



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE LIC. PLENA E BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

AUTOR:

OTONILSON DE SOUSA MEDEIROS

FITOSSANIDADE E MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE PINHÃO MANSO

Campina Grande – PB
Fevereiro/2012

OTONILSON DE SOUSA MEDEIROS

FITOSSANIDADE E MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE PINHÃO MANSO

Relatório referente ao Estágio Supervisionado do Bacharelado, apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Licenciado e Bacharel em Ciências Biológicas.

ORIENTADORAS:

DSc. Valeria Veras Ribeiro

DSc. Julita Maria Frota Chagas Carvalho

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

M488f Medeiros, Otonilson de Sousa.
Fitossanidade e micropropagação *in vitro* de pinhão manso
[manuscrito] / Otonilson de Sousa Medeiros. – 2012.
35 f. : il. color

Digitado.

Relatório de estágio supervisionado (Graduação em Ciências
Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde, 2012.

“Orientação: Profa. Dra. Valeria Veras Ribeiro,
Departamento de Biologia”.

“Orientação: Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho,
EMBRAPA-Algodão/PB”.

1. Fitossanidade. 2. Sementes. 3. *Jatropha Curcas* L.. I.
Título.

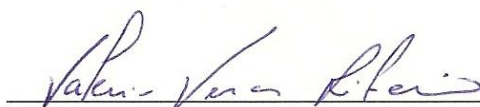
CDD 21. ed. 632.9

OTONILSON DE SOUSA MEDEIROS

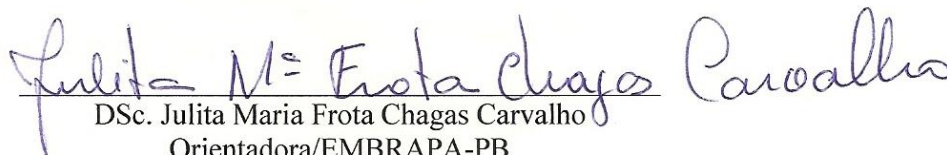
FITOSSANIDADE E MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE PINHÃO MANSO

Aprovado em 01/02/2012.

EXAMINADORES



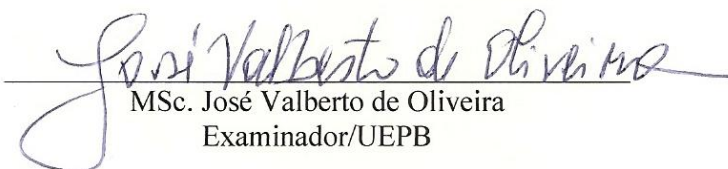
DSc. Valeria Veras Ribeiro
Orientadora /UEPB



DSc. Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Orientadora/EMBRAPA-PB



DSc. Márcia Adelino da Silva Dias
Examinadora/UEPB



MSc. José Valberto de Oliveira
Examinador/UEPB

Campina Grande – PB
Fevereiro/2012

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu Deus todo poderoso, razão da minha existência, e fundamentação da minha fé. A minha mãe por todo amor e ensinamentos e pela conduta moral irrepreensível ao longo da sua trajetória de vida e aos meus professores por todo apoio, incentivo e carinho recebidos.

O tolo pensa que sempre está certo, mas os sábios aceitam conselhos.

Provérbios 12:15

RESUMO

FITOSSANIDADE E MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE PINHÃO MANSO

MEDEIROS, O. S.; RIBEIRO, V. V.; CARVALHO, J. M. F. C.

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta da família Euphorbiaceae que vem sendo cogitada como uma das alternativas de matéria-prima para a fabricação de biodiesel. As sementes de pinhão manso ocupam duas importantes funções na cadeia produtiva desta oleaginosa: é a matéria-prima para extração do óleo e o material de propagação seminal, portanto, as sementes ocupam local de destaque e sua qualidade deve ser mantida para que as sementes possam expressar seu potencial. O teste de sanidade de sementes é fundamental para identificar patógenos que possam acometê-la e possivelmente afetar sua qualidade. Porém, devido ao fato do pinhão manso não ser ainda uma planta domesticada, em muitos casos, os plantios com essa cultura são desuniformes, prejudicando a produção. Contudo, alternativas para mitigar o problema surgem, dentre estas, encontra-se em grande destaque a multiplicação *in vitro* da espécie. Diante do exposto, objetivou-se, com este trabalho, estudar a micoflora e a micropropagação de *Jatropha curcas* L., visando identificar os agentes patogênicos que possam afetar o desenvolvimento da semente, bem como micropropagar para fins de estabelecimento de mudas. O trabalho foi desenvolvido em dois experimentos: o primeiro experimento considerou a análise sanitária das sementes; no segundo experimento foi estudado a micropropagação *in vitro* e *ex vitro* do pinhão manso. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e nos Laboratório de Biotecnologia Vegetal, da Embrapa Algodão, Campina Grande – PB. No decorrer da primeira etapa da pesquisa foi possível observar que os patógenos: *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. foram detectados tanto em sementes desinfestadas quanto em sementes não desinfestadas; *Aspergillus* sp. foi o fungo predominante nas sementes estudadas. Fungos do gênero *Rhizoctonia* sp. acometeram apenas as sementes desinfestadas. Fungos do gênero *Rhizopus* sp. foram encontrados apenas em sementes não desinfestadas. O maior percentual de emergência (53%) das plântulas foi observado aos 15 dias após a semeadura. Já no segundo experimento observou-se que os tratamentos contendo o BAP associado ou não à Quitosana em diferentes concentrações promoveram um acréscimo nas médias de número de folhas e número de brotos dos explantes.

Palavras chave: Fitossanidade, fitorreguladores, *Jatropha curcas* L., Micropropagação.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Sementes de <i>Jatropha curcas</i> L.....	18
FIGURA 2	Sementes de pinhão manso dispostas com a carúncula voltada para cima...	19
FIGURA 3	Amêndoas de pinhão manso após serem retirados os tegumentos (esquerda). Planta matriz (ao centro) e explantes nós cotiledonares inoculados em meio MS suplementado com fitoreguladores.....	20
FIGURA 4	Sementes de pinhão manso desinfestadas (A e B) e não-desinfestadas (C) alocadas em placas de Petri.....	22
FIGURA 5	Incidência de fungos em sementes desinfestadas (esquerda) e não desinfestadas (direita) de pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	22
FIGURA 6	Plântulas saudáveis de pinhão manso aos 15 dias após a semeadura.....	23
FIGURA 7	Percentual de emergência das plântulas de pinhão manso do 7º ao 15º dia após a semeadura.....	24
FIGURA 8	Brotos de pinhão manso (esquerda) superbrotamento com BAP; e ausência de superbrotamento com TDZ (direita).....	26

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Tratamentos utilizados no experimento. Campina Grande, 2011.....	21
TABELA 2	Quantidade e percentual de plântulas de pinhão manso emergidas no período de sete a quinze dias após a semeadura. Campina Grande, 2011 ...	23
TABELA 3	Resumo das Análises de Variância do número de brotos, número de folhas e número de calos em explantes de pinhão manso cultivado em diferentes concentrações de hormônios. Campina Grande-PB, 2011.	24
TABELA 4	Valores médios para o número de brotos, número de folhas e número de calos em explantes de pinhão manso cultivado em diferentes concentrações de reguladores de crescimento. Campina Grande-PB, 2011.	25

LISTA DE SIGLAS

BAP	6-Benzilaminopurine
°C	Graus Celsius
g	Gramas
L	Litro
mL	Mililitro
MS	Meio de cultivo Murashige e Skoog, 1962
pH	Potencial hidrogeniônico
QTZ	Quitosana
TDZ	Thidiazuron
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
$\mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	Micromol de fótons por metro quadrado por segundo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
2.1 O Pinhão manso.....	13
2.2 Sanidade das sementes.....	14
2.3 Multiplicação <i>in vitro</i>.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Caracterização do campo de estágio e etapas do desenvolvimento.....	18
3.1.1 Análise sanitária das sementes e germinação.....	18
3.1.2 Micropropagação.....	20
3.1.2.1 Condições gerais de cultivo.....	20
3.1.2.2 Desinfestação e Germinação.....	20
3.1.3 Superbrotamento.....	21
3.1.4 Procedimento estatístico.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	22
4.1 Emergência e sanidade de plântulas.....	22
4.2 Superbrotamento.....	24
5. CONCLUSÕES	27
5.1 Técnico-científicas.....	27
5.2 Acadêmico-científicas.....	27
6. REFERÊNCIAS.....	31

1. INTRODUÇÃO

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é considerado uma opção agrícola para regiões áridas e secas por ser uma espécie nativa, exigente em insolação e com forte resistência à seca (ARRUDA et al., 2004). Em razão de sua rusticidade, a distribuição geográfica da cultura é bastante vasta, com bom desenvolvimento tanto em regiões tropicais secas como em zonas equatoriais úmidas, assim como em terrenos áridos e pedregosos, suportando longos períodos de secas (SATURNINO et al., 2005).

É uma espécie oleaginosa que, por suas potencialidades, vem sendo considerada economicamente importante e tem como característica principal resistência à seca, além da produção de óleo com todas as qualidades necessárias para ser transformado em óleo diesel (ARRUDA et al., 2004). Atualmente, o óleo extraído da semente tem sido utilizado para fins energéticos. A torta (co-produto da *J. curcas* L.) é tóxica, e, portanto, inadequada para alimentação animal; entretanto, tem potencial como adubo orgânico, pois o farelo residual apresenta elevados teores de nitrogênio, fósforo e potássio. Esta oleaginosa tem importância agrícola, por fornecer matéria-prima para a produção de biocombustível, isto é, devido ao seu teor de óleo que varia entre 30 e 40%, com produção anual de 1.100 e 1.700L/ha (NUNES, 2007). Com essas características e por apresentar tolerância à seca, a cultura seria uma alternativa agrícola para a região Nordeste.

As sementes de pinhão manso ocupam duas importantes funções na cadeia produtiva desta oleaginosa: é a matéria-prima para extração do óleo e o material de propagação seminal, portanto as sementes ocupam local de destaque e sua qualidade deve ser mantida para que as sementes possam expressar seu potencial.

O teste de sanidade de sementes tem como objetivo determinar a condição sanitária de um lote de sementes, fornecendo informações para programas de certificação, serviços de vigilância vegetal, tratamento de sementes, melhoramento de plantas e outros (MACHADO, 2000). Por isso, torna-se necessário a adoção desse teste para uma cultura que se encontra em plena expansão.

A espécie *Jatropha curcas* L. se propaga por via seminal e vegetativa e conforme Nunes et al. (2008) plantios desuniformes, com uso de sementes, e a baixa demanda de material vegetal (estacas), e também pelo sistema radicular incompleto, têm sido apontados como os principais fatores que limitam a expansão da cultura. Assim, pesquisas a respeito de multiplicação *in vitro* da espécie são imprescindíveis.

A cultura de tecidos permite o crescimento e a multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta (explante) sobre um meio nutritivo e em condições assépticas. Esta técnica se baseia principalmente no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade de produzir órgãos, como brotos e/ou raízes, num meio de cultura favorável.

Atualmente no Brasil, a micropropagação vem sendo muito utilizada, permitindo um acesso mais rápido dos agricultores à mudas de melhor qualidade, especialmente das variedades tradicionais e as desenvolvidas pelos programas de melhoramento genético. A técnica envolve o desenvolvimento *in vitro* de brotos a partir de gemas (ápices caulinares ou florais), nos quais é induzida a formação de novas gemas, em condições controladas de cultivo (ALVES et al., 2010). Com a micropropagação, faz-se uma seleção precoce de material superior e uma produção em larga escala em pequeno espaço físico e segundo Andrade (2002), o meio de cultura é o principal fator para uma regeneração *in vitro* com sucesso.

Dessa forma objetivou-se, com este trabalho, realizar o levantamento da micoflora no intuito de Identificar e isolar os agentes patogênicos que possam afetar a germinação das sementes e o desenvolvimento da plântula de *Jatropha curcas* L.; Avaliar a taxa de germinação e sanidade das plântulas no intuito de verificar o desenvolvimento dos embriões e os possíveis danos causados pelos patógenos endo e exógenos nesse processo; e por fim analisar a taxa de germinação das sementes *in vitro*, na busca de tentar estabelecer um protocolo de regeneração, estudando a melhor concentração dos fitorreguladores 6-Benzilaminopurine (BAP), Thidiazuron (TDZ), e do copolímero Quitosana (QTZ) e das combinações: BAP + QTZ e TDZ+ QTZ.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O Pinhão manso

O biodiesel é um combustível obtido a partir de matérias-primas vegetais ou animais. No Brasil, desde 2005 foi aprovada a Lei Brasileira do Biodiesel (Lei Nº 11.097 de 13 de Janeiro de 2005), a qual obrigou a adição de 3% de biodiesel ao diesel de petróleo. A partir de então foi intensificado estudos com diversas plantas oleaginosas que possam servir de matéria-prima para a fabricação do biocombustível.

Devido à grande extensão territorial do Brasil e diversidade de solo e clima, estima-se que existam aqui centenas de espécies de plantas oleaginosas com grande potencial para produzir óleo para fabricação do biodiesel. E neste cenário, o pinhão manso surge como um dos destaques, porém é uma planta pouco conhecida e necessita de estudos (BELTRÃO, 2006).

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta da família Euphorbiaceae que vem sendo cogitada como uma das alternativas de matéria-prima para a fabricação de biodiesel. É uma planta perene, rústica, ainda não domesticada e que se encontra em evidência devido ao teor de óleo encontrado em suas sementes, que varia de 33% a 36% (ALBUQUERQUE et al., 2008).

É um arbusto de crescimento rápido, que em condições naturais pode alcançar até quatro metros de altura. As folhas são verdes, esparsas e brilhantes, largas e alternas, em forma de palma com três a cinco lóbulos e pecioladas. Floração monóica, apresentando flores masculinas, em maior número, nas extremidades das ramificações e femininas nas ramificações (LOPES et al, 2007). Os frutos são do tipo cápsula ovóide, trilocular, contendo via de regra três sementes e sua produtividade é muito variável, dependendo da região, do método de cultivo e dos tratamentos culturais, bem como da regularidade pluviométrica e da fertilidade do solo (DRUMOND et al., 2010).

O pinhão manso, por ser uma planta asselvajada, apresenta significativa desuniformidade quanto a crescimento, arquitetura e desenvolvimento (ALBUQUERQUE et al., 2009). Apesar da grande demanda de informações sobre o pinhão-manso, os trabalhos de pesquisa se encontram em fase inicial. Ainda não há material selecionado, sistema de produção e zoneamento agrícola definidos; pouco se sabe do real potencial da planta. Assim, existe uma importante demanda por pesquisas na área de tecnologia de sementes e de produção de mudas (SOUZA et al., 2010).

2.2 Sanidade das sementes

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa m.4, autorizou em janeiro de 2008, a inscrição da espécie *Jatropha curcas* L. no Registro Nacional de Cultivares (RNC). A proibição de cultivo da espécie decorria, sobretudo, da ausência de pesquisas sobre o desempenho agrônomo da cultura e a ausência de estudos básicos sobre o desempenho das sementes (PINTO et al., 2009).

Vários estudos estão sendo desenvolvidos com o pinhão manso para que esta oleaginosa possa ser cultivada de maneira adequada. Estudos sobre a semente são de extrema importância, pois este insumo marca o início da vida na planta e qualquer problema na semente pode afetar todo o desenvolvimento do vegetal. Diante disso, é fundamental observar a sanidade das sementes, pois vários são os danos que podem acometê-la. Há danos que podem ser provocados por patógenos associados às sementes e estes danos podem culminar com a morte em pré-emergência, podridão radicular, tombamento de mudas, manchas necróticas em folhas, caules, frutos, deformações como hipertrofias e subdesenvolvimento, descoloração de tecidos e infecções latentes (NEERGAARD, 1979).

Aliada à expansão da cultura, nos últimos anos a comercialização de sementes de pinhão manso está sendo feita de forma desordenada, sem fiscalização e sem testes que visem à determinação da sua qualidade fitossanitária. Esse fato faz com que haja o risco de disseminação de fitopatógenos para diferentes áreas produtoras e a distribuição de sementes com baixo poder de germinação, o que resulta em prejuízos para os produtores (NEVES et al., 2009)

O teste de sanidade de sementes tem como objetivo determinar a condição sanitária de um lote de sementes, fornecendo informações para programas de certificação, serviços de vigilância vegetal, tratamento de sementes, melhoramento de plantas e outros (MACHADO, 2000). Portanto, torna-se necessário a adoção desse teste para uma cultura que se encontra em plena expansão.

Considerando a função da qualidade da semente, sua parcela de contribuição em um sistema de produção, pode chegar a 20%, sendo mantidas favoráveis as demais condições para o cultivo. Entretanto, para atributos de qualidade como a sanidade inicial das sementes, o referido diferencial pode ser ainda mais elevado e comprometedor, em razão dos tipos e intensidade com que agentes patogênicos podem associar-se às sementes em determinadas circunstâncias (MACHADO, 2010).

Segundo Aguiar et al. (2001), as sementes são eficientes meios de disseminação e de introdução de patógenos em áreas isentas. O inóculo inicial de epidemias pode depender da transmissão do patógeno pela semente, assim como reduzir a qualidade fisiológica das mesmas. Popinigis (1977) afirma que todos os fungos de armazenamento têm a capacidade de reduzir o poder germinativo da semente e causar a morte do embrião. Teores de água mais baixos na semente, próximos ao limite mínimo para o crescimento dos fungos, propiciam um ataque lento; todavia, na medida em que o teor de água da semente se eleva, ocorrem reduções no percentual germinativo em virtude do rápido crescimento de fungos.

A diversidade fúngica presente em sementes pode afetar diretamente a qualidade fisiológica destas. Sementes colhidas, beneficiadas e armazenadas sob condições inadequadas podem apresentar perda do poder germinativo e vigor e também servirem de veículo para a disseminação e/ou transmissão de patógenos. Dependendo das condições em que foram colhidas e armazenadas pode haver a prevalência de diferentes grupos de fungos nas sementes. Normalmente, fungos fitopatogênicos que ocorrem ainda em condição de campo perdem sua viabilidade em decorrência do tempo de armazenamento. Aliado ao decréscimo destes ocorre, normalmente, o acréscimo daqueles fungos tipicamente considerados “fungos de armazenamento”. Neste grupo de fungos usualmente prevalecem os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* que são fungos cosmopolitas e generalistas (SOARES et al., 2010).

Mas não só os fungos de armazenamento são de interesse, segundo escritos de Silva e Bettiol (2009) é provável que toda planta, potencialmente, abrigue microrganismos endofíticos em seus tecidos e que esses, nessa íntima relação, podem exercer efeitos benéficos nas plantas que servem de hospedeiras, como promoção de crescimento e controle de fitopatógenos.

Os endófitos, denominados assim por Petrini (1991), representam na atualidade uma crescente preocupação para o campo da Biotecnologia, devido não haver estudos concretos sobre sua ação durante as etapas de desenvolvimento da pesquisa *in vitro*, sendo notório que estes comprometerem, de alguma forma, os resultados esperados, visto que estes residem interno aos tecidos das plantas sem produzir estruturas externas visíveis (AZEVEDO *et al* (2000), o que porventura dificulta sua detecção.

Os endófitos diferem dos epífitos que vivem na superfície dos vegetais, e dos fitopatógenos, que lhes causam doenças (SOUZA, et al., 2004). Este mesmo autor afirma que as interações endófito/planta, ainda não são muito bem compreendidas, podendo ser de natureza simbiótica, neutra ou antagônica, esta última estudada pela fitopatologia.

Outro fator também preocupante é, na análise das implicações vegetativas, a baixa qualidade sanitária das sementes pode causar sérios prejuízos em sistemas agrícolas. Torna-se fácil entender os benefícios do uso de sementes com qualidade comprovada, isentas de agentes patogênicos. Esta condição pode ser indicada por meio de testes laboratoriais e garantida pelo rigoroso acompanhamento e manejo de alguns fatores nas fases de campo, beneficiamento e armazenamento (MACHADO, 2010).

Quando armazenadas, as sementes podem ser infectadas por um grupo de fungos, denominados “fungos de armazenamento”. Estes fungos são xerofíticos podendo crescer em umidade relativa (UR) de até 70%. Um dos gêneros de grande importância neste contexto é o *Aspergillus* sp. (DHINGRA, 1985).

A contaminação de sementes por patógenos pode ocorrer tanto no campo como nas operações subsequentes afetando a sua qualidade, reduzindo a sua capacidade germinativa, e causando tombamento de plântulas recém-emergidas (CARNEIRO, 1990). Portanto, a realização de estudos sobre associação de fungos encontrados em maior número e frequência em sementes e a avaliação do seu potencial patogênico é de fundamental importância, pois pode fornecer subsídios para modelos epidemiológicos, produção de mudas e armazenamento de sementes (SANTOS et al., 1997).

2.3 Multiplicação *in vitro*

De acordo com Nunes (2008) plantios desuniformes, com uso de sementes de baixa qualidade e a baixa demanda de material vegetal (estacas) têm sido apontados como os principais fatores que limitam a expansão do pinhão manso. Assim, pesquisas a respeito de multiplicação *in vitro* dessa espécie são imprescindíveis.

A cultura de tecidos é uma técnica de cultivo de plantas nos quais pequenos fragmentos de tecido vegetal, explantes, são isolados, desinfestados e cultivados assepticamente. Com esta técnica pode-se produzir plantas idênticas à original ou regenerar plântulas saudáveis, vigorosas e puras. (CARVALHO et al., 2010).

A Micropropagação oferece condições para se obter plantas de difícil propagação e de ciclos de vida longa, em menor espaço de tempo do que o método convencional. Esta técnica tem como finalidade primária dirigir o crescimento e o desenvolvimento do explante manipulado em condições de iluminação e temperatura controlada, além da adição de substâncias de naturezas diversas, principalmente reguladores de crescimento, ao meio de cultivo, e também variando a concentração de determinados nutrientes (CARVALHO, 1999).

O interesse em técnicas de micropropagação *in vitro* do pinhão manso tem sido crescente. Neste contexto, Carvalho et al. (2010) objetivando estudar os meios de cultivo desta cultura, verificaram que a germinação dos eixos embrionários depende do tratamento utilizado e complementam que sementes de pinhão manso com baixo poder germinativo, germinam e desenvolvem-se bem ao serem imersas e cultivadas em ácido giberélico na ausência e/ou presença de sacarose. Portanto, com a técnica de micropropagação, é possível fazer uma seleção precoce de material superior com uma produção em larga escala em pequeno espaço físico e, segundo Andrade (2002), o meio de cultura é o principal fator para uma regeneração *in vitro* com sucesso.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Caracterização do campo de estágio e etapas de desenvolvimento

A pesquisa desenvolveu-se nos Laboratórios de Fitopatologia e Cultivo de Tecidos localizados no setor de biotecnologia e Casa de Vegetação da Embrapa Algodão, situada em campina grande, PB.

As sementes foram provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Algodão, localizado na cidade de Patos, no sertão paraibano.



Figura 1 – Sementes de *Jatropha curcas* L.

3.1.1 Análise sanitária das sementes e germinação

O método aplicado para a análise da sanidade foi o de incubação em substrato de papel de filtro. Esse teste é muito utilizado por permitir um número maior de repetições, não envolver trabalho de laboratório especializado, ser um teste relativamente simples e por fornecer informações acerca das condições fitossanitárias das sementes (ONO et al, 1996).

Para a realização desse teste utilizou-se duas folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e contidas em placas de Petri, com dez repetições e dez sementes por placa, totalizando 200 sementes, sendo 100 com desinfestação superficial e 100 sem desinfestação superficial.

Para a desinfestação superficial primeiro quebrou-se a tensão superficial das sementes através da imersão em álcool a 70% por 30 segundos, depois foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 0,5% durante dois minutos e, em seguida, lavadas com água destilada esterilizada. As sementes sem desinfestação foram apenas lavadas com água destilada esterilizada. A desinfestação de sementes com hipoclorito é um procedimento importante,

pois permite verificar a ocorrência de fungos internos às sementes ou grãos (MAUDE, 1996; DHINGRA; ACUÑA, 1997).

Após a semeadura as placas de Petri, devidamente vedadas com papel filme, foram distribuídas, aleatoriamente, na câmara de incubação com temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e mantidas por sete dias sob regime alternado de 12h de luz e 12h de escuro. Após este período, foram feitas as avaliações examinando individualmente as sementes ao microscópio estereoscópico, para a identificação morfológica de estruturas fúngicas em nível de gênero. O resultado foi expresso em porcentagem de sementes infectadas.

O substrato escolhido para realização do teste de germinação foi a areia, por ser mais favorável ao processo de germinação de sementes de pinhão-manso (MARTINS et al., 2008). Para avaliar a germinação, as sementes foram semeadas em leito de areia esterilizada e mantidas em casa de vegetação por dez dias (PEREIRA et al., 2007). Foram realizados três repetições de 60 sementes, em bandeja com areia lavada, totalizando 180 sementes. Durante esse período as irrigações foram feitas em condição de campo. As leituras ocorreram aos 7, 9, 11, 13 e aos 15 dias, em que foi avaliado o percentual de emergência (PE). Foram consideradas germinadas as sementes que originarem plântulas normais, completas em suas estruturas essenciais, conforme critério estabelecido por Brasil (2009).

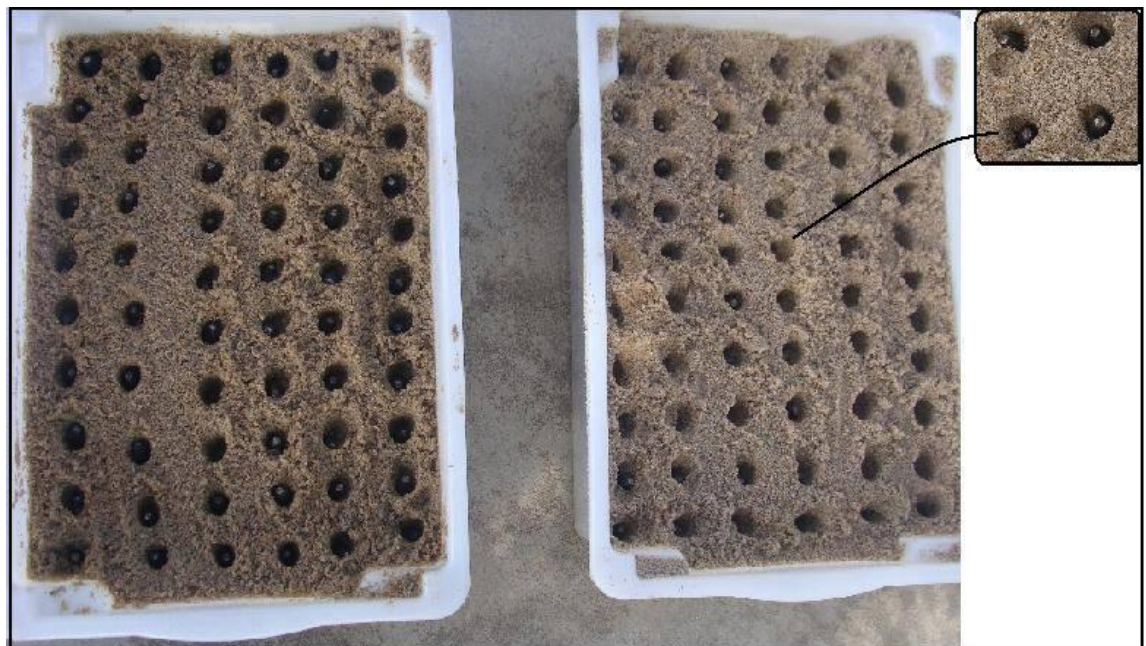


Figura 2. Sementes de pinhão manso dispostas com a carúncula voltada para cima

3.1.2 Micropropagação

3.1.2.1 Condições gerais de cultivo

O experimento foi realizado em condições assépticas, utilizando como meio de cultura básico, o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), que é uma combinação de sais minerais (micro e macronutrientes) além de 0,3mg/L. de Tiamina, suplementado com 30g. L⁻¹ de sacarose e 5,7g. L⁻¹ de Agar, com pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem e 120° C durante 20 minutos. A incubação foi realizada em sala de crescimento com temperatura de 25±5°C e fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de 30μmol. m⁻².s⁻¹. Os tubos foram fechados com tampa de polipropileno e vedados com fita filme.

3.1.2.2 Produção de planta matriz

As sementes de *Jatropha curcas* L., foram lavadas em água corrente com detergente e, após secas, retiraram-se seus tegumentos para em seguida mergulhá-las em álcool 70% por 1 minuto; a desinfestação foi em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% por 20 minutos. Em câmara de fluxo laminar (CFL) estas foram enxaguadas por três vezes em água destilada sendo, portanto, deixado imersas por 24 horas na última água. Ao final desse período de tempo, excisou-se seus eixos embrionários e inoculou-se em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), colocando-os em câmara escura até o desenvolvimento dos eixos embrionários, para em seguida mantê-los por 25 a 30 dias, a temperatura de 25±2°C e fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de 30μmol. m⁻².s⁻¹.



Figura 3 – Amêndoas de pinhão manso após serem retirados os tegumentos (esquerda) Planta matriz (ao centro) e explantes nós cotiledonares inoculados em meio MS suplementado com fitoreguladores

3.1.3 Superbrotamento

Após as plântulas desenvolverem as primeiras folhas permanentes, foram levadas para câmara de fluxo laminar, para serem excisados os explantes nós cotiledonares e, em seguida, inocular em meio de cultura MS, conforme os tratamentos discriminados na Tabela 1. As avaliações ocorreram aos 20 dias, e as variáveis avaliadas foram o número de brotos por explante (NB) e número de folhas (NF).

Tabela 1. Tratamentos utilizados no experimento. Campina Grande, 2011.

Tratamento (T)	Regulador de crescimento	Concentração mg/L
1	TDZ	0,005
2	QTZ	0,0025
3	QTZ	0,0038
4	QTZ	0,005
5	TDZ+QTZ	0,005+0,0025
6	TDZ+QTZ	0,005+0,0038
7	TDZ+QTZ	0,005+0,005
8	BAP	0,50
9	BAP+QTZ	0,50+0,0025
10	BAP+QTZ	0,50+0,0038
11	BAP+QTZ	0,50+0,005
12	0	0

TDZ = Thidiazuron; QTZ = Quitosana; BAP = 6-Benzilaminopurina

3.1.4 Procedimento estatístico

Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, com oito repetições e três explantes por frasco. Após a coleta de dados, foi realizada a análise da variância, e a comparação das médias realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Emergência e sanidade das plântulas

Tanto as sementes desinfestadas com hipoclorito (a 5%) como também aquelas que não passaram pelo processo de desinfestação prévia, foram acometidas por fungos (Figura 4).

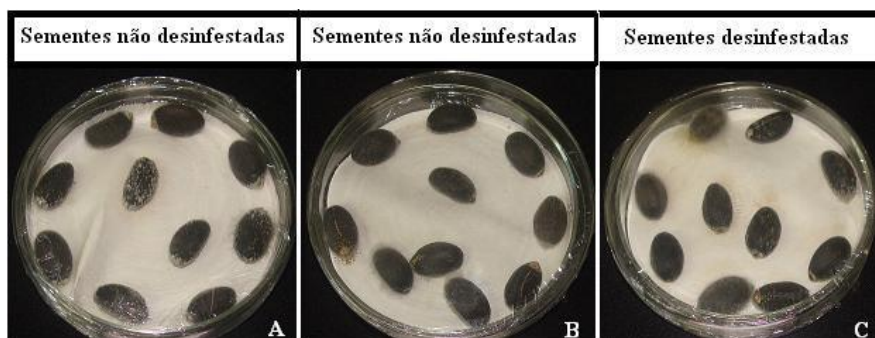


Figura 4: Sementes de pinhão manso desinfestadas (A e B) e não-desinfestadas (C) alocadas em placas de Petri.

No presente estudo, constatou-se maior incidência dos fungos do gênero *Aspergillus* sp. (26,0%), seguida por *Fusarium* sp. (12,0%) e *Rhizoctonia* sp. (5,0%) em sementes desinfestadas, (Figura 5 a esquerda). Quando as sementes não foram submetidas ao processo de desinfestação, os fungos observados foram do gênero: *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp., com percentuais de 71%, 21,2% e 10% respectivamente (Figura 5 a direita).

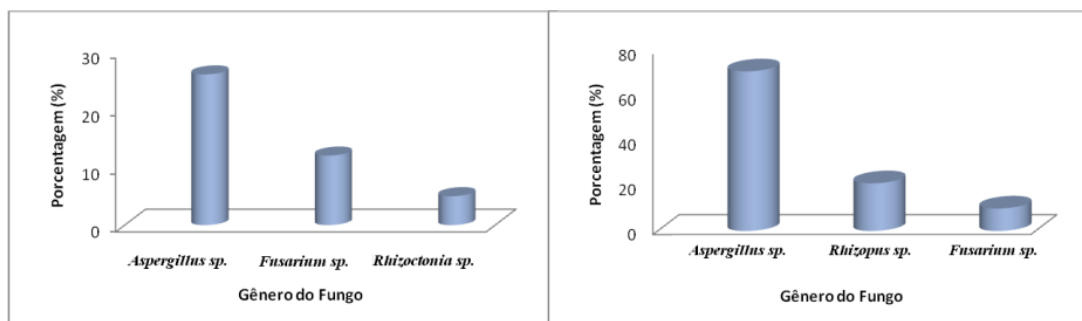


Figura 5: Incidência de fungos em sementes desinfestadas (esquerda) e não desinfestadas (direita) de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)

Sabendo-se da importância das sementes no sistema de produção do pinhão manso, faz-se necessário ampliar estudos na área de fitopatologia e sanidade das sementes dessa espécie para que sejam conhecidos os patógenos, seu potencial patogênico e o tratamento adequado para combater ou minimizar seus efeitos.

No teste de germinação, observa-se pelos dados contidos na Tabela 2 que a emergência das plântulas de pinhão manso teve início a partir do 7º dia após a sementeira e ao 15º foi registrado o maior percentual de plântulas saudáveis emergidas em 53% (Figura 6).



Figura 6 – Plântulas saudáveis de pinhão manso aos 15 dias após a sementeira

Considerando as cinco épocas avaliadas (7, 9, 11, 13 e 15 dias após a sementeira), foi registrada uma amplitude de variação de 0 % de plântulas emergidas aos sete dias a 53,33% de plântulas emergidas aos 15 dias após a emergência, o que representa 96 plântulas, considerando a sementeira de 180 sementes (Tabela 2).

Tabela 2. Quantidade e percentual de plântulas de pinhão manso emergidas no período de sete a quinze dias após a sementeira. Campina Grande, 2011 .

-----Emergência das plântulas-----							
	Bandeja 1		Bandeja 2		Bandeja 3		
DAS *	Plântulas emergida s	Emergência a (%)	Plântulas emergida s	Emergência (%)	Plântulas emergida s	Emergência (%)	MG
7	0	0,0	5	8,33	8	13,33	7,22
9	6	10	15	25,00	24	40,00	25
11	22	36,66	28	46,66	32	53,33	45,55
13	25	41,66	31	51,66	37	61,66	51,66
15	26	43,33	31	51,66	39	65,00	53,33

* = dias após a sementeira; MG = média geral

Os dados de emergência das plântulas registrados em cinco épocas se ajustaram ao modelo linear crescente, indicando que quanto maior o número de dias, contados a partir da sementeira, maior foi o número de plântulas emergidas (Figura 7).

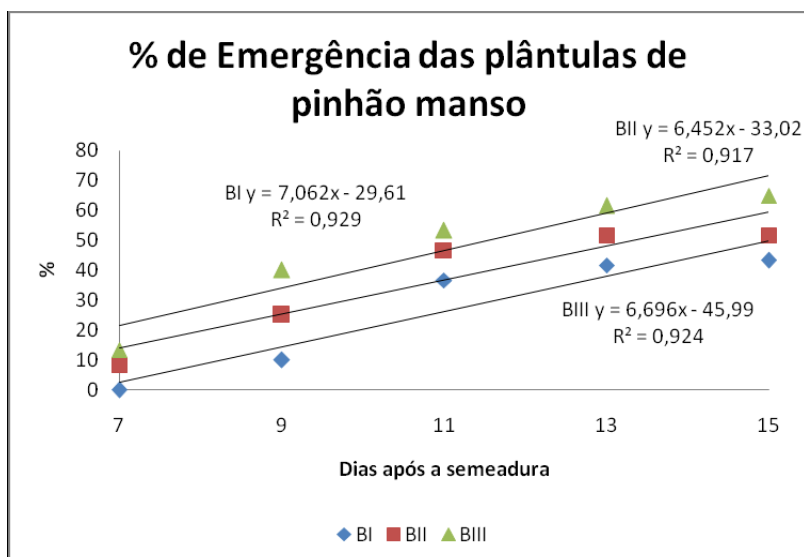


Figura 7 – Percentual de emergência das plântulas de pinhão manso do 7º ao 15º dia após a semeadura.

4.2 Superbrotamento

Pelos dados contidos na Tabela 3 pode-se inferir que houve efeito dos tratamentos sobre o número de brotos, número de folhas dos explantes de pinhão manso. Observa-se que para as variáveis analisadas os tratamentos exerceram influência significativa ($p \leq 0,01$).

Tabela 3. Resumo das Análises de Variância do número de brotos, número de folhas e número de calos em explantes de pinhão manso cultivado em diferentes concentrações de hormônios. Campina Grande-PB, 2011.

-----Quadrado Médio-----			
Fonte de Variação	GL	Número de brotos	Número de folhas
Tratamento	11	76,78**	187,66**
Resíduo	84	0,95	3,27
Total	95	-	-
CV (%)		47,05	52,34
Média Geral		2,07	3,45

** = significativo em nível de 1% de probabilidade.

Verifica-se através da Tabela 4 que o T11 promoveu o melhor desempenho para as variáveis: número de brotos e número de folhas aos 20 dias após o subcultivo. No referido tratamento, foi registrado uma média de 9,83 brotos por explante, diferenciando-se dos demais tratamentos e apresentando um percentual 99,2% superior à média obtida pelo tratamento testemunha (T12) onde se obteve apenas 0,08 brotos por explante e não diferindo dos tratamentos: 1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7.

Tabela 4. Valores médios para o número de brotos, número de folhas e número de calos em explantes de pinhão manso cultivado em diferentes concentrações de reguladores de crescimento. Campina Grande-PB, 2011.

Tratamentos (T)	Reguladores de crescimento	Concentração (mg/L)	Nº de brotos*	Nº de folhas**
1	TDZ	0,005	0,74 D	0,79 C
2	QTZ	0,0025	0,45 D	0,62 C
3	QTZ	0,0038	0,04 D	0,04 C
4	QTZ	0,005	0,25 D	0,29 C
5	TDZ+QTZ	0,005+0,0025	0,29 D	0,29 C
6	TDZ+QTZ	0,005+0,0038	0,08 D	0,08 C
7	TDZ+QTZ	0,005+0,005	0,33 D	0,33 C
8	BAP	0,50	5,15 B	9,12 AB
9	BAP+QTZ	0,50+0,0025	5,20 B	11,49 A
10	BAP+QTZ	0,50+0,0038	2,41 C	6,20 B
11	BAP+QTZ	0,50+0,005	9,83 A	12,07 A
12	0	0	0,08 D	0,08 C

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.

A aplicação do BAP+QTZ na concentração de 0,5+0,005 mg/l também favoreceu a maior média para o número de folhas (12 folhas) contabilizadas nos explantes, embora não diferindo do tratamento composto por BAP+QTZ na concentração de 0,5+0,025 mg/l, onde obteve-se 11 folhas e do tratamento onde utilizou-se apenas o BAP na concentração de 0,5 mg/l onde obteve-se em média 9 folhas por explante (Tabela 4).

Dentre as citocininas a 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido utilizada com comprovada eficácia para promover o cultivo de tecidos. No presente trabalho, pode-se constatar a eficiência desse hormônio na indução do número de brotos e número de folhas dos explantes que apresentaram o maior número de folhas e número de brotos (Figura 8 esquerda).

Luiz et al. (2008) testaram o meio MS acrescido de vitamina B5 e BAP em diferentes concentrações e constataram que a presença dessa citocinina favoreceu um maior número de brotos, corroborando, portanto, com os resultados para o número de brotos obtidos neste trabalho.

Grattapaglia e Machado (1998) afirmam que em diferentes espécies, as citocininas podem apresentar diferentes resultados. O crescimento e o padrão de desenvolvimento na maior parte dos cultivos *in vitro* estão diretamente relacionados com a composição do meio e a concentração dos reguladores de crescimento como o BAP, presente no meio.

Observou-se que nos tratamentos contendo o BAP (à 0,5 mg/l) associado ou não à Quitosana em diferentes concentração (0,0025; 0,0038 e 0,005 mg/l) promoveram um acréscimo as médias obtidas no número de brotos que obteve amplitude de variação de 5,15 a 9,83 e no número de folhas, que variou de 6,20 a 12,07. Neste contexto, Cordeiro et al. (2004) citam que o efeito benéfico do BAP na multiplicação de brotações relaciona-se com a influencia deste regulador de crescimento na divisão celular e na liberação celular das gemas auxiliares inibidas pela dominância apical.

O thidiazuron (TDZ) também tem sido usado na micropropagação, com resultados satisfatórios quando se objetiva a formação de calos em algumas espécies (HUETTEMAN; PREECE, 1993). Porém no trabalho em questão a formação de calogênese é prejudicial à organogênese direta. Como observado na Figura 8, à direita, os brotos regenerados com o uso desta citocinina se apresentam menos vigorosos e não ocorreu superbrotamento.

Morales et al. (1999) ao avaliar o efeito do BAP e do TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1, concluíram que o TDZ não é a citocinina mais indicada para a calogênese e organogênese em internódios de macieira, visto ocorrerem elevadas taxas de vitrificação dos tecidos. Todavia, os dados obtidos pelo autor supracitado divergem dos resultados levantados nesse trabalho, em que a expressiva calogênese, com o uso do TDZ, inibiu e prejudicou o desenvolvimento dos brotos de pinhão manso (Figura 8 a direita).

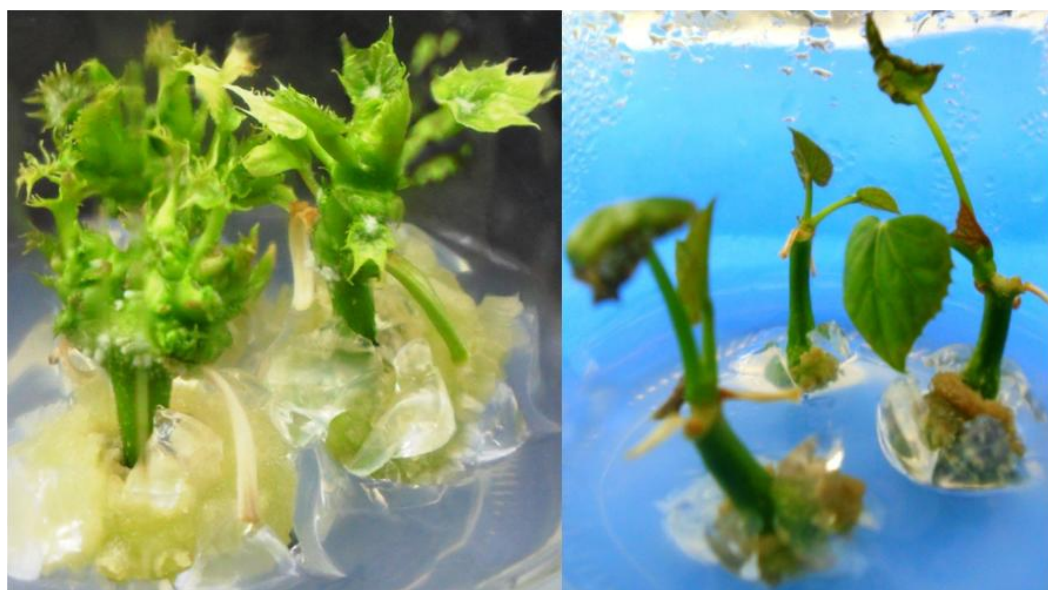


Figura 8 - Brotos de pinhão manso (esquerda) superbrotamento com BAP; e ausência de superbrotamento com TDZ (direita).

5. CONCLUSÕES

5.1 Técnico-científicas

De acordo com os dados levantados na pesquisa podemos afirmar que os patógenos: *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. foram detectados tanto em sementes desinfestadas quanto em sementes não desinfestadas e que *Aspergillus* sp. foi o fungo predominante nas sementes estudadas. Dentre os fungos registrados, os do gênero *Rhizoctonia* sp. acometeram apenas as sementes desinfestadas, já os fungos do gênero *Rhizopus* sp. foram encontrados apenas em sementes não desinfestadas. Na etapa de emergência das plântulas foi registrado o maior percentual (53%) aos 15 dias após a semeadura. Com relação a Micropropagação, os tratamentos contendo o BAP associado ou não à Quitosana em diferentes concentrações promoveram um acréscimo nas médias de número de folhas e número de brotos dos explantes, já o Thidiazuron, este foi responsável por induzir expressiva formação de calos nos explantes, o que provavelmente tenha inibido o desenvolvimento dos brotos adventícios.

5.2 Acadêmico-científicas

O estágio me proporcionou um contato direto com o universo da ciência, dos laboratórios de pesquisa e sua rotina, propiciando um diálogo efetivo com profissionais da área e com inúmeros teóricos experientes no assunto. Nesse ínterim destaca-se a imensurável contribuição dos supervisores do estágio, da UEPB e da Embrapa, sem os quais nada disso seria possível. Pelo volume de informação e pela vivência no transcorrer das atividades e nos eventos em que me fiz presente, pode-se afirmar que, de fato, o estágio garante significativas experiências para o desenvolvimento do profissional bacharel. Esse treinamento teórico-prático possibilita à aquisição de competências na área de formação, pois testa o grau de entrosamento do discente e o nível de consistência daquilo que ele aprendeu e do que conseguiu transmitir como informação - seja na forma de escritos, seja nos debates acerca do seu objeto de prospecção em apresentações orais - àqueles que interagem consigo por afinidade científica e nos eventos científicos.

Conduzir este experimento foi uma tarefa gratificante, mesmo que em alguns momentos as dificuldades tenham aparecido, como por exemplo, a contaminação devido à presença de microrganismos endofíticos que anulavam todos os esforços na busca do êxito na pesquisa. Todavia estas apenas foram um impulso e reforço no meu interesse em continuar a

pesquisa, e cada dia mais me convenceram do valor do trabalho do biólogo, principalmente pela contribuição que este possa oferecer ao desenvolvimento da ciência, quer na área da fitopatologia, quer na área do cultivo de tecidos vegetais.

AGRADECIMENTOS

Primeiro que tudo agradeço ao Deus que me sustenta e me fundamenta, sem Ele nada sou, nada tenho, nada faço. A Ele honra e graça para sempre, amém.

Ao meu lado nessa jornada estiveram muitas pessoas especiais que, de uma forma ou de outra, às vezes até sem saber, contribuíram para a realização desse trabalho. A todos meu mais sincero agradecimento.

A minha mãe, luz do meu caminho nesse mundo terreno, por ter sido a fonte da minha inspiração e por sempre me ter apoiado ao longo da minha vida, me amando, amando e amando... continue me amando, pois assim serei capaz de ir em frente e não temer os desafios.

Em especial, destaco o papel incontestável das minhas orientadoras, Dr^a Valeria e Dr^a. Julita que me apoiaram e incentivaram na busca do conhecimento, tirando minhas eventuais dúvidas, e foram muitas, e por todos os ensinamentos transmitidos durante o tempo em que trabalhamos juntos, o que muito contribuiu para a minha formação.

Dr^a Nair Helena que acreditou em mim e propiciou meu primeiro contato com o pinhão manso, aguçando o meu interesse pela cultura.

Amanda, que em todos os momentos me estendeu a mão. Deus tem te abençoado porque Ele conhece e sonda teu coração... obrigado é muito pouco.

Akyla... nossa, como foi importante seu incentivo e colaboração. Do fundo do meu coração, obrigado. Orgulho-me de poder chamá-la de minha amiga.

A Embrapa Algodão que me recebeu nesse tempo de pesquisa como parte do organismo dessa família institucional, pela excelente formação que me proporcionou, pelas amizades conquistadas, pelas lutas travadas, pelos desafios impostos e, acima de tudo, pela excelente escola de vida.

Ao pessoal do Laboratório de cultivo de tecidos, em especial Dione, alguém que sempre com um sorriso nos lábios me ajudou em cada etapa. Agradeço pelo carinho e pela amizade com que me trataram. Que Deus os abençoe infinitamente.

As amigas de todas as horas e também estagiárias: Alanne Rayssa, Raquel, Jéssica, Taíza, Flávia, pelo apoio, amizade e socorro bem presente nas horas certas.

À Universidade Estadual da Paraíba, na figura da Chefia, Coordenação e Departamento de Biologia, por me proporcionar a oportunidade de realização da minha graduação.

Aos meus competentes professores, pelo rigor, disponibilidade e pelos preciosos ensinamentos ao longo do curso, em especial professora Marcela Tarciana, que em parceria com minha orientadora, Dr^a Valeria, iniciou o projeto do PIBIC, porta aberta para meu estágio em cultivo de tecidos e conseqüentemente meu TCC.

Aos meus familiares que souberam, em silêncio, contribuir na realização desse sonho real, me apoiando e incentivando.

Por fim a todos que, de alguma forma especial, contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa e mesmo não sendo citados aqui, saibam que reservo em meu coração um agradecimento muito especial. Do fundo do meu coração,

OBRIGADO A TODOS!

O autor

6. REFERÊNCIAS

AGUIAR, R. H., FANTINATTI, J. B.; GROTH, D.; USBERTI, R. Qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de girassol de diferentes tamanhos. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 134-139. 2001.

ALBUQUERQUE, F. A. OLIVEIRA, M. I. P.; LUCENA, A. M. A.; BARTOLOMEU, C. R. C.; BELTRÃO, N. E. M. **Crescimento e desenvolvimento do pinhão manso: 1º Ano Agrícola**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Algodão- Embrapa Algodão, Campina Grande-Pb, 2008. (Documentos, 197).

ALBUQUERQUE, F. A.; ARRIEL, N. H. C.; BELTRÃO, N. E. M.; LUCENA, A. M. A.; SOUZA, S. L.; FREIRE, M. A. O.; e SAMPAIO, L. R. Análise de crescimento inicial do *Jatropha curcas* em condições de sequeiro. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.13, n.3, p.99-106. 2009.

ALVES, H. J.; LIMA, M. B.; TRINDADE, A. V. **Mudas micropropagadas**. Agência de informação Embrapa. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia40/AG01/arvore/AG01_8_41020068054.html>. Acesso em: 03 de Jun. 2010.

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Embrapa. Documento 58. Planaltina, 2002.

ARRUDA, F. P. de; BELTRÃO, N. E. de M.; ANDRADE, A. P. de; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semiárido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 789-799, jan./abr. 2004.

AZEVEDO, J. L. *et al.*. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**. Valparaíso, v. 3, p. 40-65, 2000.

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

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Brasília: 2009. 365p.

CARNEIRO, J. S. Qualidade sanitária de sementes de espécies florestais em Paraopeba, MG. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.15 n.1, p.75-77, 1990.

CARVALHO, J. M. F. C. Técnicas de micropropagação. Campina Grande: Embrapa CNPA, 1999. 39 p. (Embrapa - CNPA. Documento, 64).

CARVALHO, J. M. F. C.; ARRIEL, N. H. C.; LIMA, I. C. S.; ALVES, M. M.; MILANI, M. Avaliação de meios de cultivo para pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, E SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 4;1, 2010, João Pessoa. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 211-216.. (CD ROOM)

CORDEIRO, I. M. C. C.; LAMEIRA, O. A.; OHASHI, S. T.; ROSAL, L. F. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (Paricá), **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 1, 2004. p. 118-124.

DHINGRA O. O. 1985. Prejuízos causados por microorganismos durante o armazenamento de sementes. Disponível em: <<http://www.abrates.org.br/revista/artigos/1985/v7n1/artigo17.pdf>> Acesso em 12 de dezembro de 2009.

DHINGRA, O. D., ACUÑA, R. S. – **Patologia de sementes de soja**. Viçosa: UFV, 1997. 119p.

DRUMOND, M. A.; SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R.; MARTINS, J. C.; ANJOS, J. B.; EVANGELISTA, M. R. V. Desempenho agrônomo de genótipos de pinhão manso no Semiárido pernambucano, **Ciência Rural**, v.40, n.1, 2010.

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 2000. 66p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. p. 183-260.

HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, n. 2, p.105-119, 1993.

LOPES, N. F. A.; TEIXEIRA, T. S.; RIBEIRO, L. R.; SILVA, N. C. A.; NETO, H. D.; MELO, M. A. V. Prospecção familiar: características fenotípicas do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) na Bacia do Riachão – Norte de Minas Gerais. **Rev. Bras. de Agroecologia**, Vol.2, n. 2, p. 227-231, 2007.

LUIZ, K. C. M.; VICTÓRIA, J. M. N; KALAPOTHAKIS, E. **Micropropagação de *Jatropha curcas* L.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador - BA. **Anais...** Salvador. Disponível em: <<http://web2.sbg.org.br>>. Acesso em 20 de janeiro, 2011.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças.** Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138p.

MACHADO, J. C. Benefícios da sanidade na qualidade de sementes, **Informativo ABRATES**, v.20, n.3, p.18-19, 2010

MARTINS, C. C.; MACHADO, C. G.; CAVASINI, R. Temperatura e Substrato para o Teste de Germinação de Sementes de Pinhão-Manso. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 863-868, 2008.

MAUDE, R. B. **Seed borne diseases and their control** - Principles and practices. Wallingford, CAB International, 1996. 280p.

MORALES, C. F. G.; LOMBARDI, S. R. B.; SOARES, P. F.; FORTES, G. R. L. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cultivar gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, Botucatu, v. 5, n. 3, p. 174-177, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.437-497, 1962.

NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. London: Mac Millan, 1979. v.1, 839p.

NEVES, W. S.; PARREIRA, D. F.; FERREIRA, P. A.; LOPES, E. A. Avaliação fitossanitária de sementes de pinhão-manso provenientes dos vales do Jequitinhonha e Mucuri. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v.3, n.2, p. 17-23, 2009.

NUNES, L. F. **Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.).** Lavras, 2007. 78f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras.

NUNES, C. F.; PASQUAL, M.; SANTOS, D. N.; CUSTÓDIO T. N.; ARAUJO A. G. Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.1, p.9-14, 2008.

ONO, E. Y. S.; ANDRADE, J. B.; NAKAO, M.; PAIAO, F. G.; ONO, M. A.; HOMECHIN, M.; HIROOKA, E. Y. Microbiota fúngica em amostras de milho da Região Sul do Paraná. In: CONGRESSO DE MILHO E SORGO, 21, 1996, Londrina, p. 296.

PEREIRA, M. D.; DIAS, D. C. F. S.; DIAS, L. A. S. Germinação de sementes de Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) em diferentes temperaturas e substratos. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília, **Resumos...** Brasília.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J. e HIRANO, S. S. **Microbial Ecology of leaves**. New York: String-verlag, 1991. 179-197

PINTO, T. L. F.; FILHO, J. M.; FORTI, V. A.; CARVALHO, C.; JUNIOR, F. G. G. Avaliação da viabilidade de sementes de pinhão manso pelos testes de tetrazólio e de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.195-2001, 2009.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Ministério da Agricultura, AGIPAN, Brasília, Brasil, 1977.

SANTOS, M. F.; RIBEIRO, W. R. C.; FAIAD, M. G. R.; SANO, S. M. Fungos Associados as Sementes de Baru (*Dipterys alata* Vog.) **Revista Brasileira de sementes**. v. 19, n.1, p. 135-139. 1997.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte: Epaming, v. 26, n. 229, p. 44-78, 2005.

SILVA, H. S. A.; BETTIOL, W. Microrganismos Endofíticos como Agentes de Biocontrole da Ferrugem do Cafeeiro e de Promoção de Crescimento. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1. ed. São Paulo, Jaguariúna, 2009. cap. 18, p. 276-287.

SOARES, D. J.; QUEIROZ, C. M.; DEVIDE, A. C. P.; CASTRO, C. M. Diversidade fúngica em sementes de mamoneira oriundas de Pindamonhangaba-SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, & SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 4;1, 2010, João Pessoa. **Anais...** Campina grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 975-979.

SOUZA A. Q. L.; SOUZA A. D. L.; FILHO S. A.; PINHEIRO M. L. B.; SARQUIS M. I. M.; PEREIRA J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p.185 – 195, 2004.

SOUZA, Y. A.; PEREIRA, A. L.; SILVA, F. F. S.; REIS, R. C. R.; EVANGELISTA, M. R. V.; CASTRO, R. D.; DANTAS, B. F. Efeito da salinidade na germinação de sementes e no crescimento inicial de mudas de pinhão-manso. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2, p. 083-092, 2010.