



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS



CRISTIANE DANTAS DE BRITO

PERFIL MORFOFISIOLÓGICO DO DESENVOLVIMENTO E
GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CRESCIMENTO INICIAL DE
PLÂNTULAS DE *Jatropha curcas* L.

Feira de Santana - BA
2015

CRISTIANE DANTAS DE BRITO

**PERFIL MORFOFISIOLÓGICO DO DESENVOLVIMENTO E
GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CRESCIMENTO INICIAL DE
PLÂNTULAS DE *Jatropha curcas* L.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Renato Delmondez de Castro

Co-orientadores: Profa. Dra. Marta Bruno Loureiro

Prof. Dr. Henk W. M. Hilhorst

Feira de Santana - BA
2015

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cimille Gabrielle Cardoso Antunes

Prof. Dr. Wilco Ligterink

Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira

Profa. Dra. Marilza Neves do Nascimento

Prof. Dr. Renato Delmondez de Castro

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

B875p Brito, Cristiane Dantas de
Perfil morfofisiológico do desenvolvimento e germinação de sementes e crescimento inicial de plântulas de *Jatropha curcas* L. / Cristiane Dantas de Brito. – Feira de Santana, 2015.

113 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Renato Delmondez de Castro.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2015.

1. *Jatropha curcas* L. - Germinação - Crescimento. 2. Sementes - Desenvolvimento - Maturação. 3. Plantas - Ciclo de vida. I. Castro, Renato Delmondez de, orient. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 582.757

A todos que respeitam a natureza e se interessam pela ciência de sementes.

AGRADECIMENTOS

Todo trabalho científico cresce com o apoio e ajuda de pessoas e instituições que cooperam e somam para o resultado final. Este não é diferente, e assim quero deixar registrado meu reconhecimento e sincera gratidão a todas as instituições e pessoas que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana (PPG em RGV), pela seriedade e responsabilidade de seus profissionais que iniciaram o curso e pelo constante empenho em aprimorá-lo, representados nas pessoas da atual coordenadora Dr^a. Claudinéia Regina Pelacani Cruz e do secretário Alberto Vicente que contribuem intensivamente para o sucesso do programa.

Ao Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos da Universidade Federal da Bahia (LBBB/UFBA), onde pude desenvolver grande parte dos ensaios.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM - Fiocruz), Unidade de Microscopia Eletrônica, pela cooperação técnica no processamento das amostras e preciosas contribuições, em especial à Dr^a. Lúcia Maria Vieira Moreno, Dr^a. Adriana Lanfredi Rangel e Dr. Cláudio Pereira Figueira.

A todos os membros do Laboratório de Fisiologia de Plantas da Universidade e Centro de Pesquisa de Wageningen (Wageningen University and Research Center - WUR/Holanda), em especial aos Dr. Henk W.M. Hilhorst e Dr. Wilco Ligterink.

Agradeço também ao Laboratório de Biologia Celular (Wageningen University and Research Center - WUR/Holanda), em especial ao Dr. Andre Van Lammeren e ao Dr. Henk Kieft pelo suporte técnico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior Fundação (CAPES) por ter me concedido bolsa durante o doutorado no Brasil e Estágio de Doutorado Sanduíche na Holanda, por intermédio do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior - PDSE.

A Petrobrás pelo suporte financeiro através do projeto “*Caracterização de sistemas de produção e de acessos de mamona (Ricinus communis L.) e pinhão manso (Jatropha curcas L.) no semi-*

árido com foco na agricultura familiar” e a FAPUR (Fundação de Apoio a pesquisa Científica e Tecnológica da UFRRJ) pela gestão dos recursos financeiros.

A Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA), na pessoa do Engenheiro Agrônomo Jairo Nunes Costa, que viabilizou a coleta do material no campo experimental de pinhão manso situado em Alagoinhas-BA.

Ao meu Orientador Dr. Renato Delmondez de Castro e a minha Co-orientadora Dr^a. Marta Bruno Loureiro, por sempre acompanharem meu trabalho e apresentarem sugestões pertinentes e construtivas.

À Professora Dr^a. Luzimar Gonzaga Fernandez, que sempre se empenhou em viabilizar boas condições de trabalho aos estudantes do LBBB.

A todos os companheiros do LBBB, em especial:

- Clarissa Telles e Paulo Teixeira, por terem me acompanhado em todas as etapas do presente trabalho.
- Dr^a Leomara Vieira de França pela iniciação dos trabalhos de campo e análises fisiológicas.
- Ivana Oliveira Virgens, companheira de tema e de bolsa sanduiche, pelas discussões esclarecedoras sobre o pinhão manso.
- Aos estudantes de Iniciação científica Aliomar e Artur pela ajuda nos trabalhos de campo e processamento de dados.

Agradeço ainda as colegas Cíntia Luísa Mascarenhas, minha representante legal, e Cimille Antunes, sempre acessível e disposta a ajudar, principalmente com ricas discussões sobre todos os temas e análises estatísticas.

A Jesus Emanuel Gonzaga Fernandez por acompanhar-nos ao campo experimental com a difícil tarefa de dirigir semanalmente para Alagoinhas.

A todas as demais pessoas e instituições que direta ou indiretamente também auxiliaram, apoiaram e contribuíram para o êxito deste projeto.

Se quiseres saber o final, presta atenção no começo.

(Provérbio africano)

RESUMO

O ciclo de vida de uma planta com sementes envolve estádios subsequentes de desenvolvimento, como a formação da semente, a germinação e o estabelecimento da plântula. Essas etapas juntas representam a fase crítica de interseção entre duas gerações e são caracterizadas por profundas mudanças citológicas, morfológicas, metabólicas e fisiológicas. *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) conhecida popularmente como pinhão-mansô, produz sementes ricas em óleo com propriedades e aplicações em diversos setores industriais, incluindo a produção de biodiesel. O presente estudo teve como objetivo caracterizar padrões morfofisiológicos e elucidar adaptações morfoanatômicas envolvendo a embriogênese, maturação, germinação e o crescimento de plântulas de *J. curcas*. Para tanto, foi inicialmente analisado e descrito o perfil morfofisiológico baseado em 13 estádios de desenvolvimento e maturação, associados à coloração do exocarpo do fruto e do tegumento das sementes e descrição das estruturas presentes em cada estágio (Capítulo 1). A análise das configurações do citoesqueleto microtubular durante embriogênese evidenciou atividade do ciclo celular por meio da presença de microtúbulos corticais e mitóticos durante a histodiferenciação e organogênese. Foi possível caracterizar um novo padrão organogênético de embriogênese revelado pela presença de radícula multimeristemática e de estômatos em embriões de sementes de *J. curcas* (Capítulo 2). Os embriões multimeristemáticos, providos de um meristema apical central e quatro meristemas laterais, revelaram um novo modelo de formação de sistema radicular durante a germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas, em que há protrusão simultânea de uma raiz principal maior e quatro raízes adventícias menores, todas crescendo ao mesmo tempo, durante a formação inicial do sistema radicular da plântula (Capítulo 3). Os estômatos ocorrem na área de transição hipocótilo-radícula e exibem diferentes tamanhos e fases ontogênicas. Estas estruturas apresentaram um curto período de vida, degenerando-se durante o desenvolvimento da plântula, sugerindo seu funcionamento restrito à etapa de crescimento simultâneo das cinco raízes durante a germinação, aparentemente devido à alta demanda em trocas gasosas e metabolismo energético, e uma provável evolução para as lenticelas presentes no caule desta espécie (Capítulo 4).

Palavras-chave: Pinhão-mansô. Embriogênese. Citoesqueleto microtubular. Multimeristema. Estômatos.

ABSTRACT

The life cycle of a seed plant involves subsequent stages of development including seed formation, germination and seedling establishment. Together these stages represent the critical phase of intersection between two generations and are characterized by deep cytological, morphological, metabolic and physiological changes. *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) is popularly known as physic nut and produces seeds rich in oil with properties that allow its use in various industries, including the production of biodiesel. This study aimed to advance on the understanding of morphophysiological patterns and elucidate morphoanatomical adaptations involving embryogenesis, maturation, germination and seedling growth in *J. curcas*. Therefore, it was initially analysed and described the morphophysiological profile based on 13 stages of development and maturation associated to color of the fruit exocarp and seed coat, and description of the structures present at each stage (Chapter 1). Analysis of microtubular cytoskeleton configurations during embryogenesis showed cell cycle activity by the presence of cortical and mitotic microtubules during histodifferentiation and organogenesis, whilst it was possible to characterize a new organogenetic profile of embryogenesis revealed by the presence of a multimeristematic radicle and stomata in embryos of *J. curcas* seeds (Chapter 2). The multimeristematic embryos formed by a central apical meristem and four lateral meristems interconnected by a complex vascular system have revealed a new model of root formation during seed germination and seedling development, in which there is simultaneous protrusion of a larger main root and four smaller adventitious roots, all growing at the same time during the formation of the seedling root system (Chapter 3). The stomata occurred in the radicle-hypocotyl transition area, exhibited different sizes and ontogenic phases and short lifespan by degenerating during seedling development. This demonstrates its functioning as restricted to the simultaneous growth stage of the five roots during germination, apparently due to high demand in gas exchange and energy metabolism, and a likely evolution onto the lenticels present in the stem of this species (Chapter 4).

Keywords: Physic nut. Embryogenesis. Microtubular cytoskeleton. Multimeristem. Stomata.

LISTA DE FIGURAS

Nº	Legenda	Pág
REFERENCIAL TEÓRICO		
Figura 01	- Semente de <i>Jatropha curcas</i> L.	20
Figura 02	- Imagens históricas de <i>Jatropha curcas</i> L.	21
Figura 03	- Representação esquemática de eventos físicos e metabólicos que ocorrem durante a germinação (Fases I e II) e crescimento inicial de plântulas (Fase III).	25
Figura 04	- Micrografias de fluorescência apresentando diversas configurações mitóticas em secções longitudinais de radículas embrionárias de <i>Jatropha curcas</i> L. em desenvolvimento.	28
CAPÍTULO 1		
Figura 01	- Classificação dos frutos de <i>Jatropha curcas</i> L. em diferentes estádios de maturação baseado na coloração do exocarpo.	44
Figura 02	- Sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. em oito diferentes estádios de desenvolvimento, encontradas em frutos com exocarpo Verde.	45
Figura 03	- Aspecto visual das sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. encontradas nos frutos em diferentes estádios de maturação.	47
CAPÍTULO 2		
Figura 01	- Secções longitudinais do eixo embrionário durante o desenvolvimento de sementes de <i>Jatropha curcas</i> L.– estágio Verde-A.	67
Figura 02	- Configurações do citoesqueleto microtubular do eixo embrionário de <i>Jatropha curcas</i> L. em diferentes estádios de desenvolvimento.	69
Figura 03	- Secções anatômicas transversais do eixo embrionário de <i>Jatropha curcas</i> L. em diferentes estádios de desenvolvimento.	70
Figura 04	- Aspecto do citoesqueleto microtubular do eixo embrionário de <i>Jatropha curcas</i> L. em diferentes estádios de desenvolvimento.	71
CAPÍTULO 3		
Figura 01	- Sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. em diferentes fases da germinação.	83
Figura 02	- Micrografias estereoscópicas com detalhes do crescimento do sistema radicular em <i>Jatropha curcas</i> L. durante 96 horas de embebição em água.	86
Figura 03	- Sementes maduras secas e secções longitudinais em eixos embrionários de três espécies do gênero <i>Jatropha</i> .	87
Figura 04	- Eletromicrografias do meristema apical da raiz do eixo embrionário de sementes de <i>Jatropha curcas</i> L., sob diferentes períodos de embebição em água e fases da germinação.	88

Figura 05	Secções longitudinais da extremidade radicular do eixo embrionário de <i>Jatropha curcas</i> L., sob diferentes períodos de embebição em água.	89
Figura 06	Secções longitudinais da extremidade radicular no eixo embrionário de <i>Jatropha curcas</i> L., após 48 horas de embebição em água.	90
Figura 07	Secções transversais no hipocótilo do eixo embrionário de <i>Jatropha curcas</i> L., após 48 horas de embebição em água.	91
Figura 08	Série de secções transversais do hipocótilo para a radícula (A-F) no eixo embrionário de <i>Jatropha curcas</i> L., após protrusão radicular (72 horas de embebição em água).	92
Figura 09	Secções anatômicas em <i>Jatropha curcas</i> L.	93
CAPÍTULO 4		
Figura 01	Sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. em diferentes fases da embebição em água e protrusão da radícula.	102
Figura 02	Estômatos em embriões de <i>Jatropha curcas</i> L.	104
Figura 03	Estômatos abertos e fechados em embriões de <i>Jatropha curcas</i> L.	105
Figura 04	Estômatos em diversos estádios de diferenciação no eixo embrionário de <i>Jatropha curcas</i> L.	105
Figura 05	Degeneração dos estômatos do eixo embrionário de <i>Jatropha curcas</i> L.	106
Figura 06	Estômatos no eixo embrionário em diferentes espécies do gênero <i>Jatropha</i> .	107

LISTA DE TABELAS

Nº	Legenda	Pág
Tabela 01	- Média das variáveis morfométricas (comprimento e largura) dos frutos de <i>Jatropha curcas L.</i> nos diferentes estádios de maturação.	48
Tabela 02	- Média das variáveis morfométricas (comprimento, largura e espessura) das sementes de <i>Jatropha curcas L.</i> em diferentes estádios de maturação.	49
Tabela 03	- Média dos teores de umidade (%) e massa seca (g) das sementes de <i>Jatropha curcas L.</i> nos diferentes estádios de maturação.	50
Tabela 04	- Médias da porcentagem de germinação (G), tempo para 50% da germinação total (T50), tempo médio de germinação (TMG), uniformidade (U8416) e área abaixo da curva (AAC), em sementes de <i>Jatropha curcas L.</i> nos diferentes estádios de maturação.	51
Tabela 05	- Média dos teores de lipídeos totais (%) em sementes de <i>Jatropha curcas L.</i> nos diferentes estádios de maturação.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC	Área abaixo da curva
BMM	Butilmetilmetacrilato
BPP	Banda Pré-Prófase
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
CO₂	Gás carbônico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPA	Dias após antese
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EBDA	Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola
EGTA	Ácido tetra-acético de etileno glicol
FAO	Agência para Agricultura e Alimentação
g	Gramas
G	Porcentagem de germinação
h	Horas
H₂O	Água
IFAD	Fundo Internacional para Desenvolvimento da Agricultura
kDa	Quilo Daltons
LBBB	Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos
M	Molar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mL	Mililitro
µm	Micrometro
nm	Nanômetro
OsO₄	Tetróxido de ósmio
PBS	Tampão fosfato salino
PEG	Polietilenoglicol
PFA	Paraformaldeído

PIPE	Ácido 1,4-Piperazinediethanesulfonic
RAS	Regras para Análise de Sementes
T50	Tempo para 50% da germinação total
TBST	Tampão tris salino contendo Tween 20
TMG	Tempo médio de germinação
U8416	Uniformidade
UEFS	Universidade Estadual de Feiras de Santana
UFBA	Universidade Federal da Bahia
WUR	Wageningen University and Reseacher Center

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1. <i>Jatropha curcas</i> L.	19
2.2. Desenvolvimento e maturação de sementes	21
2.3. Germinação de sementes e crescimento de plântulas	23
2.4. Citoesqueleto microtubular em plantas	26
2.5. Referências	28
CAPÍTULO 1 – Perfil morfofisiológico da maturação de frutos e sementes de <i>Jatropha curcas</i> L.	38
1 Introdução	40
2 Material e Métodos	41
3 Resultados e discussão	43
4 Referências	54
CAPÍTULO 2 – Configurações do citoesqueleto microtubular durante o desenvolvimento de sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. revelam um novo padrão de embriogênese.	60
1 Introdução	62
2 Material e Métodos	63
3 Resultados e discussão	66
4 Referências	74
CAPÍTULO 3 – Aspectos morfoanatômicos da formação inicial do sistema radicular de <i>Jatropha curcas</i> L.	79
1 Introdução	81
2 Material e Métodos	82
3 Resultados e discussão	85
4 Referências	95
CAPÍTULO 4 – Evolução da morfologia de estômatos presentes no eixo embrionário de <i>Jatropha curcas</i> L.	99
1 Introdução	101
2 Material e Métodos	102
3 Resultados e discussão	104
4 Referências	110

1 INTRODUÇÃO GERAL

A semente constitui o mais complexo e bem sucedido método de reprodução sexuada em plantas vasculares e representa uma adaptação para a rápida dominância das angiospermas. O aumento da fase esporofítica e a redução da fase gametofítica e a ampla variedade de adaptações morfológicas (raízes, folhas, cutícula, estômatos, etc.) permitem às plantas com sementes ocorrerem em uma extensa variedade de habitats e dominar a flora terrestre (LINKIES et al., 2010).

As sementes das Angiospermas se desenvolvem de um óvulo fertilizado e consistem de três componentes geneticamente diferentes: O **embrião** desenvolvido a partir do zigoto, que representa o novo esporófito da próxima geração e é produto da fusão da oosfera com um núcleo espermático; o **endosperma**, normalmente triploide, formado pela fusão de dois núcleos polares com o segundo núcleo espermático; e o **tegumento** ou testa formado a partir de integumentos, representado pelo tecido maternal do óvulo (BOESEWINKEL & BOUMAN, 1995; TAIZ & ZEIGER, 2009).

O desenvolvimento das sementes abrange duas fases: a morfogênese do embrião (embriogênese) e a fase da maturação. A morfogênese é caracterizada por uma alta atividade mitótica e inicia-se pela dupla fertilização no saco embrionário, dando origem ao zigoto e endosperma. A primeira divisão do zigoto é assimétrica e estabelece a polaridade do embrião, com uma célula apical (calazal) e uma célula basal (micropilar), que formarão o embrião propriamente dito e o suspensor, respectivamente. Após consecutivas divisões mitóticas, as células resultantes se diferenciam formando os tecidos e órgãos do embrião (meristemas, cotilédones e hipocótilo, por exemplo). Quando as divisões celulares cessam, o embrião entra na fase de maturação. Esta segunda fase é caracterizada pela expansão celular e acúmulo de reservas (açúcares, proteínas e lipídeos) nos tecidos de armazenamento. A maturidade fisiológica é o estágio de máximo acúmulo de matéria seca e interrupção da translocação de substâncias da planta-mãe. Em sementes ortodoxas há ainda uma terceira fase: a dessecação, marcada por um acentuado declínio no peso fresco devido à perda de água (BEWLEY & BLACK, 1994; DE CASTRO & HILHORST, 2004; DUBREUCQ et al., 2010; WEBER et al., 2010).

A germinação é a emergência de uma nova planta a partir da semente. Esse evento começa quando o embrião, contido numa semente, retoma as atividades após a embebição sob condições favoráveis e se completa com a protrusão radicular através dos tecidos circundantes

como tegumento e endosperma (BEWLEY, 1997; MARTIN et al., 2010; RAJJOU et al., 2012). Sementes com tegumento permeável geralmente exibem três fases durante a germinação: (I) embebição com intensificação da atividade respiratória; (II) ativação dos processos metabólicos e limitada absorção de água; (III) protrusão da radícula embrionária devido à acentuada atividade mitótica (BEWLEY & BLACK, 1994; BRADFORD, 1995; NONOGAKI et al., 2010; BEWLEY et al., 2012).

Durante o crescimento, as plântulas atingem o pico de suas atividades metabólicas (fotossíntese, respiração, absorção de água e sais minerais). Nesta fase vegetativa, características estruturais de plasticidade fenotípica garantem modificações morfológicas adaptativas para sobrevivência nas condições do habitat. Devido à competição por espaço, o rápido crescimento de raízes e parte aérea é de crucial importância para o estabelecimento das mesmas (LARCHER, 2003).

O desenvolvimento de plantas envolve vários aspectos, como multiplicação celular (crescimento por divisão), aumento de volume (crescimento por alongamento) e diferenciação de órgãos e tecidos. Em células vegetais, os microtúbulos, estruturas alongadas e ocas, formados pelas proteínas α - e β -tubulina, apresentam mudanças na dinâmica estrutural durante a progressão do ciclo celular e desempenham um importante papel na morfogênese, definindo características que tornam a planta um indivíduo autotrófico e sésil, mas altamente responsivo ao ambiente que a cerca (ALBERTS et al., 2002; HASEZAWA & KUMAGAI, 2002; WASTENEYS, 2002; LARCHER, 2003).

Jatropha curcas L., conhecida como pinhão manso, é uma espécie oleaginosa com múltiplos usos comerciais e possui ampla distribuição geográfica no Brasil e no mundo. Pelas características de rusticidade, pode crescer em condições ambientais adversas, como climas semiáridos e solos com poucos nutrientes. Nos plantios comerciais as plantas propagadas por sementes são geralmente preferidas para o estabelecimento de plantações com longo ciclo produtivo para a produção de óleo (OPENSHAW, 2000; JOKER & JEPSEN, 2003; ROSADO et al., 2010).

A fim de se estabelecer estratégias adequadas para o desenvolvimento e produção de sementes de *J. curcas*, é de importância fundamental a condução de pesquisas com diferentes abordagens, que permitam a obtenção de resultados descritivos, qualitativos e quantitativos, consistentes a nível morfológico, fisiológico, bioquímico e citológico. Desta forma, este estudo

tem como objetivo investigar e aprofundar o conhecimento do processo de formação da semente de *J. curcas*, analisando modificações fisiológicas e bioquímicas, eventos do ciclo celular, bem como os aspectos morfológicos durante a germinação das sementes e desenvolvimento de plântulas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Jatropha curcas* L.

Jatropha curcas L. (pinhão manso), espécie pertencente à família Euphorbiaceae, tem como possível centro de origem o México e parte continental da América Central. Os portugueses reconheceram as propriedades medicinais de *J. curcas* no século XVI e mais tarde estabeleceram plantações comerciais para produção de sabão e óleo de iluminação nas ilhas de Cabo Verde e em Guiné-Bissau. Posteriormente foi distribuída para outros países da África e Ásia. Atualmente, sua ocorrência se estende às zonas de savanas tropicais e monções e climas temperados com um verão quente e uma estação chuvosa (HELLER, 1996; MAES et al., 2009; ACHTEN et al., 2010). No Brasil, cresce espontaneamente em diversas condições edafoclimáticas, abrangendo uma área que vai do estado do Maranhão até o Rio Grande do Sul (ROSADO et al., 2010).

Quanto à caracterização botânica, esta espécie apresenta porte arbustivo ou arbóreo, variando 2 a 5 metros de altura. Suas flores são pequenas, amarelo-esverdeadas, monóicas e produzidas na mesma inflorescência, onde normalmente uma flor central feminina é circundada por várias flores masculinas. Eventualmente, também ocorrem flores hermafroditas (DEHGAN & WEBSTER, 1979; BRASILEIRO et al., 2012; CATZÍN-YUPIT et al., 2014). Seus frutos são cápsulas ovoides, triloculares, com uma semente em cada lóculo (CARVALHO et al., 2009; LAVIOLA et al., 2011). As sementes de *J. curcas* são endospermáticas, apresentam forma ovalada e carúncula com formato cônico revestindo a região do hilo. O tegumento possui coloração marrom-escura uniformemente distribuída, com textura porosa e fissuras em sua superfície (Figura 1A). O embrião dispõe de dois cotilédones largos e foliáceos (Figura 1B) (ARRUDA et al., 2004; LOUREIRO et al., 2013).

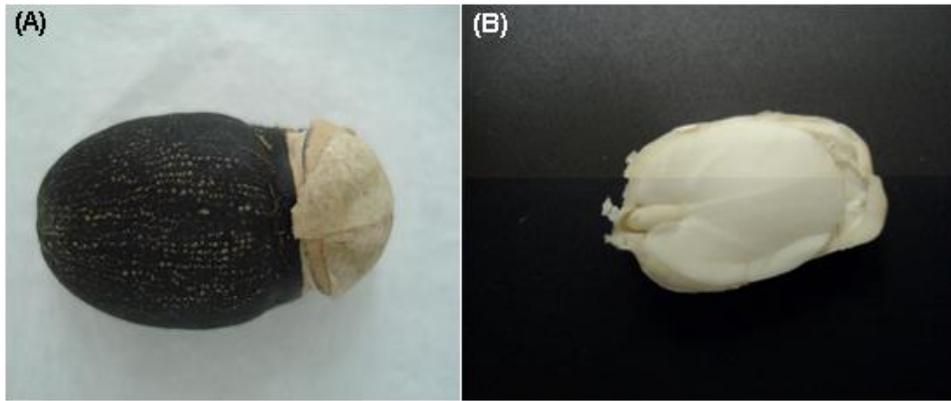


Figura 1. Semente de *Jatropha curcas* L. (A) tegumento e carúncula bem desenvolvida; (B) eixo embrionário sobre endosperma com cotilédone foliáceo. Fonte: autor.

O ciclo produtivo de *J. curcas* é longo, podendo alcançar 40 anos e manter uma produtividade média de sementes de 2 toneladas/ha. Pode ser cultivada numa ampla variedade de ambientes, com grande tolerância a altas temperaturas e preferência por solos profundos e bem drenados (OPENSHAW, 2000; AZEVEDO, 2006).

É considerada uma cultura potencial para os trópicos, pois além de crescer em solos degradados e favorecer a recuperação de áreas erodidas, as diferentes partes da planta podem ter múltiplas utilidades comerciais. Folhas, raízes e látex do caule têm propriedades medicinais. A torta processada do exocarpo do fruto e tegumento das sementes pode ser utilizada como adubo. As sementes contém um alto teor de óleo (35% - 40%), com uso apropriado para iluminação, na fabricação de sabão, na indústria de cosméticos e na produção de combustível para cozinha e biodiesel. Uma variedade não tóxica, proveniente do México e América Central e que não contém ésteres de forbol, pode ser utilizada na alimentação humana e animal (JONGSCHAAP et al., 2007; ACHTEN et al., 2008; ISLAM et al., 2011).

A Agência para Agricultura e Alimentação (FAO) e o Fundo Internacional para Desenvolvimento da Agricultura (IFAD) relataram que a utilização de *J. curcas* na produção de biodiesel poderia favorecer agricultores pobres, principalmente em regiões remotas do semi-árido de países pobres e em desenvolvimento como Índia no continente asiático, Mali e Tanzânia na África (BRITTAINE & LUTALADIO, 2010). Em 2008, já haviam sido plantados mais de 900.000 ha de *J. curcas* em todo o mundo (85% na Ásia, 13% na África e no resto da América Latina), e em 2015 estima-se que esta área seja de 12,8 milhões de hectares (KANT & WU, 2011). Para 2020, devido às mudanças climáticas previstas, é estimada uma queda global de 11%

no rendimento da produção de sementes de *J. curcas* em áreas como Sahel (África), leste do Brasil e Norte da Austrália (TRABUCCO et al 2010).

Em “História do Brazil”, capítulo VII do livro primeiro de Frei Vicente do Salvador, e que cobre o período de 1500 a 1627, encontra-se a mais antiga referência brasileira sobre a utilidade de *J. curcas* (OLIVEIRA, 2008). Entre pinturas de naturalistas holandeses do século XVII, encomendadas por Maurício de Nassau em 1637, destaca-se um quadro do pintor Albert Eckhout (Figura 2) onde são retratadas diversas plantas do Nordeste brasileiro, entre elas *J. curcas*. Pode-se observar que na época já se fazia o intercâmbio de plantas entre as diversas regiões da Terra, não havendo referências específicas sobre a origem desta espécie.

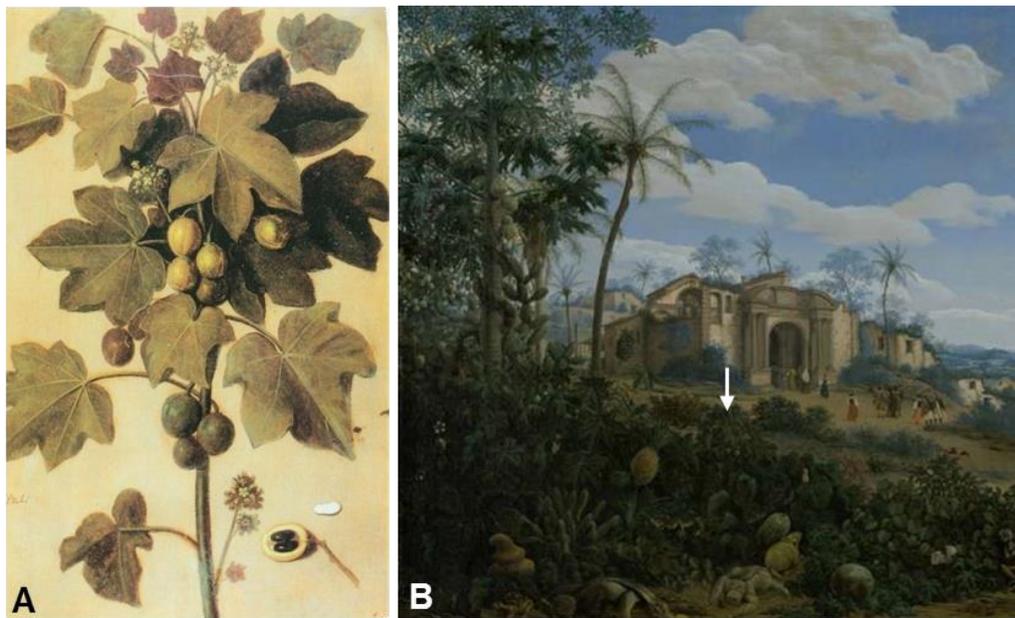


Figura 2. Imagens históricas de *Jatropha curcas* L. (A) Desenho extraído do livro Albert Eckhout (1641) – Visões do Paraíso Selvagem (BRIENEN, 2010). (B) Vista da Sé de Olinda, Frans Post (1662), Óleo sobre tela, Rijksmuseum, Amsterdam. A seta aponta para *Jatropha curcas* L.

2.2 Desenvolvimento e maturação de sementes

O complexo corpo multicelular das plantas vasculares resulta de um longo processo evolutivo de especialização para a sobrevivência no ambiente terrestre (NIKLAS, 1997). Nas Angiospermas, os padrões apical-basal e radial do corpo de uma planta são estabelecidos logo após as primeiras divisões do zigoto no saco embrionário do óvulo. Após uma sequência de

estádios, que envolve principalmente o fluxo de nutrientes da planta-mãe para os tecidos do óvulo, há a formação de um embrião maduro e da semente (EVERT, 2007; RAVEN, 2007).

Em termos conceituais, as fases de desenvolvimento de sementes podem ser agrupadas em dois períodos distintos, relacionados à completa formação do embrião. O primeiro período geralmente é definido como embriogênese, durante o qual se estabelece o plano no qual o embrião é formado, incluindo a elaboração de formas (morfogênese). Isto acontece através de intensas divisões mitóticas e diferenciação celular, levando à formação de diferentes tecidos (histogênese) e de estruturas funcionalmente organizadas – organogênese (WEST & HARADA, 1993; GOLDBERG et al., 1994; HARADA, 1997; TAIZ & ZEIGER, 2009). O segundo período é o de maturação da semente. Esta etapa envolve o acúmulo de reservas, mudanças no tamanho e nos pesos fresco e peso seco do embrião; supressão de germinação precoce; aquisição de tolerância à dessecação; dessecação e quiescência; e em muitas espécies, a indução de dormência (KOORNNEEF & KARSSSEN, 1994; VERTUCCI & FARRANT, 1995; HARADA, 1997).

Quanto à tolerância à dessecação, as sementes são classificadas como ortodoxas (tolerantes, podem ser desidratadas até baixo grau de umidade), recalcitrantes (sensíveis à dessecação) e intermediárias, que apresentam um comportamento entre ortodoxo e recalcitrante (ROBERTS, 1973; ELLIS et al., 1990). A interrupção do crescimento do embrião se constitui numa condição imposta durante a fase de maturação das sementes ortodoxas, mas não é essencial para formação de um embrião viável. Embriões de sementes recalcitrantes não passam por um período de interrupção do desenvolvimento e quiescência metabólica, sendo intolerantes à dessecação (WALBOT, 1978).

A regulação espacial e temporal de todas as etapas envolvidas na formação das sementes requer a ação combinada de várias vias de sinalização que integram informações de programas genéticos, sinais hormonais e metabólicos, permitindo assim a manutenção e sobrevivência das sementes sob uma vasta gama de condições ambientais (WOBUS & WEBER, 1999; GUTIERREZ et al., 2007).

Quando maduras, as sementes apresentam uma diversidade de tamanhos, formas e meios de dispersão, bem como diferentes compostos de reserva armazenados (carboidratos, proteínas e lipídeos) que serão mobilizados para o crescimento pós-germinativo do novo indivíduo, até a fotossíntese ser eficientemente estabelecida (BEWLEY & BLACK, 1994).

A maturidade fisiológica das sementes varia de acordo com a espécie e as condições ambientais predominantes durante sua formação. O conhecimento desse estágio de máxima viabilidade e vigor é de fundamental importância para a produção de sementes de boa qualidade (EDWARDS, 1980; BEDANE et al., 2006). Além dos testes fisiológicos clássicos (ISTA, 1993; BRASIL, 2009), estudos relacionados aos mecanismos celulares, moleculares e bioquímicos envolvidos na aquisição do vigor durante o desenvolvimento, germinação e armazenamento de sementes, podem gerar três grupos de marcadores de qualidade das sementes, dentre eles: indicadores da deterioração celular (acúmulo de espécies reativas de oxigênio, oxidação de RNA, etc.); indicadores da eficácia do sistema de proteção/defesa (açúcares solúveis, enzimas antioxidantes, etc.); e indicadores da germinação, atividade respiratória, indução do ciclo celular, etc. (CORBINEAU, 2012).

Durante séculos as pesquisas agrícolas têm sido direcionadas para a melhoria das características qualitativas e quantitativas associadas aos componentes químicos das sementes (BAUD et al., 2008). Dentre estes, os lipídeos são essenciais a todas as células vivas, pois são componentes obrigatórios de membranas biológicas. Cerca de 95% dos lipídeos das sementes são representados por triacilgliceróis e servem como fonte de reserva. São compostos químicos de particular importância na dieta humana e animal, além do uso pelas indústrias para produção de detergentes, tintas e lubrificantes (MIQUEL & BROWSE, 1995; RAJASSEKHARAN & NACHIAPPAN, 2010).

2.3 Germinação de sementes e crescimento de plântulas

O termo germinação inclui uma série de eventos que começa com a absorção de água por uma semente quiescente e termina com o alongamento e penetração do eixo embrionário nos tecidos circundantes. O sinal visível de que a germinação foi concluída é o aparecimento da radícula. Eventos subsequentes, incluindo a mobilização das reservas, são associados ao crescimento de plântulas (BEWLEY & BLACK, 1994; BEWLEY, 1997).

Germinação é um processo complexo durante o qual a semente deve, de maneira rápida, se recuperar fisicamente da secagem de maturação (no caso das sementes ortodoxas), retomar e sustentar uma intensa atividade metabólica, completar eventos celulares essenciais ao crescimento do embrião, e se preparar para posterior crescimento de plântulas (NONOGAKI et al., 2010).

Uma semente não dormente germina numa variedade de ambientes possíveis para seu genótipo. O controle da germinação depende da sensibilidade da semente a fatores ambientais (água, temperatura, luz, oxigênio, nitrato, etc.), a inibidores químicos, ao tipo de tegumento e a idade. Sementes viáveis que não completam sua germinação, mesmo sob condições favoráveis, são denominadas dormentes (HILHORST, 1995; BASKIN & BASKIN 1998; FINCH-SAVAGE & LEUBNER-METZGER, 2006).

As sementes possuem relações hídricas específicas e a taxa de embebição varia de acordo a espécie, condições ambientais, conteúdo de água inicial e as características da testa e dos tecidos de reserva. Normalmente, as sementes apresentam um padrão trifásico de absorção de água (Figura 3). A fase I é um processo estritamente físico dirigido pelo potencial matricial da semente seca até a completa hidratação dos conteúdos celulares. Uma intensa atividade respiratória é iniciada dentro de minutos. A fase II é um período de limitada absorção de água (fase de platô) e onde ocorrem eventos como síntese, duplicação e reparo de DNA, tradução de mRNA, alongamento celular (e em algumas espécies divisão celular) e início da degradação dos tecidos de revestimento. Na fase III a germinação se completa com a protrusão da radícula. Nesta etapa há ligeiro aumento no conteúdo de água absorvido e na atividade respiratória pelas células do embrião em crescimento, por expansão e divisões mitóticas simultaneamente. É também observada uma acentuada taxa de mobilização de reservas para sustentar a plântula em crescimento até esta se tornar fotossinteticamente ativa (BEWLEY & BLACK, 1994; BRADFORD, 1995; BEWLEY 1997; DE CASTRO et al., 2000; NONOGAKI et al., 2010; BEWLEY et al., 2012).

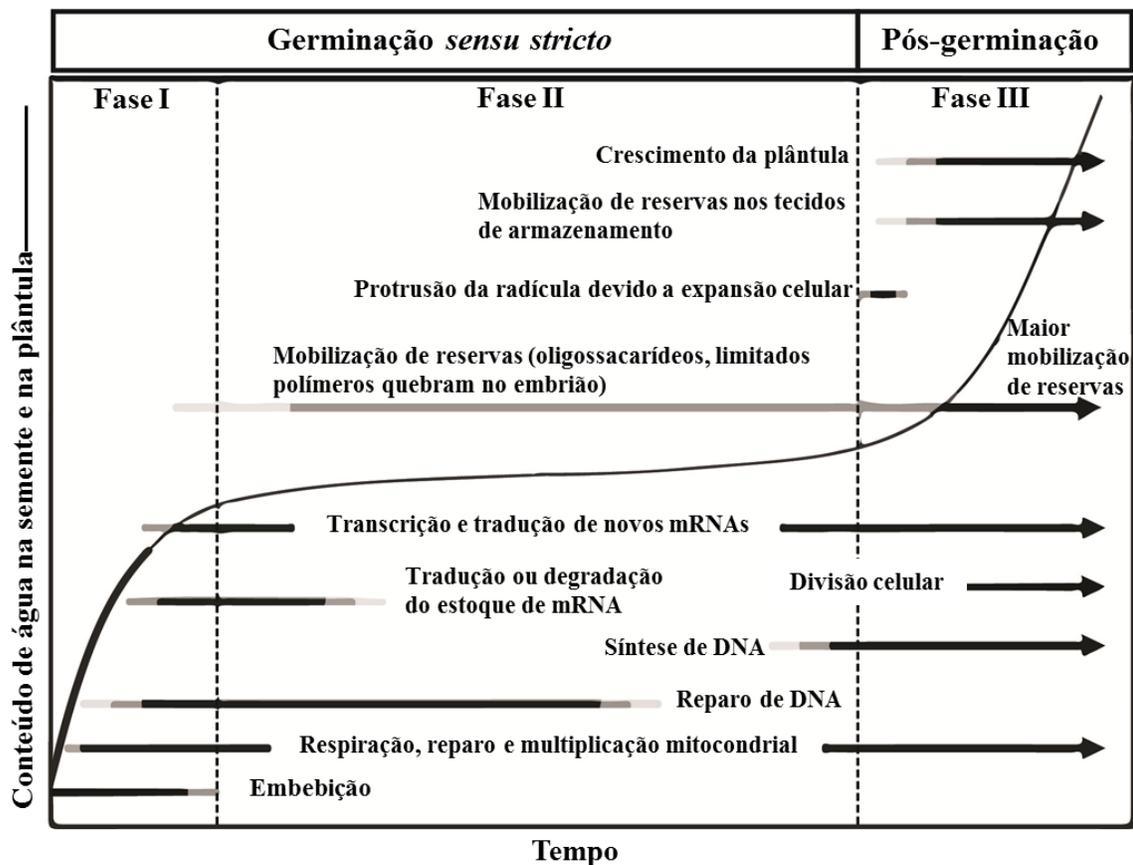


Figura 3. Representação esquemática de eventos físicos e metabólicos que ocorrem durante a germinação (Fases I e II) e crescimento inicial de plântulas (Fase III). O tempo necessário para esses eventos ocorrerem varia entre as espécies e é influenciado pelas condições de germinação. (Modificado a partir de NONOGAKI et al., 2010; BEWLEY et al., 2012).

Um novo modelo conceitual, dependente de dormência das sementes, sugere a existência de um padrão multifásico de embebição, no qual a ruptura da testa precede a ruptura do endosperma. Neste caso a fase II, seria subdividida em A, B e C. A fase IIA ocorre como a clássica fase II; a fase IIB é associada ao início da ruptura da testa, e, finalmente, a fase IIC representa o alongamento do embrião com ruptura da testa, mas sem a ruptura do endosperma. A transição da fase IIC para a fase III marca a ruptura do endosperma e protrusão radicular (TOOROP, 2015).

A germinação não é garantia do sucesso reprodutivo de uma espécie vegetal. O estabelecimento e sobrevivência de plântulas são etapas consideradas frágeis no processo de desenvolvimento de uma planta adulta e eventos cruciais na manutenção das populações. Uma

plântula caracteriza-se por depender da reserva da semente e/ou apresentar estruturas funcionais oriundas das reservas da semente (FENNER & KITAJIMA, 1999; MELO et al., 2004).

A sobrevivência das plântulas depende de estratégias adaptativas baseadas em atributos morfofisiológicos, que favoreçam a capacidade de lidar com vários fatores ambientais como disponibilidade de água, temperatura, radiação, patógenos, herbivoria e interações competitivas. (GARWOOD, 1996; MOLES & WESTOBY, 2004; DE MICCO & ARONNE, 2012).

Dentre as estruturas morfofisiológicas, a raiz é a primeira a emergir após a germinação das sementes. O desenvolvimento do sistema radicular possibilita o desenvolvimento das plântulas, servindo para ancorá-las no solo e captar água e nutrientes. Além disso, a raiz contém a base para o crescimento e desenvolvimento da planta, da germinação até a senescência: o meristema radicular. À medida que as plântulas crescem, um programa endógeno de desenvolvimento associado a estímulos ambientais, tais como níveis de nutrientes e estímulos mecânicos, afetam a padronização de produção de raízes laterais e adventícias e, conseqüentemente, a arquitetura de exploração do solo. O entendimento dessa morfologia ajuda na compreensão do processo de estabelecimento de plântulas em condições naturais (RAVEN, 2007; RICHTER et al., 2009; MUNNÉ-BOSCH, 2014).

Em síntese, a semente contém uma nova planta em miniatura na forma de embrião que, ao germinar, produzirá uma nova geração de plantas (BEWLEY, 1997). A germinação das sementes e estabelecimento de uma plântula normal são etapas determinantes para a propagação das espécies vegetais, e são de importância ecológica e econômica (RAJJOU et al., 2012). Levando em consideração que o Brasil é riquíssimo em diversidade de sementes, estudos relacionados aos atributos morfológicos e fisiológicos em sementes e plântulas são imprescindíveis para se entender como as plantas são multiplicadas e perpetuadas na Terra.

2.4 Citoesqueleto microtubular em plantas

O desenvolvimento de uma planta depende de mecanismos para moldar a estrutura do corpo vegetal em um ambiente mutável. Encerradas em paredes celulares semirrígidas, as células vegetais não podem se movimentar, mas passam por fases de divisão, crescimento (alongamento) e diferenciação que se sobrepõem no espaço e tempo. Estes processos dependem de distintos arranjos de microtúbulos associados às diferentes etapas do ciclo celular (ALBERTS et al., 2002; DEINUM & MULDER, 2013).

O ciclo celular abrange uma sequência de eventos moleculares que permitem as células se duplicarem e segregarem seus cromossomos, formando novas células. Nas células eucarióticas, o ciclo celular é dividido em quatro fases distintas, que inclui duas fases de *gap* (intervalo - fases **G1** e **G2**), uma fase de síntese (**S**) e mitose (**M**). Na fase **G1** as células crescem com um conteúdo de DNA 2C, em **S** a informação genética é replicada, em **G2** ocorre um maior aumento de volume das células (DNA 4C) em preparação para as divisões. Finalmente, na mitose os componentes celulares são divididos entre as duas células filhas que recebem um conjunto idêntico de cromossomos (HOWARD & PELC, 1986; GEORGE et al., 2008).

Durante a progressão do ciclo celular, o citoesqueleto microtubular apresenta mudanças configuracionais que determinam a estrutura tridimensional das células vegetais, a direção da expansão celular, a segregação dos cromossomos irmãos, a formação e controle espacial da nova parede celular. Para executar essas funções, os microtúbulos são construídos em arranjos complexos que sofrem crescimento e redução devido ao seu mecanismo intrínseco de instabilidade dinâmica. Microtúbulos são polímeros polares compostos de heterodímeros de α e β tubulina, cada uma com massa molecular de, aproximadamente, 50.000 Da. Consistem de 13 protofilamentos circularmente arranjados, conectados na superfície lateral (α - α e β - β), formando um tubo de 25nm de diâmetro (GODDARD et al., 1994; MAYER & JÜRGENS, 2002; HASHIMOTO, 2013).

Os microtúbulos corticais (MC), a banda preprófase (BPP) e fragmoplasto são estruturas microtubulares específicas de plantas (Figura 4). Os MC são observados no final da fase G1 e ocorrem perpendicularmente ao eixo de expansão celular. Controlam a forma da célula através da orientação da deposição das microfibrilas de celulose na parede celular. A BPP - um anel de microtúbulos que circunda o núcleo no plano equatorial da célula - forma-se no final da fase G2 e determina o futuro plano de divisão celular. No final da prófase, a BPP é substituída pelo fuso mitótico. O fragmoplasto aparece no final da anáfase e promove a síntese da nova placa celular na citocinese. Na próxima fase G1 o novo núcleo move-se para a periferia da célula e apenas MC são visíveis (HASEZAWA & KUMAGAI, 2002; PASTUGLIA et al., 2006; TAIZ & ZEIGER, 2009).

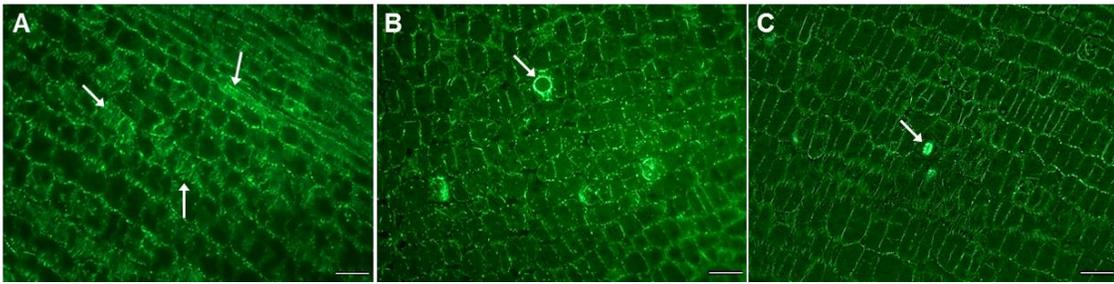


Figura 4. Micrografias de fluorescência apresentando diversas configurações mitóticas em seções longitudinais de radículas embrionárias de *Jatropha curcas* L. em desenvolvimento (A) microtúbulos corticais; (B) banda pré-prófase e (C) fragmoplasto. As barras indicam 25 μ m. Fonte: autor.

Divisão, expansão, diferenciação e comunicação celular são processos fundamentais no desenvolvimento vegetal. Para tanto, é necessária uma regulação coordenada da síntese macromolecular, da extensão da parede celular orientada pela pressão de turgor, do ciclo mitótico e endociclo. Todas estas etapas envolvem mudanças na arquitetura dos microtúbulos e o desligamento de genes que codificam proteínas associadas ao citoesqueleto microtubular que resultam na morfogênese de fenótipos aberrantes (KOST et al., 1999, FOLKERS et al., 2002; SABLONSKI & DORNELAS, 2013).

A organização do citoesqueleto microtubular vem sendo bastante estudada em sementes, levando em consideração eventos celulares durante o desenvolvimento, germinação, quebra de dormência, armazenamento e tolerância a dessecação (FINCH-SAVAGE et al., 1998; DE CASTRO et al., 2000; PAWLOWSKI et al., 2004; FARIA et al., 2006). Uma série de modelos computacionais e técnicas de microscopia, incluindo o uso de corantes fluorescentes, têm sido usados para investigar a organização do citoesqueleto microtubular durante o ciclo celular em plantas (WICK, et al., 1981; BASKIN et al., 1992; HAWES & SATIAT- JEUNEMAITRE, 2001; GOSHIMA & KIMURA, 2010; SHAW, 2013). Mas, ainda são imprescindíveis pesquisas para ampliar a compreensão sobre o desenvolvimento de plantas a fim de se entender também as relações entre eventos do ciclo celular e contribuição destes para a formação de sementes.

3 REFERÊNCIAS

ACHTEN, W. M. J.; VERCHOT, L.; FRANKEN, Y. J.; MATHIJS, E.; SINGH, V. P.; AERTS, A.; MUYS, B. *Jatropha* bio-diesel production and use. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v.32, n.12, p.1063-1084, 2008.

ACHTEN, W. M.; NIELSEN, L. R.; AERTS, R.; LENGKEEK, A. G.; KJAER, E. D.; TRABUCCO, A.; HANSEN, J. K.; MAES, W. H.; GRAUDAL, L.; AKINNIFESI, F. K.; MUYS, M. Towards domestication of *Jatropha curcas*. *Biofuels*, London, v. 1, n. 1, p. 91-107, 2010.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4 ed. Garland Publishing, Inc. New York, USA, 2002, p. 258.

ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de Pinhão Manso (*Jatropha curca* l.) como Alternativa para o Semi-árido Nordeste. **Rev. Bras. ol. fibros.**, Campina Grande, v.8, n.1, p.789-799, 2004.

AZEVEDO, H. “Pinhão manso é lançado pelo presidente Lula como opção para biodiesel – vegetal é de fácil cultivo”. **Hoje em Dia**, 8 a 14/01/2006, Brasília-DF, 2006.

BASKIN, C.C.; BASKIN, J. M. **Seeds**. Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. San Diego: Academic Press, 1998. 666 p.

BASKIN, T.I.; BUSBY, C. H.; FOWKE, L. C.; SAMMUT, M.; GUBLER, F. Improvements in immunostaining samples embedded in methacrylate: localization of microtubules and other antigens throughout developing organs in plants of diverse taxa. **Planta**, v. 187, p. 405-413, 1992.

BAUD, S. Storage Reserve Accumulation in Arabidopsis: Metabolic and Developmental Control of Seed Filling. **The Arabidopsis Book**, v.6, p. 1-24, 2008.

BEDANE, G. M.; GUPTA, M. L.; GEORGE, D. L. Optimum harvest maturity for guayule seed. **Industrial Crops and Products**, v.24, p.26-33, 2006.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. New York: Plenum, 1994. 445p.

BEWLEY, J.D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, Canadá, v. 9, p.1055-1066, 1997.

BEWLEY, J. Derik.; NONOGAKI, H.; HILHORST, H W. M.; BRADFORD, K. J. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3ª edição. New York: Springer-Verlag, 2012, 392p.

BOESEWINKEL, F. D.; BOUMAN, F.: Seed Morphology and Development. In: **Seed development and germination**. Kigel, J. & Galili, G. (eds).. Capítulo 1. P1 – 24. New York, 1995.

BRADFORD, K. J. Water relations in seed germination. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.) **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995, p.351-396.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 395 p.

BRASILEIRO, B. G.; DIAS, D. C. F. S.; BHERING, M. C.; DIAS, L. A. S. Floral biology and characterization of seed germination in physic nut (*Jatropha curcas*. L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 4, pág. 556-562, 2012.

BRIENEN, R. P. *Albert Eckhout: visões do paraíso selvagem*. Obra completa. Trad. Julio Bandeira. Rio de Janeiro: Ed. Capivara, 2010.

BRITTAINE, R.; LUTALADIO, N. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Jatropha: A Smallholder Bioenergy Crop The Potential for Pro-Poor Development**. Vol. 8, Roma, 2010. Disponível em: [bhttp://www.fao.org/docrep/012/i1219e/i1219e00.pdf](http://www.fao.org/docrep/012/i1219e/i1219e00.pdf). Acesso em 17 de novembro de 2010.

CARVALHO, B. C. L.; OLIVEIRA, E. A. S.; LEITE, V. M.; DOURADO, V. V. **Informações técnicas para o cultivo do pinhão-manso no Estado da Bahia**. Salvador: EBDA, 2009, 79 p.

CATZÍN-YUPIT, C. N.; RAMIREZ-MORILLO, I. M.; POOL, F. A. B.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Ontogenic development and structure of the embryo, seed, and fruit of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **South African Journal of Botany**, v. 93, pág. 1-8, 2014.

CORBINEAU, F. Markers of seed quality: from present to future. **Seed Science Research**, v.22, p. S61-S68, 2012.

DE CASTRO, R.D.; HILHORST, H.W.M. Embebição e reativação do metabolismo. Pp. In: A.G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre, Artmed. 2004, p. 149-162.

DE CASTRO, R.D.; VAN LAMMEREN, GROOT, S. P.C.; BINO, R. J.; HILHORST, H. W. M. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant Physiology**, v. 122, n. 2, p. 327-335, 2000.

DEHGAN, B.; WEBSTER, G. L. Morphology and infrageneric relationships of the genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). **Bot.**, v. 74, 1979.

DEINUM, E. E.; MULDER, B. M. Modelling the role of microtubules in plant cell morphology, **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 688-692, 2013.

DE MICCO, V.; ARONNE, G. Occurrence of Morphological and Anatomical Adaptive Traits in Young and Adult Plants of the Rare Mediterranean Cliff Species *Primula palinuri* Petagna. **The Scientific World Journal**, v.2012, p. 1-10, 2012.

EDWARDS, D. G. W. Maturity and quality of tree seeds – a state of the art review. **Seed Sci. Technol.** v.8, p. 625-657, 1980.

DUBREUCQ, B.; BAUD, S.; DEBEAUJON, I.; DUBOS, C.; MARION-POLL, A.; MIQUEL, M.; NORTH, H.; ROCHAT, C.; ROUTABOUL, J.-M.; LEPINIEC, L. Seed Development. In: **Plant Developmental Biology – Biotechnological perspectives**. Eng – Chong Pua & Michael R. Davey (eds) - Volume I. Capítulo 17. P. 341- 359. Springer. Heidelberg, Germany, 2010.

ELLIS, R. H.; HONG, B.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behavior? **Journal of Experimental Botany**, v.41, n°230, p. 1167-1174, 1990.

EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells and Tissues of the Plant Body. Their Structure, Function and Development**. Blucher, 3° edição, 2007, 293 p.

FARIA, J. M. R.; DAVIDE, L. C.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A.C.; PEREIRA, R. C.; VAN LAMMEREN, A. A. M.; HILHORST, H. W. M. Physiological and cytological aspects of *Inga vera* subsp. *Affinis* embryos during storage, **Braz. J. Plant Physiol.**, v 18, n. 4, p. 503-513, 2006.

FENNER, M.; KITAJIMA, K. Seed and seedling ecology. In: PUGNARE, F. I.; VALLADARES, F. (Ed.). **Handbook of Functional Plant Ecology**. New York, NY, USA: Marcel-Dekker, 1999. p. 589-621.

FINCH-SAVAGE, W. E.; BERGEVOET, J. H. W.; BINO, R. J.; CLAY, H. A.; GROOT, S.P.C. Nuclear Replication Activity During Seed Development, Dormancy Breakage and Germination in Three Tree Species: Norway Maple (*Acer platanoides* L.), Sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) and Cherry (*Prunus avium* L.), **Annals of Botany**, v. 81, p. 519-526, 1998.

FINCH-SAVAGE, W.E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, Freiburg, v. 171, n° 3, p. 501-523, 2006.

FOLKERS, U.; KIRIK, V.; SCHOBINGER, U.; FALK, S.; KRISHNAKUMAR, S.; POLLOCK, M. A.; OPPENHEIMER, D. G.; DAY, I.; REDDY, A. R.; JURGENS, G.; HULSKAMP, M. The Cell morphogenesis gene *ANGUSTIFOLIA* encodes a CtBP/BARS-like protein and is involved in the control of the microtubule cytoskeleton, **The EMBO Journal**, v. 21, n. 6, p. 1280-1288, 2002.

GARWOOD, N. C. Functional morphology of tropical tree seedlings. In: SWAINE, M. D. (Ed.). **The ecology of tropical forest tree seedlings**. Paris: Unesco – Parthenon publishing, 1996. 457 p.

GEORGE, E.F.; DEBERGH, P.C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E.F., HALL, M.A., DE KLERK, G. J. (Eds.), **Plant Propagation by Tissue Culture**. Springer, Dordrecht, 2008, p. 29-64.

GODDARD, R. H.; WICK, S. M.; SILFLOW, S. D.; SNUTAD, D. P. Microtubule Components of the Plant Cell Cytoskeleton, **Plant Physiology**, v. 104, p. 1-6, 1994.

GOLDBERG, R. B.; DE PAIVA, G.; YADEGARI, R. Plant embryogenesis - zygote to seed. **Science**, v.266, p.605-614, 1994.

GOSHIMA, G.; KIMURA, A. New look inside the spindle: microtubule-dependent microtubule generation within the spindle, **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, p. 44-49, 2010.

GUTIERREZ, L.; VAN WUYTSWINKEL, O.; CASTELAIN, M.; BELLINI, C. Combined networks regulating seed maturation. **Trends in Plant Science**, v.12, n°7, 2007.

HARADA, J. J. **Seed maturation and control of germination**. In: LARKINS, B. A.; VASIL, I. K (Ed.). Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development. Dordrecht: Kluwer Academic, p.545-592, 1997.

HASEZAWA, S.; KUMAGAI, F. Dynamic Changes and the Role of the Cytoskeleton during the cell Cycle In Higher Plant Cells, **International Review of Cytology**, v. 214, p. 161-191, 2002.

HASHIMOTO, T. A ring for all: g-tubulin-containing nucleation complexes in a centro somal plant microtubule arrays. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 698-703, 2013.

HAWES, C. R.; SATIT - JEUNEMAITRE, B. Trekking along the Cytoskeleton, **Plant Physiology**, v.125, p.119-122, 2001.

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

HILHORST, H. W. M. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. **Seed Science Research**, Wagening, v. 5, n°2, p.61-73, 1995.

HOWARD, A.; PELC, S.R. Synthesis of deoxyribonucleic-acid in normal and irradiated-cells and its relation to chromosome breakage. **International Journal of Radiation Biology**, v. 49, n. 2, p. 207-218, 1986.

ISLAM, A. K. M. A.; YAKOOB, Z.; ANUAR, N. *Jatropha*: A multipurpose plant with considerable potential for the tropics. **Scientific Research and Essays**, v.6, p. 2597-2605, 2011.

ISTA. International Rules for Seed Testing. **Seed Sci. and Technol**, v. 21, p.1-288, 1993.

JØKER, D.; JEPSEN, J. *Jatropha curcas* L. Humleback: Seed Leaflet, 2003. n. 83, p. 1-2. Available at: <http://curis.ku.dk/ws/files/20648145/jatropha_curcas_83.pdf>. Accessed at: 23 nov. 2014.

JONGSCHAAP, R.E.E; CORRE, W. J.; BINDRABAN, P. S.; BRANDENBURG, W. A. Claims and Facts on *Jatropha curcas* L., **Plant Research International**, Wageningen, 2007.

KANT, P.; WU, S. The Extraordinary Collapse of *Jatropha* as a Global Biofuel. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 7114-7115, 2011.

KOORNNEEF, M.; KARSSSEN, C. M. **Seed dormancy and germination**. In: MEYEROWITZ, E. M.; SOMMERVILLE, C.R. (Ed.). *Arabidopsis*, Cold Spring Harbor, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 313-334, 1994.

KOST, B.; MATHUR, J.; CHUA, N. Cytoskeleton in plant development, **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p. 462-470, 1999.

LARCHER, W. **Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups**. 4th edition. Berlin: Springer. 513 pp. 2003.

LAVIOLA, B. G.; BHERING, L. L.; MENDONÇA, S.; ROSADO, T. B.; ALBRECHT, J. C. Caracterização morfo-agronômica do banco de germoplasma de pinhao manso na fase jovem. **Biosci. J.**; v. 27, n. 3, p. 371-379, 2011.

LINKIES, A.; GRAEBER, K.; KNIGHT, C.; LEUBNER-METZGER, G. The evolution of seeds. **New Phytologist**, v. 186, p. 817-831, 2010.

LOUREIRO, M. B.; TELES, C. A. S.; COLARES, C. C. A.; ARAÚJO, B. R. N.; FERNANDEZ, L. G.; CASTRO, R. D. Caracterização morfoanatômica e fisiológica de sementes e plântulas de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). Viçosas/MG, **Revista Árvore**, v. 37, n. 6, pág. 1093-1101, 2013.

MAES, W. H. Climatic growing conditions of *Jatropha curcas* L. **Biomass & Bioenergy**, v. 33, p. 1481-1485, 2009.

MARTIN, R.C.; PLUSKOTA, W. E.; NONOGAKI, H. Seed Germination. In: Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives . Eng – Chong Pua & Michael R. Davey (eds) - Volume I. Capítulo 19. P. 383- 404. Springer. Heidelberg, Germany, 2010.

MAYER, U.; JURGENS, G. Microtubule cytoskeleton: a trackrecord, **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 494-501, 2002.

MELO, F. P. L.de.; AGUIAR NETO, A.V. de.; SIMABUKURO, E.A.; TABARELLI, M. Recrutamento e estabelecimento de plântulas. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação – do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, Capítulo 15, 2004. p. 237-250.

MIQUEL, M.; BROWSE, J. **Lipid Biosynthesis in Developing Seeds**. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). Seed development and germination. New York, capítulo 7, 1995, p. 169 – 194.

MOLES, A. T.; WESTOBY, M. What do seedlings die from and what are the implications for evolution of seed size? **Oikos**, v. 106, n°.1, p. 193-199, 2004.

MUNNÉ-BOSCH, S. Perennial roots to immortality. **Plant Physiology**, v.166, n°2, p.720-725, 2014.

NIKLAS, K. J. **The evolutionary biology of plants**. Chicago: University of Chicago Press, 1997.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination still a mystery. **Plant Science**, v. 179, n°6, p.574-581, 2010.

OLIVEIRA, M. L. **A História do Brasil de Frei Vicente do Salvador – História e Política no Império Português do Século XVII**. Rio de Janeiro: Versal; São Paulo: Odebrecht, v.2, 2008, 241p.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, v.19, p.1-15, 2000.

PASTUGLIA, M.; AZIMZADEH, J.; GOUSSOT. M.; CAMILLERI, C.; BELCRAM, K.; EVRARD, J.; SCHIMT, A.; GUERCHE, P.; BOUCHEZ, D. y –Tubulin Is Essential for

Microtubule Organization and Development in Arabidopsis, **The Plant Cell**, v. 18, p. 1412-1425, 2006.

PAWLOWSKI, T. A.; BERGEVOET, J. H. W.; BINO, R. J.; GROOT, S. P. C. Cell cycle activity and β -tubulin accumulation during dormancy breaking of *Acer platanoides* L. seeds, **Biologia Plantarum**, v. 48, n. 2, p. 211-218, 2004.

RAJASEKHARAN, R.; NACHIAPPAN, V. **Fatty Acid Biosynthesis and regulation in Plants**. In: PUA, Chong.; DAVEY, Michael, R. (Ed.). *Plant Developmental Biology – Biotechnological perspectives*. Eng. Springer. Heidelberg, Germany, v. II, Capítulo 6. 2010, p. 104 - 116.

RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed Germination and Vigor. **Rev. Plant Biol**, v.63, p. 507-533, 2012.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7.ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2007. 906p.

RICHTER, G. L.; MONSHAUSEN, G. B.; KROL, A.; & GILROY, S. Mechanical stimuli modulate lateral root organogenesis. **Plant Physiology**, v.151, p.1855-1866, 2009.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, n°3, p. 499-514, 1973.

ROSADO, T. B.; LAVIOLA, B. G.; FARIA, D. A.; PAPPAS, M. R.; BHERING, L. L.; QUIRINO, B.; GRATTAPAGLIA, D. Markers Reveal Limited Genetic Diversity in a Large Germplasm Collection of the Biofuel Crop *Jatropha curcas* L. in Brazil, **Crop Science**, v. 50, p. 2372-2382, 2010.

SABLOWSKI, R.; DORNELAS, M. C. Interplay between cell growth and cell cycle in plants, **Journal of Experimental Botany**, p. 1 – 12, 2013.

SHAW, S. L. Reorganization of the plant cortical microtubule array, **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 693-697, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TRABUCCO, A.; ACHTEN, W. M. J.; BOWE, C.; AERTS, R.; ORSHOVEN, J.; NORGROVES, L. ; MUYS, B. Global mapping of *Jatropha curcas* yield based on response of fitness to present and future climate. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 2, p. 139-151, 2010.

TOOROP, P. E. Nitrate controls testa rupture and water content during release of physiological dormancy in seeds of *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. **Seed Science Research**, p.1-9, 2015.

VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed Development and Germination**. New York: .Marcel Dekker Press, p. 237-271, 1995.

WALBOT, V. **Control mechanisms for plant embryogeny**. In: CLUTTER, M. E. (Ed.) *Dormancy and Developmental Arrest*. New York: Academic Press, p.113-166, 1978.

WASTENEYS, G. O.; Microtubule organization in the green Kingdom: chaos or self order? **Journal of Cell Science**, v.115, p.1345-1354, 2002.

WEBER, H.; SREENIVASULU, N. WESCHKE, W. Molecular Physiology of Seed Maturation and Seed Storage Protein Biosynthesis. In: **Plant Developmental Biology – Biotechnological perspectives**. Eng – Chong Pua & Michael R. Davey (eds) - Volume II. Capítulo 5. P. 83- 104. Springer. Heidelberg, Germany,2010.

WEST, M. A. L.; HARADA, J. J. Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. **The Plant Cell**, v.5, p.1361-1369, 1993.

WICK, S. M.; SEAGULL, R. W.; OSBORN, M.; WEBER, K.; GUNNING, B. E. S. Immunofluorescence Microscopy of Organized Microtubule Arrays in Structurally Stabilized Meristematic Plant Cells, **The journal of cell biology**, v.89, p. 685 – 690, 1981.

WOBUS, U.; WEBER, H. Seed maturation: genetic programmes and control signals. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.33-38, 1999.

CAPÍTULO 1

PERFIL MORFOFISIOLÓGICO DA MATURAÇÃO DE FRUTOS E SEMENTES DE *Jatropha curcas* L.

RESUMO

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae), conhecida popularmente como pinhão manso, possui sementes oleaginosas que podem ser utilizadas como matéria-prima para a produção de biodiesel, dentre outras aplicações industriais. É uma espécie tolerante à restrição hídrica e por isso apropriada ao cultivo em regiões semiáridas. As irregularidades na frutificação e maturação dificultam a colheita e o processamento de frutos e sementes, o rendimento em sementes e óleo, assim como a obtenção de lotes de sementes com boa qualidade fisiológica para fins de propágulo. O objetivo deste trabalho consistiu em caracterizar o perfil fisiológico durante o desenvolvimento e maturação de frutos e sementes de *J. curcas* e identificar a melhor época de colheita baseando-se em aspectos morfológicos e fisiológicos. O desenvolvimento dos frutos e sementes foi monitorado no campo e, ao final da safra, os frutos foram colhidos em uma única etapa e classificados visualmente em seis estádios distintos de desenvolvimento e maturação, conforme coloração do exocarpo. As sementes foram classificadas em treze estádios baseando-se no aspecto do fruto e na coloração da testa. Os parâmetros analisados indicam que a melhor época de colheita é quando os frutos estão secos e com coloração marrom, e as sementes apresentaram máximo acúmulo de matéria seca, menor teor de umidade, maior germinação e vigor, maior teor de lipídeos e dimensões de comprimento e largura estabilizadas, parâmetros estes relacionados com o ponto de maturidade fisiológica para as sementes de *J. curcas*.

Palavras-chave: Pinhão manso. Massa seca. Germinação. Maturidade fisiológica. Teor de óleo.

ABSTRACT

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae), known as physic nut, is an oil seed species suitable as feedstock for biodiesel production, among other possible industrial applications. It is also considered tolerant to water restriction and thus suitable for cultivation in semi-arid regions. However, the lack of uniformity in fructification and seed maturation hinder the harvest and processing of fruits and seeds, seed and oil yields, as well as obtaining seed lots with good physiological quality as propagule. Thus, the aim of this study was to characterize the physiological profile during development and maturation of *J. curcas* fruits and seeds and identify the best time to harvest the fruits and seeds based on morphological and physiological aspects. Fruit and seed development was monitored and fruits were harvested at once at the end of the maturation phase, and then visually classified in six distinct stages of maturation based on size and colour of the exocarp, whereas seeds were classified into thirteen distinct stages based on the appearance of the fruit and colour of the tegument. The overall analysis of parameters indicated the best harvest time to be when the fruits are brown and brown-dry when seeds present maximum dry matter accumulation, lower moisture content, highest germination and vigor, higher lipid content and stable length and width dimensions, being these parameters related to physiological maturation in physic nut seeds.

Keywords: Physic nut. Dry weight. Germination. Physiological maturity. Oil content.

1 INTRODUÇÃO

O ciclo de vida em plantas superiores compreende o desenvolvimento da semente, seguido pela germinação e desenvolvimento pós-germinativo. Estas etapas são marcadas por eventos fisiológicos específicos relacionados às mudanças no conteúdo de água, peso fresco, peso seco, além de padrões distintos de expressão gênica e estabelecimento da arquitetura fundamental da planta, tais como a histogênese, organogênese e morfogênese (BEWLEY & BLACK, 1994; TAIZ & ZEIGER, 2009).

A embriogênese de sementes é caracterizada por rápidas e sucessivas divisões celulares e histodiferenciação. Neste processo, uma única célula é transformada em uma estrutura multicelular. Já a etapa de maturação das sementes está relacionada com a deposição de reservas e expansão celular. Em sementes ortodoxas há uma fase de secagem ou dessecação, caracterizada por um rápido declínio do peso fresco, tornando essas sementes tolerantes à dessecação (BEWLEY & BLACK, 1994).

A qualidade máxima da semente, traduzida pela germinação e vigor, está também associada ao acúmulo máximo de peso seco durante o seu desenvolvimento (maturidade fisiológica). Esse ponto marca a suspensão do transporte de metabólitos do floema à semente, e, em alguns casos, ocorrem mudanças específicas nos tecidos que ligam a semente à planta mãe (EGLI, 1998; DE CASTRO & HILHORST, 2004).

Jatropha curcas L. ocorre naturalmente no semiárido nordestino e em países das Américas equatoriais. No entanto, a espécie ainda não está plenamente domesticada, mas já se destaca pelo potencial oleaginoso de suas sementes, e também pela aparente rusticidade e tolerância a condições de estresses abióticos e talvez também a estresses bióticos (SATURNINO et al., 2005). Atualmente, esta cultura vem sendo considerada como mais uma opção agrícola para a região nordeste, pois se constitui em uma planta viável para a obtenção de óleo como matéria-prima para a fabricação de biodiesel, com produtividade mínima de duas toneladas de sementes por hectare (DRUMMOND et al., 2008).

As sementes de *J. curcas* possuem um elevado teor de óleo, cerca de 55 %, rico em ácidos graxos de alta qualidade, que sendo usado para a produção de biodiesel, poderá contribuir para a diminuição da emissão de gases de efeito estufa, pela substituição parcial de combustíveis fósseis (OPENSHAW, 2000; JONGSCHAAP et al., 2007).

O ciclo produtivo da espécie varia de acordo com o tipo de plantio, que pode ser por via sexuada ou vegetativa. De modo geral, as plantas oriundas de sementes são mais resistentes e apresentam maior longevidade, atingindo idade produtiva após quatro anos, enquanto que as provenientes de estacas são de vida mais curta, sistema radicular menos vigoroso, e a produção tem início após 10 meses, mas só atinge a plenitude após dois anos. Quando obtida por via seminal, em boas condições de produção, a longevidade do *J. curcas* pode atingir de 30 a 40 anos, podendo atingir até 50 anos (CORTESÃO, 1956; PEIXOTO, 1973; ACHTEN et al., 2010).

A interação de fatores ambientais e intrínsecos à planta afeta a maturação de sementes e frutos e envolve significativas mudanças na composição bioquímica, na quantidade de matéria seca, no teor de umidade, no tamanho, na germinação e vigor das sementes (DELOUCHE, 1980; DE RON, et al., 2004). A associação de marcadores morfológicos, fisiológicos e bioquímicos é uma ferramenta confiável para identificar as diferentes fases do desenvolvimento (MICHELANGELI et al., 2013). A qualidade máxima de uma semente depende do estágio de maturação na qual o embrião e o endosperma se encontram e pode ocorrer antes ou depois do ponto de maturidade fisiológica (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000; DIAS, 2001).

Levando-se em consideração que a semente é o produto final (ou inicial), e o carreador das características genéticas da planta, das características fisiológicas como propágulo, e das características bioquímicas como produto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o processo de formação das sementes de *J. curcas* a partir das análises das modificações fisiológicas e bioquímicas, bem como os aspectos morfológicos, durante o amadurecimento de frutos e sementes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O material biológico utilizado neste trabalho foi produzido no campo experimental da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA), localizado no município de Alagoinhas/BA, latitude de 12° 08' – 12°10' S e longitude de 38° 26' – 38° 30' W. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Inicialmente, realizou-se o acompanhamento da floração e do desenvolvimento dos frutos e sementes, através de visitas semanais ao campo. Para tanto, as inflorescências contendo botões florais femininos foram marcadas com fita colorida e identificadas com etiquetas de papel, antes da ocorrência da antese. Os frutos formados foram

acompanhados durante o seu desenvolvimento e colhidos manualmente, de uma só vez, na última etapa de acompanhamento no campo. Nesta fase, estes se apresentavam em diferentes estádios de maturação, sendo então classificados com base no tamanho e coloração. Após a colheita, as sementes foram extraídas dos frutos e passaram por classificação com base na coloração da testa, sendo reservadas para a condução dos ensaios.

As análises morfológicas foram realizadas através de medições dos frutos e sementes nas diferentes fases do desenvolvimento. As medidas foram tomadas com auxílio de paquímetro digital (Jomarca) com precisão de 0,01 mm. Nos frutos foram mensurados comprimento (distância do pedúnculo ao lado oposto) e largura (região mediana). Nas sementes foram analisadas as seguintes dimensões: comprimento (medida do ápice à base/carúncula ao lado oposto), largura e a espessura (região mediana). Para tal, foram utilizadas quatro repetições de 25 unidades (frutos/ sementes), sendo os resultados expressos em milímetros.

Para determinação do teor de umidade foram utilizadas quatro repetições de aproximadamente 5 g de sementes, partidas previamente em quatro partes com auxílio de um estilete. Para tal, foi utilizado o método de estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 24 horas. Os resultados foram expressos em porcentagem de massa fresca das sementes, conforme recomendações das Regras para Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009).

O acúmulo de massa seca foi avaliado através da pesagem dos tecidos das sementes após secagem em estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 24 horas. Cada repetição foi pesada separadamente em balança analítica (0,0001 g), sendo os resultados expressos em gramas.

As análises morfológicas, determinação do teor de umidade e acúmulo de massa seca foram realizados em sementes a partir do estágio Verde-C, pois não havia número suficiente de sementes nos estádios Verde-A e Verde-B para avaliação destes parâmetros.

Para a condução do teste de germinação, inicialmente as sementes foram desinfestadas em solução contendo 0,125% de cloro ativo e Tween 20 (1 gota de Tween 20 para cada 100 mL de solução), sendo agitadas constantemente durante 10 minutos e em seguida submetidas a 4 lavagens com água destilada. O teste foi montado em rolo de papel tipo “germitest” (28 cm x 38 cm), umedecido com água destilada, na proporção de três vezes o peso do papel seco. As sementes foram dispostas no papel e levadas ao germinador (Eletrolab, Mod. EL202) ajustado à temperatura de 25°C , na ausência de luz. Cada rolo foi acondicionado em saco plástico para evitar o ressecamento do substrato e possíveis contaminações. Foram consideradas germinadas as

sementes que apresentaram a prostrusão da radícula com cerca de 2 mm de comprimento. As avaliações foram realizadas diariamente durante doze dias, ou seja, até a finalização do teste. Os testes de germinação foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, utilizando-se oito repetições de vinte e cinco sementes (totalizando 200 sementes), para cada um dos diferentes estádios de maturação. Os parâmetros avaliados foram: porcentagem de germinação (G), tempo para 50% da germinação total (T50), uniformidade da germinação (U8416), área abaixo da curva (AAC) e tempo médio de germinação (TMG).

A extração de lipídeos totais foi realizada em sistema soxhlet, utilizando-se 3 repetições de 10 g de sementes (peso seco) e 300 mL de hexano P. A. como solvente extrator, com refluxo de 6 a 8 ciclos por hora. Esta etapa teve duração de oito horas em média e foi conduzida em três repetições para cada amostra. As amostras foram previamente secas em estufa, utilizando-se o mesmo procedimento da determinação do teor de umidade, e em seguida foram acondicionadas em cartuchos de papel filtro para a extração do óleo. A quantificação de lipídeos totais foi baseada no peso das amostras (sementes secas) antes e após a extração de lipídeos, calculada com base na fórmula descrita a seguir, os dados foram expressos em porcentagem. Devido a quantidade insuficiente de sementes nos estádios iniciais do desenvolvimento, a extração de lipídeos só foi realizada a partir do estádio chamado neste trabalho de Verde-E.

$$\text{Teor de óleo (\%)} = \left(\frac{m_{ae} - m_{pe}}{m_{ae}} \right) \times 100$$

Onde:
 m_{ae} = Massa da amostra seca antes da extração com solvente (g)
 m_{pe} = Massa da amostra seca após a extração com solvente (g)

Os resultados obtidos no teste de germinação foram analisados no programa estatístico “Germinator” (JOOSEN et al, 2010). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, e para comparação entre médias foi utilizado o teste t de Student a 5% de probabilidade. Nos demais ensaios, os dados obtidos foram analisados pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os frutos de *J. curcas* foram classificados em seis diferentes estádios de desenvolvimento a partir do seu aspecto morfológico externo, conforme a coloração do exocarpo (Figura 1), a

saber: Verde (exocarpo predominantemente verde), Verde-Amarelo (exocarpo com pigmentação em transição do verde para o amarelo), Amarelo (exocarpo predominantemente amarelo), Amarelo-Marrom (exocarpo com pigmentação amarela iniciando a transição para marrom), Marrom-Amarelo (exocarpo marrom com pigmentação amarela residual) e Seco (exocarpo predominantemente marrom, seco e iniciando a deiscência).

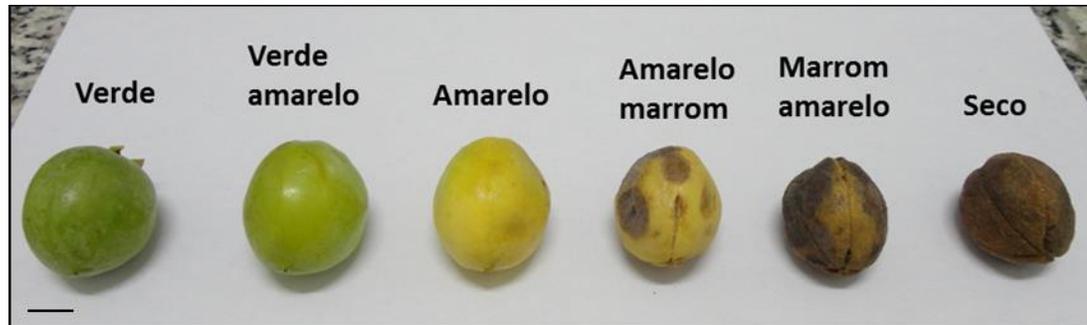


Figura 1. Classificação dos frutos de *Jatropha curcas* L. em diferentes estádios de maturação baseado na coloração do exocarpo. Barra = 1 cm. Fonte: autor.

Frutos de *J. curcas* foram também classificados visualmente em 6 estádios de maturação, utilizando-se a cartela de cores de Munsell, em Verde, início da pigmentação amarela, predominantemente amarelo, início da pigmentação Marrom, maduro e seco iniciando a deiscência (DRANSKI et al., 2010). Outros autores encontraram somente 4 estádios (PESSOA et al., 2012; SANTOS et al., 2012) que incluem as classificações Verde, Amarelo, Amarelo com marrom e Seco. Silva et al. (2012b) utilizou uma classificação com 5 estádios, incluindo o Verde amarelo. Catzín-Yupit et al. (2014) verificaram uma série de mudanças morfológicas externas como indicativo de maturidade fisiológica em frutos de *J. curcas* durante o desenvolvimento, coincidindo com a mudança de coloração do exocarpo para amarelo.

Após atingirem o estágio Verde, os frutos de *J. curcas*, permaneceram em média 4 semanas com o mesmo aspecto morfológico externo (verdes e grandes). Porém, dentro destes frutos foram encontradas sementes em diferentes estádios de desenvolvimento. As sementes provenientes de frutos Verdes foram então divididas, visualmente, em oito classes, de acordo com a cor e aparência da testa (exotesta e endotesta) em A, B, C, D, E, F, G e H (Figura 2). De forma geral, as sementes foram classificadas em 13 estádios de maturação: Verde (subdivididas em A, B, C, D, E, F, G, H), Verde-Amarelo, Amarelo, Amarelo-Marrom, Marrom-Amarelo e

Seca. Não foi possível identificar os diferentes estádios do desenvolvimento das sementes baseando-se apenas na coloração e tamanho dos frutos Verdes.

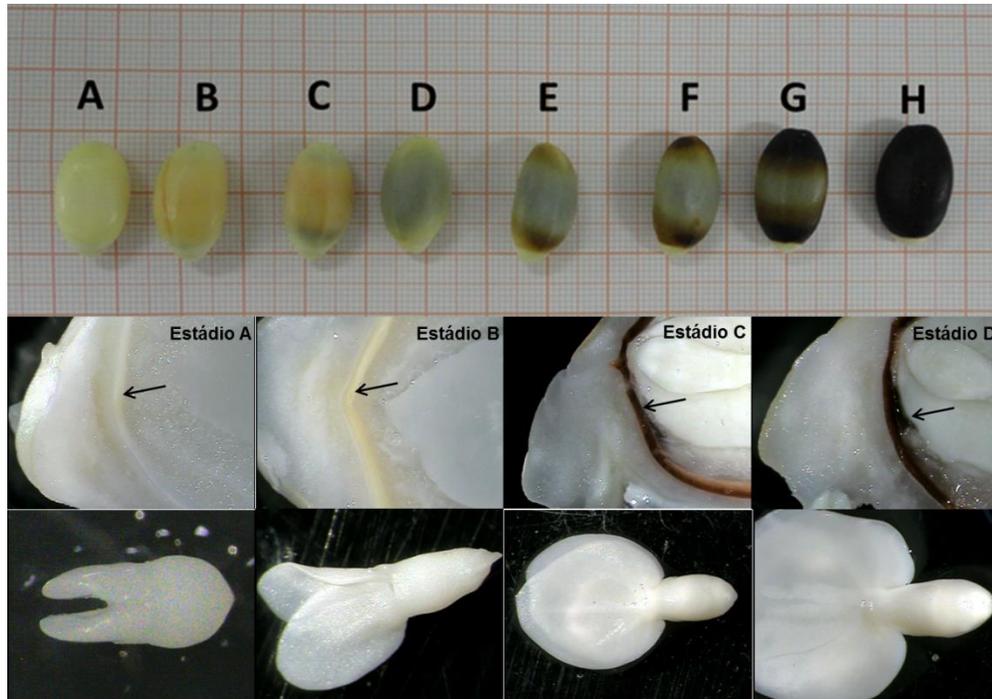


Figura 2. Sementes de *Jatropha curcas* L. em oito diferentes estádios de desenvolvimento encontradas em frutos com exocarpo Verde; **A** - testa branco translúcido e embrião em estágio torpeda; **B** - testa predominantemente alaranjada e embrião em estágio cotiledonar jovem; **C** - exotesta alaranjada e endotesta com extremidades escuras e embrião em estágio cotiledonar intermediário; **D** - exotesta amarelada e endotesta completamente escura e embrião em estágio cotiledonar final; **E** - exotesta clara na região mediana e levemente escura nas extremidades, e endotesta completamente escura; **F** - exotesta clara na região mediana e fortemente escura nas extremidades, e endotesta completamente escura e formada; **G** - exotesta com pequena faixa clara no centro e fortemente escura nas extremidades e endotesta completamente escura e formada; **H** - testa escura e completamente formada. As setas indicam para a testa das sementes. Fonte: autor.

As sementes oriundas dos frutos Verde-Amarelo, Amarelo, Amarelo-Marrom e Marrom-Amarelo foram classificadas com a mesma nomenclatura dada aos frutos que as continham e apresentaram testa com coloração semelhante às sementes classificadas como Verde-H, estas encontradas nos frutos Verdes (Figura 3). As sementes encontradas nos frutos Secos possuíam a testa rígida e bastante seca e foram classificadas como secas. Já a carúncula apresentou coloração

esbranquiçada em todos os estádios, exceto nas sementes Secas, que exibiram coloração castanho-claro.

Mudanças gradativas na coloração da testa das sementes foram verificadas ao longo do seu desenvolvimento. Inicialmente, as sementes apresentaram testa com coloração branca translúcida, posteriormente foram se tornando alaranjadas com as extremidades escuras (hilo e lado oposto), o que foi aumentando até o total escurecimento das mesmas. Estas se apresentavam pretas e brilhantes no último estádio. No estádio Verde-A, o embrião apresentava dois pequenos cotilédones rudimentares, encontrando-se no estádio torpedo. Entre os estádios Verde-B e Verde-D, o embrião se encontrava no estádio cotiledonar, com os cotilédones em crescimento e o eixo embrionário alongando longitudinalmente, sendo possível diferenciar radícula, hipocótilo e cotilédones (Figura 2).

Aos 25 DAA (dias após a antese), Catzín-Yupit et al. (2014) verificaram que a testa das sementes começaram a ganhar uma consistência rígida e, aos 35 DAA, as sementes apresentavam uma coloração marrom e consistência completamente sólida, que no presente estudo corresponde, respectivamente, aos estádios Verde-E e Verde-Amarelo. Entretanto, sementes com este aspecto foram observadas, neste trabalho, nos estádios Verde-D e Verde-H, ou seja, estádios anteriores aos descritos pelos autores. Vários autores, estudando a maturação de sementes de *J. curcas*, não fizeram distinção entre as sementes oriundas dos frutos Verdes (KAUSHIK, 2003; DRANSKI et al., 2010; PESSOA et al., 2012; SANTOS et al., 2012; SILVA et al., 2012b). Já Rubio et al. (2013) classificaram estas sementes em apenas dois estádios, Verdes – clara e escura. No entanto, com base nos resultados encontrados neste trabalho, pode-se verificar que existe uma grande variação de estádios de maturação nas sementes extraídas de frutos Verdes, tornando-se importante esta classificação.

De acordo com Silva et al. (2011a) os frutos permanecem verdes até 55 DAA e a mudança do final da fase verde para marrom escuro se dá em torno de 10 dias, mostrando uma rápida maturação. As alterações na coloração do exocarpo podem ser explicadas pelas mudanças físico-químicas, entre elas está a degradação da clorofila e formação de outros pigmentos, como carotenóides e antocianinas, que alteram a coloração dos frutos (RAVEN et al., 2007).



Figura 3. Aspecto visual das sementes de *Jatropha curcas* L. encontradas nos frutos em diferentes estádios de maturação. (a) Verde-Amarelo; (b) Amarelo-Marrom; (c) Semente Seca. Barra = 0,5 cm. Fonte: autor.

A maturidade fisiológica das sementes é geralmente acompanhada por visíveis mudanças no aspecto externo, na coloração dos frutos e das próprias sementes (SOUZA & LIMA, 1985; FIGLIOLIA, 1995). Assim, a coloração dos frutos e das sementes também pode ser considerada como um importante parâmetro na determinação da maturidade fisiológica (CORVELLO et al., 1999; FOWLER & MARTINS, 2001). A colheita deve ser realizada no estágio de maturação adequado, pois frutos colhidos imaturos têm pouca qualidade, alto índice de perda de água e por isso são mais sensíveis às desordens fisiológicas (AZZOLINI et al., 2004).

Estudos com diversas espécies têm relacionado às características físicas (tamanho, peso e umidade) e morfológicas (coloração de frutos e testa das sementes) com diferentes estádios de maturação (LIN, 1988; LAGO et al., 1994; DIAS et al., 2001; FANAN et al., 2009; DRANSKI et al. 2010). O acompanhamento dessas modificações físicas e fisiológicas que ocorrem durante o desenvolvimento de frutos e sementes, permite o reconhecimento das sementes maduras em campo, caracterizando o momento em que esta deixa de receber nutrientes da planta mãe, alcança a maturidade fisiológica e pode então ser colhida (SILVEIRA et al., 2002).

Foi verificada uma redução significativa nas dimensões dos frutos de *J. curcas* ao longo da maturação, que se iniciou após o estágio Verde-Amarelo. Valores máximos nas variáveis morfométricas foram observados nos frutos com coloração Verde-Amarelo e valores mínimos nos frutos Secos. O comprimento e a largura sofreram uma variação de 30,76 a 27,24 mm e 26,63 a 21,44 mm, respectivamente. Frutos Secos apresentaram uma média de comprimento e largura menor que os demais estádios (Tabela 1). A desuniformidade nas fases de desenvolvimento das sementes encontradas nestes frutos, associada aos valores de massa seca, teor de umidade, porcentagem de germinação e teores de lipídeos totais (Tabelas 2, 3, 4 e 5), sugerem que as sementes e os frutos de *J. curcas* ainda estão em crescimento nesse estágio.

Tabela 1. Média das variáveis morfométricas (comprimento e largura) dos frutos de *Jatropha curcas* L. nos diferentes estádios de maturação.

Estádio de maturação	Comprimento (mm)		Largura (mm)	
Verde	29,47	ab	25,88	ab
Verde-Amarelo	30,76	a	26,63	a
Amarelo	30,42	a	26,00	ab
Amarelo-Marrom	29,25	ab	24,86	b
Marrom-Amarelo	28,26	bc	23,12	c
Seco	27,24	c	21,44	d
Média	29,23		24,66	
C. V. (%)	2,54		2,3	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Em *J. curcas*, um maior tamanho dos frutos Verde-Amarelo também foi constatado por Dranski et al. (2010), além da redução das variáveis morfométricas nos estádios finais de maturação, também verificado por Santos et al. (2012). A redução do tamanho dos frutos, nos diferentes estádios avaliados, pode ser relacionada às variações no teor de umidade (Tabela 3), que ocorrem naturalmente durante o processo de maturação de sementes ortodoxas, e também coincide com o período de acúmulo de matéria seca, que se traduz no acúmulo de reservas (BEWLEY & BLACK, 2004). A água é o veículo no qual os nutrientes são retirados do solo e transportados para órgãos fotossintetizantes, onde então, são transformados em fotoassimilados e conduzidos para os tecidos em desenvolvimento, como frutos e sementes (TAIZ & ZEIGER, 2009). Sendo assim, o aumento inicial nas dimensões de sementes e frutos é comum durante o processo de desenvolvimento, sendo observado em várias espécies como em *Bixa orellana* (AMARAL et al., 2001), *Tamarindus indica* (GURJÃO et al., 2006) e *Apuleia leiocarpa* (LOUREIRO et al., 2009).

Quanto às análises morfométricas, as sementes de *J. curcas* apresentaram uma diminuição do comprimento na etapa final da maturação (secas). Foram observadas variações expressivas na largura e espessura somente entre o primeiro e os dois últimos estádios avaliados. As sementes nos estádios Verde-C e Amarelo apresentaram as maiores dimensões relativas ao comprimento e as secas, as menores. Entre o estádio inicial (Verde-C) e o final (secas), as sementes apresentaram uma variação média de 20,18 a 18,60 mm para o comprimento; de 11,36 a 10,86 mm de largura e de 9,23 a 8,49 mm de espessura (Tabela 2).

Tabela 2. Média das variáveis morfométricas (comprimento, largura e espessura) das sementes de *Jatropha curcas* L. em diferentes estádios de maturação.

Estádio de maturação	Variáveis morfométricas (mm)		
	Comprimento	Largura	Espessura
Verde-C	20,18 a	11,36 a	9,23 a
Verde-D	18,86 fg	11,16 abc	8,35 cde
Verde-E	18,78 fg	10,94 cd	8,23 e
Verde-F	19,10 ef	10,94 cd	8,30 cde
Verde-G	19,68 ef	11,00 bcd	8,48 bcd
Verde-H	19,94 ab	11,09 bcd	8,53 bc
Verde-Amarelo	19,19 ef	10,97 cd	8,28 de
Amarelo	20,12 a	11,23 ab	8,63 b
Amarelo-Marrom	19,49 bcd	11,08 bcd	8,49 bcd
Marrom-Amarelo	19,52 ab	10,92 d	8,60 b
Seco	18,60 g	10,86 d	8,49 bcd
Média	19,41	11,05	8,51
C. V. (%)	0,88	0,89	1,08

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Durante a transição dos estádios Verde-Amarelo para o Amarelo e Amarelo-Marrom para Marrom-Amarelo não ocorreu uma variação significativa na massa seca (tabela 3). Silva et al. (2012b) encontraram o mesmo padrão para sementes de *J. curcas* em diferentes estádios de maturação. No entanto, Dranski et al. 2010 e Silva et al. (2011a) encontraram maiores valores médios de massa seca em frutos com coloração marrom, sugerindo o início de desligamento dos frutos com a planta mãe e início de deterioração.

Neste trabalho, as sementes apresentaram decréscimo significativo no teor de umidade dos estádios iniciais até os finais do desenvolvimento e maturação, variando de 80,56% em sementes classificadas como Verde-C e extraídas de frutos verdes a 16,13% em sementes Secas (Tabela 3). Foi observada grande variação no teor de umidade das sementes encontradas nos frutos verdes, com uma diferença de 26,66% entre o estágio Verde-C e Verde-H. Também se verificou um declínio significativo, cerca de 27,15%, no teor de umidade das sementes Marrom-Amarela para Seca.

Em diversos estudos sobre maturação de *J. curcas*, foram encontrados valores de teor de umidade semelhantes aos verificados neste trabalho. Em sementes oriundas de frutos verdes e secos, foram registrados valores de umidade de 88,82 e 10,74%, respectivamente (PESSOA et al., 2012). Também em sementes de frutos secos, Rubio et al. (2013) encontraram 11,06% de

umidade. Silva et al. (2011a) constataram uma queda de 23,2% do antepenúltimo (Marrom-Amarelo) para o último estágio (Seco), indicando esta etapa como o final do processo de maturação das sementes desta espécie.

Tabela 3. Média dos teores de umidade (%) e massa seca (g) das sementes de *Jatropha curcas* L. nos diferentes estádios de maturação.

Estádio de maturação	Teor de umidade (%)		Massa seca (g)	
Verde-C	80,56	a	0,91	h
Verde-D	70,69	b	1,38	g
Verde-E	65,92	c	1,60	fg
Verde-F	62,35	cd	1,83	ef
Verde-G	58,76	d	2,07	de
Verde-H	53,90	e	2,32	cd
Verde-Amarelo	50,27	ef	2,60	bc
Amarelo	46,63	fg	2,48	bc
Amarelo-Marrom	45,49	g	2,77	b
Marrom-Amarelo	43,28	g	2,69	b
Seco	16,13	h	4,12	a
Média	54,00		2,25	
C. V. (%)	3,36		5,58	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

O alto teor de umidade, constatado no início da maturação das sementes, é imprescindível ao transporte de produtos fotossintetizados que são utilizados como fonte de energia para o metabolismo das sementes em desenvolvimento, e que são posteriormente armazenados como reserva a ser utilizada durante a germinação (CORVELLO et al., 1999; SANTOS et al., 2011). Em sementes de *J. curcas*, Xu et al. (2011) verificaram um aumento exponencial do peso fresco nos primeiros estádios de desenvolvimento e uma parada no crescimento durante os últimos estádios, iniciando assim, o processo de dessecação com aumento no acúmulo de lipídeos e demais nutrientes de reserva. Desta maneira, alguns critérios físicos avaliados em conjunto como morfometria, teor de umidade e massa seca, sinalizam a maturidade fisiológica das sementes dessa espécie (CROOKSTON & HILL, 1978).

As sementes extraídas de frutos verdes dos estádios Verde-C até Verde-E não germinaram, e a germinação no estágio Verde-F foi inferior a 1%. Isto ocorreu devido à imaturidade do embrião nesses estádios como pode ser verificado na Figura 2. As maiores porcentagens de germinação foram de 86, 85 e 81%, verificadas em sementes extraídas de frutos

Verde-Amarelo, Verde-H e Amarelo, respectivamente. A partir deste estágio houve uma diminuição significativa da germinação de 77 para 61% nos estádios Amarelo-Marrom e Seco, respectivamente (Tabela 4). Estes estádios coincidem com a etapa final de dessecação e esta queda na germinação pode estar relacionada com algum tipo de dormência (Tabela 4). Isto sugere que, após a colheita, sementes de *J. curcas* ainda precisam de um certo período de repouso para germinar (JØKER & JEPSEN, 2003). A germinação de sementes da espécie é inibida simplesmente pela presença do endosperma, sugerindo que essa estrutura causa algum grau de dormência. Todavia, o tempo de armazenamento reduz esse efeito, fazendo com que as sementes recuperem a capacidade de germinação (PAIVA NETO et al., 2014).

Para as variáveis tempo para 50% da germinação total (T50) e tempo médio de germinação (TMG), as sementes secas apresentaram o melhor desempenho (menor tempo), enquanto que as sementes no estágio Verde-G apresentaram o pior desempenho (maior tempo), com os valores médios mais elevados. Nos outros estádios essas variáveis se mantiveram constantes (Tabela 4).

Tabela 4. Médias da porcentagem de germinação (G), tempo para 50% da germinação total (T50), tempo médio de germinação (TMG), uniformidade (U8416) e área abaixo da curva (AAC), em sementes de *Jatropha curcas* L. nos diferentes estádios de maturação.

Estádio de maturação	Variáveis				
	G(%)	T50(hs)	TMG(hs)	U8416(hs)	AAC
Verde-G	47 d	176,3 c	172,9 c	79,6 ab	0,1 d
Verde-H	85 ab	151,2 b	151,1 b	67,4 a	0,5 c
Verde-Amarelo	86 a	153,0 b	133,6 abc	89,1 abc	1,3 b
Amarelo	81 ab	137,6 b	134,6 a	106,4 bc	3,3 a
Amarelo-Marrom	77 b	142,0 b	138,6 ab	105,2 c	2,7 a
Marrom-Amarelo	62 cd	141,4 b	136,3 ab	114,7 c	3,4 a
Seco	61 c	120,4 a	106,9 a	96,9 bc	4,7 a
Média	71	146,0	139,1	94,2	2,3
C. V. (%)	20,9	11,7	14,3	17,6	74,1

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t (Student) a 5% de probabilidade.

Pôde-se verificar que a germinação foi mais uniforme (U8416) nos estádios em que os frutos apresentavam coloração verde e menos uniforme nos dois estádios com coloração marrom. A velocidade da germinação (AAC) aumentou gradualmente durante o processo de maturação, atingindo o máximo a partir do estágio Amarelo e não apresentando diferença significativa até o

estádio Seco (Tabela 4). Sementes colhidas tardiamente podem sofrer uma diminuição na sua qualidade fisiológica, caracterizada pela deterioração acelerada e germinação reduzida (MARCOS FILHO, 2005).

Alguns estudos mostram que sementes de *J. curcas*, extraídas de frutos verdes, não germinaram, e maior taxa de germinação foi observada em sementes secas (DRANSKI et al., 2010; PESSOA et al., 2012). Outros autores encontraram os maiores índices de germinação e velocidade de germinação em frutos com coloração marrom (SILVA et al., 2011a; SILVA et al., 2012b). No entanto, Kaushik (2003), observou a porcentagem máxima de germinação em sementes extraídas de frutos amarelos.

A identificação do estágio de maturação apropriado para a colheita de sementes na época adequada é de extrema importância, principalmente em culturas com frutificação e maturação desuniformes, a exemplo de *J. curcas*. Diferentes critérios como, tamanho, cor, conteúdo de água e de lipídeos e aspectos da germinação têm sido utilizados para estabelecer o ponto de maturidade fisiológica de sementes de espécies oleaginosas e estes têm se mostrado eficientes.

Pôde-se verificar que houve diferença significativa nos teores de lipídeos totais durante o desenvolvimento de sementes de *J. curcas* (Tabela 5), com aumento de 14,01% nestes valores, quando comparados os estádios iniciais aos finais. As maiores porcentagens de lipídeos totais foram encontradas em sementes oriundas de frutos com coloração Marrom-Amarelo (26,11%) e sementes de frutos Secos (23,28%).

Tabela 5. Média dos teores de lipídeos totais (%) em sementes de *Jatropha curcas* L. nos diferentes estádios de maturação.

Estádio de maturação	Teor de lipídeos totais (%)
Verde-E	9,27 e
Verde-F	17,84 bcd
Verde-G	17,78 bcd
Verde-H	21,17 abc
Verde-Amarelo	11,88 be
Amarelo	23,10 ab
Amarelo-Marrom	14,88 cde
Marrom-Amarelo	26,11 a
Seco	23,28 ab
Média	18,44
C. V. (%)	7,08

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

As variações na porcentagem de lipídeos e de outras reservas são características do processo de maturação, pois estes valores são traduzidos em variações de peso fresco e seco das sementes, o que foi verificado neste trabalho, quando se avaliou o teor de umidade e a massa seca (Tabela 3). Nesta espécie, Santos et al. (2011) também verificaram o máximo teor de lipídeos em sementes de frutos com coloração marrom-amarela e marrom com 26,21 e 25,34%, respectivamente. Em sementes de *J. curcas* em desenvolvimento, Annarao et al. (2008) detectaram que o teor de óleo foi menor nos estádios iniciais e maior nos estádios finais, variando de 0,3 a 24,9% (classificados como estádios I até VI), e que ocorreu um pequeno decréscimo no percentual de óleo em sementes maduras ou estágio VII (24,4%), quando comparadas com o estágio anterior. Porwal et al. (2014) também relataram um decréscimo na porcentagem de lipídeos em sementes maduras (32%) em relação a sementes extraídas de frutos verdes (33%) e sementes de frutos amarelo e marrom (34%).

Quanto ao teor máximo de lipídeos verificado neste trabalho, pode-se considerá-los relativamente baixos, quando comparados aos dados divulgados na literatura. Em sementes de *J. curcas* foram encontrados teores de lipídeos em torno de 40% (DE SOUZA et al., 2009). Teores superiores de lipídeos totais, cerca de 31,60%, também foram verificados em sementes desta espécie cultivada no estado do Maranhão, sendo que neste caso o cálculo foi realizado com base no peso úmido (PENHA et al., 2007).

De acordo com Santos et al. (2011) tanto o acúmulo como a composição dos lipídeos armazenados em sementes, dependem de fatores genéticos e condições de campo durante a maturação. Segundo Teixeira (1987) essas diferenças podem variar em função da localidade e tratos culturais, sendo verificado pelo autor variações de 23 a 34% no conteúdo de lipídeos totais em sementes de *J. curcas*. As alterações no regime hídrico durante o período de maturação, também podem explicar as variações encontradas no teor de lipídeos totais entre as sementes provenientes de diferentes acessos, já que interferem diretamente no acúmulo de massa seca.

Sob outro aspecto, em dados divulgados na literatura pode-se verificar que na extração de lipídeos do albúmen são alcançados maiores valores no conteúdo de lipídeos totais, como verificado por Penha et al. (2007), 31,62 % nas sementes inteiras e 66% no albúmen.

A partir deste trabalho pode-se concluir que não é possível estabelecer o estágio de desenvolvimento das sementes de *J. curcas* baseando-se apenas na coloração do exocarpo de frutos. Sementes produzidas em frutos com coloração Verde-Amarelo apresentaram a maior

porcentagem de germinação, no entanto, as sementes oriundas de frutos Secos apresentaram o menor tempo e maior velocidade de germinação. As sementes oriundas dos frutos de coloração Marrom-Amarelo e Secos apresentaram as maiores percentagens de lipídeos totais, sendo assim, recomenda-se a utilização dos frutos de ambas as colorações para a extração de óleos. Sementes oriundas de frutos Secos também apresentam as menores dimensões de comprimento e largura, máximo acúmulo de matéria seca e menor conteúdo de água, podendo estes parâmetros serem usados como indicativos da maturidade fisiológica desta espécie.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à CAPES e CNPq pela concessão das bolsas de Doutorado e Iniciação Científica, a Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola por permitir a colheita das sementes na estação experimental de Alagoinhas (BA), ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana e a PETROBRÁS pelo financiamento deste trabalho.

4 REFERÊNCIAS

- ACHTEN, W. M.; NIELSEN, L. R.; AERTS, R.; LENGKEEK, A. G.; KJAER, E. D.; TRABUCCO, A.; HANSEN, J. K.; MAES, W. H.; GRAUDAL, L.; AKINNIFESI, F. K.; MUYS, M. Towards domestication of *Jatropha curcas*. **Biofuels**, London, v. 1, n. 1, p. 91-107, 2010.
- AMARAL, L.I.V.; PEREIRA, M.F.D.A.; CORTELAZZO, A.L. Formação das substâncias de reserva durante o desenvolvimento de sementes de urucum (*Bixa orellana* L. - Bixaceae). **Acta Botânica Brasílica**, Feira de Santana, v. 15 n.1, p. 125-132, 2001.
- ANNARAO, S.; SIDHU, O. P., ROY, R., TULI, R., KHETRAPAL, C.L. Lipid profiling of developing *Jatropha curcas* L. seeds using ¹H NMR spectroscopy. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 99, p. 9032 – 9035, 2008.
- AZZOLINI, M.; JACOMINO, A. P.; BRON, I.U. Índices para avaliar qualidade pós-colheita de goiabas em diferentes estádios de maturação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.2, p.139-145, 2004.

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C.. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 14, n. 01, pp 1-16, 2004.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M.; **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum. 445p. 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 395 p.

CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal, Funep, 2000. 588p.

CASTRO, R.D. de; HILHORST, H.W.M. Embebição e reativação do metabolismo. In: A.G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). **Germinação. Do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Artmed. 2004, p. 149-162.

CATZÍN-YUPIT, C. N.; RAMIREZ-MORILLO, I. M.; POOL, F. A. B.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Ontogenic development and structure of the embryo, seed, and fruit of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **South African Journal of Botany**, Matieland, v. 93, n. 1, p. 1-8, 2014.

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

CORVELLO, W. B. V.; VILELLA, F. A.; NEDEL, J. L.; PESKE, S. T. Época de colheita e armazenamento de sementes de cedro (*Cedrella Fissilis* Vell.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 21, n. 2, p. 28-34, 1999.

CROOKSTON, R. K.; HILL, D. S. A visual indicator of the physiological maturity of soybean seed. **Crop Science**, Madison, v. 18, n. 5, p. 867-870, 1978.

DE RON, A. M.; CASQUERO, P. A.; GONZALEZ, A. M.; SANTALLA, M. Environmental and genotypic effects on pod characteristics related to common bean quality. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Braunschweig, v. 190, n. 4, p. 248-255, 2004.

DELOUCHE, J. C. Environmental effects on seed development and seed quality. **Hort Science**, Alexandria, V. 15, n. 6, p. 775-780, 1980.

DIAS, D. C. F. Maturação de sementes. **Seed News**, Pelotas, v. 5, n. 6, p. 22-24, 2001.

DRANSKI, J. A. L.; PINTO JÚNIOR, A. S.; STEINER, F.; ZOZ, T.; MALAVASI, U. C.; MALAVASI, M. M.; GUIMARÃES, V. F. Physiological maturity of seeds and colorimetry of fruits of *Jatropha curcas* L. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 158-165, 2010.

DRUMMOND, M. A.; ARRUDA, F. P.; ANJOS, J. B dos. Pinhão-manso - *Jatropha curcas* L. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008. 15 p. (Embrapa Semi-Árido. Documentos, 212).

EGLI, D. B. **Seed Biology and yield of grain crops**. New York: CAB International, 1998. 178 p.

FANAN, S.; MEDINA, P. F.; CAMARGO, M. B. P.; RAMOS, N. P. Influência da colheita e do armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 150-159, 2009.

FERREIRA, D. F. **Sistema SISVAR para análises estatísticas**: manual de orientação. Lavras: Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciências Exatas, 2000. 66 p.

FIGLIOLIA, M. B. Colheita de sementes. In: SILVA, A.; PIÑARODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. **Manual técnico de sementes florestais**. São Paulo: Instituto Florestal, 1995. p. 1-12. (Série Registros, 14).

FOWLER, J. A. P.; MARTINS, E. G. Coleta de sementes. In: FOWLER, J. A. P.; MARTINS, E. G. **Manejo de sementes de espécies florestais**. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2001. v. 1, p. 9-13. (Documentos, 58).

GURJÃO, K. C. de O.; BRUNO, R. de L. A.; ALMEIDA, F. de A. C.; PEREIRA, W. E.; BRUNO, G. B. Desenvolvimento de frutos e sementes de tamarindo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 351-354, 2006.

HILHORST, H. W. M. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 5, n. 2, p. 61-73, 1995.

JØKER, D.; JEPSEN, J. *Jatropha curcas* L. Humleback: Seed Leaflet, 2003. n. 83, p. 1-2. Available at: <http://curis.ku.dk/ws/files/20648145/jatropha_curcas_83.pdf>. Accessed at: 23 nov. 2014.

JONGSCHAAP, R.E.E; CORRE, W. J.; BINDRABAN, P. S.; BRANDENBURG, W. A. Claims and facts on *Jatropha curcas* L. Global *Jatropha curcas* evaluation, breeding and propagation program. **Plant Research International**, Wageningen, v. 1, n. 158, p. 1-42, 2007.

JOOSEN, R. V. L.; KODDE, J.; WILLEMS, L. A. J.; LIGTERINK, W.; VAN DER PLAS, L. H. W.; HILHORST, H. W. M. GERMINATOR: a software package for high-throughput scoring and curve fitting of Arabidopsis seed germination. **The Plant Journal**, Oxford, v. 1, n. 62, p. 148-159, 2010.

KAUSHIK, N. Effect of capsule maturity on germination and seedling vigour in *Jatropha curcas*. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 31, n. 2, p. 449-454, 2003.

LAGO, A. A.; SAVY FILHO, A.; BANZATTO, N. V.; CAMARGO, O. B. A. Maturação e produção de sementes do gergelim ‘iac-ouro’. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 16, n. 2, pág. 134-137, 1994.

LIN, S. S. Efeito do tamanho e maturidade sobre a viabilidade, germinação e vigor do fruto de palmitero. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 8, n. 1, p. 57-66, 1988.

LOUREIRO, M. B.; GONÇALVES, R.; ROSSETTO, C. A.V. Avaliação do efeito do tamanho de sementes na germinação e no vigor de garapa (*Apuleialeiocarpa* (Vog.) Macbr.). **Revista da Universidade Rural**, Seropédica, v. 24, n. 1, p. 73-77, 2004.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia das sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, v. 12, 2005. 495 p.

MICHELANGELI, J. A. C.; BHAKTA, M.; GEZAN, S. A.; BOOT, K. J.; VALLEJOS, C. E. From flower to seed: identifying phenological markers and reliable growth functions to model reproductive development in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant, Cell and Environment**, Rockville, v. 36, n. 11, p. 2046-20, 2013.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2000.

PAIVA NETO, V. B.; PRANDO, F. P.; RODRIGUES, L. A.; ZUFFO, M. C. R.; LIMA, S. F. Ação inibitória do endosperma na germinação *in vitro* de embrião zigótico de pinhão manso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 433-438, 2014.

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

PENHA, M. da N. C.; SILVA, M. D. P.; MENDONÇA, K. K. M.; BRANDÃO, K. S. R.; MACIEL, A. P.; SILVA, F. C. Caracterização físico-química da semente e óleo de pinhão manso (*Jatropha curcas*) cultivado no Maranhão. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília. **Anais**. Brasília: MCT/ABIPTI, 2007. p. 1-6.

PESSOA, A. M. S.; MANN, R. S.; SANTOS, A. G.; RIBEIRO, M. L. F. Influência de maturação de frutos na germinação, vigor e teor de óleo de sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Scientia Plena**, Aracajú, v. 8, n. 7, p. 1-11, 2012.

PORWAL, J.; BEHRA, B.; PONNEKANTI, N.; BANGWAL, D.; KAUL, S. An integrated analytical approach for the compositional evaluation of different stages of fully ripened *Jatropha curcas* seed oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 117, n. 3, p. 398-405, 2014.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 728 p.

RUBIO, F.; MENEGHEL, A. P.; GOMES, L. F. S.; MALAVASI, M. M. Estádios de maturação do fruto no desempenho germinativo e teor de óleo de sementes de *Jatropha curcas* Linn. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 663-668, 2013.

SANTOS, S.; MARTINS, M.; AGUILAR, P. Acúmulo de matéria seca e óleo nas sementes de pinhão manso e qualidade do óleo extraído. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 16, n. 2, p. 209-215, 2012.

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.

SILVA, L. J.; DIAS, C. F. S.; MILAGRES, C. C.; DIAS, L. A. S. Relationship between fruit maturation stage and physiological quality of physic nut (*Jatropha curcas* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 1, p. 39-44, 2012.

SILVA, M. B. R.; FERNANDES, P. D.; DANTAS NETO, J.; NERY, A. R. Crescimento e produção do pinhão-manso irrigado com água residuária sob condições de estresse hídrico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 6, p. 261-269, 2011.

SILVEIRA, M. A. M.; VILLELA, F. A.; TILLMANN, M. A. A. Maturação Fisiológica de sementes de Calêndula (*Calendula officinalis* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 31-37, 2002.

SOUZA, A. D. V. de; FAVARO, S. P.; ÍTAVO, L. C. V.; ROSCOE, R. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão manso, nabo forrageiro e crambe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 10, p. 1328-1335, 2009.

SOUZA, S. M.; LIMA, P. C. F. Maturação de sementes de angico (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 7, n. 2, p. 93-99, 1985.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TEIXEIRA, J. P. Teor e composição do óleo de sementes *Jatropha* Spp. **Revista Bragantia**, Campinas, v. 46, n. 1, p. 151-157, 1987.

XU, R.; WANG, R.; LIU, A. Expression profiles of genes involved in fatty acid and triacylglycerol synthesis in developing seeds of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.). **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 1683-1692, 2011.

CAPÍTULO 2

CONFIGURAÇÕES DO CITOESQUELETO MICROTUBULAR DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE *Jatropha curcas* L. REVELAM UM NOVO PADRÃO DE EMBRIOGÊNESE

RESUMO

Jatropha curcas L. (pinhão manso), pertencente à família Euphorbiaceae, tem como possível centro de origem o México e parte continental da América Central. Esta espécie tem sido foco frequente de pesquisas, pois suas sementes podem ser usadas para produção de biodiesel e as diferentes estruturas da planta possuem múltiplas utilidades comerciais. No presente estudo foram realizadas análises anatômicas e imunohistoquímicas, visando melhor entendimento do processo de embriogênese e das alterações morfofisiológicas durante os diferentes estádios de desenvolvimento das sementes de *J. curcas*. Através das análises anatômicas, foi constatada a gênese de estômatos na camada epidérmica situada na área de transição hipocótilo-radícula, bem como a formação da radícula embrionária multimeristemática, revelando uma embriogênese distinta do padrão comum em Angiospermas. As análises imunohistoquímicas permitiram a detecção de tubulinas e das diferentes configurações do citoesqueleto microtubular. Microtúbulos corticais e mitóticos foram visualizados apenas nos estádios iniciais do desenvolvimento, evidenciando intensa atividade do ciclo celular e de histodiferenciação entre os estádios Verde-A e Verde-G, confirmando a formação de radícula composta por cinco meristemas. A degradação de microtúbulos e tubulina foi verificada a partir do estágio Verde-H, caracterizando a fase de maturação de sementes de *J. curcas*, na qual o tegumento está completamente formado. Nesse estudo foi possível associar características morfofisiológicas dos diferentes estádios de desenvolvimento das sementes de *J. curcas* às diferentes configurações do citoesqueleto microtubular e, definir a transição destas fases.

Palavras-chave: Microtúbulos. Histodiferenciação. Organogênese.

ABSTRACT

Jatropha curcas L. (Physic nut), belongs to the Euphorbiaceae family, has likely center of origin Mexico and continental Central America. This species has been a frequent focus of research, because the seeds can be used for biodiesel production and the different plant structures have multiple commercial uses. In the present study, anatomical and immunohistochemical analyzes were performed, aimed at better understanding the process of embryogenesis and morphophysiological changes during the various stages of *J. curcas* seed development, revealing a distinct embryogenesis pattern in Angiosperms. . From anatomical analyzes, it was found the genesis of stomata in the epidermal layer located in the hypocotyl-radicle transition area, as well as the formation of multimeristematic embryonic radicle. Immunohistochemical analysis allowed the detection of tubulin and several configurations of microtubular cytoskeleton. Both cortical microtubules and mitotic arrays were found only in the early stages of development, showing intense activity of the cell cycle and histodifferentiation between Green-A and Green-G stages, in which confirms the formation of radicle composed of five meristems. The degradation of microtubules and tubulin was observed from the Green-H stage, characterizing the *J. curcas* seed maturation phase, in which the seed coat is fully formed and there is a significant increase in germination rate. In this study it was possible to associate morphophysiological characteristics of different stages of development of *J. curcas* seeds to different microtubule cytoskeleton settings and define the transition of these phases.

Keywords: Microtubules. Histodifferentiation. Organogenesis.

1 INTRODUÇÃO

Em espermatófitas, o desenvolvimento da semente pode interromper o ciclo de vida ou ligar duas gerações esporofíticas. Este mecanismo biológico representa uma vantagem evolutiva, pois as sementes contêm o material genético e os nutrientes necessários para estabelecer a próxima geração, permitindo a dispersão e sobrevivência das plantas, que são formas de vida sésseis (BEWLEY, 1997; BAUD & LEPINIEC, 2010).

O desenvolvimento das sementes inicia-se pela dupla fertilização no saco embrionário, originando o zigoto e o endosperma. A embriogênese é o subsequente período de desenvolvimento no qual, após consecutivas divisões mitóticas, o eixo polar do corpo da planta é definido, com a especificação dos ápices caulinar e radicular e formação dos sistemas de tecidos embrionários e órgãos. Quando as divisões celulares cessam, o embrião entra na fase de maturação, que é caracterizada pela expansão celular e acúmulo de reservas (açúcares, proteínas e lipídeos) nos tecidos de armazenamento. Nas sementes ortodoxas, como em *J. curcas*, há ainda a fase de dessecação, marcada por um acentuado declínio no peso fresco devido à perda de água (WEST & HARADA, 1993; BEWLEY & BLACK, 1994; HARADA, 1997; DE CASTRO & HILHORST, 2004; DUBREUCQ et al 2010).

Um dos principais desafios das células vegetais é controlar a sua morfologia. Para tanto, precisam ser capazes de crescer e se dividir dentro das limitações do tecido circundante para o qual é determinada, e construir uma parede celular mecanicamente robusta, a fim de conter a pressão de turgor. Isto requer o controle tanto da direção de crescimento, quanto da orientação do plano de divisão. Estes processos dependem de distintos arranjos de microtúbulos associados às diferentes etapas do ciclo celular (ALBERTS et al., 2002; DEINUM & MULDER, 2013).

Microtúbulos são polímeros polares compostos de heterodímeros de α e β tubulina, cada um com massa molecular de, aproximadamente, 50.000 Da. Desempenham um papel central em importantes processos das células eucarióticas, como divisão e expansão celular, transporte intracelular e definição da forma das células. Nas plantas são especialmente importantes na morfogênese. Durante a progressão do ciclo celular, o citoesqueleto microtubular apresenta mudanças configuracionais devido ao mecanismo intrínseco de instabilidade dinâmica dos microtúbulos. Estes sofrem crescimento e redução, levando à formação de diferentes arranjos como microtúbulos corticais (MC), banda preprófase (BPP) e fragmoplasto, que são estruturas

microtubulares específicas de plantas (GODDARD et al.,1994; HASEZAWA & KUMAGAI, 2002; MAYER & JÜRGENS, 2002; HASHIMOTO, 2013).

Eventos do ciclo celular, analisados através dos perfis espacial e temporal das diferentes configurações do citoesqueleto microtubular, são utilizados como meios eficazes para caracterizar as fases de histodiferenciação e organogênese durante o desenvolvimento de sementes (DE CASTRO & MARRACCINI, 2006).

Jatropha curcas L. pertence à família Euphorbiacea, cujo gênero compreende cerca de 175 espécies. É classificada como árvore pequena ou arbusto perene que cresce até 5m de altura, e o ciclo de vida pode atingir 50 anos (DIVAKARA et al.,2010). No Brasil, cresce espontaneamente em diversas condições edafoclimáticas, abrangendo uma área que vai do estado do Maranhão até o Rio Grande do Sul (ROSADO et al., 2010), passando por regiões com características bem distintas. Produz sementes endospermáticas com um alto teor de óleo (35% - 40 %), que pode ser utilizado para iluminação, na fabricação de sabão, na indústria de cosméticos e na produção de combustível para cozinha e biodiesel (JONGSCHAAP et al., 2007).

Existem diversos estudos sobre o desenvolvimento de sementes de *J. curcas* (KAUSHIK, 2003; DRANSKI et al., 2010; PESSOA et al., 2012; SILVA et al., 2012; RUBIO et al., 2013; CATZÍN-YUPIT et al., 2014; PORWAL et al., 2014), porém, nenhum estudo relacionado ao ciclo celular durante a embriogênese e maturação foi encontrado. Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar as configurações do citoesqueleto microtubular durante o desenvolvimento de sementes de *J. curcas* e associá-las às alterações morfofisiológicas durante os diferentes estádios de desenvolvimento, descritos no capítulo 1.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

O material biológico utilizado neste trabalho foi produzido, em 2012, no campo experimental da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA), localizado no município de Alagoinhas/BA, latitude de 12° 08' – 12°10' S e longitude de e 38° 26' – 38° 30' W. Para o estudo do citoesqueleto microtubular foram coletados embriões em diferentes estádios de desenvolvimento, conforme classificação das sementes de *J. curcas* descrita no capítulo 1. As

sementes foram classificadas em 13 estádios de maturação: Verde (subdivididas em A, B, C, D, E, F, G, H), Verde-Amarelo, Amarelo, Amarelo-Marrom, Marrom-Amarelo e Seca.

2.2 Emblocamento das amostras

Os procedimentos preparativos envolveram 4 etapas: fixação, desidratação, infiltração, e emblocamento das amostras em resina BMM (butil- e metil- metacrilato). Foram utilizados 5 eixos embrionários para cada estágio de desenvolvimento. Estes foram extraídos com auxílio de estilete e pinça e acondicionados em microtubos (2 mL) contendo solução fixadora. O processo de fixação consistiu na imersão das amostras em Paraformaldeído (PFA) a 4% (p/v) mais tampão MSB – tampão estabilizador de microtúbulos (50 mM PIPES, 5 mM EGTA, 5 mM MgSO₄.7H₂O, 2.5g KOH, pH 6.9), sendo agitadas constantemente à temperatura ambiente, durante 4 horas, em forno hibridizador (BELLCO GLASS INC - AUTOBLOT). Em seguida, passaram por quatro lavagens em tampão MSB, com duração de trinta minutos por cada lavagem. A etapa de desidratação foi realizada gradativamente com trocas sequenciais de solução de etanol com DTT nas concentrações de 10, 30, 50, 70, 96 e 100%, sendo as amostras agitadas nas concentrações de 10 até 50% durante trinta minutos, e mantidas em pernoite a 4°C na concentração de 70%, e na manhã seguinte, mantidas por 1 hora a 4°C nas concentrações de 96 e 100%.

A etapa de infiltração também foi realizada de forma gradativa, com trocas sequenciais de soluções de etanol: BMM (3:1/ 1:1/ 1:3) a cada 2 horas, seguida de uma etapa final apenas com BMM a 100% durante o período noturno. Por fim, as amostras foram acondicionadas em cápsulas preparativas para inclusão em fundo cônico (Electron Microscopy, cod. nº 70020) contendo BMM 100%, sendo em seguida submetidas à polimerização sob luz ultravioleta por 12 horas à -20°C (Freezer Carrier – Mod. F550), conforme metodologia proposta por Baskin (1992), modificada por De Castro et al. (2000) e Faria et al. (2005).

2.3 Seccionamento, Imunomarcção e Microscopia

Após o emblocamento das amostras, foram feitos cortes anatômicos semi-finos (1,5 µm) em ultra micrótomo (Leica, Mod. EM UC7), estes foram colocados sobre gotas de água em lâminas para microscopia. O enrugamento das secções foi removido estirando-as com vapor de clorofórmio, usando-se um cotonete saturado, posicionado próximo à superfície da secção

flutuando sobre a gota de água. Em seguida, as lâminas foram postas sobre chapa aquecedora à 60°C até evaporação completa da água e fixação das secções à lâmina.

Para a completa remoção da resina de BMM, as lâminas com os cortes histológicos foram colocadas em berço e lavadas em acetona duas vezes durante 10 minutos sob agitação constante, seguida de lavagem em solução tampão fosfato-salino (PBS) (2,7 M de Cloreto de Sódio (NaCl), 0,2 M de Fosfato Dissódico (Na₂HPO₄), 0,05 M de Cloreto de Potássio (KCl) e 0,03 M de Fosfato Monopotássico (KH₂PO₄) pH 7.5, também por duas vezes, durante 10 minutos. Em seguida, foi realizada imersão em solução de Cloridrato de Hidroxilamina 0,1 M (HAH - Sigma-Aldrich, cod. n° 5470-11-1) durante cinco minutos e, posteriormente, enxágue em tampão PBS pH 7.5 durante 5 minutos, sempre sob agitação constante.

Em etapa posterior, as secções foram imersas, por 30 minutos, em solução bloqueadora a 1%, contendo albumina de soro bovino (BSA-V - Aurion, cod. n° 900.011) e PBS (pH 7.5). Em seguida, passaram por três lavagens em solução de BSA acetilado a 0,01% (BSAc - Aurion, cod. n° 900.099) e PBS pH 7.5, durante 5 minutos cada, sob agitação permanente. Após estas etapas, foi realizada secagem das lâminas com papel filtro e marcação em torno dos cortes com caneta hidrofóbica. Os cortes marcados foram incubados durante a noite à 4°C, na ausência de luz, em anticorpo monoclonal anti α -tubulina produzido em camundongo (Clone DM 1A, Sigma-Aldrich, cod. n° T9026) diluído 1:100 (v/v) em BSAc. No dia seguinte, realizaram-se quatro lavagens de 15 minutos, em solução de PBS pH 7.5 com 0,01% de BSAc, e as lâminas foram da caixa escura para o berço de lavagem de lâminas.

As lâminas foram secas com papel filtro, tomando-se cuidado para não danificar os cortes, e incubadas por duas horas à temperatura ambiente com anticorpo secundário anti IgG de camundongo, produzido em caprino, e conjugado com AlexaFluor® 488 (Clone B-5-1-2, Invitrogen – Molecular Probes, cod. n° 32-2588) diluído 1:100 (v/v) em BSAc. A partir desta etapa, todo procedimento foi realizado com mínimo de luz, acondicionando-se as lâminas em caixa escura. Após incubação em anticorpo secundário, foram realizadas quatro lavagens adicionais de 15 minutos cada, em solução de PBS pH 7.5 com 0,01% de BSAc. Por fim, procedeu-se à cobertura das secções com glicerol (CITIFLOUR AF-3, Electron Microscopy, cod. n° 17972-25) e lamínula para detecção e visualização de tubulina e/ou microtúbulos.

Secções também foram coradas com azul de toluidina a 1%, para análises anatômicas.

As secções foram analisadas em microscópio de fluorescência com câmara acoplada (Olympus, Mod. BX51), utilizando-se para tal o filtro de excitação azul, com comprimento de onda de 450 a 490 nm.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB) da Universidade Federal da Bahia e na Plataforma de Microscopia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM – Fiocruz) Salvador - BA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imunomarcagem das secções histológicas evidenciou que, ao longo dos diferentes estádios de desenvolvimento, a tubulina estava presente em diferentes configurações do citoesqueleto ou também em forma de grânulos.

Em sementes classificadas como Verde-A o embrião encontra-se no estágio torpedo (Capítulo 1, Figura 2A). Na análise das secções anatômicas pode-se constatar o desenvolvimento e diferenciação do hipocótilo e radícula, e o início da diferenciação dos tecidos vasculares, dérmico e fundamental (Figura 1A). Nesse estágio, ao longo de todo eixo embrionário, houve uma intensa organização do citoesqueleto microtubular em arranjos corticais e mitóticos, como banda da pré-prófase, fuso mitótico e fragmoplasto (Figura 1B, 1C e 1D, respectivamente).

No estágio Verde-B ambas as configurações microtubulares (corticais e mitóticas) também estavam presentes (Figura 2A-C). Nesta etapa, já é observado uma distinção dos sistemas de tecidos, sendo bem visível a delimitação do sistema vascular, fundamental, epiderme, meristema da raiz principal e meristemas das raízes adventícias (Capítulo 3). No córtex, no tecido vascular e nos meristemas das raízes adventícias há numerosas divisões celulares (Figura 2A-B). No ápice radicular, as células apresentaram-se bastante alongadas, com predominância de microtúbulos corticais (Figura 2C). O embrião encontra-se em estágio cotiledonar inicial (Capítulo 1, Figura 2B), apresentando dois cotilédones bem desenvolvidos, um eixo alongado e meristemas apicais bem diferenciados.

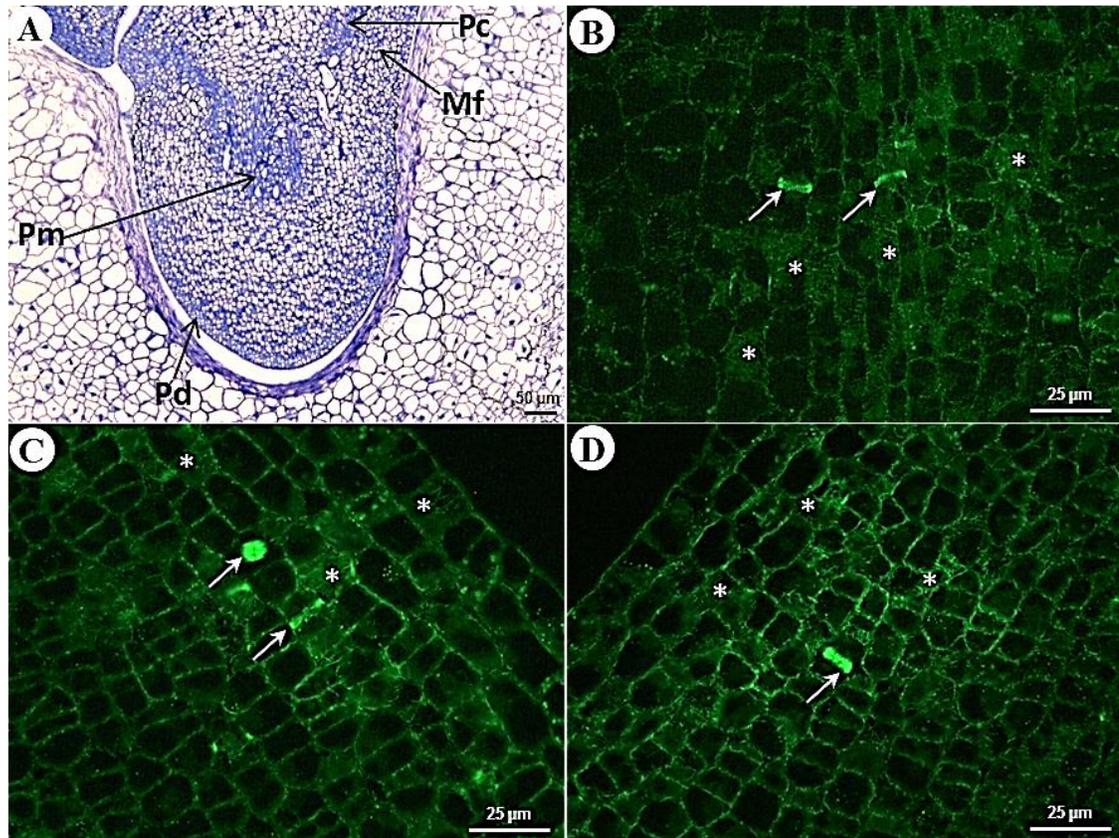


Figura 1. Secções longitudinais do eixo embrionário durante o desenvolvimento de sementes de *Jatropha curcas* L. – estágio Verde-A. (A) Meristemas primários: Promeristema (Pm), Procâmbio (Pc), Meristema fundamental (Mf), Protoderme (Pd). (B) Organização do citoesqueleto microtubular: as setas indicam bandas da pré-prófase (BPP) e os asteriscos indicam os microtúbulos corticais. (C) BPP, fuso mitótico (setas) e microtúbulos corticais (asteriscos). (D) Fragnoplasto (seta) e microtúbulos corticais (asteriscos). Fonte: autor.

Os meristemas das raízes adventícias (conforme descrito Capítulo 3) já estão bem definidos nesse estágio (Figura 2B), confirmando que estes se formam durante a embriogênese. Meristemas são regiões de tecidos embrionários, formadas por populações de células tronco pluripotentes, que podem dividir-se indefinidamente ou responder a estímulos que levam a formação de novos órgãos da planta (EVELAND & JACKSON, 2011).

Segundo Catzín-Yupit et al. (2014), embriões de *J. curcas* em estágio cotiledonar foram observados entre 5 e 15 dias após a antese (DAA). Este estágio é provavelmente anterior ao estágio Verde-B do presente estudo, baseando-se no aspecto morfológico externo das sementes descrito por esses autores e neste trabalho no Capítulo 1, Figura 2.

Nos estádios Verde-C, Verde-D e Verde-E foi verificada uma intensa atividade mitótica nos meristemas da raiz principal e das raízes adventícias, no cilindro vascular e na epiderme (Figura 2D-M). Nesses três estádios também se observou a forte presença de microtúbulos corticais com padrão criss-cross. Microtúbulos em criss-cross representam um padrão no qual coexistem microtúbulos transversais e longitudinais (WIESLER, 2002). No estágio Verde-E, em especial, verificou-se uma intensa marcação na região da epiderme, sistema fundamental e cilindro vascular (Figura 2J-L). No citoplasma, os microtúbulos oferecem suporte estrutural e atuam como um dispositivo que canaliza diversos componentes celulares, permitindo o movimento de partículas em várias direções (FUJITA et al., 2011).

Nas sementes Verde-C o embrião encontra-se no estágio cotiledonar intermediário (Capítulo 1, Figura 2C). De acordo com Cocucci & Mariath (2004), essa fase se caracteriza pelo desenvolvimento e diferenciação do hipocótilo e da radícula, e pelo início da diferenciação dos tecidos vasculares. No presente trabalho foi possível detectar a ocorrência de estômatos nesse estágio (Figura 3A-B), indicando que essas estruturas se formam durante a embriogênese. A alta atividade mitótica na epiderme do eixo embrionário, e na região próxima ao meristema da raiz adventícia (Figuras 2D, 2G e 2J), pode estar relacionada à geração das células-guarda, representando a formação do complexo estomático. No Estádio Verde-F também foi detectada a presença de estômatos em diferentes fases de desenvolvimento (Figura 3C).

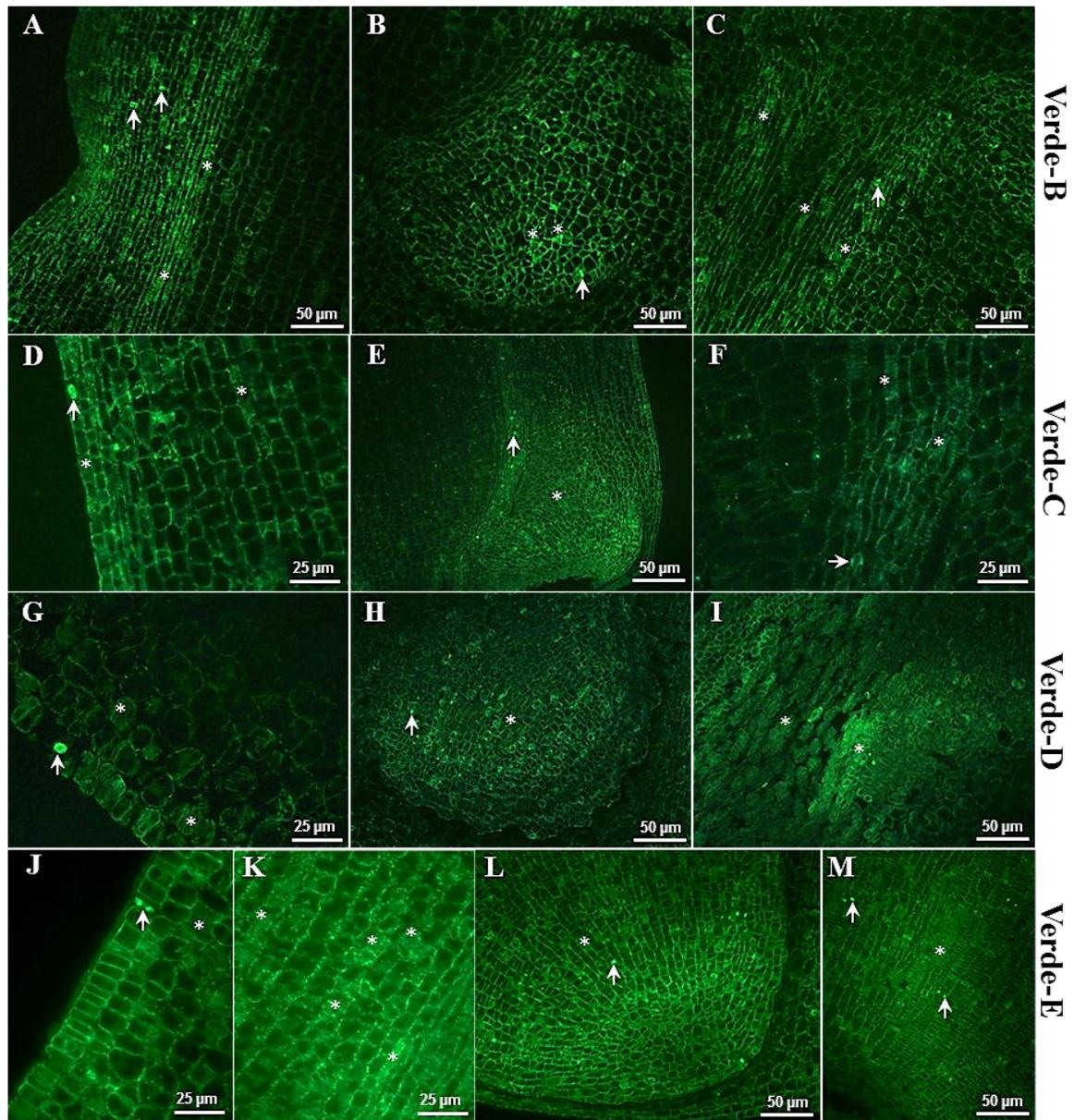


Figura 2. Configurações do citoesqueleto microtubular do eixo embrionário de *Jatropha curcas* L. em diferentes estádios de desenvolvimento. (A) Epiderme, córtex e sistema vascular. (B, E, H, L) Meristema da raiz adventícia. (C, F, I, M) Meristema apical da raiz. (D, G, J) Epiderme e córtex. (K) Sistema vascular evidenciando microtúbulos criss-cross. As setas indicam microtúbulos mitóticos e os asteriscos indicam microtúbulos corticais. Fonte: autor.

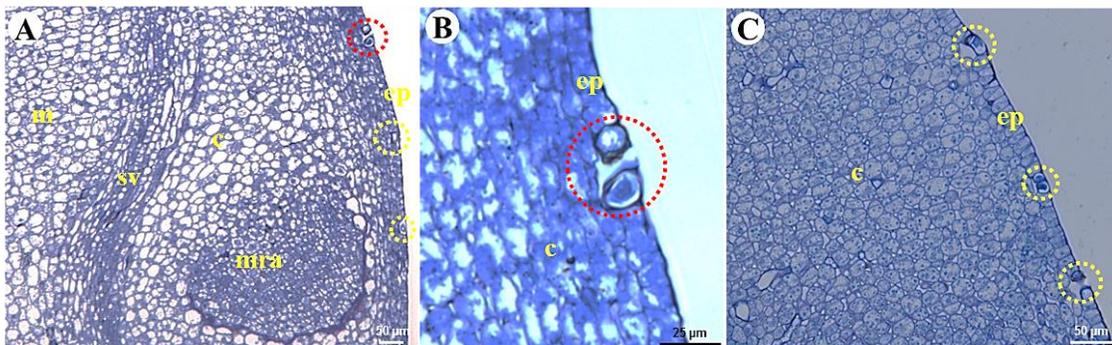


Figura 3. Secções anatômicas transversais do eixo embrionário de *Jatropha curcas* L. em diferentes estádios de desenvolvimento. (A) Estádio Verde-C, evidenciando estômatos na epiderme e o meristema da raiz adventícia. (B) Detalhe de um estômato representado dentro do círculo vermelho na figura A. (C) Estádio Verde-F, evidenciando estômatos em diferentes fases de diferenciação celular. Medula (**m**), Sistema vascular (**sv**), Córtex (**c**), Epiderme (**ep**), Meristema da raiz adventícia (**mra**). Fonte: autor.

Microtúbulos formam arranjos altamente organizados durante a morfogênese do complexo estomático, como microtúbulos corticais da interfase, BPP e arranjos radiais. Os microtúbulos estabelecem a polaridade nas divisões assimétricas das células estomáticas, controlam a orientação da deposição das microfibrilas de celulose e assim, afetam o padrão de espessamento da parede celular, definindo as propriedades mecânicas das células estomáticas e regulando precisamente o formato das células-guarda (GALATIS & APOSTOLAKOS, 2004).

No estágio Verde-F microtúbulos corticais e mitóticos, bem com grânulos fluorescentes de tubulina foram detectados (Figura 4A-C). No estágio verde-G (Figura 4D-G), os arranjos mitóticos foram visíveis somente nas regiões dos meristemas laterais das raízes adventícias, mas os arranjos corticais ainda eram persistentes nas demais regiões analisadas. A partir do estágio verde-H (figura 4H-J) foram detectados apenas grânulos fluorescentes, especialmente na região do cilindro vascular e córtex. Isso indica que as divisões celulares cessam durante o estágio anterior (verde-G), indicando o fim da histodiferenciação e início do processo de maturação. Os grânulos fluorescentes resultam da despolimerização do citoesqueleto microtubular e precedem a degradação de tubulina quando não há mais atividade mitótica (DE CASTRO et al., 2000).

Foi relatado que em sementes de *J. curcas* a histodiferenciação ocorreu antes dos 29 dias após polinização (DAP) e a fase de enchimento ocorreu entre 29 e 41 DAP (correspondendo a fase situada entre os estádios Verde-C e Verde-H). Finalmente, aos 41 DAP, houve expressiva

diminuição no teor de umidade, caracterizando a fase de dessecação das sementes ortodoxas (JIANG et al., 2012).

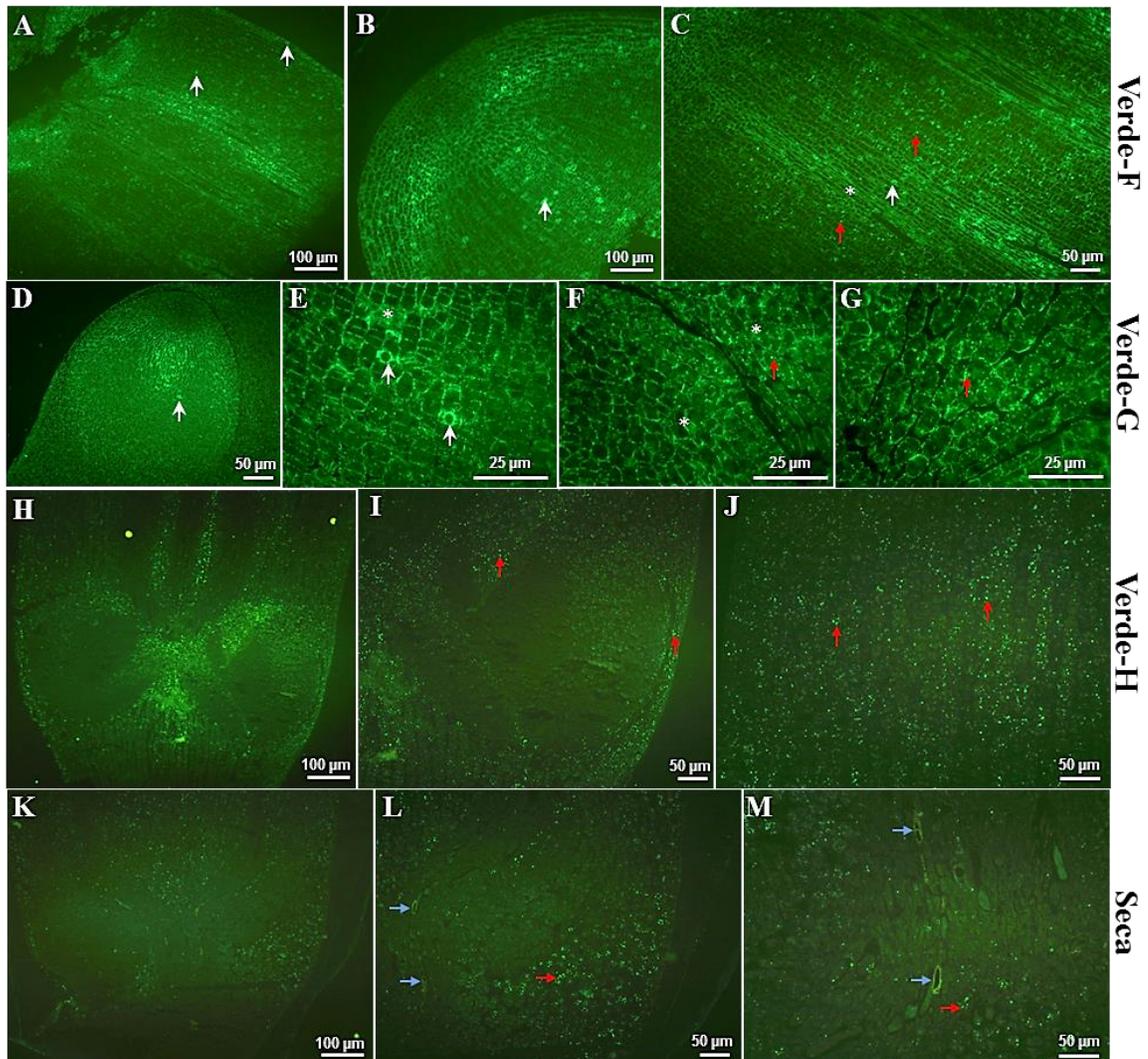


Figura 4. Aspecto do citoesqueleto microtubular do eixo embrionário de *Jatropha curcas* L. em diferentes estádios de desenvolvimento. (A, B e C) Estádio Verde-F. (D, E, F, G) Estádio Verde-G. (H, I, J) Estádio Verde-H. (K, L, M) Embrião de semente madura e seca. As setas brancas indicam microtúbulos mitóticos, as vermelhas grânulos de tubulina, as azuis elementos de xilema. Os asteriscos indicam microtúbulos corticais. Fonte: autor.

O eixo embrionário da semente no estágio seco (extraído de sementes maduras secas) apresentou somente grânulos fluorescentes de tubulina. No cilindro vascular foram observadas células bastante diferenciadas, como elementos de xilema (Figura 4K-M).

Os resultados indicam que a fase de crescimento do embrião é caracterizada por intensa atividade mitótica que cessa no embrião maduro. As células detêm as divisões durante todo processo de maturação e reassumem a atividades mitótica após a germinação.

Em *J. curcas*, o acúmulo de tubulina foi detectado após 24h de embebição de sementes secas e maduras. Já as divisões celulares recomeçaram a partir da protrusão radicular (72 horas de embebição), e foram visualizadas no ápice do meristema que forma a raiz principal e nos quatro meristemas laterais que formam as raízes adventícias da nova plântula (BRITO, 2010).

O início da embriogênese é uma fase crítica de diferenciação, onde as características básicas da planta são estabelecidas (LAU et al., 2012). O embrião contém o eixo embrionário e os cotilédones. Ambos são compostos por três tecidos primordiais: protoderme, procâmbio e meristema fundamental, que durante o desenvolvimento da plântula, se tornarão a epiderme, o tecido vascular e o tecido fundamental, respectivamente (GOLDBERG et al., 1994).

A predominância de microtúbulos corticais e mitóticos, observados nos estádios iniciais do desenvolvimento, sugere que a formação da semente de *J. curcas* resulta de divisão e expansão celular concomitante. Mudanças morfogenéticas durante este período são mediadas por taxas diferenciais de divisão e expansão celular (GOLDBERG et al., 1994). O final da atividade mitótica foi detectado no estágio H, indicando o final da histodiferenciação e completa formação do embrião com início da maturação. Isto pode ser confirmado pela alta porcentagem de germinação neste estágio (Capítulo 1, tabela 4), visto que a passagem da etapa de desenvolvimento para a fase germinativa requer a completa histodiferenciação (DE CASTRO et al., 2000). Nesse estágio, as sementes de *J. curcas* ainda não chegaram à maturidade fisiológica, pois ainda não atingiram o máximo valor de massa seca versus mínimo de teor de umidade (Capítulo 1, tabela 3).

A morfogênese do embrião termina com a completa formação das estruturas, enquanto que, durante o processo de maturação da semente, tanto o embrião quanto o tegumento são preparados para a dormência. A fase situada entre a morfogênese e a maturação da semente compreende principalmente o processo de crescimento, na qual é observado um aumento nas

divisões celulares. Em seguida, as divisões celulares são interrompidas, indicando o fim desta fase (BERGER, 1999; RAZ et al., 2001).

Do estágio Verde-H para o Seco, ocorreu um acúmulo significativo de matéria seca e redução no teor de umidade (Capítulo 1, tabela 3). O decréscimo no teor de umidade resulta na diminuição do metabolismo durante o desenvolvimento, causando uma interrupção no processo de síntese e replicação do DNA. Portanto, neste estágio estão presentes apenas grânulos de tubulina, resultantes da despolimerização de microtúbulos (KERMODE E BEWLEY, 1989; DE CASTRO et al., 2000).

A partir do estágio Amarelo há uma queda acentuada na germinação (Capítulo 1, tabela 4), isto pode ocorrer pela dormência induzida durante a dessecação em sementes ortodoxas, impedindo que as mesmas germinem ainda no fruto. As sementes ortodoxas estão maduras após passarem pelo processo de dessecação e atingirem o seu menor teor de umidade, estando nessa fase ausentes os microtúbulos corticais e mitóticos (KERMODE & BEWLEY, 1985; DE CASTRO & HILHORST, 2000).

Após a colheita, sementes de pinhão manso ainda precisam de um período de repouso para germinar (JØKER & JEPSEN, 2003). A germinação de sementes da espécie é inibida simplesmente pela presença do endosperma, sugerindo que essa estrutura causa algum grau de dormência física. Todavia, o tempo e as condições de armazenamento reduzem esse efeito (PAIVA NETO et al., 2014).

Neste trabalho foi possível definir a transição entre a fase de histodiferenciação e maturação, bem como associar as características morfofisiológicas dos diferentes estádios de desenvolvimento das sementes de *J. curcas* às diferentes configurações do citoesqueleto microtubular, à formação de radícula multimeristemática e de estômatos em epiderme embrionária. Sendo assim, pode-se concluir que a embriogênese foi caracterizada por alta atividade mitótica, com diferenciação de tecidos, órgãos e células especializadas, e a maturação marcada pelo aumento do estoque de reservas (aumento da massa seca) e redução do teor de umidade (dessecação das sementes ortodoxas). Nesta fase, o eixo embrionário interrompe seu crescimento e não há divisões mitóticas, apenas grânulos de tubulina, provenientes da quebra do citoesqueleto microtubular.

4 REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4 ed. Garland Publishing, Inc. New York, USA, 2002, p. 258.
- BASKIN, T.I.; BUSBY, C. H.; FOWKE, L. C.; SAMMUT, M.; GUBLER, F. Improvements in immunostaining samples embedded in methacrylate: localization of microtubules and other antigens throughout developing organs in plants of diverse taxa. **Planta**, v. 187, p.405-413, 1992.
- BAUD, S.; LEPINIEC, L. Physiological and developmental regulation of seed oil production. **Progress in Lipid Research**, v. 49, p. 235-249, 2010.
- BERGER, F. Endosperm development. **Current Opinion in Plant Biology**, n. 1, v. 2, p. 28-32, 1999.
- BEWLEY, J.D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, Canadá, v. 9, p.1055-1066, 1997.
- BEWLEY, J. Derek.; BLACK, Michael.; **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1994. 445p.
- BRITO, C. B. **Germinabilidade de sementes de Pinhão Manso (*Jatropha curcas L.*) sob restrição hídrica: aspectos fisiológicos, moleculares e citológicos**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010, 51p.
- CATZÍN-YUPIT, C. N.; RAMIREZ-MORILLO, I. M.; POOL, F. A. B.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Ontogenic development and structure of the embryo, seed, and fruit of *Jatropha curcas L.* (Euphorbiaceae). *South African Journal of Botany*, v. 93, p.1-8, 2014.
- COCUCCI, A. E.; J. E. A. MARIATH. Gametogênese, fecundação, seleção do gametófito mais apto, embriogênese e diásporo maduro. In: A. G. Ferreira & Borghetti, F. (Eds), *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre, Artmed. 2004, p. 15-30.
- DE CASTRO, R.D.; VAN LAMMEREN, GROOT, S. P.C.; BINO, R. J.; HILHORST, H. W. M. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress

but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. **Plant Physiology**, v. 122, n. 2, p. 327-335, 2000.

DE CASTRO, R.D.; HILHORST, H.W.M. Embebição e reativação do metabolismo. Pp. In: A.G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre, Artmed. 2004, p. 149-162.

DE CASTRO R. D. & HILHORST, H. W.M. dormancy, germination and the cell cycle in developing and imbibing tomato seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. Campinas, v. 12, p. 105-136, 2000.

DE CASTRO, R. D.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Braz. J. Plant Physiol.*, v.18, p. 175-199, 2006.

DEINUM, E. E.; MULDER, B. M. Modelling the role of microtubules in plant cell morphology, **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 688-692, 2013.

DIVAKARA, B. N.; UPADHYAYA, H. D.; WANI, S. P.; LAXMIPATHI GOWDA, C. L. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A review. **Applied Energy**, v. 87, p. 732-741, 2010.

DRANSKI, J. A. L.; PINTO JÚNIOR, A. S.; STEINER, F.; ZOZ, T.; MALAVASI, U. C.; MALAVASI, M. M.; GUIMARÃES, V. F. Physiological maturity of seeds and colorimetry of fruits of *Jatropha curcas* L. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 32, p. 158-165, 2010.

DUBREUCQ, B.; BAUD, S.; DEBEAUJON, I.; DUBOS, C.; MARION-POLL, A.; MIQUEL, M.; NORTH, H.; ROCHAT, C.; ROUTABOUL, J.-M.; LEPINIEC. **Seed Development**. In: *Plant Developmental Biology – Biotechnological perspectives*. PUA, Chong.; DAVEY, Michael, R. (Eds.). Springer. Heidelberg, Germany, v. I, Capítulo 17. 2010, p. 341-360.

EVELAND, A. L.; JACKSON, D. P. Sugars, signalling, and plant development. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-11, 2011.

FARIA, J. M. R.; BUITINK, J.; LAMMEREN, A. A. M. V.; HILHORST, H. W. M. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 418, p. 2119-2130, 2005.

FUJITA, M.; HIMMELSPACH, R.; HOCART, C. H.; WILLIAMSON, R. E.; MANSFIELD, S. D.; WASTENEYS, G. O. Cortical microtubules optimize cell-wall crystallinity to drive unidirectional growth in *Arabidopsis*. **The plant Journal**, v. 66, p. 915-928, 2011.

GALATIS, B.; APOSTOLAKOS, P. The role of the cytoskeleton in the morphogenesis and function of stomatal complexes. **New Phytologist**, v.161, p. 613-639, 2004.

GODDARD, R. H.; WICK, S. M.; SILFLOW, S. D.; SNUTAD, D. P. Microtubule Components of the Plant Cell Cytoskeleton, **Plant Physiol.**, v. 104, p. 1-6, 1994.

GOLDBERG, R. B.; DE PAIVA, G.; YADEGARI, R. Plant embryogenesis - zygote to seed. **Science**, v.266, p.605-614, 1994.

HASEZAWA, S.; KUMAGAI, F. Dynamic Changes and the Role of the Cytoskeleton during the cell Cycle In Higher Plant Cells, **International Review of Cytology**, v. 214, p. 161-191, 2002.

HASHIMOTO, T. A ring for all: g-tubulin-containing nucleation complexes in acentrosomal plant microtubule arrays, **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 698-703, 2013.

HARADA, J. J. **Seed maturation and control of germination**. In: LARKINS, B. A.; VASIL, I. K (Ed.). *Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development*. Dordrecht: Kluwer Academic, p.545-592, 1997.

JIANG, H.; WU, P.; ZHANG, S.; SONG, C.; CHEN, Y.; LI, M.; JIA, Y.; FANG, X.; CHEN, F.; WU, G. Global Analysis of Gene Expression. Profiles in developing Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) Seeds. **Plos one**, v. 7, n.5, 2012.

JØKER, D.; JEPSEN, J. *Jatropha curcas* L. Seed Leaflet, Humleback, Denmark, n.83, p.1-2, 2003. Disponível em: http://curis.ku.dk/ws/files/20648145/jatropha_curcas_83.pdf. Acesso em 23 novembro 2014.

JONGSCHAAP, R.E.E; CORRE, W. J.; BINDRABAN, P. S.; BRANDENBURG, W. A. Claims and Facts on *Jatropha curcas* L., **Plant Research International**, Wageningen, 2007.

KAUSHIK, N. Effect of capsule maturity on germination and seedling vigour in *Jatropha curcas*. **Seed Science & Technology**, n. 31, p. 449-454, 2003.

KERMODE. A. R. & BEWLEY. J. D. The Role of Maturation Drying in the Transition from Seed Development to Germination I. Acquisition of desiccation-tolerance and germinability during development of *Ricinus communis* L. seeds. **Journal of Experimental Botany**. v. 36, p. 1906-1915, 1985.

KERMODE. A. R. & BEWLEY. J. D. The Role of Maturation Drying in the Transition from Seed Development to Germination VI. Desiccation-induced changes in messenger rna populations within the endosperm of *Ricinus oommunis* L. seeds. **Journal of Experimental Botany**. v. 40, p. 33-41, 1989.

LAU, S.; SLANE, D.; HERUD, O.; KONG, J.; JÜRGENS, J. Early embryogenesis in flowering plants: settings up the basic dody pattern. **Annual Review od Plant Biology**, v.63, p.483-506, 2012.

MAYER, U.; JURGENS, G. Microtubule cytoskeleton: a track record, **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 494 – 501, 2002.

PAIVA NETO, V. B.; PRANDO, F.P.; RODRIGUES, L. A.; ZUFFO, M. C. R.; LIMA, S. F. Ação inibitória do endosperma na germinação *in vitro* de embrião zigótico de pinhão manso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.3, p.433-438, 2014.

PESSOA, A. M. S.; MANN, R. S.; SANTOS, A. G.; RIBEIRO, M. L. F. Influência de maturação de frutos na germinação, vigor e teor de óleo de sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Scientia Plena**, Aracajú, v. 8, n. 7, 2012.

PORWAL, J., BEHRA, B., PONNEKANTI, N., BANGWAL, D., KAUL, S. An integrated analytical approach for the compositional evaluation of diferente stages of fully rippened *Jatropha curcas* seed oil. **Eur. J. Sci. Technol.** v. 116, p.1-8, 2014.

RAZ, V.; BERGERVOET, J. H. W.; KOORNNEEF, M. Sequential steps for developmental arrest in Arabidopsis seeds. **Development**, v.128, p. 243-252, 2001.

ROSADO, T. B.; LAVIOLA, B. G.; FARIA, D. A.; PAPPAS, M. R.; BHERING, L. L.; QUIRINO, B.; GRATTAPAGLIA, D. Markers Reveal Limited Genetic Diversity in a Large Germplasm Collection of the Biofuel Crop *Jatropha curcas* L. in Brazil, **Crop Science**, v. 50, p. 2372-2382, 2010.

RUBIO, F.; MENEGHEL, A. P.; GOMES, L. F. S.; MALAVASI, M. M. Estádios de maturação do fruto no desempenho germinativo e teor de óleo de sementes de *Jatropha curcas* Linn. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 663-668, 2013.

SILVA, L. J.; DIAS, C. F. S.; MILAGRES, C. C.; DIAS, L. A. S. Relationship between fruit maturation stage and physiological quality of physic nut (*Jatropha curcas* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras v. 36, n. 1, p. 39-44, 2012.

WEST, M. A. L.; HARADA, J. J. Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. **The Plant Cell**, v.5, p.1361-1369, 1993.

WIESLER, B.; WANG, Q-Y.; NICK, P. The stability of cortical microtubules depends on their orientation. **The Plant Journal**, v.32, p. 1023-1031, 2002.

CAPÍTULO 3

ASPECTOS MORFOANATÔMICOS DA FORMAÇÃO INICIAL DO SISTEMA RADICULAR DE *JATROPHA CURCAS* L.

RESUMO

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae) produz sementes ricas em óleo considerado uma promissora fonte de matéria-prima renovável para a produção de biodiesel. Esta espécie é bastante conhecida também por ser bem adaptada a ambientes áridos. O presente estudo descreve um novo perfil organizacional morfoanatômico em embriões de *J. curcas*, revelado através de análises microscópicas. Embriões de sementes secas maduras possuem uma radícula multimeristemática composta por um meristema apical central principal e quatro meristemas laterais. Secções transversais mostram uma organização vascular diferenciada na estrutura primária do hipocótilo (futuro caule), no qual há quatro feixes vasculares formando um anel em torno da medula. Após a embebição das sementes, os quatro meristemas laterais se desenvolvem e conectam-se a cada dois feixes vasculares pré-existent. Assim como o meristema apical principal, os meristemas laterais parecem também serem estabelecidos durante a embriogênese, originados de células na região do cortex interno ou do periciclo, e crescem para fora através do córtex e da epiderme, formando raízes. A germinação é completada com a protrusão simultânea de uma raiz principal maior e quatro raízes menores adventícias, todas crescendo ao mesmo tempo, durante a formação inicial do sistema radicular. Esse padrão morfoanatômico diferenciado em sementes e plântulas de *J. curcas* pode representar um novo mecanismo de adaptação às condições ambientais adversas.

Palavras-chave: *Jatropha* spp. Multimeristema. Germinação. Raízes.

ABSTRACT

Jatropha curcas (Euphorbiaceae) is an oil-rich seed species considered a promising source of renewable feedstock for biodiesel production and known to be well adapted to arid environments. The present study describes a novel morpho-anatomical organizational profile in *J. curcas* embryos as revealed by microscopic analysis. Embryos of dry mature *J. curcas* seeds have a multi-meristematic radicle tip composed of one apical central main meristem and four lateral meristems. Transverse sections show a differentiated vascular organization in the primary structure of the hypocotyl (future stem), in which there are four vascular bundles forming a ring around the pith. Upon seed imbibition, the four lateral meristems develop and interconnect between each two of the pre-existing vascular bundles. As for the main apical meristem, the lateral meristems appear also to be established during embryogenesis, originating from the from cell regions in the inner cortex or from pericycle and growing out through the cortex and epidermis. Germination is completed with the simultaneous protrusion of one larger main root and four smaller adventitious roots growing at the same time during early root system formation. Such unique morpho-anatomy in seeds and seedlings of *J. curcas* may represent a novel mechanism of adaptation to adverse environmental conditions.

Key words: *Jatropha* spp. Multimeristem. Germination. Roots.

1 INTRODUÇÃO

Embora o aparecimento das angiospermas, durante o cretáceo, seja um fenômeno relativamente recente em relação a outros grupos de plantas, este clado ocupa uma ampla diversidade de habitat na Terra e varia enormemente em tamanho, forma, longevidade, morfologia reprodutiva, composição química, tamanho e organização do genoma (SOLITIS & SOLITIS, 2004; FRIIS et al., 2010).

O padrão do corpo multicelular das plantas vasculares é bastante complexo e resulta de um longo processo evolutivo de especialização para a sobrevivência no ambiente terrestre (NIKLAS, 1997). O plano do corpo do embrião é estabelecido desde a embriogênese. Neste estágio, o eixo polar e o padrão radial do corpo da planta são definidos com a especificação dos domínios do ápice radicular e caulinar, seguido da formação de tecidos embrionários e órgãos (EVERT, 2007; GEORGE et al., 2008). Cada polo apresenta o respectivo meristema apical, radicular e caulinar, que estão envolvidos com o crescimento da planta em comprimento (RAVEN, 2007; APEZZATO-DA-GLÓRIA & CARMELLO-GUERREIRO, 2012).

O embrião tipicamente maduro é diferenciado, exibe polaridade estrutural e consiste de um eixo dividido entre radícula (raiz embrionária) e parte aérea com um ou dois cotilédones. Todas essas partes são compostas de três tecidos primordiais, protoderme, procâmbio e meristema fundamental, que durante o desenvolvimento da plântula originarão, respectivamente, a epiderme, o tecido vascular e os tecidos fundamentais (parênquima, colênquima e esclerênquima) (GOLDBERG et al., 1994; LINKIES, 2010).

Durante o crescimento de órgãos axiais das plantas, o desenvolvimento vascular acontece em duas regiões específicas localizadas diretamente abaixo e acima dos meristemas apicais do caule e da raiz. Este processo resulta na formação de arranjos específicos dos feixes vasculares que correm através da planta em uma distribuição espacial característica, controlada geneticamente (CARTENÌ et al., 2014). Dois níveis de organização espacial podem ser distinguidos dentro do sistema vascular: um padrão longitudinal, isto é, o arranjo espacial dos feixes vasculares dentro de um órgão; e um padrão radial, que é o arranjo espacial do floema e xilema dentro de cada feixe vascular e, mais comumente, dentro de uma seção transversal da planta (ESAU, 1977; EVERT, 2007).

A raiz é a primeira estrutura formada durante a germinação das sementes (BEWLEY et al., 2012). O termo raiz denota um órgão multicelular, caracterizado por funções específicas

como resposta gravitrópica, ramificação endógena, pêlos radiculares e uma coifa protetora (HENRICK & STRULLU-DERRIEN, 2014). O sistema radicular compõe-se de unidades de exploração que sustentam o desenvolvimento das plantas acima do solo. O meristema apical da raiz permite a planta explorar o solo verticalmente, enquanto os meristemas laterais desenvolvem novas raízes a partir do periciclo e possibilitam a obtenção de nutrientes e água, lateralmente (MUNNÉ-BOSCH, 2014).

Jatropha curcas L. pertence à família Euphorbiaceae e tem como possível centro de origem o México e parte continental da América Central. Suas sementes contêm um alto teor de óleo (35% - 40 %), com características que possibilitam seu uso para iluminação, fabricação de sabão, na indústria de cosméticos e na produção de combustível para cozinha e biodiesel. Esta espécie vem sendo considerada uma cultura potencial para os trópicos, pois além de crescer em solos degradados, favorece a recuperação de áreas erodidas (HELLER, 1996; JONGSCHAAP et al., 2007; ISLAM et al., 2011).

A protrusão da raiz primária em *J. curcas* ocorre tipicamente no terceiro dia após a embebição em água. As plântulas apresentam um hipocótilo esverdeado e longo, dois cotilédones foliáceos e um sistema radicular composto de uma raiz principal forte, quatro raízes laterais e muitas raízes secundárias (HELLER, 1996; BRITTAINE E LUTALADIO, 2010; BRASILEIRO et al., 2012; LOUREIRO et al., 2013). Este padrão morfoanatômico pode estar relacionado com a adaptação desta espécie a ecossistemas adversos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi descrever o padrão morfoanatômico do sistema radicular em *J. curcas* em diferentes fases da germinação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

O material biológico utilizado neste trabalho foi produzido, em 2012, no campo experimental da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA), localizado no município de Alagoinhas (BA), latitude de 12° 08' – 12°10' S e longitude de 38° 26' – 38° 30' W.

2.2 Análises em microscópio estereoscópico

As análises microscópicas foram realizadas utilizando-se embriões excisados de sementes de *J. curcas* secas e o eixo hipocótilo-radícula de plântulas em diversos estádios de desenvolvimento.

Inicialmente as sementes de *J. curcas* foram desinfestadas superficialmente em uma solução contendo 0,125% de cloro ativo e Tween 20 (1 gota de Tween 20 para cada 100 mL de solução), sendo agitadas constantemente durante 10 minutos e em seguida submetidas a 5 lavagens com água destilada. O teste de germinação foi montado em rolo de papel tipo “germitest” (28 cm x 38 cm), umedecido com água destilada, na proporção de três vezes o peso do papel seco. As sementes foram dispostas no papel e levadas ao germinador (Eletrolab, Mod. EL202) ajustado à temperatura de 25°C, na ausência de luz. Cada rolo foi acondicionado em saco plástico para evitar o ressecamento do substrato e possíveis contaminações. Foram coletadas amostras nos seguintes períodos de embebição: 0 (semente seca), 24, 48, 72 (protrusão radicular), 96 e 120 horas (crescimento pós-germinativo). Em sementes não germinadas (0 a 48 horas), o tegumento foi removido, expondo o eixo embrionário (Figura 1A - D) a partir do qual a área de transição hipocótilo-radícula até a extremidade radicular foi isolada.

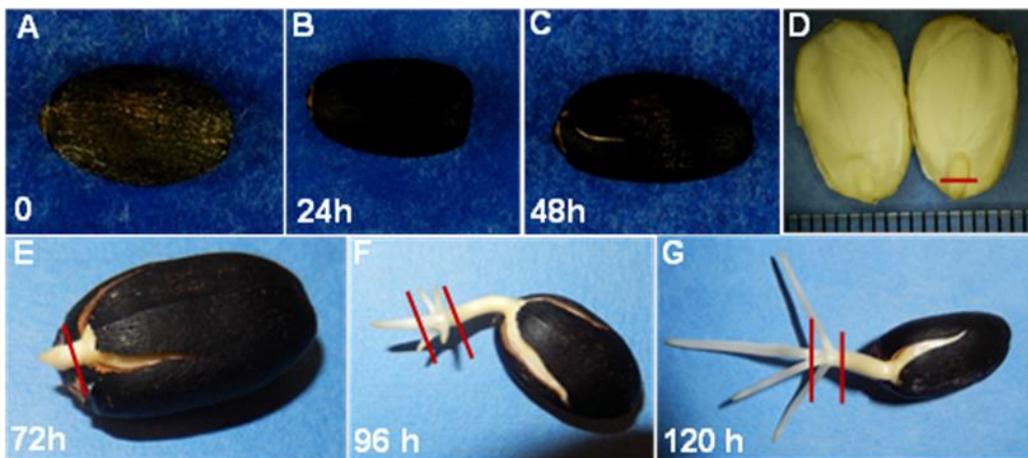


Figura 1. Sementes de *Jatropha curcas* L. em diferentes fases da germinação. (A) Semente madura seca (0 hora); (B) 24 horas embebida água; (C) 48 horas embebida água; (D) coleta de radículas em sementes não germinadas (A – C); (E) 72 horas embebida água; (F) 96 horas embebida água; (G) 120 horas em água. As linhas vermelhas delimitam a porção analisada.

Fonte: autor.

As imagens foram obtidas através do microscópio estereoscópico Zeiss Discovery V12. Os ensaios foram realizados nos Laboratórios de Fisiologia de Plantas e de Biologia Celular Vegetal da Universidade e Centro de Pesquisa de Wageningen (Wageningen University and Research Center - WUR).

2.3 Análises em Microscópio Óptico

Para as observações anatômicas, o material excisado (Figura 1) foi fixado em solução contendo Paraformaldeído 4%, Glutaraldeído 3%, tampão Fosfato Salino (PBS) 0,1 M (pH 7.2) por 24 horas. Após a fixação, as amostras foram enxaguadas 4 x 15 minutos em PBS e 2 x 15 em água bidestilada. Em seguida passaram por desidratação com trocas de solução hidroetanólica em concentrações gradativas de 10, 30, 50, 70, 96 e 100%, sendo agitadas constantemente em todas as concentrações durante 30 minutos, com exceção da concentração de 70%, na qual as amostras ficaram imersas durante a noite. A etapa de pré-infiltração consistiu em trocas da solução de etanol e solução A, esta contendo Glicolmetacrilato (Technovitt7100, Heraeus Kulzer), PEG 400 e peróxido de benzoila (Hardner I, Heraeus Kulzer), nas proporções 5:1/ 3:1/1:1/ 1:3, por duas horas cada ou deixando durante a noite. Para polimerização em blocos, as amostras foram finalmente colocadas em moldes que foram rapidamente preenchidos com Solução B (15 mL de Solução A para 1 mL de dimetilsulfóxido - Hardner II, Heraeus Kulzer) e cobertos com tampa plástica para impedir a entrada de oxigênio e formação de bolhas. Em seguida, os moldes foram levados para estufa a 37°C e mantidos por 1 hora. Após a polimerização, os moldes foram aderidos em suportes plásticos, para seccionamento em micrótomo de rotação, usando-se metilmetacrilato (Technovitt 3040, Heraeus Kulzer, Alemanha). As seções transversais e longitudinais, com 4µm de espessura, foram coradas com azul de toluidina a 1%, observadas em microscópio óptico (Nikon Optiphot) e fotografadas com câmera Panasonic wv-E 550 3-CCD. Também foram realizadas observações em embriões de sementes secas de outras espécies do gênero *Jatropha* (*J. multifida*, *J. gossypifolia*, *J. podagrica*), visando comparar com o padrão observado para a espécie estudada. Os ensaios foram realizados nos Laboratórios de Fisiologia de Plantas e de Biologia Celular Vegetal da Universidade e Centro de Pesquisa de Wageningen (Wageningen University and Research Center - WUR).

2.4 Análises em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

As amostras coletadas foram fixadas em solução Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, com pH 7.2-7.4) por 24 horas. Em seguida, foram lavadas três vezes por 10 minutos em tampão cacodilato de sódio 0,1M e pós-fixadas por 1 hora, no escuro, à 4°C, numa solução contendo tetróxido de ósmio (OsO₄) a 2% e cacodilato de sódio 0,2 M. Após esta etapa, as amostras foram novamente lavadas, duas vezes em cacodilato de sódio 0,1 M e desidratadas por sucessivas substituições em série gradual de acetona - 30, 50, 70, 90 e 100% (duas vezes), cada lavagem com duração de 10 minutos.

A seguir, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico (Leica EM CPD 030) para secagem completa, através da substituição da acetona por CO₂. Após esta etapa, as amostras foram fixadas em cilindros de alumínio com 12 mm de diâmetro (Stubs), por meio de uma fita adesiva de carbono com dupla face, e submetidas à metalização por vaporização de ouro em alto vácuo, a fim de aumentar a condutividade elétrica no momento das análises no MEV (JEOL JSM 6390 LV). Os ensaios foram realizados na Plataforma de Microscopia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM – Fiocruz) Salvador, BA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Além do meristema apical da raiz principal, o eixo embrionário das sementes de *J. curcas* possui quatro protuberâncias meristemáticas, próximas à região do colo, que originarão quatro raízes adventícias (Figura 2). À medida que aumenta o tempo de embebição das sementes em água (24 e 48 horas), as protuberâncias tendem a ficar mais proeminentes (Figura 2B-C). Após a protrusão radicular (72 horas em água) a raiz central apresenta-se com uma base espessa, que se afunila em direção à coifa e as raízes adventícias se tornam bem visíveis (Figura 2D). Após 96 horas em água, a raiz principal já está bastante alongada e as raízes adventícias bem desenvolvidas, passando a ter o mesmo padrão morfológico de desenvolvimento da raiz principal (Figura 2E).

O eixo embrionário das sementes de *J. curcas* é descrito como axial, espatulado, com um eixo hipocótilo-radícula cilíndrico, caracterizando-se ainda por apresentar hipocótilo com diâmetro maior na base, próximo ao colo e menor próximo à inserção dos cotilédones (MONTERO et al., 2009).

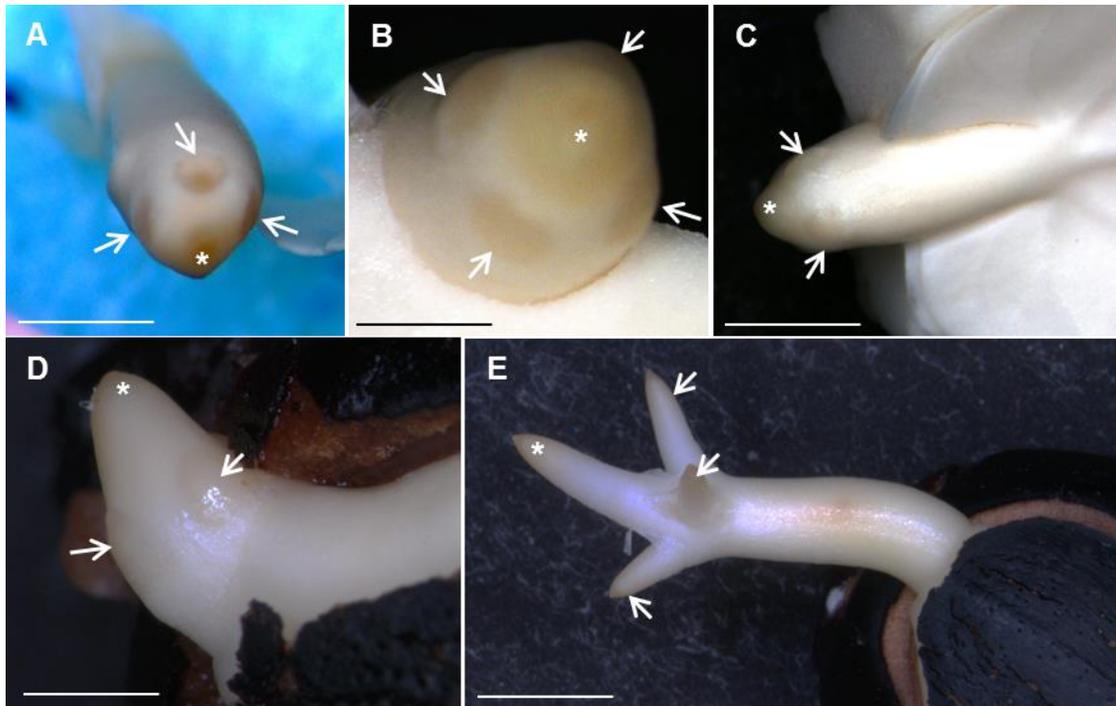


Figura 2. Micrografias estereoscópicas com detalhes do crescimento do sistema radicular em *Jatropha curcas* L. durante 96 horas de embebição em água. (A) Porção da extremidade radicular evidenciando protuberâncias meristemáticas em embriões de sementes maduras secas. (B) Aspecto morfológico após 24 horas em água. (C) Após 48 horas em água. (D) Germinada após 72 horas em água. (E) Após 96 horas, raízes adventícias e raiz principal bem desenvolvidas. As setas indicam a formação das raízes adventícias e os asteriscos a raiz principal. Barra = 1mm. Fonte: autor.

O hipocótilo de *Cnidoscylus juercifolius* (Euphorbiaceae) tem características semelhantes às de *J. curcas*, tais como a coloração, o aspecto ampuliforme, textura lisa, brilhoso, engrossado e latescente (SILVA et al., 2007). De acordo com Nunes et al. (2009), o coleto é bem definido pela diferença de cor e pela dilatação que ocorre entre o hipocótilo e as raízes. Añez et al. (2005) fazendo a caracterização morfológica dos frutos, das sementes e do desenvolvimento das plântulas de *Jatropha elliptica*, observaram que para essa espécie normalmente cinco raízes são formadas, uma central e quatro periféricas denominadas adventícias, que se desenvolvem a partir do colo.

Alguns autores relatam que, após a germinação, a raiz principal de *J. curcas* é cilíndrica, glabra, branca e ramifica-se rapidamente, com o aparecimento de 4-5 ramificações no terceiro dia após a protrusão radicular (HELLER, 1996; BRITTAINE & LUTALADIO, 2010; BRASILEIRO et al., 2012; LOUREIRO et al., 2013). Porém, neste trabalho pode-se verificar que os meristemas

para formação das raízes adventícias já estão presentes no embrião de sementes secas maduras (Figuras 2A, 4A e 5A) e que tais raízes podem romper a epiderme do embrião antes mesmo da protrusão da raiz principal, através do endosperma e tegumento (Figura 4B). As protuberâncias meristemáticas que dão origem as raízes adventícias são, portanto, formadas durante o desenvolvimento do embrião. Essas características também foram observadas em outras espécies do gênero *Jatropha*, revelando a existência de uma estrutura radicular complexa (presença de cinco meristemas), conforme observado em secções anatômicas de *J. multifida*, *J. podagrica* e *J. gossypiifolia* (Figura 3A-C), podendo-se considerar este padrão um marcador morfológico para o gênero.

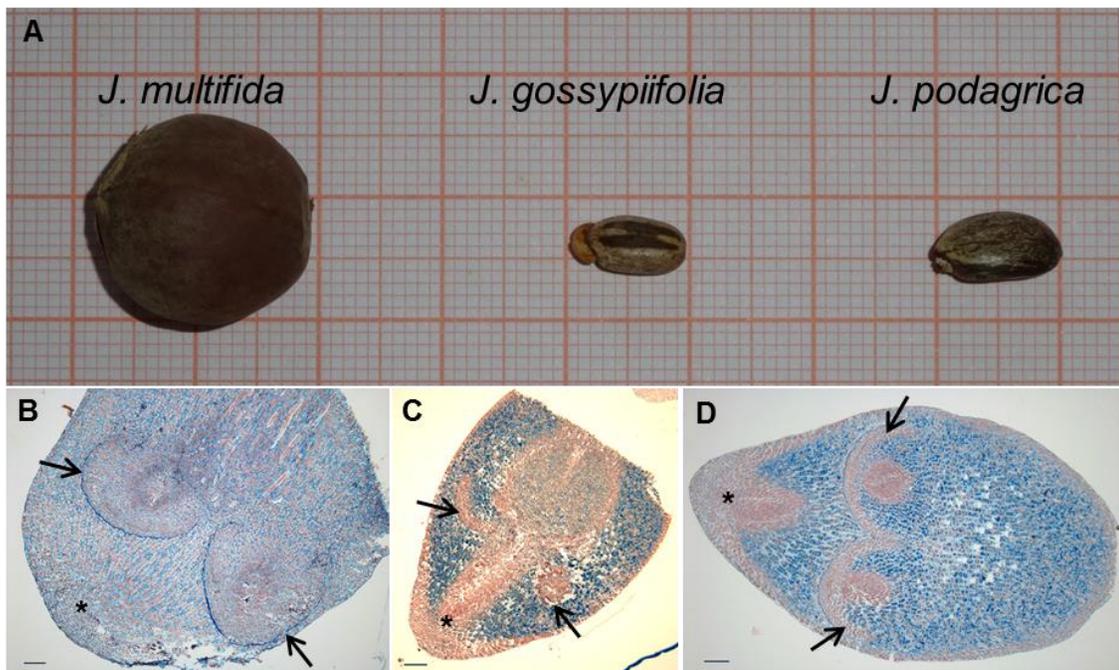


Figura 3. Sementes maduras secas e secções longitudinais em eixos embrionários de três espécies do gênero *Jatropha*. (A) Sementes. (B) *Jatropha multifida*. (C) *Jatropha gossypiifolia*. (D) *Jatropha podagrica*. As setas indicam o meristema das raízes adventícias e os asteriscos o meristema da raiz principal. Barra = 100 μ m. Fonte: autor.

As eletromicrografias (Figura 4) e secções histológicas de embriões (Figura 5), sob diferentes períodos de embebição em água, confirmam um padrão morfoanatômico diferenciado em *J. curcas* e aparentemente no gênero *Jatropha*. As raízes adventícias começam a romper a epiderme, na região do colo, a partir de 48 horas de embebição em água (Figura 4 B-C), antes

mesmo da protrusão da raiz principal através do tegumento (germinação), que ocorreu após 72 horas de embebição em água (Figuras 2D e 4D). Estas características sugerem que o embrião de *J. curcas* é multimeristemático, originando um sistema radicular complexo, com a formação de 5 raízes na fase inicial de estruturação do sistema radicular, podendo ser um diferencial para o gênero.

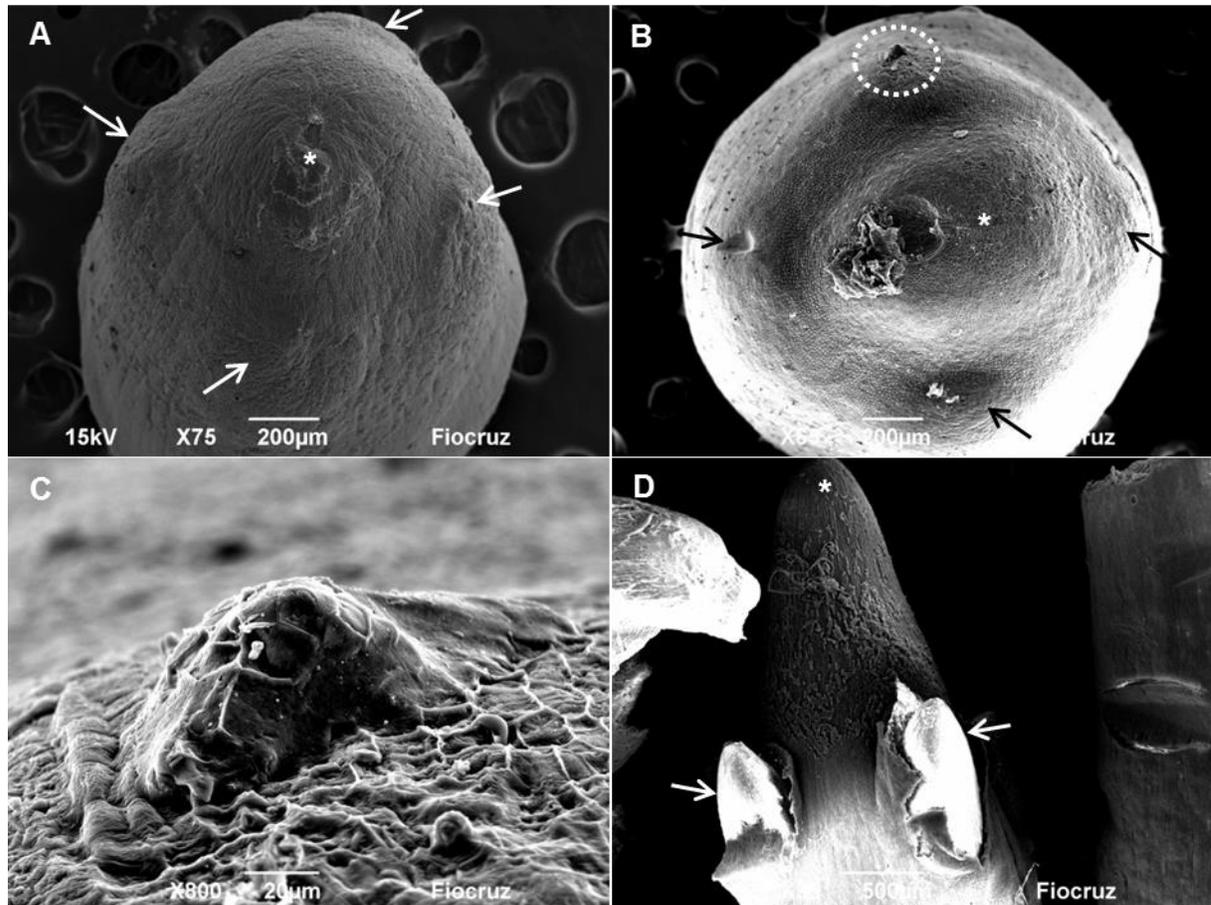


Figura 4. Eletromicrografias do meristema apical da raiz do eixo embrionário de sementes de *Jatropha curcas* L. sob diferentes períodos de embebição em água e fases da germinação. (A) Protuberâncias meristemáticas (setas) em embriões de sementes secas. (B) Modificação morfológica nas protuberâncias meristemáticas (setas e círculo), após 48 horas de embebição em água (sementes não germinadas). (C) Detalhe da região circulada em B, expondo a ruptura da epiderme por uma das raízes adventícias. (D) Após a germinação (72 horas de embebição em água), é possível observar aqui a raiz principal e 2 adventícias (setas). Fonte: autor.

Para Carvalho e Nakagawa (2000) o eixo embrionário constitui-se em uma das mais importantes estruturas na semente, pois apresenta a capacidade de se desenvolver, graças à presença de tecido meristemático nas suas duas extremidades. Em secções longitudinais da extremidade radicular em embriões de sementes secas de *J. curcas*, além dos meristemas primários (Promeristema, Procâmbio, Protoderme e Meristema Fundamental) e das células da Coifa, são também visíveis dois grupos de células meristemáticas localizadas na região de transição entre o colo e o ápice da raiz principal (Figura 5A). Após 48 horas de embebição em água, à medida que a germinação progride e as células se tornam mais alongadas, já é possível observar que a organização desse grupo de células meristemáticas é bastante similar a organização das células do ápice radicular da raiz principal e que, portanto, originará outras raízes (Figura 5B).

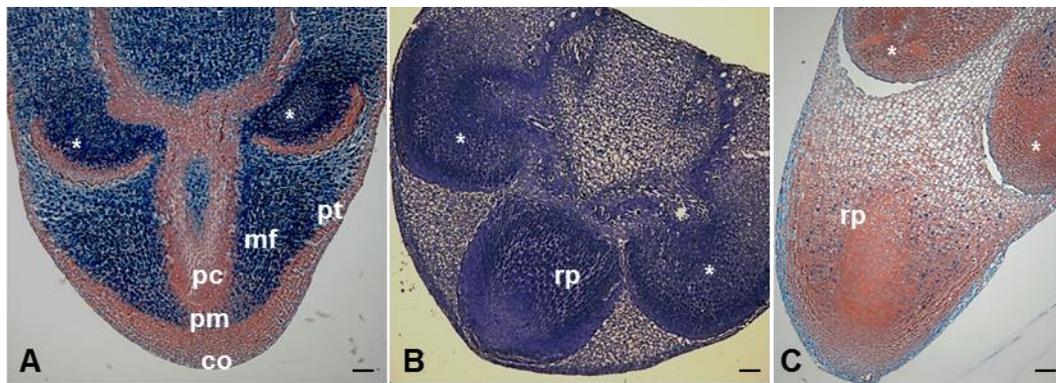


Figura 5. Secções longitudinais da extremidade radicular do eixo embrionário de *Jatropha Curcas* L., sob diferentes períodos de embebição em água. (A) Meristemas primários e dois diferentes grupos de células meristemáticas (asteriscos) em embriões de sementes secas. (B) Alongamento das células meristemáticas (após 48 horas de embebição em água - sementes não germinadas) que originarão a raiz principal e as raízes adventícias. (C) Crescimento da raiz principal e das raízes adventícias após a germinação (72 horas de embebição em água). Coifa (**co**), Promeristema (**pm**), Procâmbio (**pc**), Meristema fundamental (**mf**), Protoderme (**pt**), Raiz principal (**rp**). Barra = 100µm. Fonte: autor.

A partir de 48 horas de embebição em água, já é possível observar alguns elementos de xilema em formação (Figura 6A - C) que estes conectarão os tecidos vasculares das raízes com os do cilindro vascular do eixo caulinar. Este evento indica o início da organização do procâmbio para formação do sistema vascular. Essas células ocorrem na região de transição hipocótilo-

radícula e próximo às raízes adventícias. No protofloema e no córtex desta mesma zona ocorrem muitos laticíferos articulados (Figura 6B-C). Os laticíferos são células ou série de células conectadas, que contêm um fluido chamado látex em estado de suspensão, que ocorrem no corpo primário e secundário de plantas, sendo bastante comuns no gênero *Jatropha* (Euphorbiaceae) (KRISHNAMURTHY et al., 2013).

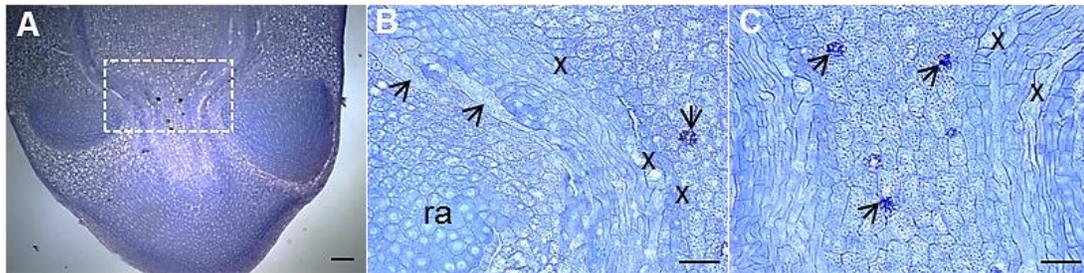


Figura 6. Secções longitudinais da extremidade radicular no eixo embrionário de *Jatropha Curcas* L., após 48 horas de embebição em água. (A) Visão geral dos meristemas. (B) e (C) Área selecionada pelo retângulo em A, evidenciando células do xilema (x), laticíferos (setas) e raiz adventícia (ra). Barra = 100µm. Fonte: autor.

Após 72 horas de embebição em água (Figura 2D, 4D e 5C), a raiz principal se alonga até a ruptura do tegumento, diferenciando-se na parte final do hipocótilo, junto com as raízes adventícias (estas já tendo iniciado a ruptura da epiderme na região do colo). Depois de 96 horas de embebição em água, a raiz principal e as raízes adventícias são praticamente semelhantes em tamanho e anatomia (Figura 2E).

Nas secções transversais do hipocótilo pode ser visualizada a estrutura primária do caule (Figura 7). O procâmbio é circular e aberto, com quatro lacunas alternadas pelos feixes procambiais, formando um anel em torno do córtex (Figura 7A); a medula é ampla, com células parenquimáticas de conteúdo amilífero, apresentando drusas e células laticíferas (Figura 7B).

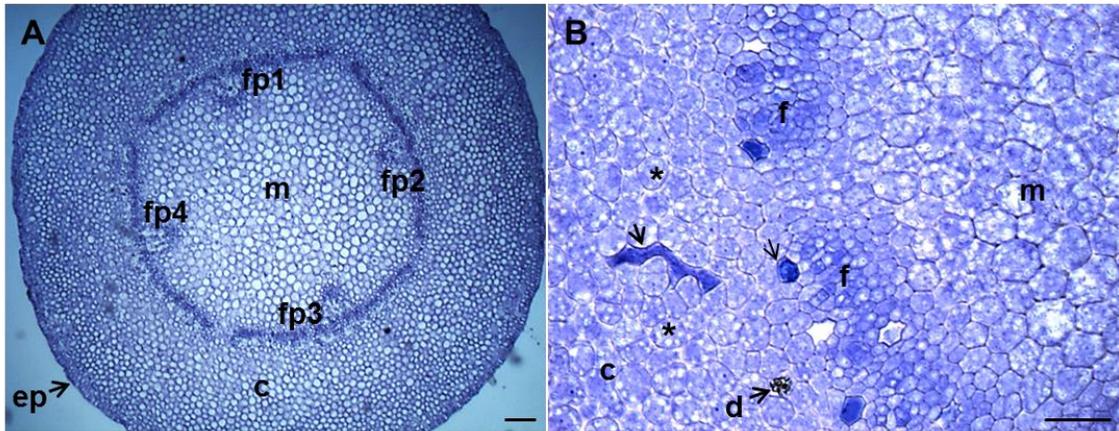


Figura 7. Secções transversais no hipocótilo do eixo embrionário de *Jatropha Curcas* L., após 48 horas de embebição em água. (A) Estrutura primária do caule. (B) Visão detalhada da medula (**m**) e córtex (**c**). Feixe procambial (**fp**); Epiderme (**ep**); Floema (**f**); Drusa (**d**). As setas indicam os laticíferos e os asteriscos grânulos de amido em células do parênquima cortical. Barra = 100µm. Fonte: autor.

Os quatro grupos de células meristemáticas, que originarão as raízes adventícias, estão localizados abaixo do colo e das lacunas situadas entre os feixes procambiais (feixes vasculares) do hipocótilo. Assim, é formado um arranjo com quatro ângulos diametralmente opostos. Cada ângulo será o ponto de conexão de uma raiz adventícia com dois feixes procambiais durante a formação do sistema radicular em plântulas de *J. curcas*, como pode ser observado nas secções transversais em série no sentido hipocótilo-radícula, após protrusão radicular com 72 horas de embebição em água (Figura 8).

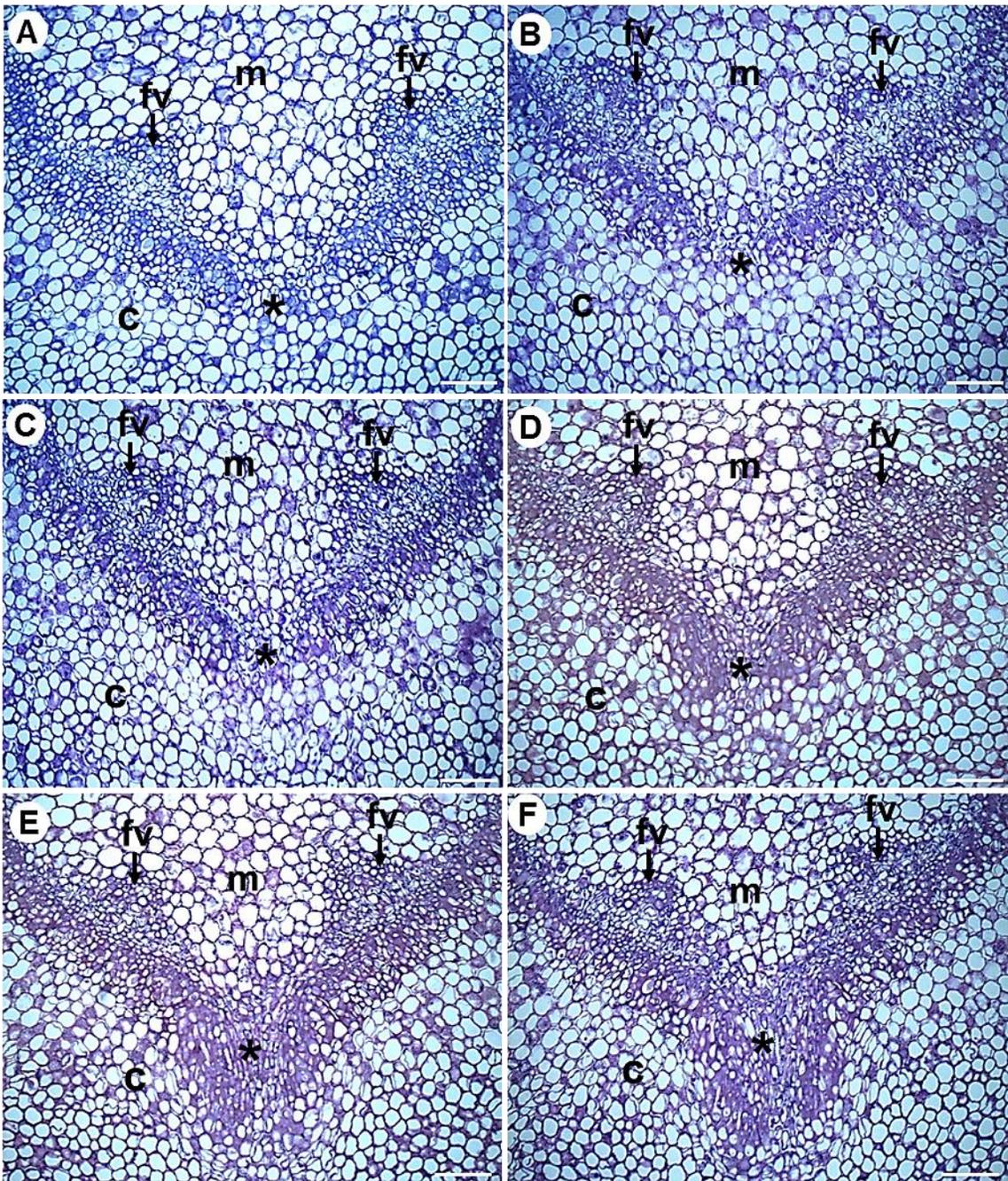


Figura 8. Série de secções transversais do hipocótilo para a radícula (A-F) no eixo embrionário de *Jatropha curcas* L., após protrusão radicular (72 horas de embebição em água). Em detalhe, a formação de uma das quatro raízes adventícias no estreito espaço entre os feixes vasculares procambiais (asteriscos). Medula (**m**); Cortex (**c**); Feixe vascular (**fv**). Barra = 100µm. Fonte: autor.

Assim, os quatro espaços entre os feixes vasculares do procâmbio são conectados ligeiramente abaixo do colo, resultando numa medula, circundada pelo cilindro do procâmbio, que é contínuo com o hipocótilo através da raiz principal (Figura 9). Em plântulas coletadas após uma semana da embebição das sementes em água, o sistema radicular primordial já se encontra completamente formado, bem como sua conexão com os tecidos condutores (Figura 9C).

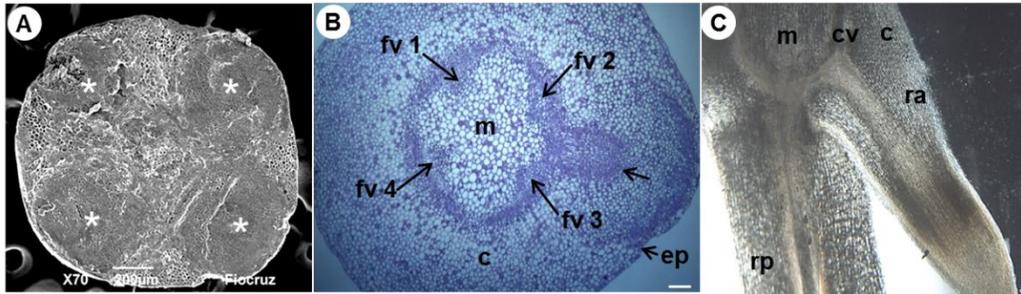


Figura 9. Secções anatômicas em *Jatropha curcas* L. (A) Eletromicrografia de secção transversal mostrando a localização dos 4 meristemas (asteriscos) em embrião de semente seca. (B) Secção transversal na área de transição hipocótilo-radícula, após 72 horas de embebição em água. São visíveis os 4 feixes vasculares formando um anel em torno da medula, conectados pela formação de uma raiz adventícia que cresce através do córtex e epiderme. (C) Sistema radicular já formado em uma plântula com 8 dias. Raiz principal (**rp**); Raiz adventícia (**ra**); Medula (**m**); Córtex (**c**); Feixe vascular (**fv**); epiderme (**ep**); Cilindro vascular (**cv**). Barras = 100µm. Fonte: autor.

Um padrão semelhante de formação inicial de sistema radicular foi descrito por POPHAM (1947) em *J. cordata*, porém o autor verificou que os tecidos característicos das raízes adventícias só se diferenciavam no primeiro ou segundo dia após a semeadura.

Os meristemas laterais são pré-estabelecidos durante a embriogênese. A grande atividade celular no floema primário indica que estes meristemas podem ser originados de regiões de células do córtex interno ou cilindro central externo. As raízes adventícias são geralmente de origem endógena, iniciando sua formação próxima aos tecidos vasculares e crescendo através dos tecidos localizados em torno do seu ponto de origem (EVERT, 2007).

Estudos envolvendo o enraizamento de estacas originárias de plantas adultas de *J. curcas*, sob diferentes concentrações de Ácido-3-indolbutírico (AIB), constataram que as raízes adventícias primordiais se originavam da endoderme (tecido próximo aos feixes vasculares e fora do cambio) e não dos calos. Estas começam a se desenvolver no oitavo dia e emergem através da

epiderme após o décimo primeiro dia (NOOR CAMELLIA et al., 2009). O conhecimento sobre a formação de raízes adventícias é de grande interesse econômico para propagação de plantas via estaquia. Enquanto estacas de algumas espécies são difíceis de enraizar, outras não requerem tratamento com reguladores de crescimento (como auxina) para promover o crescimento de raízes adventícias (SYROS et. al., 2004). Segundo Heller (1996) plantas de *J. curcas* propagadas via estaquia, apresentam muitas desvantagens. Estas não produzem a raiz principal, conseqüentemente possuem menor capacidade para atingir a água do solo e a reserva de nutrientes, apresentando baixo potencial de rendimento e menor longevidade. Além disso, a ausência da raiz pivotante resulta em menor estabilidade quando a planta está exposta à determinadas condições de vento, já os indivíduos produzidos a partir de sementes seriam a melhor escolha em sistemas agroflorestais.

Além de sustentação, a raiz é o órgão responsável pela fixação, absorção, reserva de metabólitos e condução de nutrientes e água para toda a planta. A absorção efetiva de água pela planta se dá através das raízes e é maximizada pelo crescimento destas, assim como dos pêlos radiculares (TAIZ & ZAIGER, 2009). Vale ressaltar que a raiz é um órgão extremamente sensível aos estresses ambientais. O meristema apical desempenha um papel fundamental na resposta imediata a fatores de estresses biótico e abiótico, ativando cascatas de sinais que são enviados a outros órgãos da planta (BAGNIEWSKA-ZADWORNA, 2008). Estudos relatam que o sistema radicular das plântulas do gênero *Jatropha* consiste de uma raiz primária e 4 a 5 raízes adventícias e a raiz principal se diferencia diretamente abaixo da parte inferior do hipocótilo (MURTHY et al., 2013).

O presente estudo confirma que *J. curcas* apresenta um padrão morfoanatômico diferenciado. Nesta espécie os embriões de sementes maduras possuem uma radícula multimeristemática composta de um meristema central principal e quatro meristemas laterais. A germinação é completada com a protrusão simultânea de uma raiz principal e quatro pequenas raízes adventícias, todas crescendo simultaneamente durante a formação inicial do sistema radicular. A morfologia do meristema apical da raiz do eixo embrionário de *J. curcas* pode estar relacionada com a adaptação desta espécie a ecossistemas adversos, como ambientes com baixa disponibilidade hídrica, estresse nutricional, presença de predadores e patógenos, sustentação em solos rasos e pedregosos, comum no semiárido brasileiro, onde a espécie se encontra bem adaptada.

4 REFERÊNCIAS

- AÑEZ, L. M. M.; COELHO, M. F. B.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; DOMBROSKI, J. L. D. Caracterização morfológica dos frutos, das sementes e do desenvolvimento das plântulas de *Jatropha elliptica* Müll. Arg. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n° 3, p.563-568, 2005.
- APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 3ª edição, 2013. 438p.
- BAGNIEWSKA-ZADWORNA, A. The root microtubule cytoskeleton and cell cycle analysis through desiccation of *Brassica napus* seedlings. **Protoplasma**, v.233, p.177-185, 2008.
- BEWLEY, J. D.; NONOGAKI, Hiro.; HILHORST, Henk W. M.; BRADFORD, Kent J. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3ª edição. New York: Springer-Verlag, 2012, 392p.
- BRASILEIRO, B. G.; DIAS, D. C. F. S.; BHERING, M. C.; DIAS, L. A. S. Floral biology and characterization of seed germination in physic nut (*Jatropha curcas* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n° 4, p. 556-562, 2012.
- BRITTAINE, R.; LUTALADIO, N. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Jatropha: A Smallholder Bioenergy Crop The Potential for Pro-Poor Development**. Vol. 8, Roma, 2010. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/012/i1219e/i1219e00.pdf>. Acesso em 17 de novembro de 2010.
- CARTENÌ, F. Modelling the development and arrangement of the primary vascular structure in plants. **Annals of Botany**, v.114, p. 619-627, 2014.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4ª edição, Jaboticabal: Funep, 2000. 588p.
- ESAU, K. **Anatomy of seed plants**. 2ª edição, New York, John Wiley, 1977. 550p.
- EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells and Tissues of the Plant Body. Their Structure, Function and Development**. Blucher, 3º edição, 2007, 293 p.

FRIIS, E. M.; PEDERSEN, K. R.; CRANE, P. R. Diversity in obscurity: fossil flowers and the early history of angiosperms. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.365, p. 369-382, 2010.

GEORGE, E. F.; IAI, M. A.; KLERK, G. J. **Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background**. 3ª edição, Dordrecht: Springer, 2008. 520p.

GOLDBERG, R. B.; DE PAIVA, G.; YADEGARI, R. Plant embryogenesis - zygote to seed. **Science**, v.266, p. 605-614, 1994.

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

HENRICK, P.; STRULLU-DERRIEN, C. The Origin and Early Evolution of roots. **Plant Physiology**, v. 166, p. 570-580, 2014.

ISLAM, A. K. M. A.; YAAKOB, Z.; ANUAR, N. *Jatropha*: A multipurpose plant with considerable potential for the tropics. **Scientific Research and Essays**, v.6, nº.13, p. 2597-2605, 2011.

JONGSCHAAP, R.E.E; CORRE, W. J.; BINDRABAN, P. S.; BRANDENBURG, W. A. Claims and Facts on *Jatropha curcas* L. Global *Jatropha curcas* evaluation, breeding and propagation program. **Plant Research International**, Wageningen, v. 1, n. 158, p. 1-42, 2007.

KRISHNAMURTHY, K. V.; VENKATASUBRAMANIAN, P.; LALITHA, S. Laticifers of *Jatropha*. In: BAHADUR, B.; SUJATHA, M.; CARELS, N. (Eds). **Jatropha**, Challenges for a New Energy Crop, capítulo 1, p. 3-10, 2013.

LINKIES, A.; GRAEBER, K.; KNIGHT, C.; LEUBNER-METZGER, G. The evolution of seeds. **New Phytologist**, v. 186, p. 817-831, 2010.

LOUREIRO, M. B.; TELES, C. A. S.; COLARES, C. C. A.; ARAÚJO, B. R. N.; FERNANDEZ, L. G.; CASTRO, R. D. Caracterização morfoanatômica e fisiológica de sementes e plântulas de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). Viçosas/MG, **Revista Árvore**, v. 37, n. 6, pág. 1093-1101, 2013.

MONTERO, D. S.; COLARES, C.C.A.; TELES, C.A.S.; FERNANDEZ, L. G.; CASTRO, R. D. ; LOUREIRO, M. B. **Caracterização Morfológica de Sementes e do Desenvolvimento Pós-seminal de *Jatropha curcas* L. (EUPHORBIACEAE)**. In: 60º Congresso Nacional de Botânica, 2009, Feira de Santana - BA. Anais do 60º Congresso Nacional de Botânica, 2009.

MUNNÉ-BOSCH, S. Perennial roots to immortality. **Plant Physiology**, v.166, nº2, p.720-725, 2014.

MURTHY, G. V. S.; CHAMUNDESWARI, E.; GOVERDHEN, S.; BAHADUR, Bir. Fruit, Seed and Seedling Characters in *Jatropha* L. In: BAHADUR, B.; SUJATHA, M.; CARELS, N. (Eds). **Jatropha, Challenges for a New Energy Crop**, 2013, capítulo 7, p. 95-118.

NIKLAS, K. J. **The evolutionary biology of plants**. Chicago: University of Chicago Press, 1997, 470 p.

NOOR CAMELLIA, N.A., THOHIRAH, L.A., ABDULLAH, N. A. P.; MOHD KHIDIR, O. O. Improvement on Rooting Quality of *Jatropha curcas* Using Indole Butyric Acid (IBA). **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 5, n. 4, pág. 338-343, 2009.

NUNES, C. F.; SANTOS, D. N.; PASQUAL, M.; VALENTE, T. C. T. Morfologia externa de frutos, sementes e plântulas de pinhão manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, nº.2, p.207-210, 2009.

POPHAM, R. A. Developmental anatomy of seedling of *Jatropha cordata*. **The ohio journal of science**, v. 47, n. 1, p. 1-20, 1947.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2007. 906p.

SILVA, L. M. M.; AGUIAR, I. B.; TERTULIANO, S. S. X. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Cnidoculus juercifolius* Pax & K. Hoffm (Euphorbiaceae). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v.7, nº. 2, p. 1519-5228, 2007.

SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. The origin and diversification of angiosperms. **American Journal of Botany**, v.91, nº.10, p.1614-1626, 2004.

SYROS, T.; YUPSANIS, T.; ZAFIRIADIS, H.; ECONOMOU, A. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. **Journal of Plant Physiology**, p. 69-77, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

CAPÍTULO 4

EVOLUÇÃO DA MORFOLOGIA DE ESTÔMATOS PRESENTES NO EIXO EMBRIONÁRIO DE *JATROPHA CURCAS* L.

RESUMO

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae) possui ampla distribuição no Brasil e no mundo. Esta espécie tem atraído o foco de diversas pesquisas por produzir sementes ricas em óleo que pode ser utilizado para fabricação de biodiesel. No entanto, pouco se sabe sobre os eventos morfofisiológicos que coordenam o processo germinativo de suas sementes. O presente estudo teve como objetivo a análise morfológica e busca por evidências funcionais que governam a ocorrência de estômatos, visualizados na área de transição hipocótilo-radícula em embriões de sementes maduras de *J. curcas*, provavelmente gerados durante a embriogênese. Imagens microscópicas revelaram o formato reniforme típico das células-guarda de estômatos de dicotiledôneas, as quais apresentaram tamanhos variados e um período de vida relativamente curto, limitado ao período germinativo e crescimento inicial da plântula. As células-guarda não conseguem acompanhar a taxa de alongamento das células epidérmicas vizinhas, conseqüentemente, os estômatos se rompem na região mediana, transversalmente ao eixo estomático. As duas partes rompidas formam uma grande abertura na câmara estomática, assim são geradas grandes cavidades no tecido epidérmico acima das raízes adventícias. As evidências indicam que a presença desses estômatos deve favorecer o aumento do aporte de O₂ durante as trocas gasosas, enquanto que a cavidade formada pode facilitar a transferência de água e nutrientes devido ao intenso metabolismo energético exigido para crescimento simultâneo das cinco raízes que se desenvolvem a partir da radícula multimeristemática presente em embriões desta espécie.

Palavras-chave: Euphorbiaceae. Sementes. Hipocótilo-radícula. Células-guarda.

ABSTRACT

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae) is spread worldwide including Brazil and has been increasing focus of research as it produces seeds rich in oil that can be used to produce biodiesel. However, little is known about the morphophysiological events that coordinate the germination of seeds of this species. This study aimed at the morphological analysis and search for functional evidence that govern the occurrence of stomata in the hypocotyl-radicle transition area in embryos from mature *J. curcas* seeds. These are stomata that were probably generated during embryogenesis, showing varying sizes and a period of relatively short lifespan limited to the germination and subsequent seedling growth, when the guard cells are not able to keep pace with the elongation of neighboring epidermal cells. Therefore, the stomata disrupt in its mid-region, transversely to the stomatal axis, while the disrupted parts are dragged beyond an opening in the stomatal cavity, forming a large cavity in the epidermal tissue above the adventitious roots that develop underlying. These results suggest that the presence of stomata would favor an increase of the O₂ supply while the larger cavity formed subsequently would facilitate the transfer of water and nutrients to couple with intense energy metabolism probably demanded for the simultaneous growth of the five roots that originated from the multimeristematic radicle present in embryos of this species.

Key words: Euphorbiaceae. Seeds. Hypocotyl-radicle. Guard cells.

1 INTRODUÇÃO

Estômatos são estruturas epidérmicas altamente especializadas, compostas por duas células-guarda delimitando um poro, e são circundadas pelas células subsidiárias (TAIZ & ZEIGER, 2009). Atuam como válvulas moleculares nas trocas gasosas (CO₂ e O₂), necessárias para otimizar a fotossíntese e restringir a perda de água por transpiração, ajustando a planta ao seu habitat (MOHR & SCHOPFER, 1995; DASZKOWSKA-GOLEC & SZAREJKO, 2013). Esta habilidade, juntamente com o acoplamento dos estômatos ao sistema vascular, é considerada um dos principais fatores que possibilitaram às plantas vasculares colonizarem rapidamente diferentes ambientes na Terra (RAVEN, 2002; HAWORTH et al., 2011).

As células do complexo estomático exibem uma simetria estrutural e funcionamento integrado, como resultado de uma sequência precisa de desenvolvimento e diferenciação, onde os microtúbulos corticais controlam a deposição das microfibrilas de celulose na parede celular, afetando o padrão de espessamento e definindo as propriedades mecânicas das células-guarda (SMITH, 2003; GALATIS & APOSTOLAKOS, 2004). Número, distribuição, tamanho, forma e mobilidade dos estômatos são características espécie-específicas, embora eles também variem com o habitat e de um indivíduo para outro (LARCHER, 2003).

Estômatos ocorrem em todas as partes aéreas do corpo primário da planta, porém são mais abundantes nas folhas. Raízes normalmente não apresentam estômatos, mas essa característica tem sido observada em algumas espécies, incluindo membros da família Asteraceae (*Helianthus annuus*) e Fabaceae (*Pisum arvense*, *Ornithophus sativum* e *Ceratonia siliqua*) (EVERT, 2007). Em diversas espécies do gênero *Jatropha* (Euphorbiaceae), tais como *J. gossypifolia*, *J. podagrica*, *J. multifida* e *J. curcas* foram observados estômatos em diferentes tecidos nos frutos e no tegumento das sementes (REDDY et al., 2013), mas nenhum trabalho reportou-se à ocorrência de estômatos no eixo embrionário de sementes dessas espécies.

O presente estudo teve como objetivo descrever a ocorrência de estômatos no eixo embrionário de sementes de *J. curcas* e caracterizá-los morfológicamente durante a germinação e estágios iniciais de crescimento de plântulas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

O material biológico utilizado neste trabalho foi produzido, em 2013, no campo experimental da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA), localizado no município de Alagoinhas (BA), latitude de 12° 08' – 12°10' S e longitude de e 38° 26' – 38° 30' W.

Sementes maduras secas de *J. curcas* foram desinfestadas superficialmente em solução contendo 0,125% de cloro ativo e Tween 20 (1 gota de Tween 20 para cada 100 mL de solução), sendo agitadas constantemente durante 10 minutos e em seguida submetidas a 5 lavagens com água destilada. O teste foi montado em rolo de papel tipo “germitest” (28 cm x 38 cm), umedecido com água destilada, na proporção de três vezes o peso do papel seco. As sementes foram dispostas no papel e levadas ao germinador (Eletrolab, Mod. EL202) ajustado à temperatura de 25°C, na ausência de luz. Cada rolo foi acondicionado em saco plástico para evitar o ressecamento do substrato e possíveis contaminações. Foram coletadas amostras nos seguintes períodos de embebição: 0 (semente seca), 24, 48, 72 (protrusão radicular), 96, 120, 144 e 168 horas - crescimento pós-germinativo (Figura 1A-C). Em sementes não germinadas (0-48 horas), o tegumento foi removido, expondo o eixo embrionário a partir do qual a área de transição hipocótilo-radícula até a extremidade radicular foi isolada (Figura 1A).



Figura 1. Sementes de *Jatropha curcas* L. em diferentes fases da embebição em água e protrusão da radícula. (A) Área excisada (linha vermelha) em embriões de sementes maduras secas (0 horas) até 48 horas em água; (B) Área excisada após 72 horas em água (protrusão radicular); (C) Área excisada após 96-168 horas em água. Fonte: autor.

2.2 Análises em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras coletadas foram fixadas em solução Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, com pH 7.2-7.4) por 24h. Em seguida, foram lavadas três vezes por 10 minutos em tampão cacodilato de sódio 0,1M e pós-fixadas por 1 hora, no escuro, à 4°C, numa solução contendo tetróxido de ósmio(OsO₄) a 2% e cacodilato de sódio 0,2M. Após esta etapa as amostras foram novamente lavadas, duas vezes em cacodilato de sódio 0,1M e desidratadas por sucessivas substituições em série gradual de acetona - 30, 50, 70, 90 e 100% (duas vezes), sendo cada lavagem com duração de 10 minutos.

Posteriormente, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico (Leica EM CPD 030) para secagem completa através da substituição da acetona por CO₂. Após esta etapa, as amostras foram fixadas em cilindros de alumínio com 12 mm de diâmetro (Stubs), por meio de fita de carbono adesiva em dupla face, e submetidas à metalização por vaporização de ouro em alto vácuo, a fim de aumentar a condutividade elétrica no momento das análises no MEV (JEOL JSM 6390 LV). Também foram realizadas observações em embriões de sementes secas de outras espécies do gênero *Jatropha* (*J. multifida*, *J. gossypifolia*, *J. podagrica*), visando comparar com o padrão observado para a espécie estudada. Os ensaios foram realizados na Plataforma de Microscopia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM – Fiocruz), Salvador - BA.

2.3 Análises em Microscópio Óptico

Para as observações anatômicas o material excisado foi fixado em solução contendo Paraformaldeído 4%, Glutaraldeído 3%, tampão Fosfato Salino (PBS) 0,1 M (pH 7.2) por 24 horas. Após a fixação, foram enxaguadas 4 x 15 minutos em PBS e 2 x 15 minutos em água bidestilada. Em seguida passaram por desidratação com trocas de solução hidroetanólica em concentrações gradativas de 10, 30, 50, 70, 96 e 100%, sendo agitadas constantemente em todas as concentrações durante 30 minutos, com exceção da concentração de 70% na qual as amostras ficaram mergulhadas durante a noite. A etapa de pré-infiltração consistiu em trocas da solução de etanol e solução A, esta contendo Glicolmetacrilato (Technovitt7100, Heraeus Kulzer), PEG 400 e peróxido de benzoila (Hardner I, Heraeus Kulzer) nas proporções 5:1/ 3:1/1:1/ 1:3, por duas horas cada ou deixando as mesmas durante a noite. Para polimerização em blocos, as amostras foram finalmente colocadas em moldes que foram rapidamente preenchidos com Solução B - Solução A e dimetilsulfóxido (Hardner II, Heraeus Kulzer) e cobertos com tampa plástica para

impedir a entrada de oxigênio e formação de bolhas. Em seguida, os moldes foram levados para estufa a 37°C e mantidas por 1 hora. Após a polimerização, os moldes foram aderidos em suportes plásticos, para seccionamento em paramicrotômo de rotação, usando-se metil metacrilato (Technovitt 3040, Heraeus Kulzer). Seções transversais e longitudinais com 4µm de espessura foram coradas com azul de toluidina a 1%, observadas em microscópio óptico (Nikon Optiphot) e fotografadas com câmera Panasonic wv-E 550 3-CCD. Os ensaios foram realizados nos Laboratórios de Fisiologia de Plantas e de Biologia Celular Vegetal da Universidade e Centro de Pesquisa de Wageningen (Wageningen University and Research Center - WUR).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observados, em embriões de sementes maduras secas de *J. curcas*, estômatos de vários tamanhos e irregularmente distribuídos na epiderme da região de transição hipocótilo-radícula. Estes são mais abundantes na área logo acima da região radicular composta por quatro meristemas, a partir dos quais se originam raízes adventícias (Figura 2A). Alguns estômatos ocorrem alinhados ou em grupos (Figura 2B-C). Não foram estômatos encontrados no ápice radicular, onde se encontra o meristema apical principal.

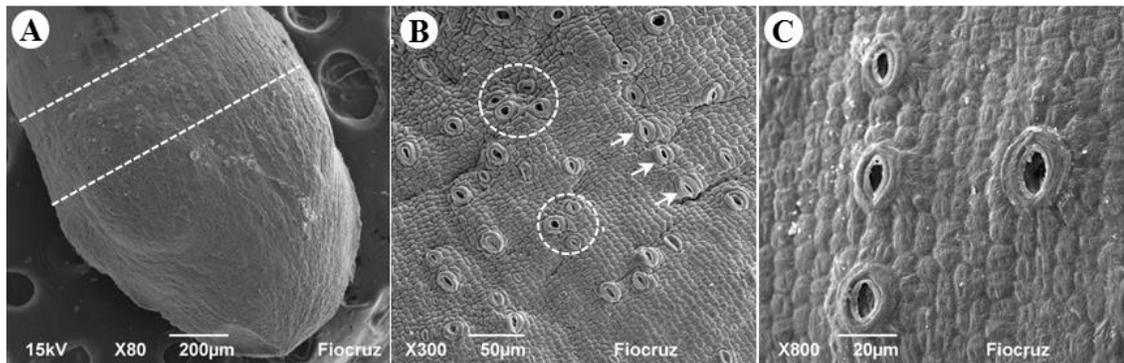


Figura 2. Estômatos em embriões de *Jatropha curcas* L. (A) Eletromicrografia mostrando localização e distribuição dos estômatos em embrião de sementes secas. As linhas brancas delimitam a área de maior densidade. (B) Padrão de distribuição dos estômatos alinhados (setas) ou em grupos (círculos). (C) Arranjo em fila e células epidérmicas alongadas após 24 horas de embebição em água. Fonte: autor.

Em embriões de sementes secas, foram visualizados estômatos com diferentes graus de turgescência (Figura 3A). Secções anatômicas de embriões após 24 horas de embebição em água mostram que alguns estômatos aparecem elevados, enquanto outros estão no mesmo nível das

células epidérmicas do eixo embrionário (Figura 3B). O fato dos estômatos se apresentarem abertos ou fechados sugere algum nível de funcionalidade.

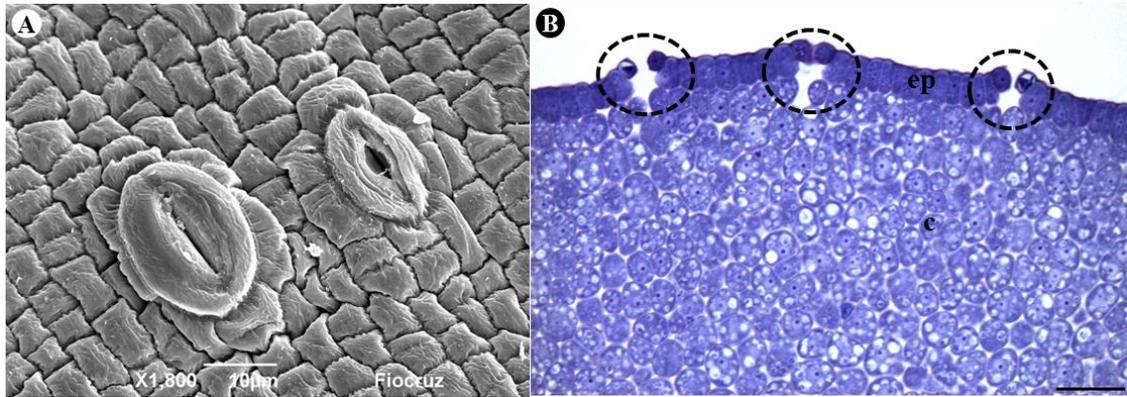


Figura 3. Estômatos abertos e fechados em embriões de *Jatropha curcas* L. (A). Eletromicrografia em embriões de sementes secas, evidenciando estômatos com e sem turgor e arranjo das células subsidiárias. (B). Secções transversais mostrando estômatos com diferentes graus de elevação na epiderme (círculos), após 24 horas de embebição em água. (Ep) Epiderme, (c) córtex. Barra em B = 100µm. Fonte: autor.

Foi possível observar, na zona epidérmica da área de transição hipocótilo-radícula, tanto a presença de estômatos imaturos (Figura 4) quanto a degeneração de estômatos pré-existentes (Figura 5). Foram verificados estômatos em diversos estádios de diferenciação em embriões de sementes secas (Figura 4A), bem como durante o processo germinativo, após 24 e 48 horas de embebição (Figura 4B-C, respectivamente).

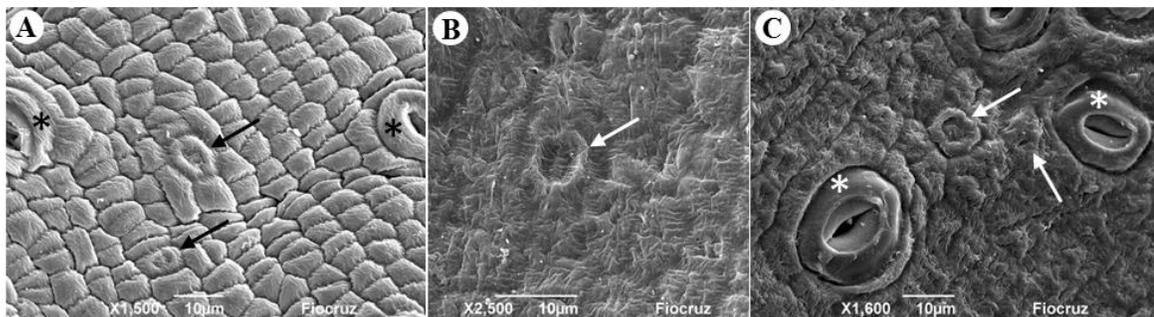


Figura 4. Estômatos em diversos estádios de diferenciação no eixo embrionário de *Jatropha curcas* L. (A) Estômatos maduros e imaturos (setas) em embriões de sementes secas. (B) Estômato imaturo (seta) observado após 24 horas de embebição. (C) Estômatos maduros (asteriscos) e imaturos (setas) observado após 48 horas de embebição. Fonte: autor.

Estômatos aparentemente maduros configuravam-se circundados por 5 a 8 células subsidiárias: uma ou duas células em cada polo e até três células em cada lado (Figura 3A). Esses estômatos demonstraram possuir um curto período de vida, uma vez que não foram capazes de acompanhar o alongamento da epiderme durante o crescimento das plântulas. Observou-se que, a partir da protrusão radicular (após 72h de embebição), as células subsidiárias e demais células epidérmicas apresentavam-se bastante alongadas, marcando o início do processo de degeneração estomática (Figura 5A).

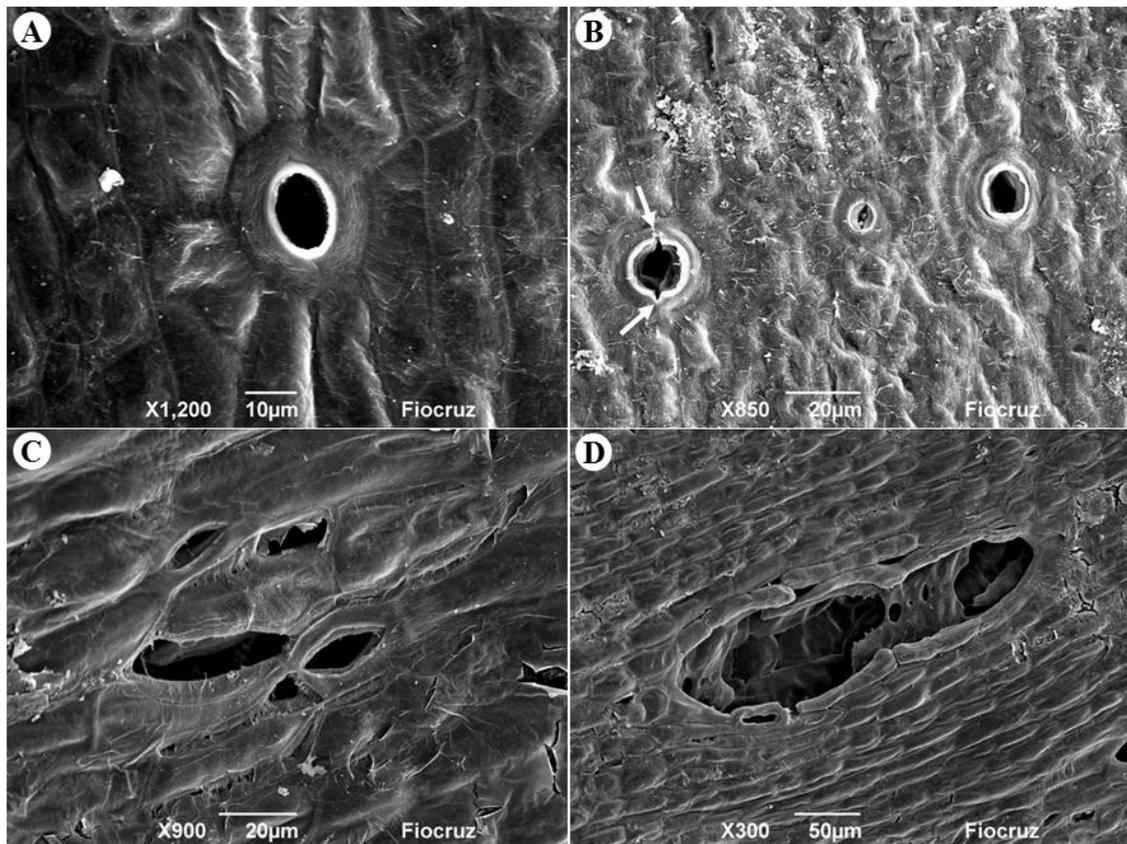


Figura 5. Degeneração dos estômatos do eixo embrionário de *Jatropha curcas* L. (A) Células subsidiárias alongadas após 72 horas de embebição em água. (B) Rompimento do estômato com fissura entre as duas células-guarda (setas), após 96 horas de embebição em água. (C) Separação entre as células-guarda e subsidiárias, e (D) cavidade formada após fissura e separação das células do complexo estomático, depois de 120 horas de embebição em água. Fonte: autor.

A partir desse estágio, os estômatos então se rompiam na região mediana entre as duas células-guarda (Figura 5B), fazendo com que metade do estômato (composto de uma das células-guarda) se separe da outra metade e das células subsidiárias (Figura 5C). Foram verificadas grandes áreas ocas abaixo da área fissurada (Figura 5D). Isto se deve, provavelmente, ao fato da cavidade subestomática ser estendida e conseqüentemente rompida durante o alongamento da plântula (CHRISTODOULAKIS et al.,2002). Nessa fase de ruptura, observada em plântulas a partir de 96h de embebição, as células-guarda não estão mais vivas e quase não é possível encontrar estômatos com uma configuração normal.

Estômatos ocorrendo na área de transição hipocótilo-radícula também foram observados em outras espécies do gênero *Jatropha*, como em *J. multifida*, *J. gossypifolia* e *J. podagrica* (Figuras 6A, 6B e 6C, respectivamente), sugerindo que se trata de uma estrutura comum para este gênero.

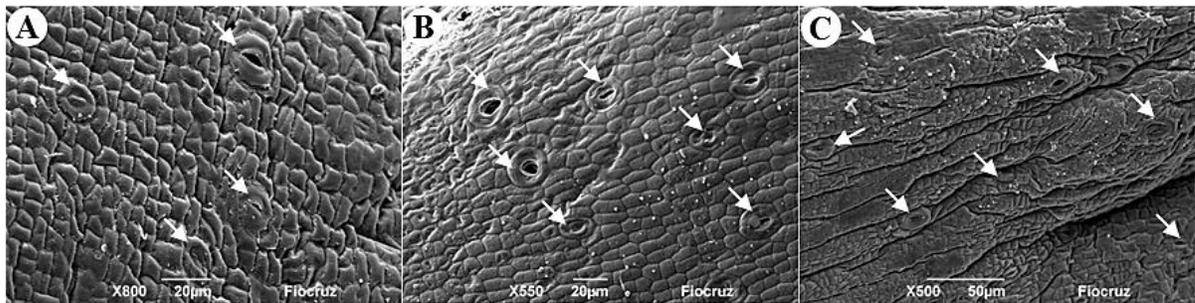


Figura 6. Estômatos no eixo embrionário em diferentes espécies do gênero *Jatropha*. (A) *Jatropha multifida*. (B) *Jatropha gossypifolia*. (C) *Jatropha podagrica*. Fonte: autor.

Sabe-se que os estômatos são estruturas originadas na epiderme, especializadas em controlar as trocas gasosas (O_2 e CO_2) e restringir a perda de água pela modulação dos níveis de transpiração (HAWORTH et. al., 2011; DASZKOWSKA-GOLEC & SZAREJKO, 2013). Como regra, os estômatos ocorrem nas partes aéreas do corpo primário das plantas, mais abundantemente em folhas, porém sua ocorrência já foi relatada em áreas não usuais em algumas espécies (EVERT, 2007). Em *Swietenia macrophylla* (Meliaceae), estômatos foram encontrados no tegumento de sementes, sugerindo que o papel dessas estruturas seria favorecer a respiração do embrião durante a embebição (PAIVA et. al., 2006). Também foi identificada a presença de raros estômatos no tegumento de sementes de *J. gossypifolia* (Euphorbiaceae) (OLIVEIRA &

PAOLI, 2014). Em diversas espécies do gênero *Jatropha* (Euphorbiaceae), inclusive *J. curcas*, estômatos estão presentes nas sépalas, cápsulas dos frutos e nos cotilédones anfiestomáticos (BAHADUR et al., 2013; MURTHY et al., 2013), contudo ainda não haviam sido descritos no eixo embrionário de *J. curcas*.

Outros autores mencionaram a ocorrência de estômatos acima do ápice radicular em plântulas de *Pisum arvense*, *Ornithopus stivum* e *Ceratonia siliqua* L. (Leguminosae) e na zona pilífera das raízes de *Helianthus annuus* (Asteraceae) e de outras quatro famílias de Angiospermas (Compositae, Cruciferae, Papilionaceae e Solanaceae). Todas possuíam a mesma estrutura estomática, composta de duas células-guarda em torno de uma grande abertura, ausência de células companheiras, inexistência de clorofila nas células-guarda, câmara subestomática pequena, assim como insensibilidade a ácido abscísico (TARKOWASKA & WACOWSKA, 1988; STASZEWSKA & TARKOWSKA, 1992; CHRISTODOULAKIS et. al., 2002).

A presença de estômatos em embriões de sementes secas de *J. curcas* indica que estes se formam durante a embriogênese e desenvolvimento da semente. Em *C. siliqua* foram verificados estômatos em diferentes estádios de diferenciação celular no ápice radicular de embriões de sementes secas e durante o crescimento de plântulas, sendo que os plastídios presentes nas células estomáticas não se diferenciavam em cloroplastos, e sim em amiloplastos funcionais (CHRISTODOULAKIS et. al., 2002).

O complexo estomático é gerado a partir de divisões diferenciais de células precursoras. A primeira divisão é assimétrica e resulta em uma célula-guarda mãe e uma célula subsidiária, e após uma divisão simétrica, a célula-guarda mãe se divide formando novas células-guarda reniformes que, após a abertura do poro, assumem sua constituição morfológica final (GALATIS & APOSTOLAKOS 2004; ABRASH & BERGMANN, 2009). Muitos estômatos não conseguem completar o seu desenvolvimento, e são chamados de estômatos abortados ou imaturos. Sua presença nas folhas de angiospermas é muito comum, se não universal (CROXDALE, 2000). No presente estudo, não foi possível constatar se os estômatos imaturos, presentes nos embriões de *J. curcas*, completam sua formação durante o processo germinativo ou se degeneram, antes de atingir a maturidade, com a retomada do crescimento do embrião.

O padrão de distribuição dos estômatos não deve ser randômico para garantir eficientes trocas gasosas sem grande perda de água, permitindo assim a adaptação das plantas às mudanças ambientais. A otimização deste arranjo depende da forma, tamanho das células e da câmara

subestômática (GLOVER, 2000). O gênero *Jatropha*, incluindo *J. curcas*, apresenta basicamente estômatos paracíticos, encontrados na epiderme de folhas, frutos, cotilédones e sépalas (DEHGAN, 1980; BAHADUR et al., 2013; MURTHY et al., 2013). Estômatos paracíticos são acompanhados, de cada lado, por uma ou mais células subsidiárias posicionadas paralelamente à fenda estomática (APPEZZATO-DA-GLÓRIA & CARMELLO-GUERREIRO, 2013).

As células-guarda reniformes são caracterizadas pela presença de paredes com espessamento desigual e matrizes de microtúbulos altamente organizados. As paredes periclinais contêm microtúbulos radiais ao redor do poro estomático, enquanto que nas paredes ventrais e dorsais os microtúbulos são orientados anticlinalmente. Este arranjo é de fundamental importância não só para a forma, mas também para o movimento dos estômatos (SACK, 1987; GALATIS E APOSTOLAKOS 2004).

Em raízes de plântulas de *C. siliquia*, Christodoulakis et al. (2002) também descreveram a formação de uma epiderme se abrindo extensivamente devido ao rompimento transversal de estômatos e sugeriram que, através dessas largas aberturas, o tecido interno da raiz primária poderia entrar em contato direto com o ambiente externo, aumentando as trocas gasosas e facilitando a transferência de nutrientes e água entre a raiz primária e seu ambiente. Este padrão morfofuncional talvez possa ser atribuído ao dos estômatos observados no eixo hipocótilo-radícula de embriões de *J. curcas* no presente estudo, favorecendo as trocas gasosas e transferência de nutrientes e água durante os eventos subsequentes de germinação e crescimento inicial das plântulas.

O caule de *J. curcas*, ligeiramente maduro, possui pequenas lenticelas ovais, esparsamente distribuídas numa superfície lisa e, quando secos, mostram finas estriações longitudinais. As raízes apresentam lenticelas bem desenvolvidas e irregularmente distribuídas. Estas são globulares nas partes jovens e alongadas nas regiões mais velhas. As lenticelas adjacentes se unem para formar uma nervura transversal na superfície da raiz e depois de certo estágio de crescimento, formam sulcos transversais (GUPTA, 1985). As lenticelas são de fundamental importância para às trocas gasosas entre os tecidos vivos e metabolicamente ativos com o ambiente externo, pois o súber é um tecido altamente impermeável à água e aos gases. As primeiras lenticelas geralmente surgem abaixo de um estômato ou grupo de estômatos. Elas podem aparecer antes do caule cessar seu crescimento primário e antes da periderme ser iniciada, ou podem surgir simultaneamente ao término do crescimento primário. As células do

parênquima sobre a câmara subestomática se dividem em vários planos, a clorofila desaparece, e é formado um tecido sem coloração (EVERT, 2007; RAVEN, 2007).

Considerando os dados avaliados até o momento, ainda não é possível definir exatamente o papel dos estômatos na região de transição hipocótilo-radícula em embriões de *J. curcas*. Como as plântulas dessa espécie formam cinco raízes (HELLER, 1996; KUMAR & SHARMA, 2008; BRITO, 2010; LOUREIRO 2013), há uma intensa atividade metabólica nessa região durante o processo de germinação e crescimento inicial das quatro raízes adventícias e da raiz principal. Desta maneira, a ocorrência destes estômatos poderia estar relacionada com o incremento das trocas gasosas, permitindo assim um maior aporte de O₂ e conseqüentemente maior catabolismo de glicose, e/ou aumento da transferência de alguns nutrientes e água durante a formação inicial do sistema radicular. Há ainda uma provável associação entre a evolução destes estômatos e a origem das lenticelas durante o estágio inicial de formação do caule.

4 REFERÊNCIAS

- ABRASH, E. B.; BERGMANN, D. C. Asymmetric Cell Divisions: A View from Plant Development. **Developmental Cell**, Review, v.16, n°.6, p. 783-796, 2009.
- ACHTEN, W. M. J.; VERCHOT, L.; FRANKEN, Y. J.; MATHIJS, E.; SINGH, V. P.; AERTS, A.; MUYS, B. *Jatropha* bio-diesel production and use. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v.32, n.12, p.1063-1084, 2008.
- APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia Vegetal**. Editora UFV, Viçosa. 3ª ed., 2013. 438p.
- BAHADUR, B.; PULLAIAH, T.; MURTHY, G.V.S. Systematics of Indian Jatrophas. In: BAHADUR, B.; SUJATHA, M.; CARELS, N. (Eds). **Jatropha, Challenges for a New Energy Crop**. Capítulo 10, 2013, p. 153-186.
- BRITO, C. B. **Germinabilidade de sementes de Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.) sob restrição hídrica: aspectos fisiológicos, moleculares e citológicos**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010, 51p.

CHRISTOUDOULAKIS, N. S.; MENTI, J.; GALATIS, B.; Structure and development of stomata on the primary root of *Ceratonia siliqua* L. **Annals of botany**, v. 89, p. 2329, 2002.

CROXDALE, J. L. Stomatal patterning in angiosperms. **American Journal of Botany**, v. 87, n°.8, p.1069-1080, 2000.

DASZKOWSKA-GOLEC, A.; SZAREJKO, I. Open or close the gate – stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. **Frontiers in plant science**, v. 4, n°.138, p. 116, 2013.

DEHGAN, B. Application of epidermal morphology to taxonomic delimitations in the genus *Jatropha*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 80, n°.3, p. 257-278, 1980.

EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells and Tissues of the Plant Body. Their Structure, Function and Development**. Blucher, 3° edição, 2007, 293 p.

GALATIS, B.; APOSTOLAKOS, P. The role of the cytoskeleton in the morphogenesis and function of stomatal complexes. **New Phytologist**, v.161, p. 613-639, 2004.

GLOVER, B. J. Differentiation in plant epidermal cells. **Journal of Experimental Botany**, v.51, n°.344, p. 497-505, 2000.

HAWORTH, M.; ELLIOT- KINGSTON, C; MCELWAIN, J. C. Stomatal control as a driver of plant evolution. **Journal Experimental Botany**, v. 62, n° 8, pág. 2419-2423, 2011.

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

JONGSCHAAP, R.E.E; CORRE, W. J.; BINDRABAN, P. S.; BRANDENBURG, W. A. Claims and Facts on *Jatropha curcas* L., **Plant Research International**, Wageningen, 2007.

KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. **Industrial crops and products**, v. 28, p. 1-10, 2010.

LARCHER, Walter. **Physiological plant ecology**. 4ª.ed. Berlin: Springer-Verlag, 2003. 513p.

LOUREIRO, M. B.; TELES, C. A. S.; COLARES, C. C. A.; ARAÚJO, B. R. N.; FERNANDEZ, L. G.; CASTRO, R. D. Caracterização morfoanatômica e fisiológica de sementes e plântulas de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). Viçosas/MG, **Revista Árvore**, v. 37, n. 6, pág. 1093-1101, 2013.

MOHR, Hans.; SCHOPFER, Peter. **Plant physiology**. Berlin: Springer Heidelberg, 1995. 629p.

MURTHY, G. V. S.; CHAMUNDESWARI, E.; GOVERDHEN, S.; BAHADUR, Bir. Fruit, Seed and Seedling Characters in *Jatropha* L. In: BAHADUR, B.; SUJATHA, M.; CARELS, N. (Eds). **Jatropha, Challenges for a New Energy Crop**, 2013, capítulo 7, p. 95-118.

OLIVEIRA, J. H. G. de.; PAOLI, A. A. S. Análises ontogenéticas em sementes de Euphorbiaceae. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 44, n.º.2, p. 165-178, 2014.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, v.19, p.1-15, 2000.

PAIVA, E. A. S.; LEMOS-FILHO, J. P. OLIVEIRA, D. M. T. Imbibition of *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) Seeds: The Role of Stomata. Oxford, Inglaterra, **Annals of Botany**, v. 98, p. 213-217, 2006.

RAVEN, J. A. Selection pressures on stomatal evolution. **New Phytologist**, v. 153, p. 371-386, 2002.

REDDY, M. P.; SUDHEER, P. D. V. N.; MASTAN, S. G.; RAHMAN H.; CARELS, N.; BAHADUR, B. Karyology and Genomics of *Jatropha*: Current Status and Future Prospects. In: BAHADUR, B.; SUJATHA, M.; CARELS, N. (Eds). **Jatropha, Challenges for a New Energy Crop**, 2013, capítulo 15, p. 301-320.

SACK, F. D. The development and structure of stomata. In: ZEIGER, E.; FARQUHAR, G. D.; COWAN, I. R. (Eds.). **Stomatal function**. Stanford, CA, USA: Stanford University Press, 1987, p. 59-89.

SMITH, L. G. Cytoskeletal control of plant cell shape: getting the fine points. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 63-73, 2003.

STASZEWSKA, U. M.; TARKOWSKA, J.A.; Stomata on the seedling roots in the representative of four families of angiosperms. **Fragmenta Floristica et Geobotanica**, Cracóvia, Polônia, v. 37, n°. 2, p. 425-430, 1992.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TARKOWSKA, J. A.; WAKOSKA, M. The significance of stomata on seedling roots. **Annals of Botany**, v. 61, p. 305-310, 1988.

WEBSTER, G.L. Classification of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, p.3-32, 1994.