescimento das plantas, constam os problemas de salinidade de salinidade; estes são decorrentes da acumulação de sais solúveis ou sódio trocável no solo, sobretudo, devido a um manejo inadequado da água de irrigação. A evaporação e a transpiração removem a água (como vapor) do solo, deixando os sais concentrados em um volume cada vez menor de água. Quando a água de irrigação contém uma concentração alta de sais solúveis e, especialmente, quando não houver drenagem para lixiviar os sais acumulados, a salinidade pode alcançar níveis prejudiciais às plantas cultivadas em pouco tempo. Atualmente, estima-se em 50% as áreas irrigada do mundo afetadas por sais ou por problemas de drenagem (RHOADES e LOVEDAY,1990); no Brasil são, aproximadamente, 160.000km<sup>2</sup> sendo 89.000 km<sup>2</sup> na região Nordeste (PEREIRA et al. 1983).

O estresse salino inibe o crescimento das plantas, por reduzir o potencial osmótico da solução do solo, restringindo a disponibilidade de água e ou pelo acumulação excessiva de íons nos tecidos vegetais, podendo ocasionar toxicidade iônica, desequilíbrio nutricional ou ambos (TESTER e DAVENPORT, 2003); porem, o grau com que cada um desses componentes do estresse influencia o crescimento das plantas é dependente de muitos fatores, dentre eles a espécie vegetal, cultivar e estágio fenológico, composição salina do meio

intensidade e duração do estresse, bem com das condições edafoclimáticas (CRAMER ET al. 1994).

Os problemas osmóticos ocorrem porque a concentração de sais solúveis na zona radicular acarreta redução do potencial hídrico da água do solo, reduzindo a disponibilidade de água para os vegetais e, conseqüentemente, as taxas de transpiração e crescimento da planta (incluindo-se expansão celular, síntese de metabólitos e componentes estruturais). A hipótese que melhor parece adequar-se às observações é que a salinidade excessiva reduz o crescimento da planta, por causar aumento no dispêndio de energia para absorver água do solo e realizar ajustamento osmótico para sobreviver em condições de estresse salino. Esta energia é desviada dos processos que conduzem ao crescimento e à produção Ayers e Westcot, 1991.

Os problemas de toxicidade normalmente surgem quando certo íons (sódio, cloro e boro), constituintes do solo ou da água, são absorvidos pelas plantas e acumulados em seus tecidos, em concentrações suficientemente altas (tóxicas) para provocar danos e reduzir seus rendimentos Ayers e Westcot, 1991. De fato, condições específicas reinantes em solos salinos e ou sódicos podem afetar, por toxicidade ou desordem nutricional, diferentes processos metabólicos das plantas como, assimilação de CO<sub>2</sub>, fotossíntese, síntese de proteínas, respiração relações hídricas, reação hídricas, reações enzimáticas e conversão de fitohormônios Teiz e Zeiger, 2002.

O grande vilão em termos de desordem nutricional tem sido o Na<sup>+</sup>; um dos seus principais efeitos deletérios é o de deslocar o Ca<sup>+2</sup> da membrana protoplasmática das células radiculares, com conseqüente perda do poder de seletividade de absorção iônica das raízes. Este fato foi contado por Cramer et al. 1995, através de perda de K<sup>+</sup> das células; é conveniente lembra que a membrana protoplasmática, em condições normais, tem uma alta especificidade por K<sup>+</sup>, o que evidencia a perda de poder seletivo das raízes devido ao deslocamento do Ca<sup>+2</sup>, ocasionado pelo Na<sup>+</sup>. Objetivou-se, com esta pesquisa, avaliar o crescimento do pinhão manso irrigado com águas de diferentes níveis de salinidade em ambiente protegido no seu período inicial do crescimento.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1.1 Localização do experimento

O trabalho foi desenvolvido em condições de casa de vegetação pertencente à Embrapa – Algodão na cidade de Campina Grande - PB entre os meses de janeiro a julho de 2008, cujas coordenadas geográficas são as seguintes: 7°15'18" de latitude Sul, 35°52'28" de longitude Oeste do meridiano de Greenwich e altitude de 547,56m.

O clima da região, de acordo com a classificação climática de Koppen adaptada ao Brasil é de do tipo "CSa", semi-árido, com verão quente e seco de 4 a 5 meses, com chuvas de outono e inverno. Os meses de maio e julho são os mais frios com temperaturas médias inferiores a 20° (CORREIA et al. 2005). Na Tabela 1, têm-se os dados meteorológicos médios durante a condução do experimento.

**Tabela 1.** Dados meteorológicos da estação do INMET (EMBRAPA-CNPA) referentes ao período de janeiro a julho de 2008.

Mês	Ano	Temperatura (T)			Precipit. Média	Evapor. Média	Umidade Relativa	Insolação Total
		Tmáx	Tmin	Tmédio				
		.....°C.....			.....mm.....		%	H
Jan	2008	30,1	20,5	24,1	68,6	130,5	53,8	242,0



Fev	2008	32,0	21,2	25,2	65,5	124,6	44,8	212,9
Mar	2008	30,0	21,4	24,4	76,3	128,4	44,6	243,1
Abr	2008	28,3	21,0	23,7	80,5	94,9	22,3	202,6
Mai	2008	29,7	20,9	24,1	75,2	96,7	42,3	200,6
Jun	2008	26,1	19,4	22,1	145,3	74,0	83,0	200,4
Julh	2008	25,5	19,2	21,0	144,4	73,6	82,7	133,9

Fonte: INMET (2008)

#### 4.1.2 Tratamentos

O estudo foi realizado até 105 dias após sementeiras - DAS, sendo avaliados a germinação e o crescimento inicial do pinhão manso. Os tratamentos consistiram de cinco níveis de salinidade de água de uma cisterna da EMBRAPA com a condutividades de C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, correspondendo às condutividades elétricas 0,13; 1,2; 2,4; 4,8 e 6,8 dS m<sup>-1</sup> a 25 °C.

#### 4.1.3 Substrato

O material utilizado como substrato foi proveniente da Embrapa Algodão – Campina Grande- PB, nas proporções de 2:1. Segundo Correia et al. (2005), misturado com resíduos orgânicos, o solo composto (Neossolo Regolítico) procedeu da região de Lagoa Seca (Campina Grande), coletado na profundidade de 0-20 cm.

No preparo da águas de irrigação, foi utilizada água da cisterna da Embrapa Algodão, baseando-se na relação entre condutividade elétrica da água (CEa). Na Tabela 2, tem-se a concentrações (mmol<sub>c</sub> L<sup>-1</sup>= CEa\*10), extraída de Rhoades et al. (1992), válida para CEa entre 0,1 a 6 dSm<sup>-1</sup>. As águas de irrigação foram salinizadas de acordo com os níveis salinos, a partir de uma solução concentrada preparada de cloreto de sódio (NaCl) 200g.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 2.** Valores de Cátions e anions da água utilizados na irrigação de janeiro a julho de 2008.

Cátions	Valor	Ânions	Valor
---------	-------	--------	-------

Ca <sup>++</sup> (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> )	1,58	Cl <sup>-</sup> (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> )	4,04
Mg <sup>++</sup> (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> )	1,81	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> )	1,73
Na <sup>+</sup> (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> )	3,27	CO <sub>3</sub> <sup>--</sup> (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> )	0,00
K <sup>+</sup> (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> )	0,16	SO <sub>4</sub> <sup>--</sup> (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> )	0,00
∑ Cátions (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> )	6,84	∑ ânions (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> )	5,77
Ph	5,9	RAS <sup>-</sup> (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> ) <sup>0,5</sup>	3,97
CE (dSm <sup>-1</sup> ) a 25°C	0,13		

Valores analisados no laboratório da Embrapa.

O volume da solução de NaCl (200g.L<sup>-1</sup>) utilizado no preparo das águas de irrigação para cada nível salino, foi determinado de forma a se obter as respectivas condutividades elétricas (CEa). Para tanto, levou-se em consideração a condutividade elétrica pré-existente da água da cisterna (0,13 dS m<sup>-1</sup>). Foi utilizada a equação de regressão onde: Y representa a CEa desejada, em dS m<sup>-1</sup> e X o volume da solução concentrada (200 g L<sup>-1</sup>) para cada 200 ml de água de irrigação. A equação foi obtida da seguinte forma: a partir da solução de NaCl (200g.L<sup>-1</sup>), efetuaram-se sucessivas diluições (0,84; 1,70; 3,10; 6,20; 8,50 g. L<sup>-1</sup>) para cada 1000 mL de água, na Tabela 3 e determinaram-se as correspondentes condutividades elétricas (CEa). Utilizando-se material de solo Neossolo Regolítico, cuja análise encontra-se na tabela 4.

**Tabela 3.** Volumes em g.L<sup>-1</sup> da solução de NaCl na concentração de 200g.L<sup>-1</sup> necessário para obtenção de 1L de água do respectivo tratamento a partir da água da cisterna da Embrapa Algodão Campina Grande-PB 2008.

Tratamentos (CEa dS m <sup>-1</sup> )	(Volume em g.L <sup>-1</sup> )
0,13 dS m <sup>-1</sup>	0,84 g.L <sup>-1</sup>
1,2 dS m <sup>-1</sup>	1,70 g.L <sup>-1</sup>
2,4 dS m <sup>-1</sup>	3,10 g.L <sup>-1</sup>
4,8 dS m <sup>-1</sup>	6,20 g.L <sup>-1</sup>
6,8 dS m <sup>-1</sup>	8,50 g.L <sup>-1</sup>

**Tabela 4.** Características físico-hídricas e químicas do solo utilizado na pesquisa. Embrapa Algodão Campina Grande- PB, 2008.

<b>Atributo físico-hídrico</b>	<b>Unidade</b>	<b>Valor</b>
Areia	g kg <sup>-1</sup>	634
Site	g kg <sup>-1</sup>	98
Argila	g kg <sup>-1</sup>	179
Classificação textural	-	Franco-arenoso
Densidade do solo (ds)	kg dm <sup>-3</sup>	1,57
Densidade das partículas (dp)	kg dm <sup>-3</sup>	2,57
Água disponível	g kg <sup>-1</sup>	60,90
pH em água (1:2,5)	-	5,9 – 6,2
CE da suspensão solo-água (1:2,5) (CEsa)	dS m <sup>-1</sup>	0,13 – 0,50

Análises realizadas pelo Laboratório de Solo da Embrapa Campina Grande, PB. 2008.

#### **4.1.4 Genótipo (acessos)**

Foram usadas sementes de três acessos de três estados diferentes, (1° Garanhuns-PE, 2° Itaporanga-PB e 3° Novo Cruzeiro-MG), provenientes de frutos colhidos em estado de completa maturação. Foi feita a separação das sementes e feita o teor de água e suas médias dos três estados: Garanhuns-PE 6,8% Itaporanga-PB 6,2% e Novo Cruzeiro-MG 6,7%.

#### **4.1.5 Material do solo**

O material do solo utilizado para a condução de ambos os experimentos, foi do tipo Neossolo Regolítico, proveniente do município de Lagoa Seca, PB. O material do solo foi coletado nas instalações da Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária (EMEPA), na profundidade de 0-20 cm, e caracterizado quimicamente e a análise física no Laboratório de Solos da Embrapa.

#### **4.1.6 Unidades experimentais**

Foram utilizados vasos plásticos, com capacidade de aproximadamente 37 litros, no total de 60 vasos, os quais foram levados aproximadamente á capacidade de campo, usando-se água da cisterna local. No fundo dos vasos, foram feitos furos na parte inferior para permitir a drenagem e todos foram de cor verde.

#### **4.1.7 Controle de pragas**

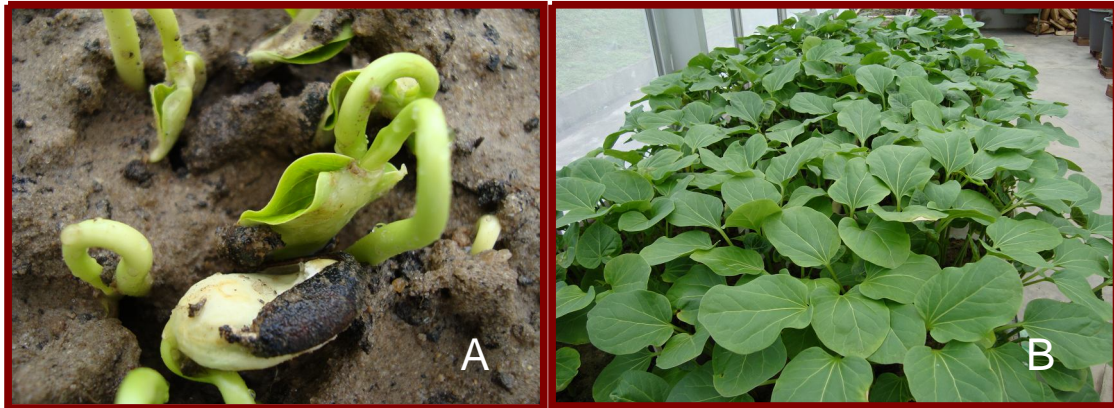
Para o controle de pragas nos experimentos, foram realizadas amostragens periódicas, para que fosse possível avaliar os danos e adotar o método de controle mais eficaz. Assim sendo, o controle foi realizado inicialmente com Endosulfan no controle dos ácaros, com pulverizador costal manual e depois utilizou-se um acaricida .

#### **4.1.8 Irrigação**

Foram realizadas irrigações diárias nos vasos, quando necessário, de forma a repor a água consumida na evapotranspiração e manter o solo com umidade próxima à capacidade de campo. A água utilizada foi à de uma cisterna localizada na Embrapa do município de Campina Grande, PB.

#### **4.1.9 Plantio**

O plantio ocorreu no dia 12/01/2008, com sementes provenientes do município de Garanhuns-PE, sendo semeadas três sementes por vaso, inserida na posição com a carúncula para cima, tendo em vista a aceleração na germinação da semente. As sementes foram plantadas com uma profundidade de aproximadamente 5 cm e uma distância de 3cm entre as sementes. O desbaste foi realizado quinze dias após a emergência das sementes, retirando-se as plântulas consideradas menos vigorosas e se deixando apenas uma planta por vaso, sendo escolhidas as de tamanho uniforme e bem distribuída no recipiente Figura 1.



**Figura 1.** O Pinhão manso aos 5 dias (A), 30 dias (B) Emergência casa de vegetação da Embrapa. Campina Grande-PB, 2008.

#### 4.2.0 Germinação

Foi avaliada diariamente mediante contagem do número de sementes germinadas, tendo como critério a emergência do epicótilo na superfície. Sendo avaliada a variável número de dias para as sementes germinarem (NDG), obtido através da expressão:  $NDG = \frac{\sum n_{ii}}{\sum n_i}$ , onde  $n_i$  = número de sementes germinadas no dia  $i$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ ), bem como a percentagem de sementes germinadas (PG) em relação ao número de sementes plantadas. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado, tendo por base a Eq.(1) apresentada por Vieira e Carvalho (1994). Como a salinidade normalmente atrasa a germinação, foi pré-estabelecido um período de 30 dias para a avaliação, ao invés do período compreendido entre 20 a 25 dias, considerado em condições normais por (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000)).

$$IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn;$$

Onde,

$G_1, G_2, G_n$  = número de plântulas computadas na primeira, na segunda e na última contagem;

$N_1, N_2, N_n$  = número de dias de semeadura à primeira, segunda e última contagens.

#### **4.2.1 Característica de crescimento inicial**

Com base no procedimento recomendado por Beltrão (2006), fez-se uma avaliação das características de crescimento inicial. Sendo as variáveis relacionadas ao crescimento do pinhão manso aos 30, 45, 60, 75, 90 e 105 dias, após a emergência das plântulas, tendo as seguintes variáveis:

**4.2.2 Altura da planta (cm):** foram feitas medições da altura a cada 15 dias com a utilização de uma régua graduada, desde o colo da planta até a inserção da última folha.

**4.2.3 Diâmetro caulinar:** a avaliação do diâmetro caulinar foi realizada com um paquímetro, verificando-se o diâmetro a 3, 5 e 8 cm do solo.

**4.2.4 Área foliar:** tomaram-se as medidas da folha (largura e comprimento da nervura principal), considerando-se como tamanho da nervura principal a distância entre o ponto de inserção do pecíolo e a extremidade inferior da folha e como largura a maior dimensão aproximadamente perpendicular à nervura principal. A área foliar foi calculada pela fórmula  $A = 0,84 \times (P + L) \times 0,99$  sugerida por Severino et al. (2004), utilizando valores do comprimento da nervura principal (P) e da largura da folha (L).

**4.2.5 Peso da fitomassa aérea:** a parte aérea de cada tratamento (caule e folhas) foi cortada e recolhida em sacos de papel, onde logo após foi levada à estufa a 65° C, permanecendo durante 96h. Depois de retirado da estufa, o material foi colocado em sacos plásticos (para evitar ganho de umidade) para o transporte até o local onde foi feita a pesagem em balança de precisão, anotando-se cada tratamento. Neste caso somente no final do experimento, aos 105 dias da germinação.

**4.2.6 Peso das raízes:** as raízes foram removidas e logo após foram lavadas em água corrente, levadas à estufa a 65° C durante 96h, onde se realizou a

pesagem, conforme descrito na fitomassa aérea. Neste caso aos 105 dias depois da germinação.

#### 4.2.7 Delineamento experimental e tratamentos

Utilizou-se no experimento o delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro repetições, totalizando 60 tratamentos em esquema fatorial 3 x 5 sendo os fatores três acessos (A) (1°Garanhuns - PE , 2° Itaporanga - PB e 3° Nova Cruzeiro-MG)e cinco níveis de condutividade elétrica (C) (0,13; 1,2; 2,4; 4,8 e 6,8 CEa , ds /m<sup>-1</sup>). Os dados foram submetidos a análise de variância e utilizou-se regressão para o fator quantitativo , segundo Silva, (2008) , (PROGRAMA de ASSISTAT).

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1 Germinação

As análises de variância dos dados de dias para emergência, índice de velocidade de emergência e percentagem de germinação, encontram-se na Tabela 5 observando-se que a interação dupla (condutividade elétrica x acessos), foi para todas variáveis significativa para os dados de germinação.

**Tabela 5.** Resumos das análises de variâncias do número de dias para emergência (NDE), índice de velocidade de emergência (IVE) e porcentagem de germinação (PG) por condutividade elétrica nos acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) submetidos a um período de 30 DIAS.

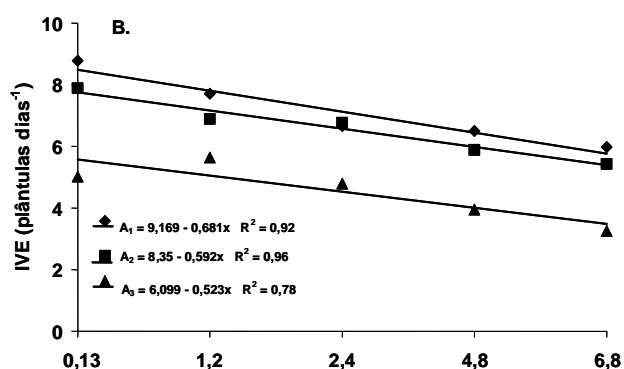
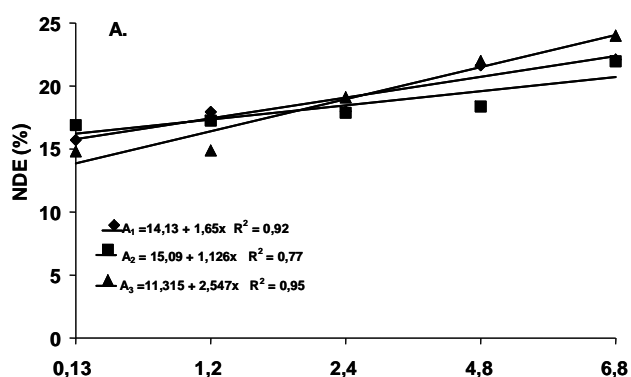
Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		NDE	IVE	PG
Acessos (A)	2	2,63711 <sup>ns</sup>	24,17385**	226,85832**
condutividade elétrica (C)	4	100,85584**	11,32516**	2676,59838**
A x C	8	17,99685**	3,04705**	178,35853**

A/C	(8)			
Efeito linear	1	137,381**	8,17216*	3257,209**
Efeito quadrático	1	6,43964 <sup>ns</sup>	1,10883 <sup>ns</sup>	75,434 <sup>ns</sup>
Desvio da regressão	1	0,1167 <sup>ns</sup>	2,7847 <sup>ns</sup>	0,4930 <sup>ns</sup>
Resíduo	42	2,34846	0,50316	20,28625
	59	652,36896	142,10977	13499,8596
CV (%)		8,18	15,45	6,36

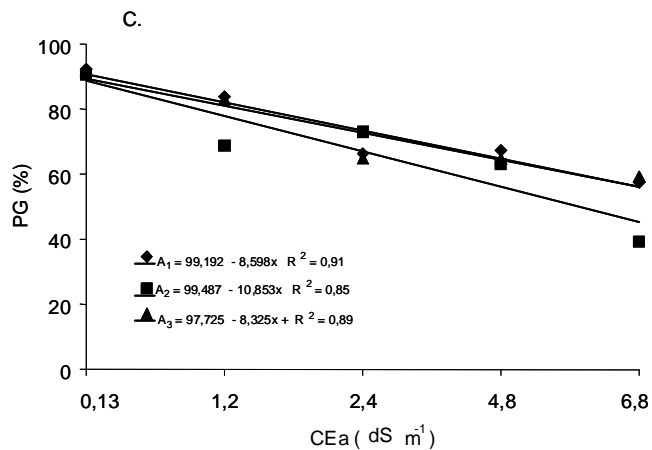
\*\* Significativo a 1% de probabilidade; \* Significativo a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> Não significativo

Na Figura 2, encontra-se a porcentagem, das sementes de pinhão manso diante a condutividade elétrica. O NDE (Número de dias para emergência) na sofreu alteração na sua emergência quando aplicado as condutividades elétricas (Figura 2 e Tabelas 5); no entanto, ocorreram reduções IVE (Índice de velocidade de emergência) e PG (porcentagem de germinação), aos 30 dias após semeadura (Tabela 5). Verificou-se que a salinidade da água de irrigação afetou significativamente os três acessos de pinhão manso, tendo havido diferenças significativas entre os tratamentos salinos, e entre os acessos, todos em nível de 1% de probabilidade

Segundo análise de regressão, o efeito da condutividade elétrica sobre o número de dias para germinação foi linear e crescente NDE foi de 10 com o aumento da salinidade da água de irrigação (Figura 2). O acréscimo relativo no IVE de 2,0 no início de NaCl 0,13 (5,5 a 8,5) concentração NaCl 6,8 (5 a 7) o “incremento relativo” por aumento unitário da condutividade elétrica em relação a C<sub>1</sub>. Observou-se ainda, que as sementes do acesso Garanhuns-PE germinaram num menor número de dias (15,87 dias), diferenciando-se estatisticamente do acesso (Itaporanga – PB).







**Figura 2.** Número de dias para emergência - NDE (A), índice de velocidade de emergência – IVE (B) e porcentagem de germinação – PG (C) em relação a níveis de condutividade elétrica aos 30 dias dos acessos de pinhão manso, Garanhuns (A1), Itaporanga (A2) e Novo Cruzeiro (A3)..

### 5.1.2 Valores primários da análise do crescimento não destrutiva

Os resumos das análises de variância dos dados das variáveis números de folhas (NF), área foliar (AF), altura de planta (AP) e diâmetro do caule (DC) aos 30, 45, 60 e 90 dias, estão na Tabela 6. Observou-se que a salinidade afetou significativamente (1% de probabilidade) as variáveis AF, NF, DC e AP, a partir da terceira avaliação (60 dias) com exceção de AP 90 dias. O diâmetro do caule não foi afetado em nenhuma época de avaliação dos níveis de condutividade. Houve interação entre níveis de condutividade elétrica nos acessos apenas para a AP 90 dias.

**Tabela 6.** Resumos das análises das variâncias (Quadrados médios) pinhão manso das variáveis, número de folhas por plantas (NF), altura de

planta em cm (AP), área foliar (AF) e diâmetro de caule em cm (DC) aos 30, 45, 60 e 90 dias. Campina Grande, PB, 2008.

Fonte de Variação	Quadrados Médios				
	G L	NF	AF	AP	DC
<b>30 dias</b>					
Acessos (A)	2	0,90337 <sup>ns</sup>	45,0243**	5,6606**	4,2373*
Condutividade elétrica (C)	4	2,04658**	17,9148**	8,4988**	153,9259**
A x C	8	8,0347**	4,21183**	8,7086**	2,0375 <sup>ns</sup>
A/ C	(8)				
Efeito linear	1	9,16998**	69,6163**	79,3720**	154,1380**
Efeito quadrático	1	43,39879**	0,36214 <sup>ns</sup>	12,6840**	7,5843 *
Residuo	45	0,26837	0,30591	1,77125	0,02421
Total	59	83,56869	146,79	207,97068	4,40982
CV (%)		10,63	9,09	10,04	19,13
<b>45 dias</b>					
Acessos (A)	2	6,5334**	184,926**	7,7730 **	0,7126 <sup>ns</sup>
Condutividade elétrica (C)	4	57,2815**	31,7588**	78,0795 **	5,4175 **
A x C	8	8,5096**	4,42367**	0,0612 *	0,2942 <sup>ns</sup>
A/ C	(8)				
Efeito linear	1	122,3352 **	120,00**	57,0214 **	22,8509 **
Efeito quadrático	1	13,0059 **	3,6021**	0,9854 <sup>ns</sup>	2,8372 <sup>ns</sup>
Residuo	45	0,47398	0,26333	1,52722	0,18489
Total	59	74,08578	542,8373	111,38242	7,54118
CV (%)		16,15	7,12	7,82	42,61
<b>60 dias</b>					
Acessos (A)	2	28,4715 **	129,62**	909,9394 **	536,2092 **
Condutividade elétrica (C)	4	1,4714 <sup>ns</sup>	87,9702**	16,5767 **	3,2228 *
A x C	8	5,3654 **	3,11825**	84,5817 **	22,6279 **
A/ C	(8)				
Efeito linear	1	1,234**	228,52**	0,456**	0,87,64**

Efeito quadrático	1	0,1345*	1,52381 <sup>ns</sup>	1,3458*	1,567**
Resíduo	45	0,48461	28,090	0,09929	0,10280
Total	59	99,22577	548,44	438,02699	244,33887
CV (%)		10,45	9,36	1,61	3,97
<b>90 dias</b>					
Acessos (A)	2	89,4693 **	47,548**	1057,2569 **	273,3370 **
Condutividade elétrica (C)	4	121,7702 **	109,907**	74,3725 **	6,6591 **
A x C	8	57,2681 **	1,7380**	12,0279 **	6,7009 **
A/C	(8)				
Efeito linear	1	1,234**	430,165**	0,456**	0,8764**
Efeito quadrático	1	0,1345*	5,94381**	1,3456*	1,567**
Resíduo	45	0,24000	0,27542	0,30806	0,05354
Total	59	280,59749	561,208	1392,64036	64,53502
CV (%)		6,94	5,12	2,29	16,79

\*\* Significativo a 1% de probabilidade; \* Significativo a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> Não significativo

### 5.1.3 Número de folhas (NF)

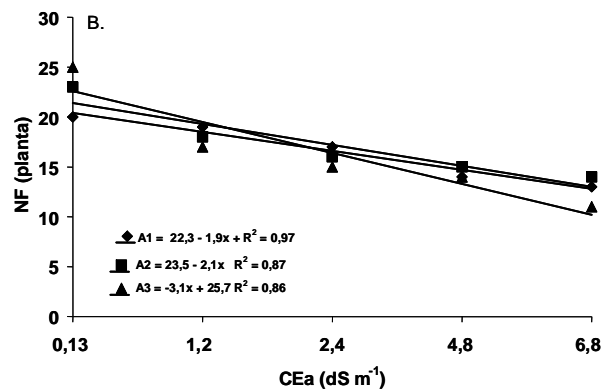
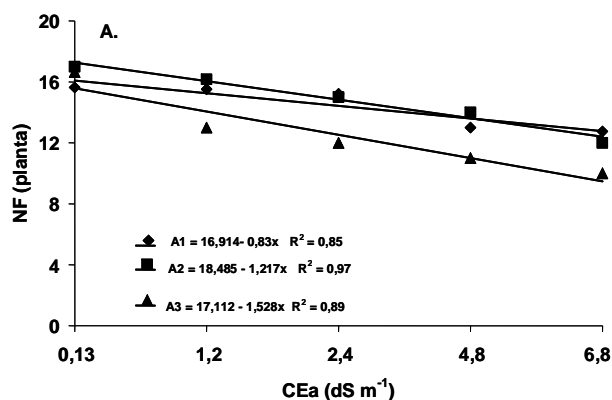
Na Figura 3 verifica-se que a condutividade elétrica da água de irrigação causou efeitos significativos para NF nos quatro últimos períodos de observações (45, 60 e 90 dias) Apenas aos 60 e 90 dias ocorreu diferença significativa no número de folhas entre todos os acessos ( $A_1$ ,  $A_2$  e  $A_3$ ), sendo significativa na Figura 2 A, B, C e D nos três acessos estudados.

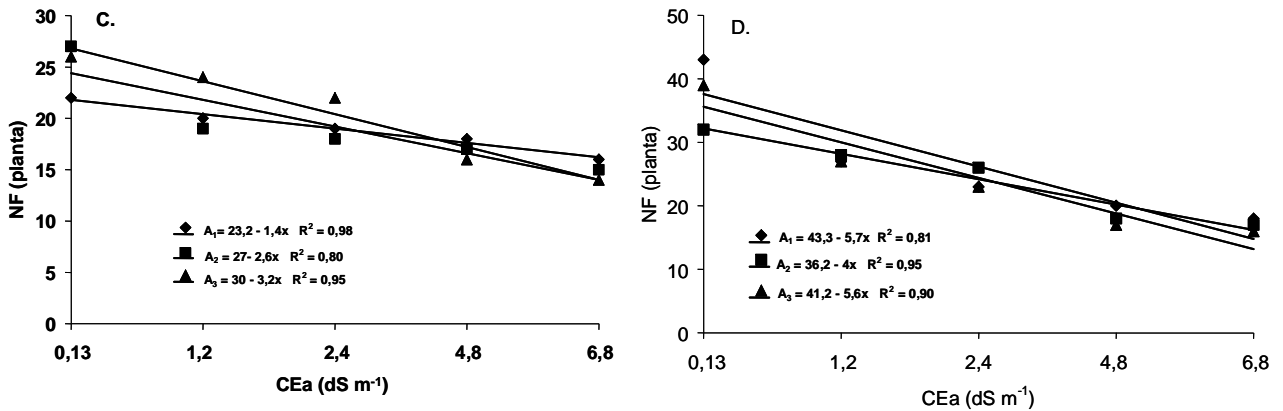
Conforme o modelo matemático da Figura 3 A, B, C e D os decréscimos para o NF aos 45 dias (decréscimo acessos  $A_1 = 6$ ,  $A_2 = 3$  e  $A_3 = 11$  de folhas por planta), 60 dias (decréscimo acessos  $A_1 = 2$ ,  $A_2 = 9$  e  $A_3 = 12$  de folhas por planta), e 90 dias (decréscimo acessos  $A_1 = 30$ ,  $A_2 = 17$  e  $A_3 = 25$  de folhas por planta), foram lineares e decrescentes, sendo respectivamente de NF 30 dias diminuo 4 (16 a 12 folhas), NF 45 dias (25 a 14 folhas), NF 60 dias (27 a 14 folhas) e NF 90 DIAS (43 a 15 folhas), com o aumento da concentração por unidade de condutividade elétrica da água de irrigação em relação ao nível salino mais baixo ( $C_1$  a  $C_5$ ). Vale ressaltar que mesmo havendo efeito significativo. entre as três primeiras épocas de avaliação (15, 30, 45 dias) as médias obtidas para o acesso de Garanhuns - PE em termo de NF foram numericamente superiores.

Cavalcanti (2003) observou uma redução altamente significativa para o número de folhas entre as cultivares da mamona, onde a partir de 4,31 dS m<sup>-1</sup> a cultivar BRS - Paraguaçu cessou emissão de folhas, enquanto na BRS - Energia continuou o surgimento de novas folhas até 8,35 dS m<sup>-1</sup>. De acordo com Maas e Nieman (1978), as plantas reduzem a emissão de folhas para se adaptarem às novas condições de estresse salino e hídrico, mantendo deste modo, a turgescência das células. Outros autores (FREIRE, 2007) também citam redução quando ao tamanho e número de folhas, e consideram este fato como sendo o resultado de alterações morfológicas e anatômicas realizadas pelas plantas, como medida de manter a absorção de água.

Romero e Oliveira (2000) têm observado que o excesso de sais pode causar toxidez similar àquela da adubação excessiva sendo possível de alterar o metabolismo do sistema radicular, reduzindo a síntese e/ou translocação de hormônios sintetizados neste órgão da planta, os quais são necessários ao metabolismo foliar. Como resultado, o crescimento das folhas é atrasado.

Vários autores observaram decréscimo no NF, quando as culturas são cultivadas na presença de alta salinidade; como exemplos, Cavalcanti (2003) encontrou em seu estudo com a mamona redução linear do NF de 2,95% para cada incremento unitário da CEa, a partir de 1,78 dS m<sup>-1</sup> e, no algodão marrom, Siqueira (2005) observou reduções no NF de 6,17% por incremento unitário da CEa, a partir de 3,5 dS m<sup>-1</sup>.

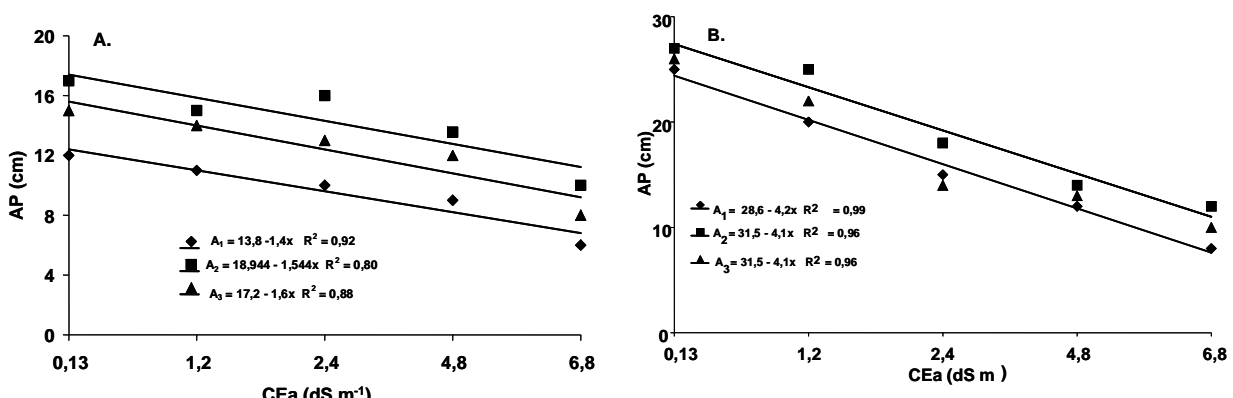


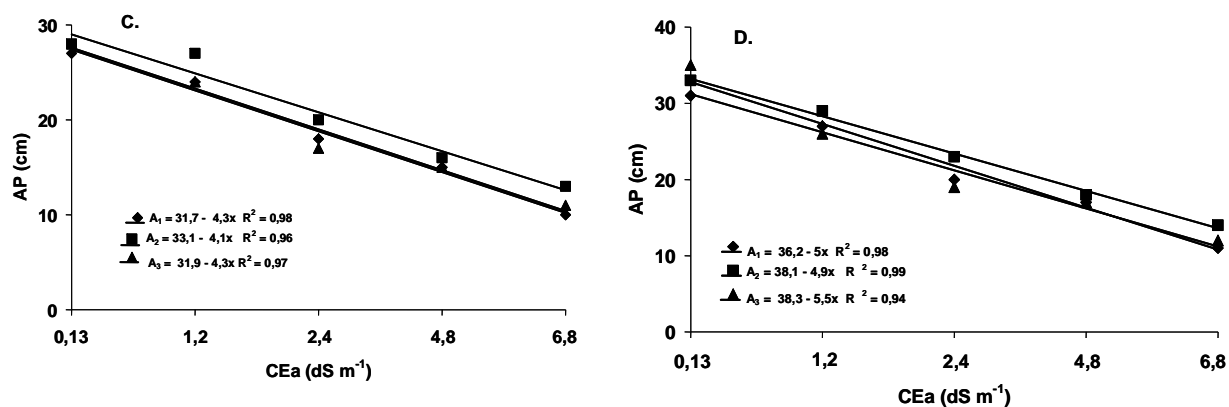


**Figura 3.** Número de folhas em níveis de condutividade elétrica, função de quatro períodos 30, 45, 60 e 90 dias de avaliações dos três acessos do pinhão manso, Garanhuns (A1), Itaporanga (A2) e Novo Cruzeiro (A3).

#### 5.1. 4 Altura de planta (AP)

Houve efeito significativo da condutividade elétrica, em nível de 1% de probabilidade, sobre a altura de planta aos 45 e 90 dias, sendo que aos 90 dias ocorreu uma diminuição mais acentuada em todos os períodos estudado. Segundo equações obtidas nas Figuras 4 A (decréscimo acessos A<sub>1</sub> = 4, A<sub>2</sub> = 5 e A<sub>3</sub> = 5 cm de altura por planta), B (decréscimo acessos A<sub>1</sub> = 15, A<sub>2</sub> = 7 e A<sub>3</sub> = 15cm de altura por planta), C (decréscimo acessos A<sub>1</sub> = 7, A<sub>2</sub> = 8 e A<sub>3</sub> = 8 de altura por planta) e D (decréscimo acessos A<sub>1</sub> = 12, A<sub>2</sub> = 16 e A<sub>3</sub> = 20 cm de altura por planta). Conforme Lima, 2007 que estudou altura e verificou um decréscimo da altura das plantas em condições de estresse salino.





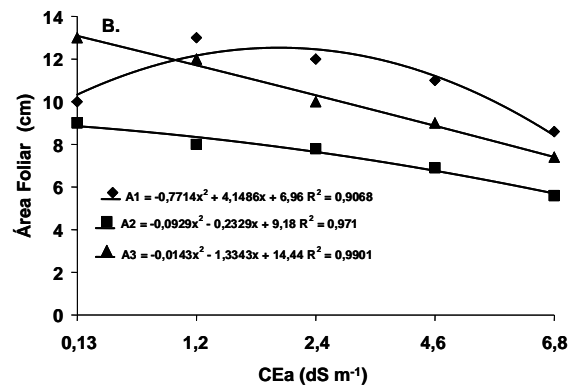
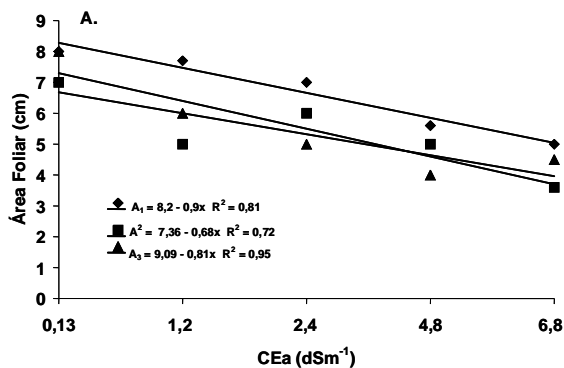
**Figura 4.** Altura da planta em níveis de condutividade elétrica, função dos quatro períodos, 30, 45, 60 e 90 dias de avaliações dos três acessos do pinhão manso, Garanhuns (A1), Itaporanga (A2) e Novo Cruzeiro (A3).

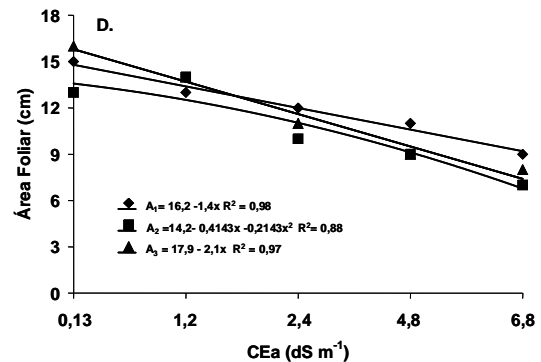
### 3.1.5. Área foliar (AF)

A área foliar alterou os efeitos níveis de condutividade elétrica da água de irrigação para as duas últimas das três avaliações realizadas (30 e 90 dias), ambas em nível de 1 % de probabilidade Figuras 5 A (decréscimo acessos  $A_1 = 2$ ,  $A_2 = 3$  e  $A_3 = 2$  cm da área foliar por planta), B (decréscimo acessos  $A_1 = 2$ ,  $A_2 = 3$  e  $A_3 = 5$  cm da área foliar por planta), C (decréscimo acessos  $A_1 = 4$ ,  $A_2 = 8$  e  $A_3 = 6$  cm da área foliar por planta) e D (decréscimo acessos  $A_1 = 6$ ,  $A_2 = 8$  e  $A_3 = 8$  cm da área foliar por planta), efeito significativo entre o acesso e salinidade de água de irrigação. Segundo (SOUZA, 1995, SILVA e SACOROTTI, 2005), a redução da área foliar provavelmente decorre da diminuição do volume de células. Os autores afirmam que a redução da área foliar e da fotossíntese contribui, de certo modo, para adaptação das culturas à condutividade elétrica. Este fato se deve ao aumento indireto da concentração total de solutos na folha,

o que contribui para o ajustamento osmótico, a menos que os solutos elevem os níveis de salinidades.

Efeitos da salinidade sobre a redução da área foliar também foram relatados por Silva et al. (2004) em duas cultivares de mamona com reduções de 92 a 99 %, quando submetidas à concentração de 85 mol.m<sup>-3</sup> de NaCl. Segundo esses autores, reduções na AF ocorrem, principalmente, em função da diminuição do volume das células devido à redução da pressão de turgor. A redução do crescimento das folhas, entretanto, é resultante tanto da divisão quanto do alongamento celular (MUNNS e TESTER, 2008).





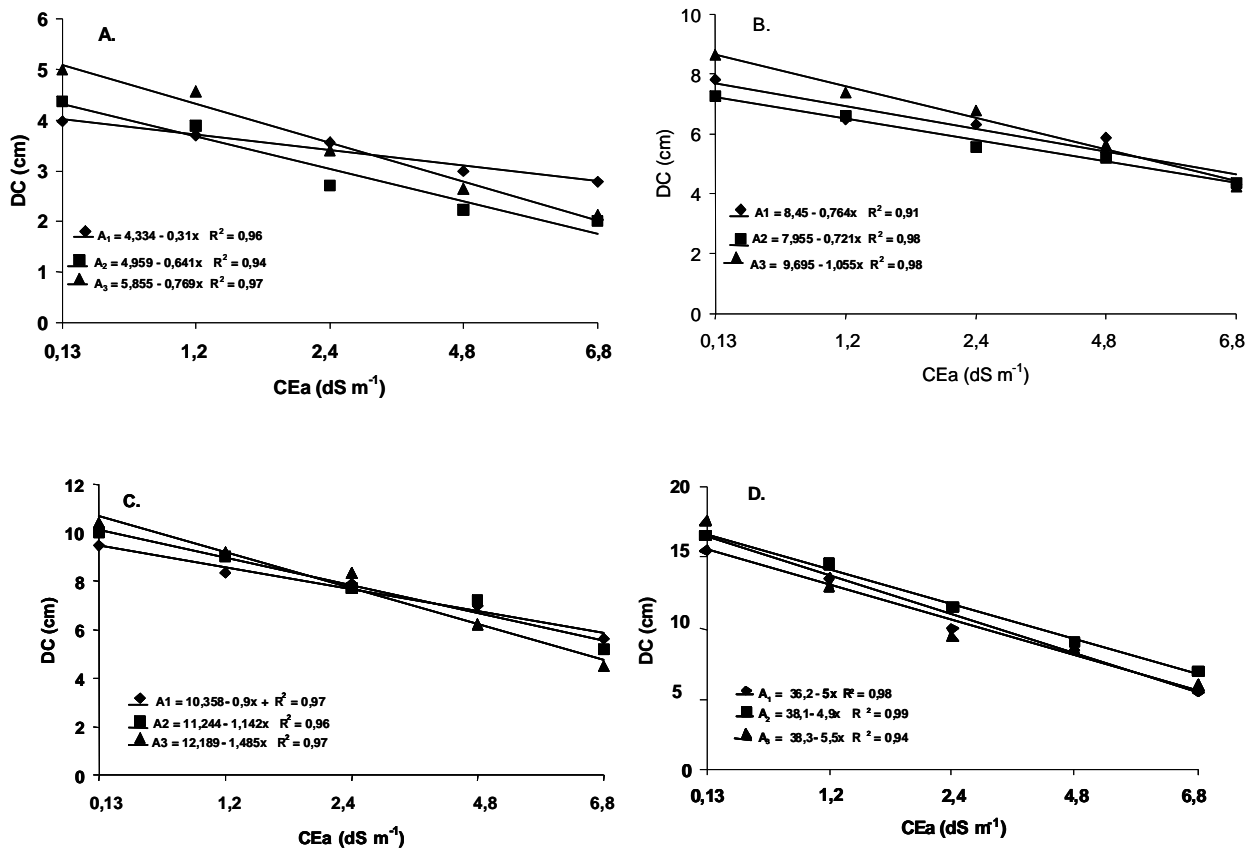
**Figura 5.** Área Foliar em relação à salinidade de água de irrigação função dos quatro períodos de avaliações dos três acessos pinhão manso Garanhus (A1), Itaporanga (A2) e Novo Cruzeiro (A3). aos 30, 45, 60 90 dias.

#### 5.1.6 Diâmetro do Caule (DC)

Os diâmetros nas Figuras 6 A (decréscimo acessos A<sub>1</sub> = 0,2, A<sub>2</sub> = 1,3 e A<sub>3</sub> = 2 cm do diâmetro por planta), B (decréscimo acessos A<sub>1</sub> = 3,5, A<sub>2</sub> = 2 e A<sub>3</sub> = 2,6 cm do diâmetro por planta), C (decréscimo acessos A<sub>1</sub> = 2,4, A<sub>2</sub> = 3,2 e A<sub>3</sub> = 2,8 cm do diâmetro por planta) e D (decréscimo acessos A<sub>1</sub> = 10, A<sub>2</sub> = 7 e A<sub>3</sub> = 12 cm do diâmetro por planta). De acordo com a classificação de Maas (1986), utilizada para indicar a tolerância de várias culturas, a salinidade, pode-se classificar o pinhão-manso como uma espécie sensível à salinidade devido à redução significativa de todas essas variáveis de crescimento analisadas neste estudo, já a partir da dose de 2,4 CEa dS m<sup>-1</sup> durante o período de estresse.

O processo de crescimento é particularmente sensível ao efeito dos sais, de forma que a taxa de crescimento pode servir de critério para avaliar o grau de estresse e a capacidade da planta de superá-lo (LARCHER, 2004). Mesmo as espécies consideradas tolerantes ao sal apresentam redução do crescimento em presença níveis de condutividade elétrica, embora em igual concentração de sal, plantas tolerantes sejam capazes de manter maiores taxas de crescimento em relação às sensíveis (NEUMANN, 1997).





**Figura 6.** Diâmetro de caule condutividade elétrica, função dos quatro períodos: 30, 45, 60 e 90 dias de avaliações dos três acessos pinhão manso Garanhuns (A1), Itaporanga (A2) e Novo Cruzeiro (A3).

### 5.1.7 Fitomassa seca da parte aérea (FSPA) 105 dias.

As análises de variância e as médias para as fitomassas seca da parte aérea (FSPA) 105 dias houve efeito significativo da salinidade da água de irrigação em nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente sobre estas três variáveis, havendo, entretanto, efeito significativo entre os acessos do pinhão manso e sem interações entre tratamentos salinos e o acesso (Tabelas 7).

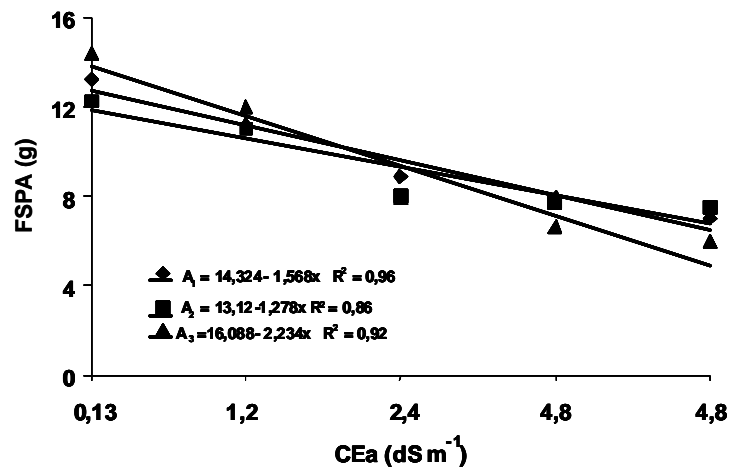
**Tabela 7.** Resumo da análise de variância dos quadrados médios fitomassa seca da parte aérea total (FSPA) de pinhão manso 105 dias, Campina Grande- PB 2008.

Fonte de Variação	G L	Quadrado médio	
		FSPA	
Fonte de Variação		105 dias	
Acessos (A)	2	156,9572 **	
Condutividade elétrica (C)	4	8,2855 **	
A x C	8	2,8061 *	
A/ C	(8)		
Efeito linear	1	0,7866**	
Efeito quadrático	1	1,1389**	
Resíduo	45	0,10942	
Total	59	77,99909	
CV (%)		10,23	

(\*\*) significativo a 0,01 de probabilidade; (\*) significativo a 0,05 de probabilidade; (ns) não significativo;

De maneira semelhante, a fitomassa seca da parte aérea (Tabela 7), sofreu efeito significativo dos níveis condutividade elétrica aos 105 dias. Conforme análise observou-se na Tabela 7, que houve decréscimo linear em nível de 1%, de probabilidade. O decréscimo percentual para o nível de salinidade mais elevado Figura 7 ocorreu um decréscimo nos acessos  $A_1 = 2$  g,  $A_2 = 1,2$  e  $A_3 = 6$  g de fitomassa da parte área por planta. Considerando-se que nos três acessos ocorreu decréscimo, evidencia-se maior efeito de níveis de salinidade sobre esta variável frente aos níveis salinos. Freira, (2007), estudando o crescimento inicial de genótipos de cajueiro irrigados com água de condutividade elétrica, variando entre 0,7 e 2,8 dS  $m^{-1}$ , observou ter sido significativamente mais afetado aos 100 dias, a fitomassa seca da parte aérea, ao

contrário do presente estudo, onde houve efeito mais negativo sobre a fitomassa verde da parte aérea



**Figura 7.** Fitomassa da parte aérea em relação condutividade elétrica da água de irrigação dos três acessos pinhão manso, Garanhuns (A1), Itaporanga (A2) e Novo Cruzeiro (A3), aos 105 dias.

### 5.1.8 Fitomassa seca total raiz (FSTR)

Na análise de variância para as variáveis FSR aos 105 dias (Tabela 8) observou-se que a salinidade da água de irrigação também influenciou significativamente sobre a produção de fitomassa seca de raízes em nível de 1%.

**Tabela 8.** Resumo da análise de variância dos dados do quadrado médio de fitomassa seca raízes (FSR) e de pinhão manso aos 105 dias. Campina Grande, PB, 2008.

Fonte de Variação	G L	Quadrado Médio	
		FSR	
		105 dias	
Acessos (A)	2	5,8692 **	
Condutividade elétrica	4	81,2741**	
(C)			
A x C	8	14,7105 **	
A/ C	(8)		
Efeito linear	1	0,7644**	
Efeito quadrático	1	1,5222**	
Resíduo	45	0,26163	
Total	59	130,20694	
CV (%)		16,99	

(\*\*) significativo a 0,01 de probabilidade;

Na Figura 8 verificou a diferença dos acessos do pinhão manso com maior sensibilidade aos 105 dias na fitomassa da raiz. Nota-se na FSR, que ocorreu um decréscimo nos acessos  $A_1 = 1,2$  g,  $A_2 = 2$  e  $A_3 = 2$  g de fitomassa das raízes por planta. Estes resultados estão em acordo com Meiri e Poljakoff-Mayber, (1970), Maas e Hoffmann, (1979), ao afirmarem que a salinidade, em geral reduz mais a produção de fitomassa das raízes de plantas, permitindo a planta aumentar a sua capacidade de absorção de água e diminuir a taxa de transpiração (SILVA et al. 1997).

**Figura 8.** Fitomassa total da Raiz em relação condutividade elétrica da água de irrigação dos três acessos pinhão mansa, Garanhuns (A1), Itaporanga (A2) e Novo Cruzeiro (A3) aos 105 dias.

## **6 CONCLUSÕES**

1. A condutividade elétrica da água irrigada reduziu significativamente a percentagem de germinação das sementes. A partir dos níveis C<sub>4</sub> (4,8 dS m<sup>-1</sup>), o acesso Garanhuns obteve melhores resultados, superando os acessos de Itaporanga e Novo Cruzeiro.

2. Os níveis condutividade elétrica da água de irrigação (CEa) reduziu o índice de velocidade de germinação e proporcionaram acréscimos em termos de dias para germinar.

3. A condutividade elétrica da água superior a 0,13 dS m<sup>-1</sup> afetou negativamente a emissão de folhas, o crescimento em altura e a área foliar das plantas, a partir dos 45 dias; havendo menores reduções no acesso de Garanhuns.

4. O aumento a condutividade elétrica e provocou decréscimo sobre a fitomassa seca aérea (FSPA) de raízes (FSTR) aos 105 dias nos três acessos de pinhão manso.

## REFERÊNCIAS

ABA - **Anuário Brasileiro de Agroenergia. Pinhão manso.** Santa Cruz do Sul: Gazeta, 2007. 520p.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura.** Campina Grande UFPB, Estudo da FAO irrigação e drenagem v.3 n.1 p.218, 1991.

BELTRÃO, N. E. M. Considerações gerais sobre o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) e a necessidade urgente de pesquisas, desenvolvimento e inovações tecnológicas para esta planta nas condições brasileiras. Campina Grande: **EMBRAPA.** 2006. 4p.

CÁCERES, D. R.; PORTAS, A. A.; ABRAMIDES, J. E. Pinhão- manso 200,<  
[HTTP://www.infobibos.com/Artigo/2007\\_3\\_pinhaomanso](http://www.infobibos.com/Artigo/2007_3_pinhaomanso)> 17 Fev.2008.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes:** ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, v.4, n. 588p. 2000.

CAVALCANTI, M. L. F. **Germinação e crescimento inicial da mamoneira irrigada com águas salinas.** Campina Grande: UFCG, 2003. 46p. Dissertação Mestrado.

CAVALCANTI, M. L. F.; FERNANDES, P. D.; GHEYI, H. R.; BARROS JÚNIOR, G.; SOARES, F. A. L.; SIQUEIRA, E. C. Índices ecofisiológicos da mamoneira sob estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.9, Suplemento**, p.66-70, 2005.

CORREIA, K. G. **Índices fenológicos e fisiológicos de amendoim sob estresse salino.** Campina Grande: UFCG, 2005. 67p. Dissertação Mestrado.

CRAMER, G. R.; LAUCHLI, A.; POLITO, V. S. **Displacement of Ca<sup>2+</sup> by Na<sup>+</sup> from the plasmalemma of root cells.** A primary response to salt stress. *Plant Physiology*, Berlin, v. 79, 1985, p. 207-211.

FREIRE, L .M. S. Estudo Termo-Oxidativo e Caracterização Físico-Química do Biodiesel de Pinhão-Manso. II **Congresso da RBTB**, UFPB, 2007.

LIMA F. C. F **Adaptive Population Sizing Schemes in Genetic Algorithms.**, Parameter Setting in Evolutionary Algorithms, Studies in Computational Intelligence Series, Springer.v1 p.123, 2007.

LIMA, J. A .A.; VALE, C. C.; OLIVEIRA, V. B. **Viruses that infect cucurbits in the northeast of Brazil.** Viruses: Reviews e Research Journal of the Brazilian Society for Virology, São Paulo, v.2, n.1/2, p.202, 1997.

MAAS, E.V.; HOFFMAN, G.J. Crop salt tolerance-current assessment. **Journal of Irrigation and Drainage Division**, New York, v.103, n.1R2, p.115-134, 1979.

MAAS, E.V.; NIEMAN, R.H. Physiology of tolerant plants to salinity. In: Jung, G.A. (ed.). Crop tolerance to sub-optimal land conditions. Madison: American Society Agronomy cap. 1. p.277-299. **Special Publication**, 1978.

MAAS, P. J. M. WESTRA, L. Y..Studies in Annonaceae. II. A monograph of the genus *Anaxagorea* A.St.-Hil. Part 2. **Botanische Jahrbücher für Systematik** 105(2): 1986, 145-204.

MEIRI, A.; MOR, E.; POLJAKOFF-MAYBER, A. Effect of exposure to salinity on growth, water status and salt accumulation in bean plants. **Annals of Botany**, London, v.34, n.136, p.383-391, 1970.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.651-681, 2008.

NEUMANN, E.; KAKORIN, S.; TSONEVA, I. DNA mediada por adsorção-cálcio nas células de levedura e da cinética de transformação de células através de eletroporação. **Biophysical Journal**, v.71, p.868-877, 1996.



PEREIRA, J.R. **Solos salinos sódicos**. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do solo, Campinas, Anais Campinas:SBCS, v.15, p.127-143.

PEREIRA, J.R. **Solos salinos sódicos**. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do solo, Campinas, Anais Campinas: SBCS, v.15, p.127-143.

ROMERO, R. E.; OLIVEIRA, T. S. Imobilização de nutrientes e produção de matéria seca em condições de salinidade e sodicidade crescentes no solo. **Revista Ceres**, v. 17, n. 272, p. 363-373, 2000.

SEVERINO, L. S, CARDOSO, G. D VALE L. S.; SANTOS, J. W. Método Para determinação da área foliar da mamoneira. **Revista Brasileira Oleaginosas e Fibrosas**, v. 8, n. 1, p. 753 - 762, de 2004.

SILVA J. R.; C. D.; PASSOS, E. E. M.; GHEYI, H. R. Aplicação de água salina no desenvolvimento e comportamento fisiológico do coqueiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.6, n.1, p.39-44, 2004.

SILVA, C. U. C.; ROCHA, P. S.; BURITY, M. P.; CÂMARA, T. R.; WILLADINO, L. Efeito de diferentes níveis de NaCl sobre o desenvolvimento *in vitro* de bananeira (*Musa* sp. Cv. 'Nanicão'). In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL**, 6., 1997, Belém, Anais... Belém: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal-PA, 1997.p.152.

SILVA, F. A. S. E. The ASSISTAT- **programa estatística**. UFCG, Campina Grande, 2008.

SILVA, R., SACCOROTTI, G., Wallenstein, N. - multipletos sísmica em São Miguel (Açores). Análise da fonte, local efeitos mão pat. **Resumos Geophysical Research**, vol. 7, 2007. União Européia de Geociências 2005 93-95.

SILVA, S. M. S.; ALVES, A. N.; GHEYI, H. R.; BELTRÃO, N. E. DE M.; SEVERINO, L. S.; SOARES, F. A. L. Germinação e crescimento inicial de duas

cultivares de mamoneira sob estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9, Suplemento, p.347-352, 2005.

SIQUEIRA, M. J. Investment Research "Pays Off: tecnologia de barreira resulta em subsuperfície Redução de custos, do solo "e **limpeza das águas subterrâneas** v.2 p.6-13, 2005.

SOUZA, C. J. C.; O Booroola (FecB) fenótipo é associado com uma mutação no morfogenética gene. **Journal** v.3 p,123,1995.

TAIZ L. ZEIGEN E. **Pant physiology**, Sinaner associates,v.2, n.2,1998.

TOMINAGA, N.; KAKIDA, J.; YASUDA, E. K.; SOUSA, L. A. S.; RESENDE, P. L.;

SILVA, N. D. A. D. **Cultivo do pinhão-manso para produção de biodiesel**. Viçosa: Centro de Produções Técnicas, 220p, 2007.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M de. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal-SP: FUNEP/UNESP,1994,164p.

## CAPÍTULO 4

### EFEITOS DO ESTRESSE SALINO SOBRE NUTRIÇÃO MINERAL DE MUDAS DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.)

#### 1 RESUMO

ROCHA Maria do Socorro. EFEITOS DO ESTRESSE SALINO SOBRE NUTRIÇÃO MINERAL DE MUDAS DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) Areia: UFPB/CCA, 2010. p.108 - 125 (Tese-Doutorado em Agronomia)

Objetivando-se avaliar a resposta do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) a doses crescentes de NaCl, foi instalado , em casa de vegetação, um experimento. O delineamento foi inteiramente casualizado com doses de NaCl (0, 13, 1,2, 2,4, 4,8 e 6,8 dS m<sup>-1</sup>) e três acessos desta oleaginosa . Aos 105 dias de cultivo, as plantas foram colhidas e avaliaram-se vários nutrientes acumulados Os sintomas de toxidez de salinidade foram caracterizados. A salinidade interferiu negativamente na absorção dos macronutrientes com exceção do fósforo e enxofre. Foi observado no pinhão manso Itaporanga e o Novo Cruzeiro quantidades superiores de sódio, fósforo e enxofre e a redução da absorção de cálcio e magnésio. Todos os macronutrientes tiveram sua absorção inibida pelo acúmulo de sódio nas folhas do pinhão manso, sendo o Fe e Zn inferiores nas folhas do acesso Garanhuns, onde os limites do sódio foram superiores. O consumo de água foi reduzido com a relação de CEa nos três acessos de pinhão manso de forma semelhante.

**PALAVRAS CHAVE:** condutividade elétrica, NaCl, salinidade.

## 2 ABSTRACT

ROCHA Maria do Socorro. EFFECTS OF SALINE STRESS ON THE MINERAL NUTRITION AND GROWTH OF *Jatropha* Areia: UFPB/CCA, 2010. p.108-125- (Tese-Doutorado em Agronomia)

To evaluate the *Jatropha* response to salinity, an experiment in a completely randomized design was conducted in nutrient solution under greenhouse conditions. The treatments corresponded to increasing levels of NaCl (0, 1.3, 1.2, 2.4, 4.8 and 6.8 dS m<sup>-1</sup>). Seventy-seven days after the beginning of the treatments, the plants were harvested and the stem diameter, the root, stem and leaf dry matters, and accumulated nutrients evaluated. All parameters presented inverse relation to increasing levels of salt. In all salt levels it was verified a decrease of N, P, K, Ca and Mg accumulated in root, stem and leaves, and an increase of Na accumulation, mainly in root at the first level of NaCl. Symptoms of salt toxicity were identified. Salinity had a negative influence on the absorption of nutrients except phosphorus and sulfur. The *Jatropha* Itaporanga and New Cruise observed higher amounts of sodium, phosphorus and iron and reduced absorption of calcium and magnesium. All the nutrients have inhibited its absorption by the accumulation of sodium in the leaves of *Jatropha curcas*, and the lower Fe and Zn in the leaves of access Garanhuns where the limits of sodium were increased. The variable.

KEY WORDS: NaCl, electrical conductivity, salinity stress.

### 3 INTRODUÇÃO

O pinhão manso (*Jatropha curcas L.*) é uma planta de origem tropical, produtora de óleo e bem adaptada a diversas regiões do Brasil, que tem sido incentivado nos últimos anos como uma alternativa para fornecimento de matéria prima para fabricação de biodiesel. Adicionalmente à capacidade de produzir óleo vegetal, ele é tido como tolerante ao déficit hídrico para sobrevivência, e pode apresentar a capacidade de recuperação de áreas degradadas em função de suas raízes profundas, crescendo em solos de baixa fertilidade (TEIXEIRA, et al. 2007). Além de produzir óleo, o pinhão manso também pode ser utilizado para outros fins, tais como: a) substituição parcial do arame em cercas vivas, já que os animais evitam tocá-lo devido ao látex cáustico que escorre das folhas arrancadas ou feridas; b) pode ser usado como suporte para plantas trepadeiras como a baunilha (*Vanilla aromática*), visto que o tronco possui casca lisa e macia e c) atua como fixador de dunas na orla marítima (PEIXOTO, 1973).

Somente nos últimos 30 anos, é que estudos agronômicos foram iniciados com a espécie, embora se trate de uma planta ainda não domesticada. Uma vez que surge como novidade e possível alternativa, desperta grande interesse, surgindo também muitas informações não confiáveis e até distorcidas sobre esta planta, tais como: produtividade elevadas (superiores a 12t/hectare) e teor de óleo elevado (SATURNINO et al. 2005). Não existem acessos definidos, e depois de se escolher e caracterizar materiais promissores para definir passos tecnológicos (HENNING, et al. 2005).

A importância da avaliação do estado nutricional de espécies vegetais, baseada na interpretação de resultados de análise foliar, tem sido amplamente utilizada e discutida, no intuito de possibilitar intervenções mais precisas em sistemas de produção vegetal, por meio de práticas de manejo e adubação.

Diversos estudos têm demonstrado a natureza dinâmica da composição de nutrientes no tecido vegetal, em consequência de fatores como idade da planta em condições climáticas (WALWORTH e SUMNER, 1987). Além disso, variações no teor de um nutriente podem influenciar não somente o teor de outro nutriente no tecido vegetal, mas também o valor crítico deste (BAILEY et al. 1997).

Os teores nutricionais nos vegetais pressupõem que as relações entre os teores dos nutrientes (relações bivariáveis) são as melhores indicadoras do desequilíbrio nutricional (WADT, 1996). As relações entre o teor de um nutriente e a média geométrica dos teores dos demais componentes da matéria seca, inclusive aqueles não avaliados analiticamente (relações ultivariáveis), são consideradas como forma de expressão do equilíbrio nutricional, quando se emprega o método CND (PARENT e DAFIR, 1992).

Objetivou-se neste trabalho. caracterizar a acumulação dos macronutrientes e micronutrientes em folha de pinhão manso e verificar o nível de tolerância ao estresse salino, utilizando doses crescentes de NaCl.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1.1 Localização do experimento**

### **4.1.2 Tratamentos**

O estudo foi realizado até 105 dias após sementeiras - DIAS, sendo avaliado a matéria seca as folhas do pinhão manso. Os tratamentos consistiram de cinco níveis de salinidade de água de uma cisterna da EMBRAPA com as condutividades de C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>, correspondendo às condutividades elétricas 0,13; 1,2; 2,4; 4,8 e 6,8 dS m<sup>-1</sup> a 25 °C e três acessos desta oleaginosa . Foram analisado no Laboratório de Universidade Federal UFPB, o acúmulo dos macronutrientes e micronutrientes das folhas de pinhão manso e verificar o nível de tolerância ao estresse salino correspondendo às condutividades elétricas 0,13; 1,2; 2,4; 4,8 e 6,8 dS m<sup>-1</sup>, utilizando doses crescentes de NaCl.

### **4.1.3 Matéria Seca**

As folhas colocada na estufa na temperatura de 65°C por 24 horas após a matéria seca foram submetida a análises químicas e determinados N, P, K, S, Ca, Mg e Na (MALAVOLTA, VITTI e OLIVEIRA, 1997). As quantidades de nutrientes acumuladas na matéria seca foram determinadas com base em seus respectivos teores, seguindo-se cálculos de índice de eficiência de utilização de nutrientes na matéria seca da parte aérea, conforme Siddiqi e Glass (1981), e índice de translocação de nutrientes para a parte aérea na Figura 1.



Foto: Maria Rocha

**Figura 1.** Folhas dos acessos de pinhão manso (A), material dos três acessos antes da secagem (B).

#### 4.1.4 Variáveis analisadas

**4.1.4.1 Análise do tecido vegetal-** após o procedimento de secagem da parte aérea das plantas as amostras foram trituradas em moinho e acondicionadas em sacos de papel para análises posteriores. Depois de processadas, as amostras secas foram submetidas ao processo de digestão sulfúrica para avaliação dos teores dos macronutrientes.

**4.1.4.2 Macronutrientes-** o nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S) , Sódio (Na) e relação sódio/potássio (Na/k) aos 105 dias nas folhas do pinhão manso de acordo com a metodologia descrita em MALAVOLTA et al. (1997). Depois foi calculada a extração de cada nutriente. A extração dos nutrientes foi calculada pela fórmula:  $\text{Nutriente extraído (g vaso}^{-1}\text{)} = 0,001 \times [\text{massa seca (g vaso}^{-1}\text{)} \times \text{teor do nutriente (gkg}^{-1}\text{)}]$ , considerando a média correspondente aos três cortes realizados.

**4.1.4.3 Micronutrientes-** o ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), zinco (Zn) e boro (B) após 105 dias nas folhas dos três acessos de pinhão manso (Garanhuns

Itaporanga e Novo Cruzeiro) a metodologia descrita em MALAVOLTA et al. (1997).

## **4.2 Análise estatística**

Utilizou-se no experimento o delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro repetições, totalizando 60 tratamentos em esquema fatorial 3 x 5 sendo três acessos ( $A_1$ ) 1º Garanhuns - PE, ( $A_2$ ) 2º Itaporanga - PB e ( $A_3$ ) 3º Nova Cruzeiro-MG), cinco concentrações de salina (C) (0,13; 1,2; 2,4; 4,8 e 6,8) e cinco períodos de avaliação (105 dias) e as variáveis avaliadas macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S, Na) e micronutrientes (Fe, Mn, Cu, Zn, B). Em função da concentração salina selecionou-se aquele em que todas as variáveis do modelo apresentaram contribuição significativa. Silva, 2008 (PROGRAMA de ASISTAT).

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Efeito da condutividade elétrica da água de irrigação na composição química de folha.**

#### **5.1.2 Macronutrientes**

Na Tabela 1 encontram-se os resultados das análises de variância com níveis crescentes de salinidade (0,13, 1,2, 2,4, 4,8 e 6,8) nos três acessos (C X A) com as variáveis dos macronutrientes ao nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S), sódio (Na) e relação sódio/potássio (Na/k) aos 105 dias nas folhas do pinhão manso. Na Tabela 1 verifica-se que a salinidade da água de irrigação exerceu efeito significativo 1% e 5% para os respectivos nutrientes.



**Tabela 1.** Resumos das análises das variâncias (quadrados médios) para teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), sódio (Na) e redução sódio/potássio (Na/K) encontrados nas folhas dos acessos de pinhão manso aos 105 DAS. Campina Grande, PB, 2008.

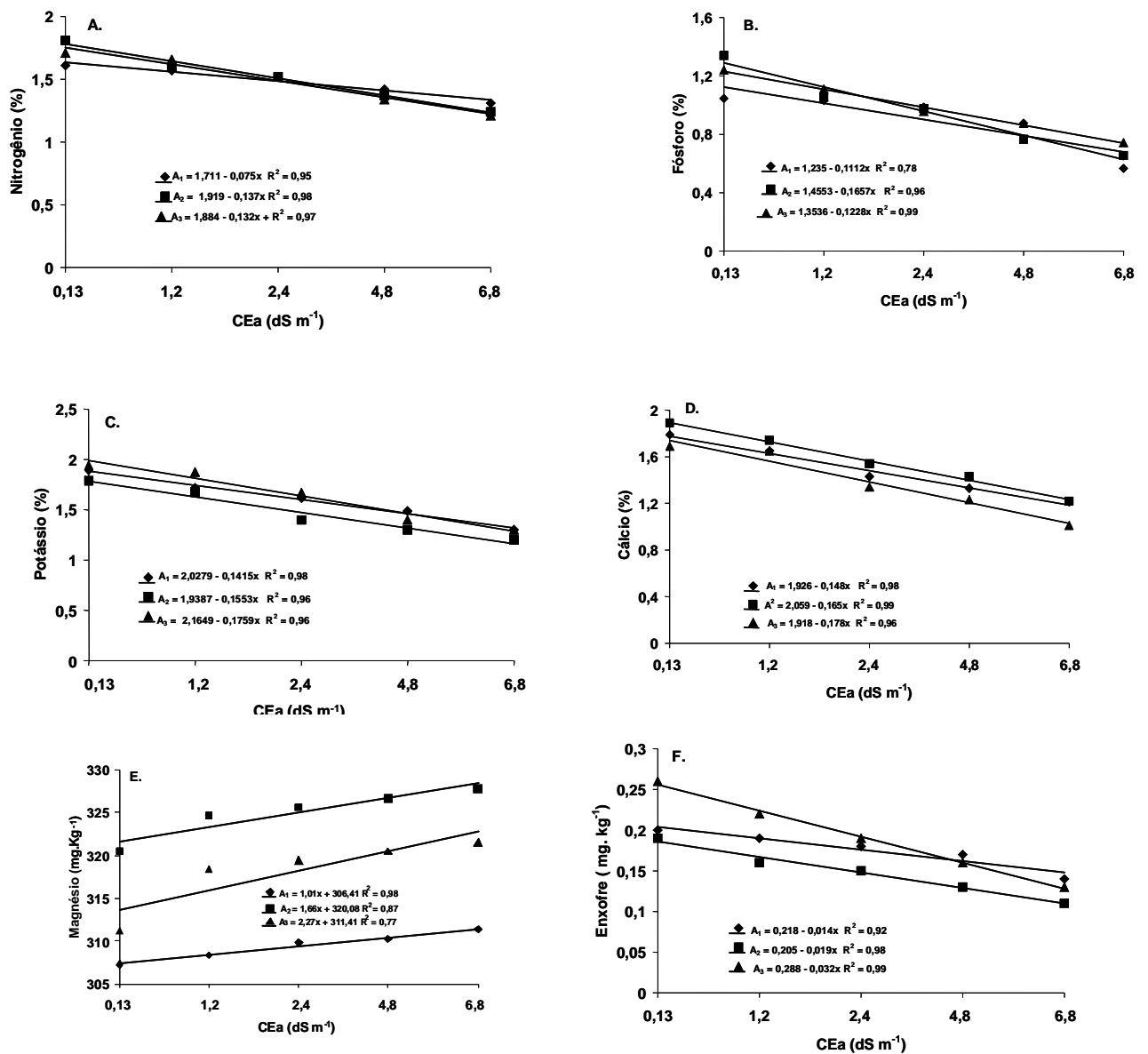
Fonte de Variação	G L	Quadrados médios		
		N	P	K
Acessos (A)	2	0,72041 <sup>ns</sup>	0,22470 <sup>**</sup>	0,07771 <sup>**</sup>
Condutividade elétrica	4	0,46114 <sup>**</sup>	0,19541 <sup>**</sup>	75,0097 <sup>**</sup>
(C)				
A x C	8	0,17579 <sup>**</sup>	0,42471 <sup>**</sup>	19,9613 <sup>**</sup>
A/ C	(8)			
Efeito linear	1	0,15696 <sup>**</sup>	0,15696 <sup>**</sup>	1,47630 <sup>**</sup>
Efeito quadrático	1	0,20024 <sup>**</sup>	0,20024 <sup>**</sup>	0,61081 <sup>**</sup>
Resíduo	45	0,00972	0,00742	0,00841
Total	59	5,12890	4,96284	4,40019
CV (%)		6,48	6,45	6,50
		Ca	Mg	S
Acessos (A)	2	0,02577 <sup>ns</sup>	0,19282 <sup>**</sup>	0,14377 <sup>**</sup>
Condutividade elétrica	4	0,67448 <sup>**</sup>	0,10596 <sup>**</sup>	0,24403 <sup>**</sup>
(C)				
A x C	8	0,27763 <sup>**</sup>	0,03718 <sup>*</sup>	0,03864 <sup>**</sup>
A/ C	(8)			
Efeito linear	1	1,47630 <sup>**</sup>	0,301 <sup>**</sup>	0,89787 <sup>**</sup>
Efeito quadrático	1	0,57283 <sup>**</sup>	0,001 <sup>*</sup>	0,03661 <sup>ns</sup>
Resíduo	45	0,01241	0,01467	0,01274
Total	59	5,52899	1,76716	2,14617
CV (%)		8,15	31,70	34,05
		Na	Na/K	
Acessos (A)	2	2894732,03953 <sup>**</sup>	0,59078 <sup>**</sup>	

Condutividade elétrica (C)	4	137145,87343**	0,11167**
A x C	8	61299,62999**	0,05419**
A/ C	(8)		
Efeito linear	1	361134,60267*	0,27456**
Efeito quadrático	1	177457,80009**	0,06404*
Resíduo	45	11376,15245	0,01139**
Total	59	7340371,47310	2,57449
CV (%)		21,51	33,85

(\*\*) significativo a 0,01 de probabilidade; (\*) significativo a 0,05 de probabilidade; (<sup>ns</sup>) não significativo;.

### 5.1.3 Nitrogênio – N (folhas)

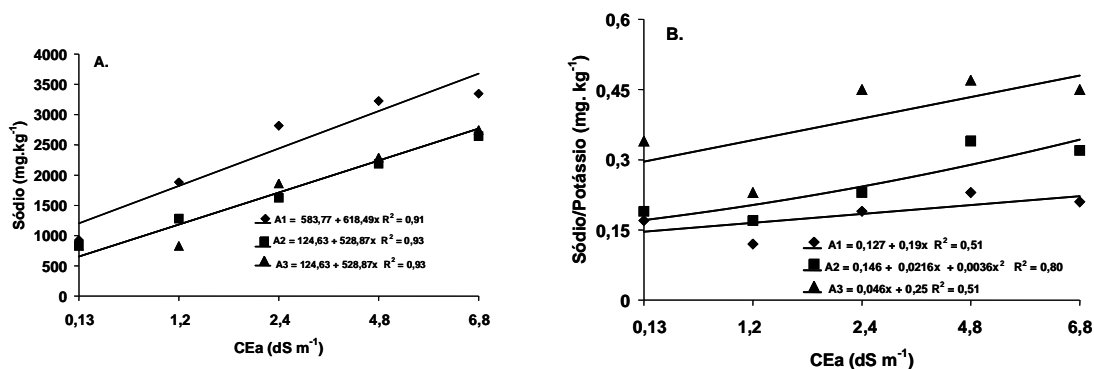
Na Figura 2 A observa-se as concentrações NaCl na água influenciou na absorção de nitrogênio (N) pelas plantas ocorreu um decréscimo nos acessos A= (A1 =1,7, A2 1,9 e A3 =1,8); B= (A1 =1,2, A2= 1,4 e A3 =1,3) C= (A1 =2,0, A2= 1,9 e A3 =2,1) nas folhas considerando os estudos de regressões, percebe-se que a salinidade da água teve efeito negativo. Estes resultados é uma evidencia da interação que ocorre entre os nutrientes, havendo inibição competitiva na absorção de Cu e Zn, pela maior absorção de Mn (LACAN e DURAND, 1985). Os resultados da análise de P e Zn nos ramos ou em fluxo, decorrente da mobilidade) diminuiu a absorção e concentração de Zn, fenômeno relatado por Olsen (1972), Silveira ET al. (1976) e Kuo (1986). A maior quantidade de P no tecido é também um indicador de que o Mg atua como carregador deste nutriente (Malavolta ET al. 1997).



**Figura 2.** As equações que representam os macronutrientes nas folhas do pinhão manso por diferentes níveis de condutividade elétrica: nitrogênio - N (A), fósforo – P (B), potássio – K (C), cálcio – Ca (D), magnésio – Mg (E) e enxofre – S (F) os acessos Garanhuns (A1), Itaporanga (A2) e Novo Cruzeiro (A3) aos 105 dias.

### 5.1.4 Sódio e relação sódio/ potássio (Na/K)

Ocorreu um crescente linear, em nível de 1% de probabilidade, ( Figura 3 A e B). Foram observando nos acessos o acréscimo  $A_1= 1,7\%$ ,  $A_2= 1,9$  e  $A_3= 1,8$   $\text{mg.kg}^{-1}$ ;  $B(A_1= 0,16$ ,  $A_2= 0,16$  e  $A_3= 0,14$   $\text{mg.kg}^{-1}$ ), na presença de nível de salinidade verificou que os acessos de Itaporanga e Novo Cruzeiro apresentaram conteúdo de sódio superior, (Figura A), justificando maior dificuldade de absorção desses elementos em presença de níveis elevadas de sódio.



**Figura 3.** Os teores de sódio e potássio e sódio em função condutividade elétrica da água de irrigação (CEa) dos acessos de pinhão manso aos 105 dias.

### 5.1.5 Micronutriente

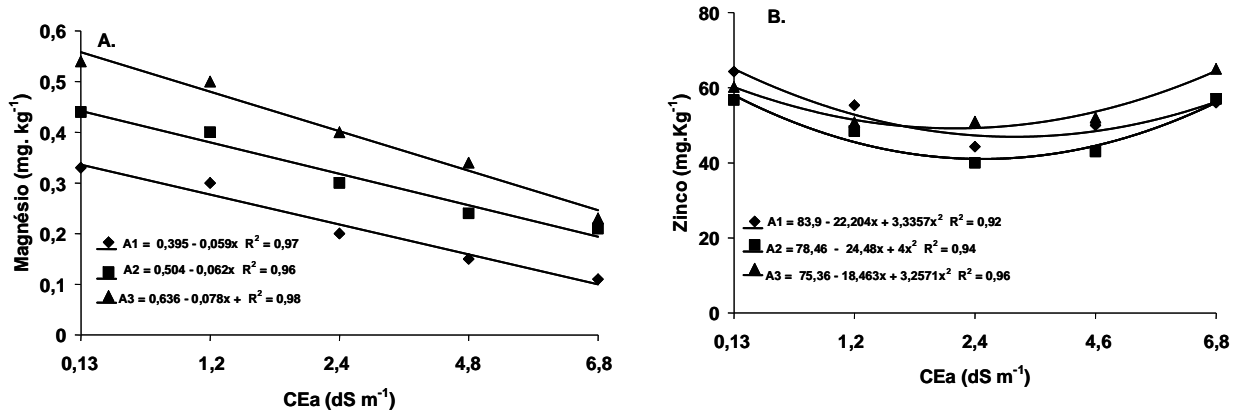
Encontram-se na Tabela 2 os resumos das análises de variância e os valores médios dos micronutrientes ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), zinco (Zn) e boro (B) após 105 dias nas folhas dos três acessos de pinhão manso (Garanhuns, Itaporanga e Novo Cruzeiro). Todos os micronutrientes significativamente 1%. Na interação dupla (A x C)

**Tabela 2** Resumos das análises da variância (Quadrados Médios) das variáveis para teores de ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), zinco (Zn) e boro (B) encontrados nas folhas dos acessos de pinhão manso (Garanhuns, Itaporanga e Novo Cruzeiro) aos 105 dias após semeadura (dias).

Fonte de Variação	Quadrados Médios			
	G L	Fe	Mn	Cu
Acessos (A)	2	4884,62**	191248,33**	58,91144 <sup>ns</sup>
Consen. Salina (C)	4	5942,47**	12110,82**	688,68**
A x C	8	3175,69**	22388,49**	53,10644*
A/ C	(8)			
Efeito linear	1	2,40267 <sup>ns</sup>	1222,53**	2482,84**
Efeito quadrático	1	20595,51**	30405,60**	94,26*
Total	59	87105,03	721527,77	4252,34
Resíduo	45	625,78579	2477,33	21,22095
CV (%)		15,89	19,08	22,16
		Zn		B
Acessos (A)	2	431,67**		602,48211**
Consen. Salina (C)	4	353,16*		440,33644**
A x C	8	713,77**		112,60544**
A/ C	(8)			
Efeito linear	1	158,33221 <sup>ns</sup>		1392,91788**
Efeito quadrático	1	840,80777**		31,85944 <sup>ns</sup>
Resíduo	45	80,28206		36,40028
Total	59	11598,88		5505,16609
CV (%)		20,03		15,32

### 5.1.6 Manganês e zinco

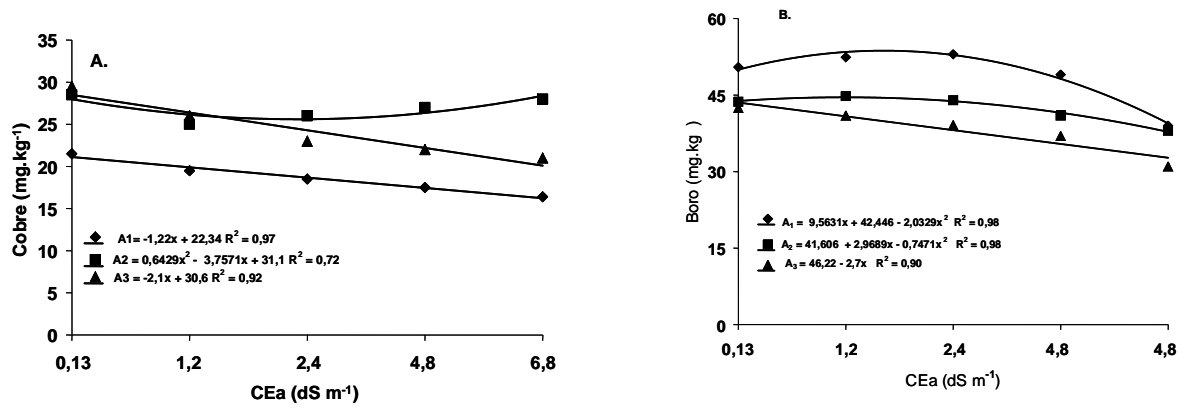
A salinidade da água de irrigação reduziu os teores de manganês aos 105 dias, sendo decrescente, linear e de 15,89% a redução por aumento unitário da condutividade elétrica de água de irrigação a partir de C<sub>1</sub> (Figura 4 A e B), o modelo matemática mais adequado foi linear para manganês com decréscimo relativos correspondentes a magnésio, A<sub>1</sub>= 0,2; A<sub>2</sub>= 0,4; A<sub>3</sub>= 0,1mg.kg<sup>-1</sup> na Figura 4 o acréscimo equivalente foi de 20,03%, zinco CEa 6,8 A<sub>1</sub> (Figura 4 A) o modelo matemático quadrático com acréscimo equivalente 6,3 no C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub>.



**Figura 4.** Concentração de manganês – Mn (A), zinco – Zn (B), em função salinidade da água de irrigação (CEa) dos acessos de pinhão manso Garanhuns (A1), Itaporanga (A2) e Nova Cruzeiro (A3) aos 105 dias.

### 5.1.7 Cobre e boro

Na Figura 5, observou os teores das concentrações de cobre (Cu) Figura 5-A foi de 22,16% e boro (B) Figura 5-B foi de 15,32%, o acréscimo 2% no acesso Itaporanga, decréscimo nos acessos Garanhuns e Novo Cruzeiro A<sub>1</sub>=0,2; A<sub>3</sub>=5 mg.kg<sup>-1</sup> na (Figura 5B) O decréscimo equivalente para boro CEa 6,8 A<sub>1</sub>=5 A<sub>2</sub>=1 A<sub>3</sub>=10 mg.kg<sup>-1</sup>, estes efeitos da salinidade sobre os teores foram encontrados nas folhas do pinhão manso aos 105 dias resultados sés por semelhantes foram encontrado por Lacan e Durand (1995).



**Figura 5.** Teores de Cobre (A), Boro (B) em função salinidade da água de irrigação (CEa) dos acessos de pinhão manso, Garanhuns (A1), Itaporanga (A2) e Novo Cruzeiro (A3) aos 105 dias.

## 6 CONCLUSÕES

1 - A salinidade da água de irrigação interferiu negativamente na absorção dos macronutrientes exceto fósforo e enxofre nos níveis de  $4,8 \text{ dS/m}^{-1}$  de condutividade elétrica. O pinhão manso Garanhuns absorveu níveis superiores de sódio e redução de Ca e Mg.

2 - O pinhão manso foi sensível ao excesso de NaCl na solução externa, mostrando uma redução de 50% na massa seca com um concentração estimada de  $2,4 \text{ CEa dS m}^{-1}$  de NaCl, valor médio dos acessos testados (  $A_1$  Garanhuns-PE,  $A_2$ -Itaporanga-BP e  $A_3$  Novo Cruzeiro-MG)

3 - A sensibilidade das plantas de pinhão manso ao estresse salino deve-se, principalmente, a uma grande acumulação de  $\text{Na}^+$  nas folhas, principalmente o primeiro, associada com grande redução na concentração de  $\text{K}^+$  induzida pelo excesso de  $\text{Na}^+$ .

4 - As concentrações de NaCl diminuí significativamente os micronutrientes ( P, K, Ca, Mg, e S) nos três acessos.



## REFERÊNCIAS

BAILEY, S.E.; OLidade IN, T.J. and BRICKA, R.M. Low-Cost Sorbents: Literature Summary. Technical Report **SERDP-97-1**, U.S. Army Engineer Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS.v.1 n.2 p.12 1997.

HENNING A. A, ALMEIDA A. M. R, GODOY C. V, SEIXAS C. D. S, YORINORI, J. T, COSTAMILAN L. M, FERREIRA L. P, MEYER M. C, SOARES R. M, DIAS, W. P. Manual de identificação de doenças de soja. Londrina: Embrapa Soja (**Embrapa Soja Documentos**), v.256 n.1 2005

LACAN, D.; DURAND, M. **Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in excised soybean roots.** **Physiologia Plantarum**, Copenhagen v.93, p.132-138, 1995.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A.**Avaliação do Estado Nutricional das Plantas. Princípios e aplicações.** 2.ed., Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319p.

PARENT, L.E.; DAFIR, M. **A theoretical concept of Compositional Nutrient Diagnosis.** *Jornal America Society*, 117:239-242, 1992.

PEIXOTO, A. R. **Plantas oleaginosas arbóreas.** São Paulo: Nobel, 1973. 284 p.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do Pinhão manso (*Jatropha curcas L.*). **Produção de oleaginosas para biodiesel.** Informe agropecuário, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-74, 2005.

KUO, S. Concurrent sorption of phosphate and zinc, cadmium, or calcium by a hydrous ferric oxide. **Soil science of america journal**, Madison, v.50 p. 1412-1419, 1986.

OLSEN, S. R. Micronutrient interactions, In: MORTVEDT, J.J.; GIORDANNO, P. M.; LINDSAY, W. L. (ed). **Micronutrientes in agriculture**. Madison: Soil Science Society of America, v. 5, n2, p.243-264, 1972.

SIDDIQI, M.T.; GLASS, A.D.M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.4, p.289-302, 1981.

SILVA, F.A.S.E. The ASSISTAT- **Programa estatístico** .UFCG Campina Grande 2008.

SILVEIRA, R. I.; MELLO, F. A. F.; SOBRINHO B. O. C.; ARZOLLA, S.; SARRUGE J. R. Influencia do pH, dos teores de fosfato solúvel na matéria orgânica e das frações granulométricas sobre a fixação de zinco pelo solo. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO**. v.15, p,113-117, 1976

TEIXEIRA, L.A.J.; NATALE, W.; MARTINS, A.L.M. **Nitrogênio e potássio via fertirrigação e adubação convencional-estado nutricional das bananeiras e produção de frutos**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.29, n.1, p.153-160, 2007.

WALWORTH, J.L.; SUMNER, M.E. **The diagnosis and recommendation integrated system (DRIS)**. Advances in Soil Science, New York, v.6, p.149-88, 1987

WADT, P.G.S. **Os métodos da chance matemática e do sistema integrado de diagnose e recomendação (DRIS) na avaliação nutricional de plantios de eucalipto**. 1996. 99p. Dissertação (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

## CAPÍTULO 5

### CRIOPRESERVAÇÃO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS ZIGÓTICOS DE PINHÃO MANSO

#### 1 RESUMO

ROCHA, Maria do Socorro. **CRIOPRESERVAÇÃO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS DE ZIGÓTICOS DE PINHÃO MANSO** (*Jatropha curcas* L.). Areia: UFPB/CCA, 2010. p.126-144 (Tese - Doutorado em Agronomia)

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é uma cultura de grande importância no Brasil e no mundo. A busca por acessos cada vez mais adaptadas que atendam a demanda vigente exige que os recursos genéticos desta espécie sejam facilmente obtidos. A presente pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar um protocolo para criopreservação de eixos embrionários do pinhão manso, como alternativa para a manutenção dos recursos genéticos da espécie. Foram utilizadas sementes de pinhão manso dos acessos Garanhuns-PB e Itaporanga – PB, com germinação em torno de 94%, teores de água ajustados para 6 a 8%. Procedida sua esterilização, foram mantidas em embebição em água por 24 horas para posterior excisão dos eixos embrionários em câmara de fluxo laminar, onde permaneceram em dessecação por 0, 28, 48 e 88 minutos para em seguida serem submetidos à criopreservação, por meio da imersão direta em nitrogênio líquido (-196°C), durante 0, 7, 28 e 60 dias. A reativação dos eixos embrionários foi realizada a cada período de armazenamento, após sua retirada e descongelamento em condições de ambiente, durante 48 minutos, sendo cultivados em meio MS sob condições de câmara regulada a temperatura de 25°C, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Aos 28 dias de cultivo, foram realizadas avaliações da regeneração, comprimento de plântulas e números de raízes emitidas. Procedeu-se análise de variância e

regressão polinomial dos dados obtidos, para cada cultivar, em função do período de dessecação e armazenamento. O teor de água limite recomendado para a criopreservação de eixos embrionários de pinhão manso está entre 9 e 16% com base no peso fresco; eixos embrionários do pinhão manso devem ser dessecados para teor de água inferior a 16%, para assegurar ótima regeneração *in vitro*, após imersão em nitrogênio líquido; eixos embrionários do pinhão manso, com teor de água em torno de 9,7%, pode ser conservado em bancos de germoplasma em condições criogênicas e regenerar mais de 80% de plântulas *in vitro* após 60 dias de armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).

**Palavra chave:** nível máximo de umidade, nitrogênio líquido, tempo de dessecação, armazenamento de criogênicos.

ROCHA, Maria do Socorro. **CRYOPRESERVATION OF EMBRYONIC AXES ZYGOTICS OF *Jatropha*** . Areia: UFPB/CCA, 2010. p.126-144 (Thesis - Doctorate in Agronomy)

### **ABSTRACT**

The *Jatropha* it is a culture of great importance in Brazil and in the world. The search for you cultivate more and more adapted that assist the effective demand it demands that the genetic resources of this species are obtained easily. To present research it was developed with the aim of evaluating a protocol for cryopreservation of embryonic axes of *Jatropha* as alternative for the maintenance of the genetic resources of the species. *Jatropha* seeds were used of the you acessos Garanhuns – PE and Itaporanga - PB, with germination around 94%, moisture content adjusted for 6 to 8%. Proceeded your sterilization they were maintained in imbibition in water for 24 hours for subsequent excised of the embryonic axes in flow camera to laminate, where they stayed in desiccation for 0, 28, 48 and 88 minutes for soon after to be submitted to the cryopreservation, directly plunged into liquid nitrogen (-196°C), during 0, 7, 28 and 60 days. The regrowth of the embryonic axes was accomplished to each storage period, after your retreat and thawing in room temperature conditions, for 48 minutes, being cultivated in MS medium and kept in the incubator room at temperature of 25°C, photoperiod of 16/8 hours (light/dark) and intensity light of 50 mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. To the 28 days of cultivation, evaluations of the regeneration, plantlets length and numbers of emitted roots were accomplished. It was proceeded variance analysis and regression polinomial of the obtained data, for each to cultivat, in function of the desiccation period and storage. The tenor of water limits recommended for the cryopreservation of embryonic axes of *Jatropha* it is between 9 and 16% with base in the fresh weight; embryonic axes of *Jatropha* should be desiccated for moisture content lower to 16% to assure a great of regeneration *in vitro*, after plunged into

liquid nitrogen; embryonic axes of *Jatropha*, with moisture content around 9,7%, they can be conserved in germoplasma banks in cryogenic conditions and to regenerate more than 80% of plantlets *in vitro* after 48 days of storage in liquid nitrogen (-196°C).

Key words : Maximum level of humidity, liquid nitrogen, time dessecacao, cryogenic storage.

### 3 INTRODUÇÃO

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) poderá ser uma das culturas importante para exploração no Brasil e no mundo, apresentando-se como ótimo fornecedor de óleo para a indústria, entre outros subprodutos gerando emprego e renda ao longo de sua cadeia produtiva.

A conservação dos recursos genéticos implica na manutenção de coleções *in situ*, ou seja, nos seus locais de ocorrência, ou *ex situ*; neste caso, podem ser mantidos indivíduos, sementes, embriões ou outras estruturas vegetais, sob diferentes condições, dependendo do material utilizado: no campo ou em casa de vegetação, em câmara seca sob baixa temperatura, em meio de cultura com baixa concentração salina, ou criopreservadas (CGIAR, 1993 e VALOIS, 1998).

As sementes é a forma mais comum de conservação *ex situ*, uma vez que é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores. A metodologia convencional compreende a desidratação das sementes para teores de umidade extremamente baixos e armazenamento em câmaras com controle de temperatura e umidade relativa. Segundo Cromarty et al. (1982) e Stein et al. (2007) estas condições permitem a preservação de material vegetal por longos períodos de tempo. Porém, pode ocorrer perda da viabilidade com o prolongamento do armazenamento, dependendo da espécie (ROBERTS e ELLIS, 1984).

A criopreservação, manutenção de material biológico sob temperaturas ultra-reduzidas (nitrogênio líquido, -196°C), tem garantido conservação por períodos indefinidos, por reduzir muito ou praticamente paralisar qualquer atividade a nível celular, minimizando a deterioração biológica durante o armazenamento (PRITCHARD, 1995).

Atualmente, a criopreservação de eixos embrionários se vem destacando como a metodologia mais apropriada para a conservação a longo prazo da diversidade genética das espécies vegetais, uma vez que os eixos toleram

condições que seriam letais para a semente inteira (SANTOS *et al.*, 2002 e GUERRA e NOFARI, 2010). González-Benito *et al.* (1998) resgataram, *in vitro*, eixos embrionários de algodoeiro criopreservados com teor de água abaixo de 20%, sem perda da viabilidade.

Embriões zigóticos são sistemas de tecidos simples, altamente organizados, que podem ser usados para produzir uma planta completa. E são apropriados para ajudar a reduzir o risco de variação somaclonal em cultura que outros métodos de regeneração de plantas *in vitro*; ademais, embriões zigóticos são usado com sucesso para criopreservação do germoplasma de muitas espécies vegetais que possuem sementes recalcitrantes, intermediárias ou com problemas no armazenamento (BERJAK *et al.*, 2000).

Considerando-se a importância de ser empregar eixos embrionários zigóticos como elemento de preservação de germoplasma do pinhão manso objetivou-se com este estudo desenvolver um protocolo para a criopreservação de eixos embrionários de pinhão manso como alternativa para a conservação dos recursos genéticos desta espécie.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material vegetal e procedimentos para excisão dos eixos embrionários**

O presente estudo foi realizado no Laboratório de cultura de tecido na EMEPA em João Pessoa, PB. Utilizaram-se sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), acessos Garanhuns – PE (A<sub>1</sub>) e Itaporanga – PB (A<sub>2</sub>), colhidas em campos de produção nos estados de Pernambuco e Paraíba, safra 2008.

Procedeu-se a esterilização das sementes em solução de hipoclorito de sódio comercial a 80% (v/v), com 2,0 a 2,5% de cloro ativo, acrescida com 1 a 2 gotas de polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween - 20®), sob agitação durante 20 minutos, seguida de tríplice lavagem em água destilada e desmineralizada esterilizada.

### **4.2 Exposição ao nitrogênio líquido**



Após esterilização, as sementes permaneceram em embebição durante 24 horas, em água destilada e desmineralizada esterilizada. Foram utilizados dois tipos de explantes sementes inteiras sem tegumentos e só eixos embrionários levadas para excisão de seus eixos embrionários na câmara de fluxo laminar, onde foram submetidos à dessecação por 0, 28, 48 e 88 minutos, sob temperatura de  $25 \pm 2$  °C. Em seguida, colocados em recipientes estéreis de polipropileno de 4,5 mL, em número de quatro réplicas de 10 eixos embrionários por frasco e imersos diretamente no nitrogênio líquido a -196 °C, onde permaneceram 0, 7, 28 e 60 dias. Após cada período de dessecação, separaram-se três repetições de 30 eixos embrionários para a determinação do teor de água, no momento de sua criopreservação, por meio da pesagem e secagem em estufa regulada a  $103 \pm 2$  °C por 17 horas. O teor de água foi expresso em porcentagem, com base no peso fresco.

#### **4.3 Avaliação da sobrevivência**

Após cada período de criopreservação, criotubos contendo os eixos embrionários foram retirados e postos para descongelar, sob temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C), durante 60 minutos; posteriormente, os eixos embrionários foram cultivados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 10 mL de meio de Murançhige e Skoog, 1962 (MS), devidamente vedados e mantidos em câmara de crescimento com a temperatura de 25 °C, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa em torno  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  proporcionada por lâmpadas fluorescentes brancas frias. As avaliações foram realizadas no 28º dia após cultivo, mediante a porcentagem de regeneração, a mensuração do comprimento de plântulas e contagem do número de raízes emitidas.

#### **4.4 Procedimento estatístico**

Os dados foram analisados de acordo com o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4 x 4, sendo dois acessos (Garanhuns – PE e Itaporanga – PB), quatro tempos de dessecação (0, 28, 48 e 88 minutos) e quatro períodos de armazenamento dos eixos embrionários (0, 7, 28 e 60 dias) com dez repetições por explantes, procedendo-se a análise de variância e

regressão polinomial, para cada acesso, em função do tempo de dessecação e do período de armazenamento. Antes da análise, os dados referentes ao comprimento de plântulas foram transformados para  $\sqrt{X + 1}$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Encontram-se, na Tabela 1, os resumos das análises de variância, onde se verifica-se efeitos significativos para a maioria das variáveis estudadas, excetuando a interação dupla entre acessos x armazenamento, na porcentagem de regeneração; a interação dupla entre acessos x dessecação, assim como a interação entre todas as variáveis (acessos x dessecação x armazenamento) no comprimento de plântulas originadas dos eixos embrionários do pinhão manso. Eixos embrionários do pinhão manso do acesso de Garanhuns, submetidos a criopreservação, apresentaram maior regeneração quando comparados com os do acessos Itaporanga, apesar desta superar aquela, no comprimento de plântula e no número de raízes emitidas por seus eixos embrionários (Tabela 2). Estes resultados indicam que as diferenças apresentadas entre acessos e/ou variedades de uma mesma espécie, quando submetidas à criopreservação, se devem, provavelmente, ao patrimônio genético de cada variante, não havendo efeitos da criopreservação sobre a viabilidade e/ou vigor das cultivares estudadas, estando esta afirmação de acordo com Batista (2000); Almeida et al. (2002), Cavalcanti Mata et al. (2002), Lopes (2005) e Guerra e Nodari (2007).

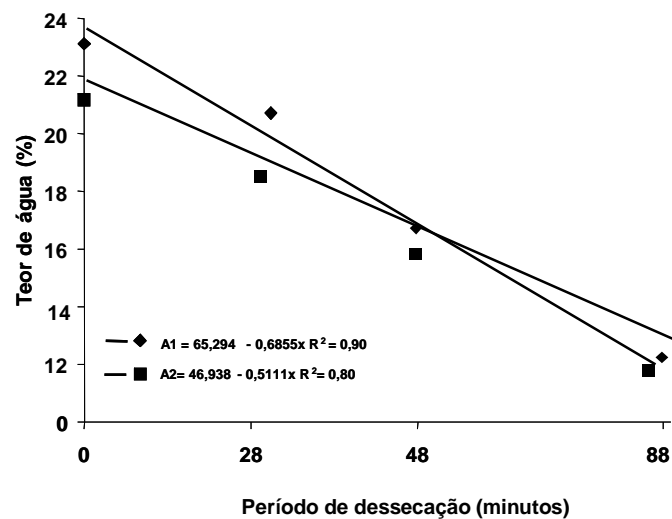
**Tabela 1.** Resumos das análises de variância dos dados variáveis em porcentagem (%) de regeneração, comprimento de plântula e número de raízes emitidas por eixos embrionários de dois acessos do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), submetidos à dessecação e ao armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C), Campina Grande-PB 2008.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios		
		Regeneração (%)	Comprimento de Plântula (cm) <sup>1</sup>	Número de Raízes Emitidas
Acessos (A)	1	1476,96125**	8,11541**	3345,51775**
Dessecação (D)	3	30231,79021**	16,52818**	2361,62810**
Armazenamento (P)	3	9344,93646**	3,65054**	670,46665**
A x D	3	451,22771**	1,70051**	866,16370**
A x P	3	145,08646**	0,33823**	1483,28944**
D x P	9	3409,59625**	2,28787**	418,04134**
A x D x P	9	169,62264**	89,7706**	208,16452**
D/A1	(3)			
Efeito linear	1	6531,9065**	43,83266**	6283,85823**
Efeito quadrático	1	2062,7052**	5,5694**	268,80109**
Desvio da regressão	1			
D/A2	(3)			
Efeito linear	1	1732,1712**	4,61550**	1881,38943**
Efeito quadrático	1	718,8197**	4,98096**	93,5410**
Desvio da regressão	1			
Resíduo	96	10,51495	0,00207	1,35240
Total	31	155218,48875	97,23033	25255,84409
CV (%)		4,75	1,82	5,59

\*\* Significativo a 1% de probabilidade; \* Significativo a 5% de probabilidade; <sup>ns</sup> Não significativo; <sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{X+1}$

Sementes de pinhão manso dos acessos Garanhuns e Itaporanga com umidade entre 6 e 8%, foram respectivamente, submetidas a embebição, por 24 horas, e apresentaram eixos embrionários com teor de água média para o acesso de Garanhuns com 28 minutos que obteve um decréscimo de 50% com 48 minutos. Os eixos já estavam com 22% e aos 88 minutos 12%. Já nos acessos de Itaporanga, aos 28 minutos 28%, com 48 minutos em 15% e aos 88 minutos

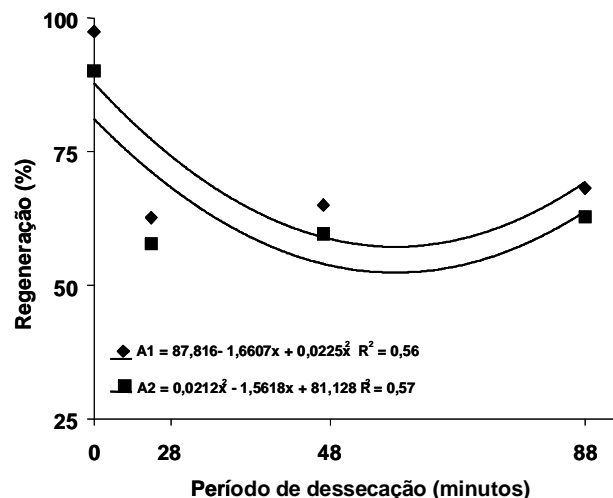
estavam com 10%. Também ocorrem decréscimos mais diferencial significativamente dos acessos de Garanhuns , após excisão (Figura 1). Quando os eixos embrionários foram submetidos à dessecação em câmara de fluxo laminar, ocorreu redução do teor de água em valores médios, para ambos os acessos, na ordem de 24, 16 e 9,7%, após 28, 48 e 88 minutos de dessecação, respectivamente. A redução de água dos eixos embrionários em um nível possível de submetê-lo à temperatura do nitrogênio líquido e/ou evitar a formação de cristais de gelo é o passo mais crítico na obtenção de um protocolo viável de criopreservação. Isto é confirmado por Toríbio e Celestino (2000), esclarecendo ainda que, em geral, as sementes, os embriões e os eixos embrionários se criopreservam prévios à desidratação por ar.



**Figura 1.** Teor de água, em porcentagem, de eixos embrionários oriundos de sementes do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) acessos Garanhuns e Itaporanga, submetidas à dessecação em câmara de fluxo laminar. Campina Grande-PB 2008.

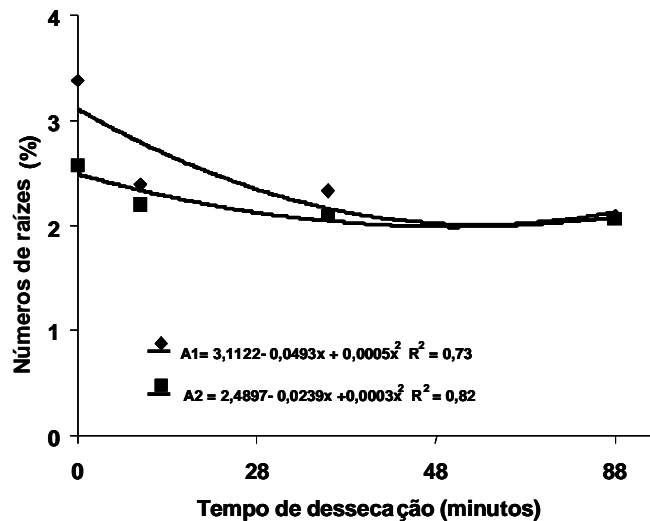
Quanto à porcentagem de regeneração de eixos embrionários de pinhão manso dos acessos Garanhuns e Itaporanga submetidos à criopreservação (Figura 2), houve variação em função da sua permanência sob dessecação em câmara de fluxo laminar e do teor de água, que apresentavam, no momento da criopreservação (Figura 2), de modo que, quanto mais tempo os eixos

embrionários permaneceram dessecando, menor foi o seu teor de água e maior sua capacidade de resistir às condições do nitrogênio líquido e regenerar uma plântula normal. Eixos embrionários do pinhão manso com teor de água inferior a 16% (b.u.), valor este atingido após 60 minutos de dessecação, garantiram, em média, regeneração de 75% e 73%, para os acessos Garanhuns e Itaporanga, após criopreservação. Conforme se observa, eixos embrionários do pinhão manso dessecados em câmara de fluxo laminar até teor de água inferior a 16% (b.u.) com boa qualidade fisiológica podem ser criopreservados com segurança, não apresentando problemas no que diz respeito à velocidade de congelamento e descongelamento que venham prejudicar a sua capacidade de regeneração. A regeneração obtida na ordem de 75 e 73% para os acessos Garanhuns e Itaporanga, respectivamente, dos eixos embrionários com 16% (b.u.) do teor de água, após imersão direta no nitrogênio líquido, indicam que a criopreservação pode ser facilmente realizada, mantendo-se a ressalva de que o material criopreservado pode apresentar diferenças no posterior desenvolvimento das plantas. Ante o exposto, Guerra e Nodari (2010) afirma que baixos conteúdos de umidade reduzem a formação de gelo nas estruturas intracelulares da semente, quando expostas às temperaturas subzero, atenuando assim, possíveis danos decorrentes do congelamento. Santos *et al.* (2002), obtiveram total regeneração (100%) *in vitro* de eixos embrionários de sementes de café com 12,6% de umidade, após congelamento em nitrogênio líquido.



**Figura 2.** Porcentagem de regeneração de eixos embrionários do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) acessos Garanhuns e Itaporanga, em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e sob o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) ao 60 dias. Campina Grande-PB 2008.

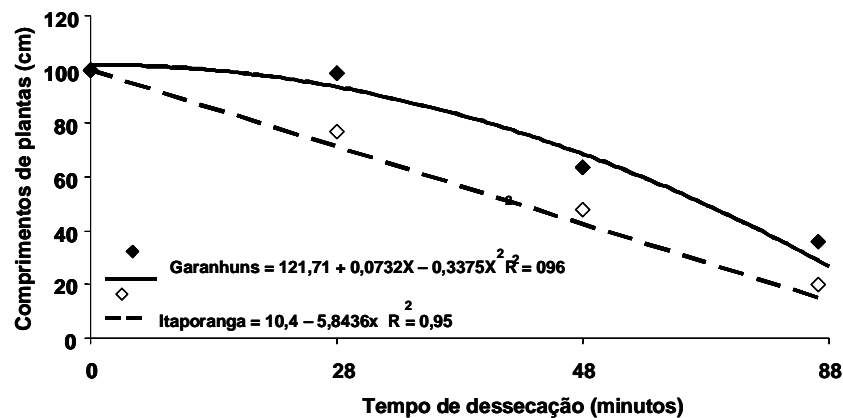
O número de raízes emitidas por eixos embrionários também sofreu alteração após criopreservação, em função do teor de água que os mesmos continham após cada tempo de dessecação (Figura 3). Um número maior de raízes (28 raízes/plântula) foi obtido para eixos embrionários criopreservados do acesso Garanhuns, aos 88 minutos de dessecação. Já o número de raízes emitidas de eixos embrionários do acesso Itaporanga, após criopreservação, apresentou tendência linear crescente, na medida em que houve redução no teor de água, na dessecação. Diante do observado, a dessecação contribui na capacidade regenerativa dos eixos embrionários de sementes do pinhão manso criopreservados, garantindo a regeneração de plântulas com um maior número de raízes (Figura 3) e, conseqüentemente, mais vigorosas (Figura 2). Portanto, a maior emissão de radícula indica que os eixos embrionários foram dessecados em um nível do teor de água que não causou danos às suas células após criopreservação. Este fato é de extrema importância e encontra apoio nos relatos de (MUMFORD e GROUT 1979; GUERRA e NODARI 2010), que observaram uma maior emissão de radículas em embriões dessecados de *Citrus limon* L.



**Figura 3.** Número de raízes emitidas por eixos embrionários do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) acessos Garanhus (A<sub>1</sub>) e Itaporanga (A<sub>2</sub>), em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar, sob o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) Campina Grande-PB 2008.

O estudo conjunto dos efeitos do tempo de dessecação e do período de armazenamento dos eixos embrionários do pinhão manso dos acessos Garanhus e Itaporanga, sobre sua regeneração, comprimento de plântulas e número de raízes emitidas encontra-se nas Figuras 4. Eixos embrionários, dos ambos acessos, quando não submetidos à dessecação não resistiram ao armazenamento criogênico e, nestas condições, não apresentaram qualquer manifestação de atividade metabólica (Figuras 4). O teor de água dos eixos embrionários dos ambos acessos, que se encontrava em torno de 53%, foi o fator

limitante para tal comportamento (Figura 4), evidenciando a necessidade da realização da dessecação dos eixos embrionários para teores de umidade que permitam a sua criopreservação. Os dados apresentados vão de encontro àqueles obtidos por Almeida et al. (2000), onde criopreservaram, com sucesso, sementes de diversas leguminosas que continham em média o teor de água entre 6 - 7%.



**Figura 4.** Comprimento de plântula emitidas por eixos embrionários do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) acessos Garanhuns (A1) e Itaporanga (A2), em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar, sob o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) Campina Grande-PB 2008.

A dessecação dos eixos embrionários, por pelo menos 28 minutos em câmara de fluxo laminar, garante regeneração na ordem de 45 e 70%, para os acessos Garanhuns e Itaporanga, respectivamente, após permanência de 60 dias em imersão no nitrogênio líquido (Figura 5). No entanto, o ótimo de regeneração só foi obtido quando os eixos embrionários foram dessecados por no mínimo 60 minutos, garantindo regeneração superior a 80%, para as dois acessos, durante todo o período de armazenamento (Figura 5). Nestas condições, os eixos embrionários continham teor de água em torno de 12%, no acesso de Garanhuns



e para acessos de Itaporanga 8% (Figura 5). Resultados semelhantes foram obtidos para embriões de *Gossypium hirsutum*, marrom BRS-200,( LOPES, 2005).

O comprimento de plântulas de pinhão manso dos acessos Itaporanga, originadas de eixos embrionários submetidos à dessecação e criopreservação, apesar de apresentar, no geral, menores valores, quando comparado com a acesso Garanhuns (Figura 5), apresentou maior uniformidade nos seus valores, ao longo do armazenamento, independente do tempo em que os eixos embrionários permaneceram sob dessecação na câmara de fluxo laminar (Figura 5), enquanto os eixos embrionários dos acessos Itaporanga parecem ter sofrido mais a influência do armazenamento em nitrogênio líquido, em função tempo de dessecação, principalmente quando dessecados por apenas 28 minutos (Figura 5). A perda de viabilidade durante a criopreservação dos eixos embrionários pode ser causada devido a danos físicos sofridos pelas estruturas durante o congelamento e/ou descongelamento, sendo, portanto de grande importância a avaliação das velocidades adequadas dos referidos processos, para garantir a integridade do material quando exposto ao nitrogênio líquido. Esses relatos encontram apoio em Almeida et al. (2000). Sob o abordado Stanwood e Bass (1981) sugerem que o congelamento rápido tende a promover um resfriamento mais uniforme da água subcelular e o descongelamento lento evita danos nos tecidos e células da semente. Em contraste, Dumet e Benson (2000) propõem que o congelamento rápido resulte em formação de cristais de gelo intracelulares, o que é letal para as células e os tecidos das sementes.

## 6 CONCLUSÕES

1- O teor de água limite recomendado para criopreservação de eixos embrionários do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) está entre 8 e 12%;

2- Eixos embrionários criopreservados com 12% (b.u.) do teor de água, apresentam regeneração de plântula *in vitro* de 73% (Itaporanga) e 75% (Garanhuns);

3- Eixos embrionários do pinhão manso com umidade em torno de 9,7%, podem regenerar mais de 80% de plântulas *in vitro*, após 60 dias de armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C);

4- As variáveis estudadas (porcentagem de regeneração, comprimento de plântulas e número de raízes emitidas), foram afetadas parabolicamente com relação aos períodos de armazenamento variando entre 0 a 88 minutos .

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F. A. C.; MORAIS, A. M.; CARVALHO, J. M. F. C.; GOUVEIA, J. P. G. de. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, v.6, n.2, p.295-302, 2002.

ALMEIDA, F. A. C.; PITA VILLAMIL, J. M.; GOUVEIA, J. P. G.. Efecto de la crioconservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.2, n.1, p.67-71, 2000.

BATISTA, R. C. **Cultivo *in vitro* e crioconservação de sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.)**. Campina Grande, 2000. 83p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba.

BERJAK, P.; WALKER, M.; MYCOCK, D. J.; WESLEY-SMITH, J.; WATT, P.; PAMMENTER, N.W. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p.140-155.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 2009. 365 p.

CAVALCANTI MATA, M. E. R. M.; DINIZ, P. S. C.; BRAGA, M. E. D. Criarmazenagem de sementes de milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v.27, n.2, p.23-30, 2002.

CGIAR (Consultive Group on International Agricultural Research) **People and plants: the development agenda**. Rome, IBPGR, 1993.

CROMARTY, A. S.; ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. **The Design of Seed Storage Facilities for Genetic Conservation**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1982. 96p.

DUMET, D.; BENSON, E.E. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. In: EGELMANN, F.; TAKAGI, H. **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Japan International Research Center for Agricultural Science, Tsukuba, Japan; International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy (JIRCAS/IPGRI). 2000. p. 43-56.

GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; CARVALHO, J. M. F. C.; PÉREZ, C. Effect of desiccation and cryopreservation of embryonic axes and seeds of cotton. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.33, n.1, p.17-20, 1998.

GUERRA, M. P.; NODARI R. O. Apostila de Biotecnologia vegetal. **Apostila de aula**. [<http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila.htm>]. 2010.

LOPES, K. P. **Criopreservação de germoplasma de oleaginosas de importância econômica para o nordeste brasileiro**. Areia, 2005. 155p. Tese (Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba Centro de Ciências Agrárias.

MUMFORD, P. M.; GROUT, W. W. Desiccation and low temperature (-196°C) tolerance of *Citrus limon* seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.7, n.3, p.407-410, 1979.

MURASIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

PRITCHARD, H. W. Cryopreservation of seeds. In: DAY, J. G.; McLELLAN, M. R. Methods in molecular biology: cryopreservation and freezes-drying protocols. Totowa: **Humana Press**, 1995. v.38, p.133-144.

ROBERTS, E. H.; ELLIS, R. H. The implication of the deterioration of orthodox seeds during storage for genetic resources conservation. In: HOLDEN, J. H. W.; WILLIAMS, J. Crop genetic resources: conservation and evaluation. **London**: Allen and Unwin, 1984. p.18-37.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N.; MUNDIM, R. C. RIBEIRO, F. N. S. Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café (*Coffea arabica* L.). Brasília: **EMBRAPA-CENARGEN**, 2002. 4p. (EMBRAPA-CENARGEN. Comunicado Técnico, 69).

STANWOOD, P.C.; BASS, L.N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.9, p. 423-437, 1981.

STEIN, V. C; PAIVA R; SOARES F. P; RAIKY S. NOGUEIRA C; SILVA, L. C; EMRICH E. GERMINAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE *Inga vera* Willd. subsp. *Affinis* (DC.) T.D. **Ciência. agrotecnica.**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1702-1708, nov./dez., 2007.

TORIBIO, M.; CELESTINO, C. El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. **Investigación Agraria**, Madrid, n.2, p.249-259, 2000.

VALOIS, A. C. C. Biodiversidade, biotecnologia e propriedade intelectual (um depoimento). **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v.15, n. especial, p.21-31, 1998.

## CAPITULO 6

### CRIOPRESERVAÇÃO DE EXPLANTES DE PINHÃO MANSO (*Jathopha curcas* L.) PELOS MÉTODOS DA VITRIFICAÇÃO

#### 1 RESUMO

ROCHA Maria do Socorro. **CRIOPRESERVAÇÃO DE EXPLANTES DE PINHÃO MANSO (*Jathopha curcas* L.) PELOS MÉTODOS DA VITRIFICAÇÃO**. Areia: UFPB/CCA, 2010. p.145-162. (Tese-Doutorado em Agronomia)

**RESUMO:** Objetivou-se com este trabalho avaliar procedimentos de criopreservação do eixo embrionário do pinhão manso (*Jathopha curcas* L.) e contribuir com a conservação a longo prazo dos recursos genéticos dessa espécie. Sementes do pinhão manso do acesso do Garanhuns-PE foram devidamente esterilizadas e extraído o eixo embrionário, quando se procedeu a excisão dos eixos embrionários sem cotiledonares e eixo embrionário com os cotiledonares de aproximadamente 5 a 7 mm. Os explantes obtidos foram submetidos ao processo de vitrificação. A vitrificação se deu por meio do pré-cultivo por 48 horas, em meio MS líquido contendo DMSO (0; 5; 10 e 15%) e/ou sacarose (0; 0,1; 0,25 e 0,5 M). Os explantes vitrificados foram colocados em tubos criobiológicos de polipropileno estéreis de 4,5 mL (quatro réplicas de 10 explantes/tubo), os quais foram devidamente selados e imersos diretamente no nitrogênio líquido (-196°C) durante cinco dias. O descongelamento dos explantes se deu pela imersão dos criotubos em água sob condições de ambiente a 25±2°C por 60 minutos e procedendo-se em seguida seu cultivo em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio MS com 30 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 10 mL.L<sup>-1</sup> de cloreto de magnésio e 2 g.L<sup>-1</sup> de gelrite e pH ajustado para 5,7. Avaliações dos explantes foram realizadas antes e após criopreservação, por meio da porcentagem de regeneração, número e comprimento de brotos emitidos após quatro semanas de cultivo. O pré-cultivo dos explantes no meio de vitrificação com DMSO em

concentração superior a 7% ou associado com sacarose a 0,1; 0,25 e 0,5 M afetou negativamente a viabilidade dos explantes e o açúcar sacarose isolada não teve efeitos significativos na regeneração dos explantes.

**Palavra chave:** regeneração, vitrificação, *in vitro*, capacidade de regeneração, recursos genéticos, armazenamento criogênico.

ROCHA, Maria do Socorro. **Cryopreservation of explants of pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) by methods of the vitrification.** Areia: UFPB/CCA, 2010. p.145-162. (Thesis - Doctorate in Agronomy)\*

## 2 ABSTRACT

This study aimed to evaluate procedures for cryopreservation of embryonic axis of *Jatropha* and contribute to long-term conservation of genetic resources of this species. Seeds of the *Jatropha* access Garanhuns-PE. Been properly sterilized and extracting embryonic axis when held without excision of the embryonic axis and cotyledon cotyledon with embryo axis of about 5 to 7 mm. The explants were subjected to the processes of vitrification. Vitrification was achieved through the pre-cultured for 48 hours in MS liquid medium containing DMSO (0, 5, 10 and 15%) and / or sucrose (0, 0.1, 0.25 and 0.5 M). The vitrified explants were placed in sterile polypropylene tubes cryobiology of 4,5 mL (four replicates of 10 explants / tube), which were properly sealed and immersed directly in liquid nitrogen (-196 ° C) for five days. The thawing of the explants occurred by immersion of cryotubes in water under ambient conditions at  $25 \pm 2$  ° C for 60 minutes, then proceed to its cultivation in test tubes containing 10 mL of MS medium with  $30 \text{ gL}^{-1}$  glucose,  $10 \text{ mL.L}^{-1}$  of magnesium chloride and  $2 \text{ gL}^{-1}$  gelrite and pH adjusted to 5,7. Reviews of the explants were taken before and after cryopreservation by means of regeneration percentage, number and length of buds after four weeks of cultivation. The pre-cultivation of explants in the middle of vitrification with DMSO at a concentration higher than 7% or associated with sucrose at 0.1, 0.25 and 0.5 M affected the viability of explants.

**Key words:** regeneration, vitrification, *in vitro*, gentic resources, cryogenic storage



### 3 INTRODUÇÃO

O melhoramento de plantas tem contribuído para o aumento da produção em diversas culturas comerciais de grande relevância em todo o mundo. A obtenção de variedades de alto rendimento e resistência a pragas e doenças requer que os recursos genéticos desejáveis de determinada espécie se encontrem disponíveis para sua utilização. Desta forma, as coleções de germoplasma passam a ter papel fundamental nos programas de melhoramento (SILVA et al. 1997 e CASTRO, 2009).

O cultivo de eixos embrionários se tornou uma ferramenta indispensável na propagação clonal e na eliminação de patógenos virais de muitas plantas cultivadas (KARTHA et al. 1979). Como as células constituintes dos eixos embrionários são menos diferenciadas e mais uniformes do que aquelas de tecidos maduros, plantas regeneradas pelo cultivo *in vitro* dos eixos embrionários devem garantir a recuperação tal qual sua progênie. Além disso, o meristema tem uma maior habilidade para regenerar a planta inteira do que o cultivo de células adultas. Então, a conservação de eixos embrionários excisados em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  (criopreservação), é potencialmente um meio satisfatório e seguro para a conservação de germoplasma vegetal (KARTHA, 1985 e CASTRO, 2009).

Na atualidade, há poucas informações científicas, de criopreservação de eixos embrionários e a metodologia mais apropriada para a conservação a longo prazo, da diversidade genética de várias espécies problemáticas ou de difícil conservação, por se tratar de uma estrutura de tamanho reduzido, ocupando o mínimo espaço possível no armazenamento e por tolerar condições que seriam letais para a semente inteira (BERJAK et al. 2000), além de eliminar a possível presença de microrganismos no armazenamento, os quais reduzem consideravelmente a germinação das sementes (MOSHKIN, 1986 e TILLMANN e MELLO, 2009).

É importante avaliar se a criopreservação de eixos embrionários zigóticos e umidade permaneceram viáveis após criopreservação. Faiad et al. (2004)

informam que eixos embrionários podem tolerar teores de umidade por volta de 12% e subsequente congelamento em nitrogênio líquido e resgatados, após criopreservação, usando a cultura de tecidos, sendo que deles se originam plantas inteiras e vitrificados.

A vitrificação é alcançada pela redução da água congelável intra e extracelular, por meio da exposição dos tecidos das plantas a misturas crioprotetoras muito concentradas ou pela dessecação física e subsequente congelamento rápido, geralmente, pela imersão direta no nitrogênio líquido. Segundo Vieira (2000), dentre os protetores químicos utilizados na solução de vitrificação destacam-se o dimetilsulfóxido (DMSO).

Objetivou-se com a pesquisa estudar procedimentos de vitrificação dos explantes dos acessos de pinhão manso, seu efeito imediato e após armazenamento criogênico, sobre sua capacidade de regeneração *in vitro*, como forma de assegurar a conservação, a longo prazo, dos recursos genéticos dessa espécie.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material vegetal e procedimento para obtenção dos explantes**

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Centro Nacional de Pesquisa da EMEPA, em João Pessoa, PB. Utilizaram-se as sementes obtidas do acesso de pinhão manso da região Garanhuns-PE, cultivadas *in vitro*.

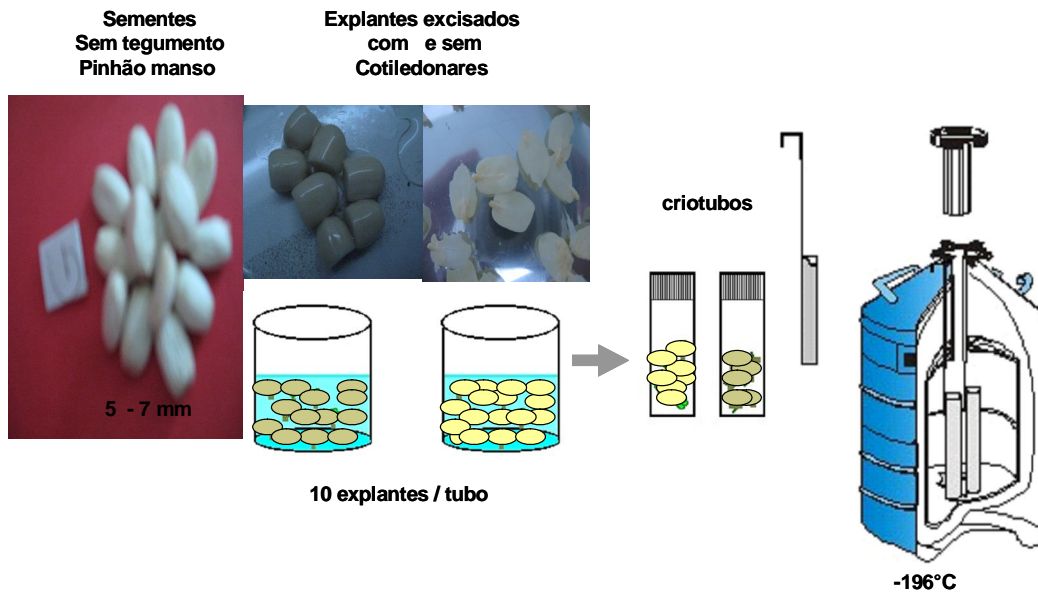
Na obtenção das sementes do pinhão manso foram devidamente esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio comercial a 40% (v/v), com 1% de cloro ativo, acrescida com 1-2 gotas de polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween-20<sup>®</sup>), sob agitação, durante 20 minutos, seguida de tríplice lavagem em água bidestilada esterilizada. Em seguida, e sob condições estéreis da câmara de fluxo laminar, sementes foram postas para germinar em tubos de ensaio de 25 x 250 mm contendo 10 mL de meio com sais minerais MS de Murashige e Skoog (1962) suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,5 g.L<sup>-1</sup> de ágar-ágar e pH ajustado para 5,7 antes da adição do solidificante ao meio. Sementes cultivadas foram mantidas na ausência de luz, até proteção da radícula e então levadas para

câmara de crescimento, com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas luz e intensidade luminosa em torno de 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , proporcionada por lâmpadas fluorescentes brancas frias. Após 25 dias de cultivo, procedeu-se, a partir daquelas plântulas, a excisão dos explantes (eixo embrionário sem cotiledonares e eixo com cotiledonares de aproximadamente 5 a 7 mm), sob condições assépticas da câmara de fluxo laminar.

#### **4.2 Método da Vitrificação**

Os explantes obtidos foram pré-cultivados em meio MS líquido, contendo um dos agentes crioprotetores ou sua combinação, em diferentes concentrações: dimetilsulfóxido – DMSO ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ) 0; 7; 14 e 20 % e sacarose 0; 0,1; 0,25 e 0,5 M e mantidos incubados em câmara de crescimento sob as condições mencionadas acima, por 48 horas (Figura 1).

Para avaliar o efeito da solução vitrificante e dessecante para regeneração, parte dos explantes pré-cultivados foi, imediatamente, cultivados *in vitro* e outra parte foi posta em tubos criobiológicos de polipropileno estéreis de 4,5 mL, em número quatro réplicas de 10 explantes por tubo, os quais foram devidamente selados e imersos diretamente no nitrogênio líquido (-196 °C).



**Figura 1.** Criopreservação de explantes do pinhão manso pelo método da vitrificação Campina Grande-PB, 2008.

O cultivo dos explantes foi realizado sob condições assépticas, na câmara de fluxo laminar, em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 10 mL de meio MS, com 30 g.L<sup>-1</sup> de glucose, 10 mL.L<sup>-1</sup> de cloreto de magnésio e 2 g.L<sup>-1</sup> de Gelrite e pH ajustado para 5,7 antes do acréscimo do agente solidificante ao meio. Quatro repetições de 10 tubos por tratamento, contendo os explantes, foram mantidas quatro semanas em câmara de crescimento, com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro) e intensidade luminosa em torno de 30 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> proporcionado por lâmpadas fluorescentes brancas frias. Ao final da quarta semana, explantes foram avaliados quanto à porcentagem de regeneração, número de brotos emitidos por explante e comprimento do maior broto.

#### 4.2.1 Procedimento estatístico

Os dados foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 x 4, sendo dois tipos de explantes (eixo embrionário e eixo com cotiledonar), quatro concentrações do DMSO (0, 7, 14 e 20%) e quatro concentrações de sacarose (0; 0,1; 0,25 e 0,5 M), as variáveis de regeneração, com 32 tratamentos com dez repetições totalizando 320 explantes por franco e procedendo-se análise de variância e regressão polinomial.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Vitrificação**

Os resumos das análises de variância dos dados de regeneração em porcentagem (%), número e comprimento de brotos, encontram-se no Tabela 1, podendo-se observar que a interação tripla (explante x dimetilsulfóxido x sacarose), só foi significativa para os dados de comprimento de brotos. Por sua vez, a única interação dupla significativa foi (explante x dimetilsulfóxido), em todas as avaliações realizadas. Já a sacarose foi a única variável que não surtiu qualquer efeito significativo nas avaliações realizadas, indicando que as concentrações desse componente, empregadas no presente estudo não alteram o metabolismo das células. Segundo Dumet et al. (1994), os açúcares, como a sacarose, são usados como substâncias crioprotetoras por se constituírem em ótimos agentes vitrificantes, além de não apresentarem citotoxicidade, mesmo quando acumulados em grande quantidade no citoplasma.

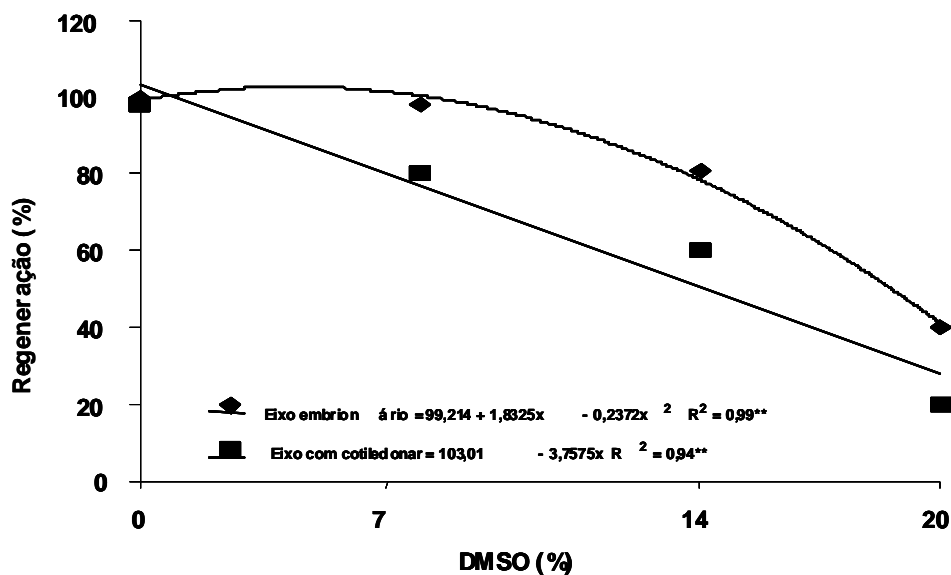
**Tabela 1** Resumos das análises de variância da regeneração, número e comprimento de brotos emitidos por eixos embrionários (*Jatropha curcas* L.), submetidos ao processo da vitrificação. Campina Grande-PB 2008.

Fonte de Variação	Quadrados Médios			
	Grau de Liberdade	Regeneração (%)	Número de brotos	Comprimento de brotos (cm)
Explante (E)	1	6258,01**	0,0348 *	3,1375**
Dimetilsulfóxido (D)	3	38946,03**	5,9549**	3,6213**
Sacarose (S)	3	49,15 <sup>ns</sup>	0,0033 <sup>ns</sup>	0,0045 <sup>ns</sup>
E x D	3	967,38**	1,0469**	0,3503**
D/ E1	(3)			
Efeito linear	1	50000,00**	4,1519**	7,0448**
Efeito quadrático	1	4556,25**	0,7591**	0,9120**
Desvio da regressão	1	945,32**	0,0009 <sup>ns</sup>	0,0048 <sup>ns</sup>
D/ E2	(3)			
Efeito linear	1	63703,83**	15,2775**	3,7758**
Efeito quadrático	1	244,14**	0,4489**	0,0564 <sup>ns</sup>
Desvio da regressão	1	290,70**	0,3672**	0,1209**
E x S	3	17,38 <sup>ns</sup>	0,0043 <sup>ns</sup>	0,0022 <sup>ns</sup>
D x S	9	10,26 <sup>ns</sup>	0,0046 <sup>ns</sup>	0,0036 <sup>ns</sup>
E x D x S	9	10,79 <sup>ns</sup>	0,0041 <sup>ns</sup>	0,0062**
Resíduo	96	25,84635	0,008749	0,002369
Total	127			
CV (%)		7,74	11,91	7,67

\*\* Significativo a 1% de probabilidade; \* Significativo a 5% de probabilidade e <sup>ns</sup> Não significativo, pelo teste F.

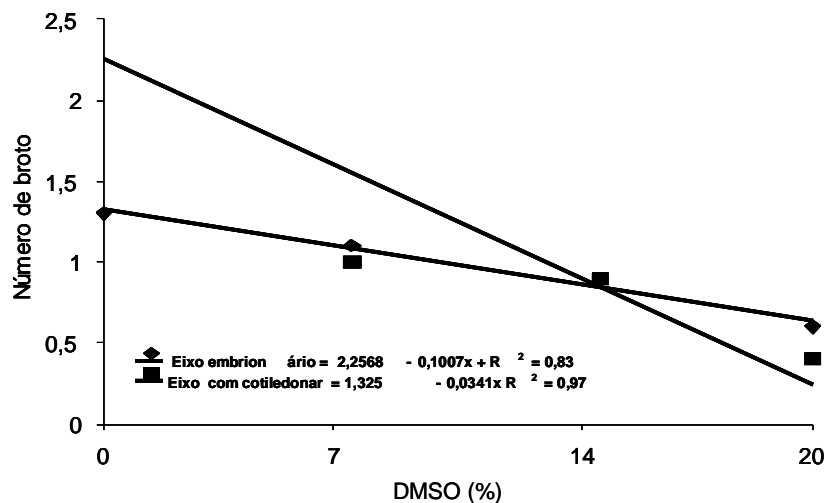
Na Figura 2, encontra-se a regeneração, em porcentagem, dos explantes do pinhão manso diante do pré-cultivo com o crioprotetor químico DMSO. O explante eixo embrionário não sofreu alteração na sua regeneração quando se empregou o DMSO em concentração inferior a 7% no meio MS líquido, apresentando regeneração superior a 98% nessas condições (Figura 2 e Tabelas

2) No entanto, ocorreram reduções na regeneração dos eixo embrionário, com valores na ordem de 63 e 28%, após pré-cultivo, com concentrações de 14 e 20% do DMSO, respectivamente, enquanto o explante eixo com cotilédones sofreu ainda mais o efeito do DMSO, reduzindo consideravelmente sua regeneração na medida em que foi submetido ao pré-cultivo com o crioprotetor químico (Figura 2 e Tabela 1). O comportamento da regeneração dos explantes após o tratamento com o DMSO demonstra a susceptibilidade dos mesmos a concentrações elevadas daquele crioprotetor, afetando sua viabilidade, sendo, portanto, de grande importância o estudo da viabilidade dos explantes após tratamento em menores concentrações. Em comunhão com os resultados obtidos, diversos trabalhos, empregando o cultivo de células vegetais, têm indicado que o ótimo de concentração do DMSO como crioprotetor situa-se entre 5 a 8% (SAKAI e SUGAWARA, 1978). Porém, padrões de 5 a 15% (KARTHA, 1979; UMEMURA ; SAKAI, 1980 e LOPES, 2005) parecem refletir as diferentes taxas de penetração do DMSO em ápices de várias espécies.



**Figura 2.** Regeneração de explantes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) cultivados *in vitro*, em função da concentração do dimetilsulfóxido (DMSO), usado como crioprotetor, Campina Grande-PB, 2009.

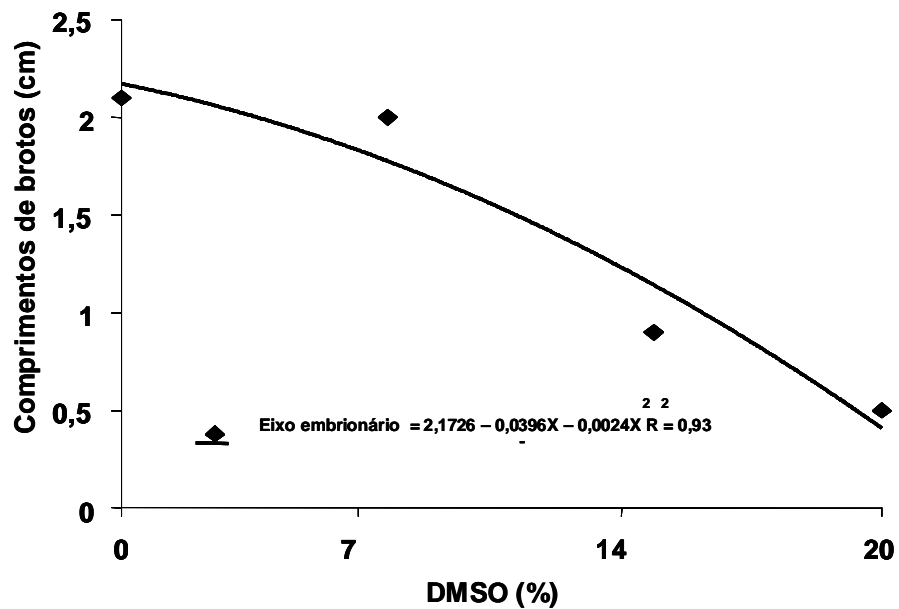
Quanto ao número de brotos (Figura 3). Concentrações superiores a 7% do crioprotetor químico tenderam a provocar a redução na emissão de brotos dos eixos embrionários. Os eixos com cotiledonar, por sua natureza, apresentam duas gemas laterais, o que lhes atribui, inicialmente, maior número de brotos por explante. Contudo, este explante parece sofrer mais o efeito do crioprotetor químico DMSO, reduzindo a emissão de brotos com o aumento de sua concentração na solução (Figura 3). Em contraste aos resultados obtidos, estudos realizados, empregando o DMSO a 14%, isolado ou associado a outros crioprotetores, garantiram elevada sobrevivência do ápices de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) (UEMURA e SAKAI, 1980) e meristemas apicais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) criopreservados (BAJAJ, 1977). Escobar *et al.* (2000) afirmam que a sacarose e o DMSO, quando empregada em altas concentrações em ápices de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) eleva a pressão osmótica de suas células, alterando suas respostas morfogenéticas, causando a formação de calos.



**Figura 3.** Número de brotos emitidos por explantes do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) cultivados *in vitro*, em função da concentração do dimetilsulfóxido (DMSO), usado como crioprotetor. Campina Grande-PB, 2008.



O comprimento de brotos emitidos por eixo embrionário também sofreu influência do pré-cultivo com DMSO em concentrações superiores a 10% (Figura 4). O comprimento de brotos emitidos pelo explante eixos foi influenciado no pré-cultivo pelo DMSO e pela sacarose. A concentração do DMSO acima de 5% no meio de pré-cultivo, afetou negativamente o explante eixos embrionário, reduzindo o comprimento dos brotos emitidos. Os resultados obtidos entram em concordância com Castro, 2009, onde ápices de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) submetidos ao DMSO, usados isoladamente ou em combinação com glicose, sacarose ou sorbitol, foram suficientemente efetivos, contudo, quando dissolvidos em meio de cultura MS com sacarose foram menos efetivos. Isto pode ser devido ao fato do meio de cultura MS causou um aumento excessivo na concentração de eletrólitos durante o congelamento e, o DMSO produzir crioproteção, prevenindo o aumento excessivo dos eletrólitos. Kartha (1985) e Sakai (1995) reafirmam que o emprego de crioprotetores químicos, a exemplo do DMSO, pode causar citotoxicidade e estresses osmóticos, levando à morte das células ou modificando sua resposta morfogênética em cultura, dependendo da concentração.



**Figura 4.** Comprimento de brotos emitidos por eixo embrionário do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) cultivados *in vitro*, em função da concentração do dimetilsulfóxido (DMSO), usado como crioprotetor. João Pessoa, PB .2009.

## 6 CONCLUSÕES

1- A viabilidade do acesso Garanhuns-PE considerando os dois tipos de explantes testados (eixo embrionário e eixo com eixo cotiledonar), não foi afetada pelo emprego da sacarose como crioprotetor nas concentrações estudadas (0,10 a 0,50 M);

2- O pré-cultivo dos eixos e eixos com cotiledôneos do pinhão manso durante 48 horas em meio MS líquido, contendo dimetilsulfóxido, em concentração superior a 7%, afetou negativamente a viabilidade dos mesmos, quer isolado ou associado à sacarose nas concentrações estudadas (0,10; a 0,50M);

3- O método de vitrificação dos eixos e eixo com cotiledôneos do pinhão manso pré-cultivados com sacarose (0,10 a 0,50 M) e/ou dimetilsulfóxido até 7% não afetou a regeneração ou qualquer atividade metabólica, após imersão direta no nitrogênio líquido (-196°C) e descongelamento sob condições de ambiente (25 ± 2 °C por 60 minutos);

## REFERÊNCIAS

CASTRO, O. O. Amostragem é decisiva na busca da qualidade. **Seed News**, Pelotas, v. 1, n. 1, p. 1-5, jan./fev. 2009.

BAJAJ, Y.P.S. Clonal multiplication and cryopreservation of cassava through tissue culture. **Crop Improvement** v.4, p.198-204, 1977.

BERJAK, P.; WALKER, M.; MYCOCK, D.J.; WESLEY-SMITH, J.; WATT, P.; PAMMENTER, N. W. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p.140-155.

DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUSSERT, S.; DUVAL, Y. Effects of various sugars and polyols on the tolerance to desiccation and freezing of oil palm polyembryonic cultures. **Seed Science Research**, v.4, p.307-313, 1994.

ESCOBAR, R. H.; MAFLA, G.; ROCA, W. M. Cassava cryopreservation I. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research progress and application**, Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p.404-407.

FAIAD, M.G.R.; SALOMÃO, A.N.; SANTOS, I.R.I. **Estratégias e resultados da conservação de germoplasma-semente a longo prazo**. <[http://www.giacometti.org.br/html/artigo\\_exibe.cfm?\d=64](http://www.giacometti.org.br/html/artigo_exibe.cfm?\d=64)> Acesso em: 25 de fevereiro 2004.

KARTHA, K. K. Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA, K.K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1985. p.115-134.

KARTHA, K. K.; LEUNG, N .L.; GAMBORG, O. L. Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration. **Plant Science Letters**. v.15, p.7-15, 1979.

LOPES, K. P. **Criopreservação de germoplasma de oleaginosas de importância econômica para o nordeste brasileiro**. Areia, 2005. 155p. Tese (Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba Centro de Ciências Agrárias.

MOSHKIN, V.A. **Castor**. New Delhi: Oxonian Press, 1986. 315p.

MURASIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NISHIWAZA, S.; SAKAI, A.; AMANO, Y.; MATSUZAWA, T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by a simple freezing method. **Cryo-Letters**, v.13, p.379-388, 1992.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry, 32. Cryopreservation of plant germplasm I**. Berlim, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1995, p.53-69.

SAKAI, A.; SUGAWARA, Y. Survival of plant germ plasm in liquid nitrogen. In: LI, P.H.; SAKAI, A. **Plant Cold Hardiness and Freezing Stress**, New York: Academic Press, 1978. p.345-359.

SHATNAWI, M.A.; ENGELMANN, F.; FRATTARELLI, A.; DAMIANO, C. Cryopreservation of almond apices using encapsulation-dehydration and vitrification. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research progress and application**, Rome: IPGRI, 2000. p.434-436.

SILVA, S.O.; SHEPHERD, K.; DANTAS, J.L.L.; SOUZA, A.S.; CARNEIRO, M.S. Germoplasma. In: ALVES, E.J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: Embrapa-CNPMF, 1997. p.61-84.

SUDARMONOWATI, E.; MULYANINGSIH, E.S.; PRIADI, D.; SAKAI, A. Cryopreservation of shoot-tips of two leguminous trees (*Acacia mangium* and *Paraserianthes falcataria*) using encapsulation-dehydration and vitrification. **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm**, Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p.449-452.

TILLMANN, M. A. A.; MELLO, V. D. C. Análise de sementes. In: **Curso de ciência e tecnologia de sementes**. Brasília, DF: ABEAS; Pelotas, RS: Universidade Federal de Pelotas/Departamento de Fitotecnia, 2009. Módulo 4, 37 p.

UMEMURA, M.; SAKAI, A. Survival of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot apices frozen to the temperature of liquid nitrogen. **Plant and Cell Physiology**. v.21, n.1, p.85-94, 1980.

VIEIRA, M.L.C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília: KL3. v.3, n.14, p.18-20, 2000.

WU, Y.; ENGELMANN, F.; FRATTARELLI, A.; DAMIANO, C. A cryopreservation protocol for strawberry cell suspension cultures. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research progress and application**, Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural

Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p.357-359.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)