



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



CRISTIANE DANTAS DE BRITO

GERMINABILIDADE DE SEMENTES DE
PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) SOB RESTRIÇÃO HÍDRICA:
ASPECTOS FISIOLÓGICOS, MOLECULARES E CITOLÓGICOS

FEIRA DE SANTANA - BAHIA

2010

CRISTIANE DANTAS DE BRITO

**GERMINABILIDADE DE SEMENTES DE
PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) SOB RESTRIÇÃO
HÍDRICA: ASPECTOS FISIOLÓGICOS, MOLECULARES E
CITOLÓGICOS**

FEIRA DE SANTANA - BAHIA

2010

CRISTIANE DANTAS DE BRITO

**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, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Renato Delmondez de Castro

Co-orientador(a): Prof^a. Dr^a. Marta Bruno Loureiro

FEIRA DE SANTANA - BAHIA

2010

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

Brito, Cristiane Dantas de
B875g Germinabilidade de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas*
L.) sob restrição hídrica: aspectos fisiológicos, moleculares e
citológicos/ Cristiane Dantas de Brito. – Feira de Santana, 2010.
51 f : il.

Orientador: Renato Delmondez de Castro

Co-Orientadora: Marta Bruno Loureiro

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Recursos Genéticos e Vegetais. Universidade Estadual de Feira de
Santana, 2010.

1.Pinhão manso – Germinação. 2.Euphorbiaceae. 3.Estresse
hídrico. 4.Ciclo celular. I.Castro, Renato Delmondez de.
II.Loureiro, Marta Bruno. III.Universidade Estadual de Feira de
Santana. IV. Título.

CDU: 582.757

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Claudinéia Regina Pelacani Cruz
Departamento de Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

Prof^a. Dr^a. Luzimar Gonzaga Fernandez
Departamento de Biofunção do Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Bahia - UFBA

Prof. Dr. Orientador Renato Delmondez de Castro
Orientador e Presidente da Banca
Departamento de Biofunção do Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Bahia - UFBA

À minha família e a todos que,
respeitam a natureza e se interessam
pelas ciências em sementes.

Ofereço

Ao meu companheiro Arno Brichta, pelo amor, respeito e
dedicação e por ter me ensinado a contar até dez...em alemão.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Se, por um lado uma dissertação é um trabalho individual, por outro, ela é inexequível sem o apoio e ajuda de uma gama de instituições e pessoas que cooperam para o resultado final do trabalho. Assim, considerando todas as dificuldades inerentes a um curso novo, montagem de laboratório, percalços causados por acidente, quero deixar aqui registrado meus mais sinceros reconhecimento e a gratidão a todas as instituições e pessoas que contribuíram para o êxito de presente trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana, pela seriedade e responsabilidade dos profissionais que iniciaram o curso e pelo constante empenho em aprimorá-lo, representados nas pessoas do atual coordenador José Raniere Ferreira de Santana e do secretário Alberto Vicente que contribuem de fato para o sucesso do programa.

À Universidade Federal da Bahia, meus agradecimentos são direcionados ao Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB), que vi “nascer e crescer”, e que se tornou um laboratório equipado e produtivo graças ao empenho constante dos professores Luzimar Gonzaga Fernandez, Renato Delmondez de Castro e Marta Bruno Loureiro.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microorganismos - LABEM (ICS-UFBA) pelo suporte técnico na visualização das imagens em microscopia de fluorescência, especialmente ao técnico Luis Lázaro.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (FIOCRUZ-BA), Unidade de Microscopia Eletrônica, pela cooperação técnica no seccionamento das amostras. Ao Prof. Dr. Marcos Vanier por ter viabilizado o convênio com o LBBB (UFBA) e em especial à Dr^a. Lúcia Maria Vieira Moreno, Claudio Pereira Figueira e doutoranda Danielle dos Anjos, não só por terem me ensinado a operar com ultramicrotomo e microscópio de fluorescência, mas também pelo acompanhamento constante na execução dos trabalhos, e pelo carinho e respeito com que sempre me trataram.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) por ter me concedido bolsa durante parte do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pelo auxílio financeiro através do projeto “Bioprospecção de Plantas Nativas do Semiárido” (CNPq – 554839/2006-7) e ao Programa Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO.

Ao meu Orientador Dr. Renato Delmondez de Castro, meus mais sinceros agradecimentos, inicialmente por ter me aceito como orientanda para execução de seu projeto, depois pelo constante incentivo e sugestões para o desenvolvimento deste trabalho e pelo respeito e consideração com que sempre me tratou.

À minha Co-orientadora Dr^a. Marta Bruno Loureiro, por sempre acompanhar meu trabalho e ainda pela revisão final do texto, meus agradecimentos de todo coração.

À Professora Dr^a. Luzimar Gonzaga Fernandez, sempre lutando para dar boas condições de trabalho aos estudantes do LBBB e ao apoio e dedicação que me tem devotado.

À Professora Dr^a. Maria Aparecida José de Oliveira (“Cidinha”) por ter me introduzido no mundo das sementes.

À Professora Dr^a. Claudinéia Regina Pelacani Cruz, a quem muito admiro e respeito, pelas boas sugestões e por aceitar fazer parte da banca examinadora.

A todos os companheiros do LBBB, em especial:

- A Clarissa Telles e Paulo Teixeira, por terem me acompanhado em todas as etapas do trabalho. Sem o apoio de vocês, tudo seria muito mais difícil;
- A amiga e companheira de espécie Leilane Leal, pelo carinho e pelas atualizações sobre pinhão manso;
- A Érica Lima, por compartilhar muitos momentos, inclusive seu almoço!
- A Alexandre Marques, pela ajuda na edição das imagens;

- A Manuela Oliveira pelo apoio constante.

Agradeço ainda aos colegas e amigos Marcos Silva, pelo apoio emocional e técnico com a eletroforese e coloração com nitrato de prata. A Cíntia Luísa Mascarenhas, pelas construtivas discussões, pela hospedagem em Feira de Santana e pelo amor incondicional. A Luísa Senna, pela hospitalidade e caronas, principalmente quando eu não podia caminhar sem muletas, e pelo seu exemplo de perseverança e luta contra as adversidades. A Ivana Virgens, sempre acessível e disposta a ajudar, principalmente com as análises estatísticas. A Cimille Antunes pela grande amizade que desenvolvemos e por trazer um reagente fundamental para a finalização do trabalho.

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

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

Albert Einstein (1879-1955)

RESUMO

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é reconhecido pela rusticidade e aparente tolerância a estresses ambientais, sendo utilizado popularmente no tratamento de varias enfermidades, com algumas propriedades farmacológicas comprovadas. Apresenta alto teor de óleo em suas sementes e por isso é considerado possível fonte renovável de matéria prima para produção de biocombustíveis. O comportamento fisiológico das sementes durante a germinação é diferenciado quando sob condições hídricas restritivas, sendo necessários estudos para melhor compreensão dos mecanismos de retomada de germinação sob condições ambientais adversas. O objetivo deste trabalho foi verificar o comportamento fisiológico, molecular e citológico de lotes distintos sementes de pinhão manso (Irará e Janaúba), durante embebição em água e sob restrição hídrica. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos da Universidade Federal da Bahia. As sementes foram caracterizadas quanto ao volume, peso, teor de umidade, germinabilidade, acumulo de tubulina e configurações do citoesqueleto microtubular, durante a embebição em água e sob restrição hídrica (osmocondicionamento). As sementes de Irará apresentaram melhor qualidade fisiológica que as de Janaúba. Este resultado reflete uma maior deterioração das sementes de Janaúba. Verificou-se reativação do ciclo celular durante a embebição em água, sendo que configurações mitóticas apareceram somente após a protrusão da radícula. Foi possível verificar no presente estudo que as sementes de pinhão manso são pouco tolerantes às condições de restrição hídrica testadas.

Palavras-chave: Euphorbiaceae. Germinação. Estresse hídrico. Ciclo celular.

ABSTRACT

Physic nut (*Jatropha curcas* L.) is a high oil content Euphorbiaceae seed species renowned for its apparent tolerance to environmental stresses, besides being used by local communities for treating various diseases, having some pharmacological properties being scientifically proven. It is nowadays considered a possible source of renewable feedstock for biofuel production. The physiological behavior of seeds under normal conditions of water availability differs when compared to restrictive water conditions. Nevertheless, it is necessary to conduct studies to better understand the mechanisms of recovery of seed germination and physiological quality under adverse environmental conditions which may allow the establishment of protocols for optimizing the germination process. The present study describes the physiological, molecular and cytological profiles of seeds of physic nut during imbibition in water and in osmotic water restriction conditions. The seeds were derived from Brazilian semiarid regions, Janaúba (MG) e Irará (BA). The bioassays were executed in the Laboratory of Biochemistry, Biotechnology and Bioproducts at the Federal University of Bahia. Seeds were characterized by volume, weight and moisture content, germination, tubulin accumulation and appearance of microtubular cytoskeleton. Seeds from Irará showed better physiological quality than those of Janaúba. This result reflects an apparent higher degree of deterioration of Janaúba seeds. Cytological analysis revealed observed accumulation of β -tubulin and reactivation of the cell cycle during imbibitions in water. Mitotic microtubules configurations appeared only after radicle protrusion whereas it did not appear in seed under osmotic water restriction. In this research, *Jatropha* seeds appeared to have little tolerance to drought.

Keywords: Euphorbiaceae. Germination. Drought stress. Cell cycle.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	A Caatinga e o Semiárido.....	3
2.2	Estresse Ambiental e Germinação de Sementes.....	5
2.3	Pinhão Manso.....	7
2.3.1	Breve histórico da espécie.....	9
2.4	Citoesqueleto Microtubular e o Ciclo Celular em Plantas.....	10
3.	MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1	Material biológico e condução dos ensaios.....	14
3.2	Caracterização inicial dos lotes.....	15
3.2.1	Biometria e peso de mil sementes.....	15
3.2.2	Teor de umidade.....	15
3.3	Avaliação fisiológica.....	15
3.4	Avaliação molecular.....	17
3.4.1	Extração de proteínas totais.....	17
3.4.1a	Preparo das amostras.....	17
3.4.1b	Obtenção dos extratos.....	18
3.4.1c	Determinação da concentração protéica dos extratos.....	18
3.4.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS – PAGE).....	19
3.4.3	Western Blotting.....	20
3.4.3a	Transferência eletroforética.....	20
3.4.3b	Imunodeteção de β -tubulina.....	21
3.5	Avaliação citológica.....	23
3.5.1	Embocamento das amostras.....	23
3.5.2	Seccionamento, imunomarcção e microscopia.....	24
3.6	Morfologia da radícula.....	25
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1	Caracterização inicial dos lotes.....	26
4.2	Avaliação fisiológica de sementes não tratadas e de sementes pré-tratadas por osmocondicionamento (sob da restrição hídrica).....	28
4.2.1	Efeito da restrição hídrica sobre a embebição e germinação.....	30

4.3	Morfologia do eixo embrionário e da radícula.....	32
4.4	Western blotting de β -tubulina e visualização imucitoquímica do citoesqueleto microtubular.....	34
5.	CONCLUSÕES	40
6.	REFERÊNCIAS'	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Esquema de isolamento de radículas para cada tratamento.....	17
Tabela 2:	Protocolo de preparação do gel de eletroforese SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970; DE CASTRO et al. 1998).....	19
Tabela 3:	Relação entre Germinabilidade, Teor de umidade, Massa seca e Volume de sementes de pinhão manso (<i>J. curcas</i>) provenientes de dois acessos.....	26
Tabela 4:	Tempo médio (T_m), velocidade média (V_m), índice de velocidade da germinação (IVG) de sementes e Coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) de sementes de <i>J. curcas</i> em água e sob restrição hídrica (-0,8MPa) á 25°C.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Semente de pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L.). (A) semente com carúncula bem desenvolvida; (B) Semente evidenciando cotilédone foliáceo e eixo embrionário sobre endosperma.....	7
Figura 2:	Pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L.) à esquerda e mamona (<i>Riccinus communis</i> L.) à direita. Fonte: OLIVEIRA, 2008.....	10
Figura 3.	Modelo esquemático de um microtúbulo em vista longitudinal e transversal Fonte: KLEINSMITH & KISH, 1995.....	11
Figura 4.	Micrografias de fluorescência em seções longitudinais de radículas de pinhão manso (<i>J. curcas</i> L.) apresentando diversas configurações mitóticas. (A) banda pré-prófase; (B) fuso mitótico e (C) fragmoplasto. As barras indicam 25µm.....	12
Figura 5:	Coleta das radículas para extração de proteínas totais. (A) Coleta; (B) armazenamento de material.....	18
Figura 6:	Representação esquemática da confecção do “sanduíche” de Western Blotting”	21
Figura 7:	Comparação das medidas de comprimento, largura e espessura (mm) em sementes de <i>J. curcas</i> provenientes de dois acessos (Irará e Janaúba).....	27
Figura 8:	Morfologia da radícula de pinhão manso em diferentes fases da germinação.....	34
Figura 9:	Acúmulo de β -tubulina durante embebição em água e sob restrição hídrica (- 0,8MPa). Acesso Janaúba (A e B) e acesso Irará (C e D)	35
Figura 10:	Organização do citoesqueleto microtubular em sementes de pinhão manso embebidas em água.....	37
Figura 11:	Organização do citoesqueleto microtubular em sementes de pinhão manso restrição hídrica.....	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AF - Antifadent

BMM - Butil- metil-metacrilato

BPP - Banda Pré-Prófase

BSA - albumina sérica bovina

BSAc - albumina sérica bovina acetilada

cm - Centímetro

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DTT - ditioneitol

EGTA - *ethylene glycol tetraacetic acid*

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

G - germinada

G - grama

HAH - Hydroxyl tetra ammonium chloride

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística

KDa - Kilodalton

KOH - Hidróxido de Potássio

M - Molar

mA - Miliampere

MgSO₄ - Sulfato de Magnésio

mg/μl - Miligrama por Microlitro

μg.mL⁻¹ - Micrograma por mL

mL - Microlitro

mM Milimolar

mm milímetro

MMA - Ministério do Meio Ambiente

MPa - Mega Pascal

MSB - Microtubule satabilizing Buffer/ tampão estabilizador de microtúbulos

ng - Nanograma

NG - não germinada

nm - Nanômetro

PBS – *Phosphate buffered saline*

PEG 8000 - Polietilenoglicol 8000

PH - potencial hidrogeniônico

PIPES Piperazine-N,N'-bis (2-ethanesulfonic acid)

p/v - Peso por volume

PVDF - Fluoreto de Polivinilideno

RAS - Regras para Análise de Sementes

RNA - Ácido Ribonucléico

RPM - Rotações por Minuto

TBST - Tampão Tris Salino Fosfato

Tris-HCl - Tris hydrochloride

1. INTRODUÇÃO

A história da agricultura demonstra que os primeiros contatos entre o homem e a fisiologia das sementes foram estabelecidos a partir da descoberta do seu uso para a propagação de plantas, no século LXXX A. C. (MARCOS FILHO, 1999). Biologicamente, sementes são estruturas complexas que, em milhões de anos, tiveram que se adaptar às condições ambientais austeras e diversas. São consideradas as unidades primárias de dispersão de plantas superiores e contem todo aparato genético das espécies (DE CASTRO & HILHORST, 2000).

A retomada do crescimento pelo embrião ou germinação de sementes é um evento fisiológico que depende da qualidade da semente e de fatores abióticos, como suprimento de água e oxigênio e a adequação de temperatura, luz e substrato, sendo que estas características “ótimas” variam entre as espécies vegetais (SALOMÃO et al., 2003). Durante o ciclo de vida das plantas com sementes, a germinação constitui-se em um estágio crítico do desenvolvimento. Esta se inicia com a entrada de água na semente e durante esta fase, as células do embrião mudam para um estado metabolicamente ativo, no qual ocorrem complexas mudanças fisiológicas e bioquímicas (SHEORAN et al. 2005). Essas complexas alterações metabólicas são finalizadas com a protrusão da radícula através das estruturas envoltórias da semente, marcando, em nível fisiológico, o final da germinação propriamente dita e o início do crescimento da plântula (CARDOSO, 2004).

O alongamento da radícula embrionária ocorre por expansão, seguido de divisão das células. Geralmente a preparação para divisão celular ocorre antes da protrusão da radícula e requer a iniciação do ciclo celular. O início deste ciclo envolve a síntese de DNA e a regeneração do citoesqueleto microtubular. Os microtúbulos, constituídos por polipeptídeos de α e β tubulina, tem um papel importante na expansão celular e na mitose. Em sementes de tomate, acontecem divisões celulares na radícula embrionária antes da protrusão. Porém estudos com outras espécies na presença de inibidores da mitose mostraram que a mitose não é essencial para o acúmulo de tubulina e para a protrusão radicular (DE CASTRO & HILHORST, 2004).

As técnicas de Western blotting e microscopia de imunofluorescência são ferramentas importantes utilizadas para avaliação dos níveis de tubulina e a localização e organização do citoesqueleto microtubular (JING et al.,1999). Fazendo-se um breve levantamento do número de trabalhos e de resultados científicos que já foram gerados e/ou adaptados para *Jatropha curcas* L. aqui no Brasil, como dados de produção, produtividade, teor de óleo, etc, percebe-se que ainda há muito que fazer em termos de pesquisa, desenvolvimento e inovação tecnológica (ARRUDA et al., 2004). Adicionalmente também pode-se verificar que são raros estudos relacionados ao ciclo celular desta espécie durante as fases da germinação.

O pinhão manso (*J. curcas*) é também conhecido como pinhão-paraguaio, template, purgueira (SATURNINO et al, 2005), pinõn, physic nut (HELLER, 1996) entre outros. A palavra *Jatropha*, deriva do grego *iatrós* (doutor) e *trophé* (comida), refletindo suas propriedades medicinais. Esta espécie ocorre naturalmente no semiárido nordestino e em países das Américas equatoriais. No entanto, ainda não está plenamente domesticada, mas 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, o pinhão manso vem sendo considerado como mais uma opção agrícola para a região nordeste, pois se constitui em uma planta oleaginosa viável para a obtenção de óleo como matéria-prima para o biodiesel, com produtividade mínima de duas toneladas de sementes por hectare, levando de dois a quatro anos para atingir a maturidade produtiva, que pode se estender por 50 anos (DRUMMOND et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os aspectos fisiológicos, citológicos e moleculares da germinação de sementes de pinhão manso Para tanto foram avaliados: **(I) parâmetros fisiológicos** (matéria seca e úmida, germinação, vigor, tolerância à dessecação); **(II) parâmetros moleculares** por meio de avaliação do acúmulo de tubulina (western blotting); **(III) parâmetros citológicos** através de detecção imunocitoquímica de tubulina e visualização de configurações do citoesqueleto microtubular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A caatinga e o Semiárido

O território brasileiro possui uma ampla variedade de paisagens naturais, de beleza singular, além de inestimável valor ecológico, imaterial e material (LIMA et al., 2009). Dos 8.514.876,599 km² de extensão territorial oficial do Brasil (IBGE, 2010) a região do Semiárido ocupa uma área de 955.000 km², que se estende entre os paralelos 3 a 17°S e os meridianos 35 a 45°W. Isto corresponde a mais da metade da área do Nordeste e pouco mais de 10% do país, incluindo ainda 1116 municípios delimitados pelo Bioma Caatinga (MOURA & CAMPOS, 2004; GIULIETTI et al., 2006).

O clima desta região é dominado por uma longa estação seca, com extrema deficiência hídrica, e um período de chuvas torrenciais, curto e irregular (RODAL et al., 1992). A pluviometria apresenta médias anuais que variam entre 240 a 1.500 mm, mas 50% da região recebe menos de 750 mm, e algumas áreas centrais menos de 500 mm (PRADO, 2003). As temperaturas médias anuais são relativamente elevadas, 26°C a 29°C, e as taxas médias de evaporação estão em torno de 2.000 mm por ano. A região se caracteriza também por apresentar terrenos cristalinos (ígneos e metamórficos), praticamente impermeáveis (50%), e terrenos sedimentares (50%), com boa reserva de água subterrânea. Os solos, com algumas exceções são pouco desenvolvidos, mineralogicamente ricos, pedregosos, pouco espessos e com fraca capacidade de retenção de água (ALVES, 2007).

A vegetação da Caatinga pode ser conceituada como uma floresta de porte baixo, com dossel geralmente descontínuo, folhagem decídua na estação seca e árvores com ramificações profusas, comumente armadas com espinhos ou acúleos, sendo freqüente a presença de microfilia e características xeromorfas (GIULIETTI et al., 2006).

O Bioma Caatinga é único no mundo. Apresenta uma grande variedade de paisagens, riquezas biológicas e endemismos (SEMA/BA, 2010). As florestas nativas do Brasil cobrem aproximadamente 65% do território brasileiro, sendo que

as Matas de Caatinga totalizam 0,23 milhão de km² ou 4% das florestas do país (FAO, 2006). A Caatinga ocupava originalmente uma área maior atingindo 0,73 milhão de km², mas pelo menos 80% de seus ecossistemas originais já foram alterados, principalmente por meio de ações devastadoras como desmatamentos e queimadas, em um processo de ocupação que começou nos tempos do Brasil colônia (MMA, 2010). Segundo dados da Secretaria do Meio Ambiente do Estado da Bahia, a principal causa apontada para a degradação dos recursos naturais renováveis desse Bioma é a pressão antrópica, sob as mais variadas formas de uso, com intensidade e frequência superiores à capacidade de regeneração natural dos mesmos.

Nesta região a demanda por recursos florestais, em propriedades agrícolas e pela indústria, vem crescendo a cada dia, portanto árvores e arbustos assumem um importante papel na economia rural. Historicamente a agricultura praticada na região do semiárido é nômade, itinerante ou migratória, onde os agricultores desmatam queimam e plantam por um curto período (em torno de dois ou três anos) e mudam para outras áreas repetindo a mesma prática, na expectativa de uma recuperação da capacidade produtiva dos solos, o que, entretanto vem reduzindo consideravelmente a biodiversidade (DRUMOND et al., 2000).

Desta forma, torna-se importante o desenvolvimento de protocolos de propagação e utilização de espécies nativas de uso múltiplo, ou de reconhecido potencial na produção de compostos naturais 'úteis'. Em outras palavras, espécies que possam ser cultivadas ou manejadas sustentavelmente, podendo agregar significativo valor ao contexto da agricultura familiar regional. Outra característica importante é identificar espécies passíveis de serem utilizadas em projetos de restauração de áreas degradadas e de preservação da Caatinga. Nesse sentido, são necessários avanços no desenvolvimento de metodologias adequadas que somente poderão existir com o conhecimento das necessidades ecológicas e do comportamento fisiológico das espécies de interesse (DANIEL et al., 1998).

A utilização de espécies adequadas à ecologia das diferentes regiões bem como, o uso de sementes de boa qualidade fisiológica, é um dos fatores básicos primordiais para o sucesso dos programas de adaptação e utilização agrônômica

de recursos genéticos vegetais (ARAÚJO-NETO, 2002). Portanto, devem ser consideradas prioritárias pesquisas sobre mecanismos de germinação de sementes de espécies nativas de valor econômico com potencial agrônômico ou biotecnológico.

Nesse contexto, o pinhão manso é considerado uma opção agrícola para áreas áridas e semiáridas, e na recuperação de áreas degradadas (SATO, 2009). Trata-se de uma espécie perene e de fácil cultivo, rica em óleo, com potencial para produção de matéria prima para biodiesel. Outro aspecto importante é sua adaptabilidade ao cultivo em pequenas propriedades, envolvendo assim o pequeno agricultor na cadeia produtiva do biodiesel (PURCINO & DRUMMOND, 1986). Entretanto, trata-se de uma espécie ainda em processo de “domesticação” (SATURNINO, 2005).

2.2 Estresse Ambiental e Germinação de Sementes

Em condições naturais e agricultáveis as plantas estão freqüentemente expostas aos estresses ambientais. Estresse pode ser definido como uma pressão excessiva de algum fator adverso que tende a inibir o funcionamento normal dos sistemas. No caso das sementes, quando não levam a morte, alteram a velocidade, o tempo e a uniformidade da germinação. Entretanto, os desvios em relação a essas variáveis dependem tanto do grau do estresse quanto da resistência da espécie a estas condições adversas (GIAVENO & OLIVEIRA, 2003; TAIZ & ZAIGER, 2009)

Dentre os diversos fatores ambientais capazes de influenciar o processo germinativo, a indisponibilidade de água é um dos mais importantes. Da embebição resulta a reidratação dos tecidos, com conseqüente intensificação do processo respiratório e das demais atividades metabólicas, incluindo reativação do ciclo celular e crescimento (DE CASTRO et al., 2000; CARVALHO & NAKAGAWA, 2000). Conseqüentemente, ocorrem também alterações no perfil de expressão de genes em resposta à condição de estresse hídrico por ‘seca’ (VERSLUES et al., 2006).

A aplicação de estresse em plantas tem sido usada para aumentar o desempenho de sementes de espécies ornamentais e agrícolas, por acelerar e uniformizar a germinação. O controle da hidratação da semente pelo emprego de soluções diluídas até um limite que permita a realização dos processos metabólicos pré-germinativos, sem a protusão da radícula, é denominado pré-condicionamento osmótico, osmocondicionamento ou priming (BRADFORD, 1986; YOON et al., 1997). O polietilenoglicol, fórmula geral $\text{HOCH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, é um dos agentes osmóticos mais utilizados nesses estudos. É quimicamente inerte e atóxico para as sementes, possui molécula grande de alto peso molecular, assim é capaz de simular condições de restrição hídrica sem penetrar no tegumento das sementes (VILLELA et al., 1991).

Frequentemente observa-se um padrão trifásico de absorção de água e hidratação de sementes secas. A fase I é rápida, dirigida pelo potencial matricial da semente seca. Trata-se de um processo puramente físico, que depende somente da ligação da água a matriz da semente. Na fase II, o metabolismo é reativado para que haja o crescimento do embrião e a finalização da germinação. É também chamada de um intervalo para preparação metabólica, caracterizada por um período de platô, onde as sementes não absorvem água (ou absorvem em pouquíssimas quantidades). Na fase III, ocorre a protrusão da raiz primária, e é observado um novo incremento no peso da semente, traduzido pelo acúmulo de água (BEWLEY & BLACK, 1994).

Até a fase II as sementes ainda são tolerantes a dessecação, podendo o processo ser estagnado e reiniciado posteriormente quando houver reidratação. Entretanto a partir da protrusão radicular haverá perda de viabilidade se o fornecimento de água for interrompido (TAYLOR, 1997; DE CASTRO et al., 2004). Assim, para realização do condicionamento osmótico, é importante se conhecer o potencial hídrico onde a porcentagem de germinação é nula e o período no qual as sementes deverão estar submetidas à solução osmótica. Se o fornecimento de água for insuficiente, as sementes não finalizarão a fase II, e se for excessivo, estas podem alcançar a fase III e os benefícios do osmocondicionamento serão perdidos (MARCOS FILHO, 2005).

O estudo do osmocondicionamento em sementes representa assim, uma linha de pesquisa das mais promissoras para se entender os mecanismos fisiológicos de sobrevivência ao estresse hídrico, não obstante vários de seus aspectos ainda não foram elucidados, como, por exemplo, os efeitos da secagem e a possibilidade de reversão dos efeitos dos tratamentos durante o armazenamento das sementes (CÓRDOBA, 1995). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de adaptação das espécies nativas às condições naturais da Caatinga e Semiárido nordestino. Assim, faz-se importante um estudo a nível fisiológico, citológico e molecular sobre a resposta de sementes de pinhão manso a tais condições (de estresse) ambientais.

2.3 Pinhão manso

Jatropha curcas L. ou pinhão manso pertence à família Euphorbiaceae, cujo gênero é constituído por 175 espécies tropicais e subtropicais (SANTOS et al., 2005). Caracteriza-se por ser um arbusto de 2 a 5 metros de altura, com flores pequenas, amarelo-esverdeadas, monóicas e produzidas na mesma inflorescência. Seus frutos são cápsulas triloculares, com uma semente em cada lóculo (CARVALHO et al., 2009). A semente é relativamente grande com tegumento rijo, quebradiço e de fratura resinosa (Figura 1A). Sob o invólucro da semente existe uma película branca cobrindo a amêndoa; albúmen abundante, branco, oleaginoso, contendo embrião provido de dois cotilédones largos, foliáceos e achatados (Figura 1B) (ARRUDA et al., 2004).

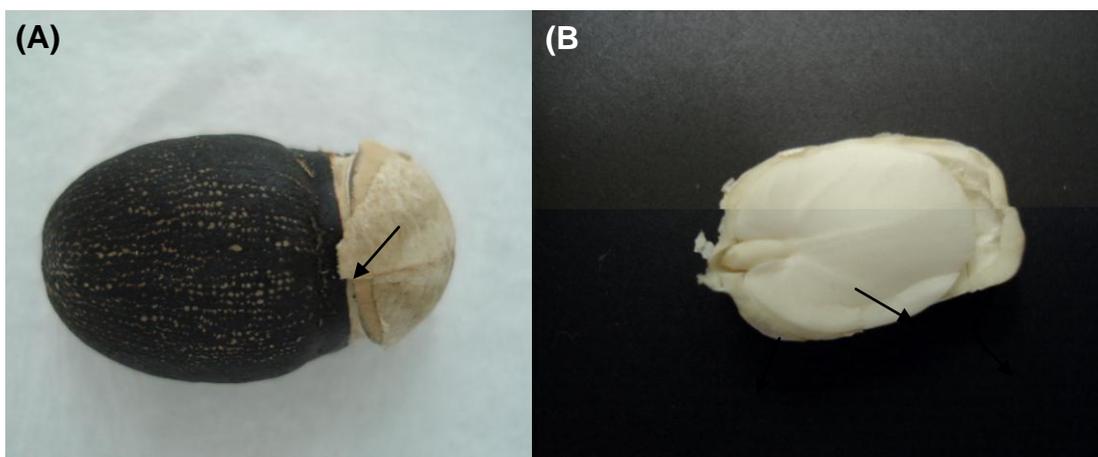


Figura 1. Semente de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). (A) semente com carúncula bem desenvolvida; (B) Semente evidenciando cotilédone foliáceo e eixo embrionário sobre endosperma.

No Brasil, ocorre praticamente em todas as regiões, sempre de forma dispersa, adaptando-se a várias condições edafoclimáticas, propagando-se, sobretudo nos estados do Nordeste, Goiás e Minas Gerais. De modo geral, cresce rapidamente em solos pedregosos e de baixa umidade, nos terrenos abandonados e não cultivados, não subsistindo, porém nos locais de densa vegetação, com a qual dificilmente consegue competir (HELLER, 1996). Muitas vezes é cultivada como cerca viva, mas seu maior emprego está na medicina popular (EULER et al., 2004).

Uma das principais vantagens da cultura de pinhão manso é o seu longo ciclo produtivo que pode chegar a 40 anos e manter a média de produtividade de sementes de 2 toneladas/ha (AZEVEDO, 2006). Por ser uma cultura perene, favorece a conservação do solo, pois o cobre com uma camada de matéria seca, reduzindo, dessa forma, a erosão e perda de água por evaporação. Essa estratégia resulta em redução de danos por enriquecimento do solo com matéria orgânica decomposta, reduzindo os custos de produção, que é um fator importante para sua viabilidade econômica, especialmente na agricultura familiar (PEIXOTO, 1973).

De particular importância, suas sementes possuem um elevado teor de óleo (cerca de 55%), com uso apropriado para iluminação em lamparinas, na fabricação de sabão, na indústria de cosméticos e na produção de combustível para cozinha e biodiesel. Esse óleo é rico em componentes de alta qualidade para a queima, favorecendo a diminuição da emissão de gases de efeito estufa pela substituição de combustíveis fósseis (OPENSHAW, 2000; JONGSCHAAAP et al., 2007).

De acordo com relatório publicado em 2010 pela Agência para Agricultura e Alimentação (FAO) e pelo Fundo Internacional para Desenvolvimento da Agricultura (IFAD), usar o pinhão manso na produção de biodiesel pode beneficiar agricultores pobres, particularmente em regiões remotas do semiárido de países pobres e em desenvolvimento como Mali e Tanzânia, na África e na Índia (Ásia).

Por diversas razões, essa espécie está sendo introduzida em vários programas de pesquisa e de desenvolvimento rural no Brasil e em muitos outros

países tais como Índia, China, Indonésia e México, considerando-se a geração de renda, emprego e o aumento na eficiência de processos rurais, agrícolas e tecnológicos. No entanto, trata-se de uma espécie que carece ainda de pesquisas e dados científicos que venham consolidar suas características potencialmente favoráveis. (DE CASTRO & LEAL, 2009).

2.3.1 Breve histórico da espécie

A delimitação da área original de distribuição do pinhão manso tem sido objeto de longos debates, mas atualmente existe um acordo crescente de que o centro de origem dessa espécie é o México e a parte continental da América Central. Também ocorre naturalmente no Brasil, Bolívia, Peru, Argentina e Paraguai (ACHTEN et al., 2008). Foi introduzida por navegadores portugueses, em fins do século XVIII, nas ilhas de Cabo Verde e em Guiné, de onde mais tarde foi disseminada pelo continente africano. Atualmente é encontrada em quase todas as regiões intertropicais, estendendo sua ocorrência da América Central à Índia, Filipinas e Timor, até mesmo às zonas temperadas, em menor proporção (GINWAL et al., 2004).

Soa assim a mais antiga referência do que poderia ser o pinhão manso no Brasil:

“Das ervas medicinais e outras qualidades occultas

Alem das arvores do Salutifero balsamo, e óleo de copaibba, de que já fis menção no cap. 6º, há outras, que destillão de si mui boa almecega pera as boticas: Outras chamadas çarsafráz, ou arvores de funcho, porque cheirão a elle, cujas raízes e o // próprio pao pera enfermidades de humores frios He tam medicinal, como o pao da china. Há arvores de Canafistula brava assi chamada porque se dá nos matos; e outra que se planta, e He a mesma, que das Índias. Há hûas chamadas andáz; que dão castanhas excelentes pera purgas; e outras que dão pinhões pera o mesmo effeito, os quais tem este mistério, que se tomão com hûa tona, e película sutil, que tem, provocam o vomito, e se lha tirão, somente provocão a câmera. Mas tem-se mais fácil, e melhor a purga da batata, ou mechuacão; que também há muita pellos matos.....”

Este texto encontra-se na História do Brasil, capítulo VII do livro primeiro, de Frei Vicente do Salvador, e que cobre o período de 1500 a 1627

A afirmação no texto acima é reforçada pela representação pictórica (Figura 2), de autoria anônima, datada de 1742, e também reproduzida na obra de Maria Leda Oliveira (2008), intitulada “História do Brasil de Frei Vicente do Salvador – História e Política no Império Português do Século XVII”.



Figura 2. Pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) à esquerda e mamona (*Ricinus communis* L.) à direita. Desenho extraído do livro: “**Virtude das Plantas**” (anônimo) 1742. A representação pictórica das plantas e animais no Brasil só viria a acontecer tardiamente, no alvorecer do século XVIII. Modificado de OLIVEIRA, 2008.

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 do pinhão manso.

2.4 Citoesqueleto Microtubular e o Ciclo Celular em Plantas

As células vegetais são cercadas por paredes rígidas que condicionam e seus movimentos. Conseqüentemente, as formas das células e dos órgãos vegetais são determinadas exclusivamente pela expansão e divisão celular. Ambos os processos dependem de distintas matrizes de microtúbulos associados aos diferentes estágios do ciclo celular (WRIGHT et al, 2009).

O ciclo celular é a sequência dos processos que acontecem durante a divisão celular, o qual depende da replicação ou duplicação de DNA, e envolve padrões específicos de organogênese e morfogênese, resultando em

diferenciação celular (VARELA, 1975; BARLOW, 1993). Em análises mais detalhadas em níveis citológico e molecular, o ciclo celular envolve o ciclo cromossômico, no qual a síntese e duplicação de DNA acontecem durante a intérfase, e o ciclo mitótico, o qual leva a divisão celular (GUNNING & STEER, 1996).

O citoesqueleto microtubular proporciona uma organização espacial e serve como arcabouço para os movimentos das organelas e de outros componentes celulares e apresenta papéis fundamentais nos processos de mitose, meiose, citocinese, depósito da parede, manutenção da forma celular e diferenciação celular (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Os microtúbulos são os principais componentes do citoesqueleto. Constituem-se de heterodímeros contendo duas cadeias polipeptídicas de α -tubulina e β -tubulina, cada um com um peso molecular em torno de 50-55 kD (Figura 3). Possuem a forma de cilindros ocos com 25 nm de diâmetro externo. Estão relacionados com o ciclo celular por meio de distintas reorganizações de sua matriz configuracional, ou seja, matriz cortical da intérfase, banda pré-prófase, fuso e matriz do fragmoplasto mitótico (DE CASTRO, 2000).

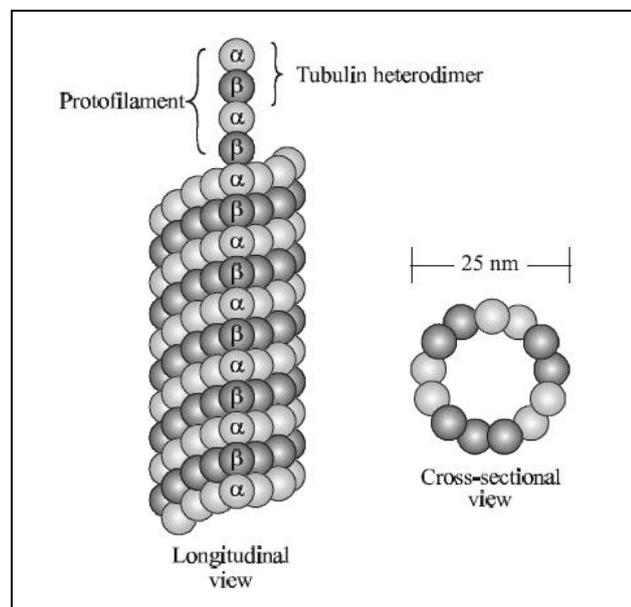


Figura 3. Modelo esquemático de um microtúbulo em vista longitudinal e transversal. Cada microtúbulo é composto por 13 protofilamentos. A organização das subunidades de α e β tubulina também está ilustrada. Modificado de KLEINSMITH & KISH, 1995.

Durante a intérfase, os microtúbulos são encontrados predominantemente no citoplasma cortical e estão arranjados de forma irregular, paralelamente entre si e perpendicularmente ao eixo principal de expansão de células. Evidências indicam que, na maioria das células, os microtúbulos corticais estão envolvidos na orientação das microfibrilas de celulose durante a síntese da nova parede celular e, portanto, desempenham um papel importante no estabelecimento do eixo de alongamento celular. Antes da mitose, a matriz cortical da intérfase é gradualmente substituída pela Banda Pré-Prófase (BPP), um anel de microtúbulos corticais que circunda o núcleo (Figura 4A) e prevê exatamente a localização final da placa celular (futura parede celular) das novas células formadas na citocinese. Logo, a BPP está diretamente envolvida com o plano de divisão celular (GODDARD et al., 1994; KOST & CHUA, 2002).

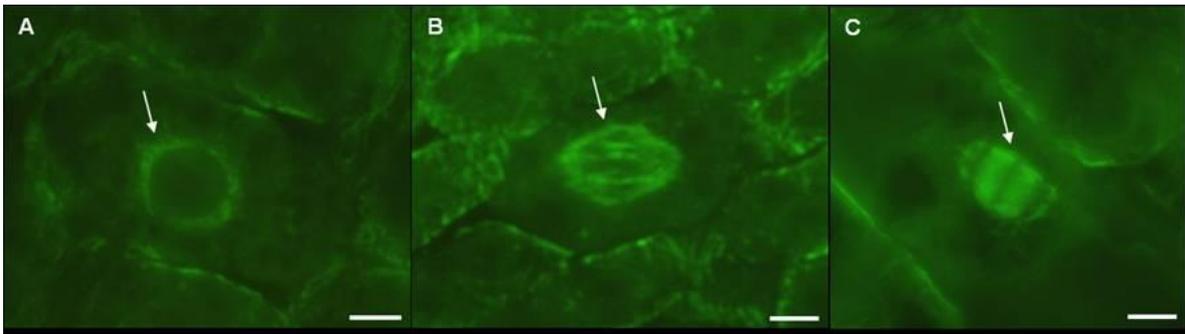


Figura 4. Micrografias de fluorescência em seções longitudinais de radículas de pinhão manso (*J. curcas L.*) apresentando diversas configurações mitóticas. (A) banda pré-prófase; (B) fuso mitótico e (C) fragmoplasto. As barras indicam 25 μ m.

O fuso mitótico é um aparato complexo e altamente organizado que substituirá gradualmente a BPP. O fuso mitótico das células vegetais (Figura 4B), nas quais não há centrossomo, origina-se de uma zona difusa. Consiste de múltiplos focos nos pólos opostos da célula, estendendo-se em direção ao plano equatorial, em arranjos quase paralelos. Quando os cromossomos se separam e os feixes de microtúbulos do cinetócoro desaparecem, a matriz do fragmoplasto mitótico (Figura 4C) começa a aparecer no plano equatorial do fuso. O fragmoplasto consiste de um anel duplo de microtúbulos e retículo endoplasmático que se forma no final da anáfase ou início da telófase, a partir das subunidades de tubulina dissociadas do fuso. Parece estar diretamente envolvido

no transporte de vesículas contendo material para a síntese de novas células da placa celular (GODDARD et al., 1994; TAIZ & ZEIGER, 2009)

A germinação de sementes depende do crescimento celular do embrião, em que a acumulação e polimerização de tubulinas, bem como a organização do citoesqueleto microtubular assumem os principais papéis. As configurações dos microtúbulos mudam durante o alongamento e divisão celular. As técnicas de Western blotting e imunofluorescência, juntas, podem ser empregadas para estudar os níveis da proteína tubulina, a localização e organização do citoesqueleto microtubular (JING et al. 1999).

Os avanços das modernas abordagens na investigação em células, incluindo as diversas abordagens genômicas, genética molecular e novas tecnologias de imagem, fornecem subsídios para entender melhor a forma, a função e a regulação do citoesqueleto de plantas (WASTENEYS & YANG, 2004). Devido a sua importância (manutenção da forma celular e determinação dos padrões de alongamento e divisão celular), o citoesqueleto de plantas é um assunto de pesquisa ativa (SMITH, 2003).

Para o estudo de sua estrutura, os elementos constitutivos devem se tornar visíveis. No entanto, utilizando microscopia eletrônica é difícil de observar todo o citoesqueleto através de grandes volumes de citoplasma. Essa dificuldade é superada por métodos baseados em imunocitoquímica, que consiste em marcar o citoesqueleto com anticorpos anti-tubulinas para a observação através do microscópio de fluorescência (BASKIN et al, 1992).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico e condução dos ensaios

As sementes de pinhão manso utilizadas foram pré-selecionadas com base no potencial para produção de óleo para biodiesel pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S.A. (EBDA) e pela subsidiária Petrobrás Biocombustíveis na Bahia, como instituições parceiras neste estudo. Foram realizadas pré-avaliações de germinabilidade para quatro diferentes lotes, sendo escolhidos para o presente estudo os dois lotes que apresentaram menor (Janaúba/MG) e maior (Irará/BA) porcentagens de germinação.

As sementes do acesso de Janaúba representam um lote de sementes colhidas na Unidade Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) em Janaúba, município situado no norte de Minas Gerais. Depois de colhidas, as sementes foram doadas à Universidade Federal de Lavras (UFLA), também em Minas Gerais, onde se encontravam a mais de 12 meses armazenadas em sacos de aniagem em galpão aberto. Já o acesso de Irará representava um lote de sementes colhidas na fazenda Porteiras, município de Irará, Bahia, e armazenadas a cerca de dois meses em sacos de plástico em galpão semi-aberto, na Unidade Experimental da EBDA deste mesmo município.

Uma vez recebidas (2008), as sementes foram devidamente identificadas e armazenadas em geladeira (4°C) em sacos plásticos até o início dos procedimentos experimentais em laboratório. Para os dois acessos, as sementes foram caracterizadas quanto ao tamanho, peso fresco de mil sementes, massa seca e teor de umidade. Para os ensaios fisiológicos, as sementes foram previamente desinfestadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio a 5% por 10 minutos e posteriormente enxaguadas por 5 (cinco) vezes em água destilada (BRASIL, 2009).

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (ICS/UFBA), na Unidade de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz e no Laboratório de Microbiologia (ICS/UFBA).

3.2 Caracterização inicial dos lotes

3.2.1 Biometria e peso de mil sementes

As medidas biométricas foram tomadas com auxílio de paquímetro digital (Marathon) com precisão de 0,01 mm. Foram selecionadas aleatoriamente 250 sementes (5 repetições de 50) e analisadas as seguintes dimensões: comprimento (medida do ápice à base/hilo ao lado oposto), largura e a espessura (região mediana). Para obtenção do peso fresco de mil sementes foram utilizadas 10 repetições de 100 sementes. Cada repetição foi pesada separadamente em balança analítica com precisão de 0,0001g e o cálculo realizado conforme recomendações das Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009).

3.2.2 Teor de umidade

Para determinação do teor de umidade das sementes, foram utilizadas 4 repetições de aproximadamente 5 g de sementes, partidas em quatro partes com auxílio de um estilete, e submetidas ao método de estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 24 h. O valor foi expresso em porcentagem de massa fresca das sementes, conforme recomendações das Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009).

3.3 Avaliação fisiológica

A qualidade fisiológica das sementes de pinhão manso pertencentes aos dois acessos (Irará e Janaúba) foi testada mediante a exposição das sementes à restrição hídrica por osmocondicionamento. O pré-tratamento de restrição hídrica foi realizado por hidratação das sementes secas, por 7 (sete) dias, em solução osmótica de polietilenoglicol (PEG 8000, potencial osmótico de -0,8 MPa) preparada de acordo com Villela et al. (2001). As condições de osmocondicionamento foram pré-definidas com base nos ensaios de Loureiro et al. (2008), a partir das quais se verificou total impedimento da germinação de sementes de pinhão manso.

Para testar a qualidade fisiológica inicial dos lotes às sementes de pinhão manso em estudo foram submetidas aos seguintes tratamentos:

- (1) Sementes secas submetidas diretamente à embebição em água, sem osmocondicionamento (**Controle**);
- (2) Sementes osmocondicionadas submetidas frescas à embebição em água (**Osmocondicionadas-Frescas**);
- (3) Sementes secas após osmocondicionamento e submetidas à embebição em água (**Osmocondicionadas-Secas**);

As avaliações fisiológicas constituíram-se de parâmetros a partir de do teste de germinação, conduzido com sementes previamente desinfestadas, dispostas uniformemente entre três folhas de papel de germinação estéril, umedecido com água destilada ou com solução osmótica em volume equivalente a três vezes o peso do papel substrato (7 mL), e incubadas em câmara de germinação (Eletrolab, Mod. EL202) ajustada à temperatura de 25°C, na ausência de luz.

Para cada tratamento utilizou-se 5 repetições de 20 sementes (totalizando 100 sementes). As avaliações foram realizadas diariamente tanto para as sementes embebidas diretamente em água (**Controle**), quanto para as sementes embebidas inicialmente em solução osmótica e depois em água. O pré-tratamento foi realizado trocando-se a solução osmótica a cada dois dias durante o período de osmocondicionamento a fim de evitar eventual contaminação por microrganismos. Ao final do pré-tratamento as sementes foram submetidas a um fluxo de água destilada por 5 minutos para lavagem e eliminação da solução de PEG-8000 sobre a superfície das sementes, e em seguida submetidas diretamente a reembebição em água (**Osmo-Fresca**), ou submetidas à secagem sobre papel na bancada do laboratório por cerca de 3 dias até equilíbrio do teor de umidade inicial dos diferentes lotes de sementes (entre 6 e 9%), sendo posteriormente submetidas a reembebição em água (**Osmo-Seca**).

Os parâmetros avaliados foram: porcentagem de germinação (emissão de raiz primária), índice de velocidade da germinação (IVG,) tempo médio da germinação (Tm), velocidade média da germinação (Vm) e coeficiente de uniformidade da germinação (CUG) (MAGUIRE, 1962; BRASIL, 2009). Os dados foram submetidos a análise de variância. A diferença entre as médias foi analisada pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade, utilizando-se para tal o

programa SISVAR 5.0 desenvolvido pela Universidade Federal de Lavras (FERREIRA, 2000).

3.4 Avaliação molecular

3.4.1 Extração de proteínas totais

a) Preparo das amostras

Para avaliar a presença de β -tubulina em sementes de pinhão manso, foram utilizadas 3 repetições de 15 radículas (cerca de 2 mm) isoladas a partir de eixos embrionários de sementes não germinadas e germinadas. As sementes foram colocadas para embeber em caixas gerbox entre 3 folhas de papel germitest, umedecidas com quantidade de água destilada (0 MPa - Controle) ou com solução de PEG 8000 (-0,8 MPa) equivalente a 3 vezes o peso do substrato e mantidas em câmara de germinação (Eletrolab, Mod. EL202). à 25°C, sob escuro contínuo. A coleta do material dos dois acessos e tratamentos ocorreu em intervalos conforme descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Esquema de isolamento de radículas para cada tratamento.

Acessos	Tratamentos	Tempos de Coleta
Irará e Janaúba	Água 0,0 MPa/25°C	Radículas extraídas de sementes secas
		Radículas extraídas após 24 horas de semeadura
		Radículas extraídas após 48 horas de semeadura
		Radículas extraídas após 72 horas de semeadura em sementes não germinadas
		Radículas protruídas, extraídas após 72 horas de semeadura (acesso Irará) e 96 horas (acesso Janaúba)
	PEG 8000 0,8MPa/25°C	Radículas extraídas após 24 horas de semeadura
		Radículas extraídas após 72 horas de semeadura
		Radículas extraídas após 120 horas de semeadura
		Radículas extraídas após 168 horas de semeadura.

O tegumento foi retirado de sementes não germinadas, expondo o eixo embrionário a partir do qual a radícula era isolada (Figura 1A), ao passo que em sementes germinadas, as radículas expostas foram isoladas diretamente sem a necessidade de retirada do tegumento. As radículas foram isoladas com auxílio de

pinça (Figura 5A) e em seguida colocadas em microtubos (Figura 5B), que por sua vez eram imersos imediatamente em nitrogênio líquido para congelamento instantâneo, e posteriormente armazenado em freezer -80°C até procedimentos posteriores.

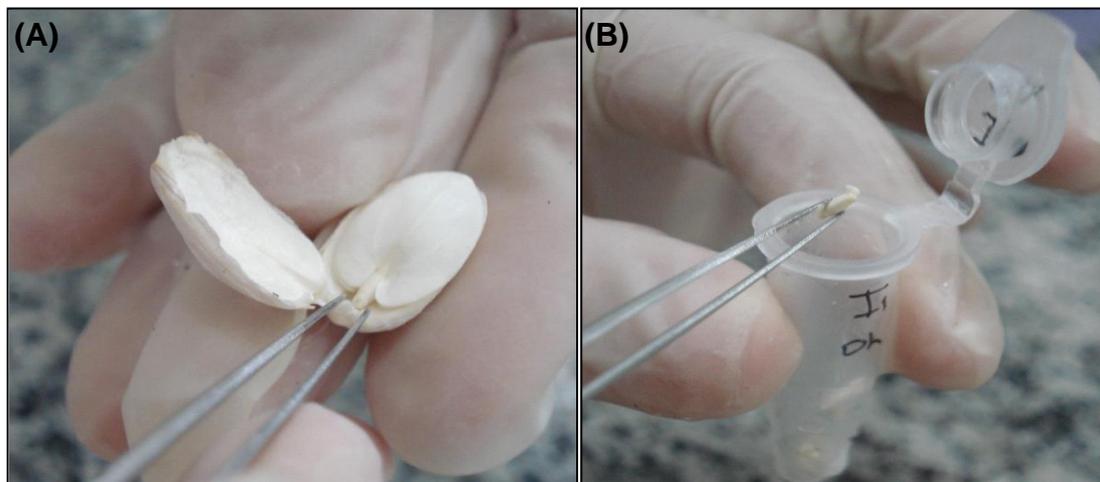


Figura 5. Coleta das radículas para extração de proteínas totais. (A) Coleta; (B) armazenamento de material.

b) Obtenção dos extratos

A extração de proteínas foi feita baseada no protocolo elaborado por em Laemmli (1970) modificado, com ajuste do pH da solução tampão de extração para 9.0 (DE CASTRO et. al. 1998). As radículas embrionárias foram trituradas em nitrogênio líquido com auxílio de bastões de vidro previamente autoclavados. Em seguida as amostras foram pesadas em balança analítica e a solução tampão de extração foi adicionada na proporção de 1:1 (mg/ μ l). O extrato foi homogeneizado em agitador tipo vortex (Ika, mod. MS 3) e aquecido em banho-maria (Polyscience, mod. POL00010) à 100°C durante 10 minutos. Após a desnaturação das proteínas por aquecimento, o extrato foi centrifugado a 4°C durante 15 minutos a 14.000 RPM em centrífuga refrigerada (HETTICH mod. 320R). O sobrenadante foi coletado e dividido em alíquotas de 20 μ L, congelado em ultrafreezer à -80°C (Sanyo mod. MDF U53VC).

c) Determinação da concentração protéica dos extratos

Para a quantificação das proteínas das amostras, utilizou-se os procedimentos do Kit "Micro-protein" (Bio-Rad, cod. nº 500-0002), modificado a

partir dos métodos descritos por Lowry et al. (1951) e Bradford (1976). Para a análise das amostras foi utilizada uma alíquota de 1 μL do extrato bruto diluído em 799 μL de água ultrapura (Millipore, Milli-Q) totalizando 800 μL . Essas amostras foram preparadas em microtubos de 1,5 mL e acrescentado a elas 200 μL do reagente de Bradford (reagente de cor), contido no kit BIO-RAD Protein Assay.

As leituras foram feitas em espectrofotômetro (Analyzer 850M), no comprimento de onda de 595 nm, e o cálculo realizado utilizando a curva de calibração obtida a partir de diluição da solução estoque padrão de albumina sérica bovina – BSA ($1440 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Molecular probes cod. nº T-7451). Os padrões foram preparados diluindo-se a solução estoque de BSA, de maneira a obter soluções padrões com as seguintes concentrações: 0 (branco); 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, acrescentado-se a estes 200 μL do reagente de Bradford e procedendo-se a leitura da absorbância para posterior quantificação.

3.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

Foram preparados géis de poliacrilamida (PAGE - “*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*”) contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS – “*Sodium Dodecyl Sulfate*”) na concentração de 12,5% de acrilamida (Sigma-Aldrich, cod. nº A3553), conforme Tabela 2.

Tabela 2. Protocolo de preparação do gel de eletroforese SDS-PAGE (Laemmli, 1970, De Castro et al. 1998).

Soluções	Gel separador (12,5%)	Gel empilhador (4%)
Solução estoque de acrilamida (Sigma-Aldrich, cod. nº A3553)	6,25 mL	670 μL
Tris-HCl 1,5M pH 8,8 (GE, cod. Nº US75825)	3,75 mL	-----
Tris-HCl 0,5M pH 6,8 (GE, cod. Nº US75825)	-----	1,25 mL
SDS 10% (Sigma-Aldrich, cod. nº L3771)	150 μL	50 μL
Água Bidestilada	4,8 mL	3 mL
TEMED (tetrametilenodiamina) - (Sigma-Aldrich, cod. nº T9281)	22 μL	10 μL
APS 10% (persulfato de amônio) -(GE, cod. nº 17-1311-01)	150 μL	70 μL
Volume final	15 mL	5mL

Após o preparo, a solução de gel separador foi aplicada entre as placas de vidro com o auxílio de pipeta graduada, até a extremidade inferior do pente

(aproximadamente 1,5 cm). Após a polimerização foi aplicada solução de gel empilhador, e inserido o “pente” na parte superior do gel. Cada gel era composto de 10 poços, sendo que no primeiro foram aplicados 15 μ L do marcador High-Range Rainbow (12 – 225 KDa, Amersham, cod. nº RPN756E). No segundo poço foi aplicado padrão de tubulina pura de bovino na concentração de 30 ng (Molecular probes cod. nº T-7451). Nos demais poços foram aplicados as amostras diluídas em solução tampão de amostra contendo azul-de-bromofenol (GE cod. nº 17-1329-01), conforme a concentração total de proteínas, totalizando 15 μ L. Posteriormente esses géis foram usados para os ensaios de Western Blotting.

Para o gel corado com prata, os poços com amostras tinham: a seguinte concentração: 10 μ L de amostra e 5 μ L de tampão de amostra contendo azul-de-bromofenol.

A programação de corrida para cada gel foi de 250V e 20mA (fonte GE EPS 601, cod. nº 18-1130-02), executada em aparelho de eletroforese vertical (Bio-Rad mod. Mini-Protean).

3.4.3 Western blotting

a) Transferência eletroforética

Foi preparado 500 mL do tampão de transferência (1,5g de Tris 25 mM, 7,2g de Glicina 192 mM e 50 mL de Metanol, pH 8,7) (DE CASTRO et. al. 2000). Após a corrida os géis foram identificados (com cortes) e imediatamente medidos e mergulhados no tampão de transferência. A faixa dos géis contendo as bandas de interesse (55 KDa) foi cortada com o auxílio de uma régua ou placa de vidro.

Os papeis para blotting (GE, cod. nº 80-6211-29) foram mergulhados no tampão de transferência, enquanto que a membrana de Fluoreto de Polivinilideno - PVDF (GE, doc. Nº RPN2020F), por ser hidrofóbica, foi primeiramente mergulhada em metanol e posteriormente lavada água bidestilada para retirada do mesmo e depois colocada no tampão de transferência por no mínimo 5 minutos. Foram transferidos para o equipamento de eletrotransferência (GE TE 77 PWR, cod. nº 11-0013-42) 3 folhas do papel para blotting (cortados na mesma

medida do gel) embebidos com tampão de transferência, colocados um a um, cuidadosamente, para evitar a formação de bolhas.

A membrana de PVDF umedecida foi disposta sobre os 3 pedaços de papel para blotting. Em seguida foi colocada a faixa de gel e sobre este mais 3 folhas do papel para blotting embebidos com tampão de transferência, formando um sanduíche (Figura 6).

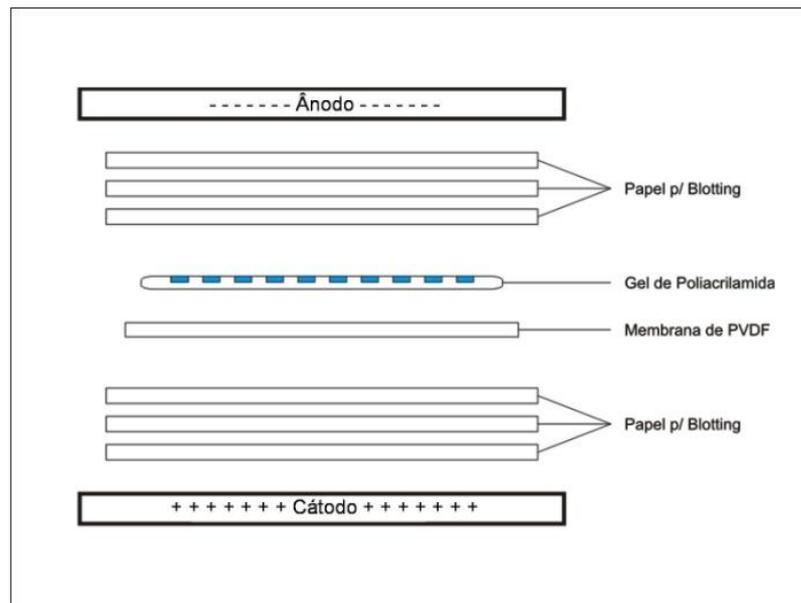


Figura 6. Representação esquemática da confecção do “sanduíche” de Western Blotting.

Em seguida o equipamento foi fechado com cuidado, sem forçar a tampa, evitando-se a formação de bolhas de ar no sanduíche de Western Blotting. Após este procedimento foi iniciada a eletrotransferência, sendo equipamento ajustado para um período de transferência com duração de 2 horas a 80 mA.

b) Imunodeteção de β -tubulina

A membrana descorada passou por duas lavagens com solução tampão salina de Tris contendo Tween-20 (TBST) (Tween-20, Sigma-Aldrich, cod. nº P9416) e em seguida foi incubada em solução bloqueadora 1% (p/v) (Roche, cod. nº 11 096 176 001) durante a noite em geladeira (4°C). No dia seguinte foi colocada em um tubo tipo falcon de 50 mL para incubação durante uma hora em anticorpo primário (anti- β -tubulina/ anticorpo monoclonal de rato contra a β -

tubulina – Chemicon, cod. nº MAB3408) diluído em solução bloqueadora 5% (p/v) e com demais soluções utilizadas nas etapas de imunodeteção.

Após incubação em anticorpo primário, a membrana foi lavada com TBST (2 X 10 minutos) seguida de 2 lavagens de 10 minutos em solução bloqueadora 5% (p/v). Após essa etapa de lavagem, a membrana foi incubada por 1 hora em anticorpo secundário (anticorpo secundário de caprino, contra rato, conjugado com peroxidase – Chemicon, cod. nº AP300P) diluído em solução bloqueadora 5% (p/v). Em seguida a membrana foi submetida a uma nova série de lavagens (4 X 15 minutos) em TBST, e finalmente submetida a detecção das bandas de β -tubulina por meio da reação da peroxidase com o kit de substratos de quimiluminescência (Roche, cod. nº 11500708001). Para tanto, as soluções de detecção do kit (Solução A e B) foram retiradas da geladeira na penúltima lavagem da membrana, para atingirem a temperatura ambiente (25°C) durante a quarta e última lavagem.

Após a última lavagem com TBST a membrana foi deitada em um cassete de revelação fotográfica, do mesmo tipo para revelação de filme de raio-x, de modo apropriado com o lado das proteínas virado para cima, e o reagente de detecção (Solução A+B) foi derramado lentamente sobre a mesma por um período de incubação de 1 minuto. Em seguida o excesso do reagente de detecção foi drenado e a membrana posicionada entre duas transparências dentro do cassete de revelação, sendo estas levemente umedecidas com a solução de detecção evitando a secagem da membrana e a presença de bolhas de ar sobre a mesma. O cassete foi então levado para uma sala completamente escura, onde folhas de filmes específicos para western blotting (Amersham Hyperfilm-ECL, GE, cod. nº 28-9068-36) foram cortados em 4 pedaços (em medidas pouco maiores que a membrana) e marcados para posterior identificação. Em seguida, o cassete foi aberto e os filmes expostos por períodos de 1, 5, 10 e 20 minutos, respectivamente, fazendo-se a captação da quimiluminescência das bandas nos filmes,

A revelação dos filmes foi conduzida no mesmo ambiente escuro, colocando os filmes imersos durante 5 minutos em solução reveladora (Kodak, cod. nº 8610248) evitando-se o contato entre os mesmos. Em seguida foram lavados em

água destilada e imersos em solução fixadora (Kodak, cod. nº 1562826) por no mínimo 5 minutos, lavados em água e postos para secar.

3.5 Avaliação Citológica

3.5.1 Emblocamento das amostras

Radículas de sementes não germinadas e germinadas de pinhão manso foram isoladas seguindo o mesmo esquema experimental da Tabela 1, e submetidas a procedimentos preparativos em nível citológico para imunodeteção de β -tubulina e visualização de possíveis configurações de citoesqueleto microtubular. Os procedimentos preparativos envolveram 4 etapas: fixação, desidratação, infiltração, e emblocamento dos das radículas em resina BMM (butil e metil metacrilato).

O processo de fixação consistiu na imersão das radículas em Paraformaldeído (PFA) a 4% (p/v) mais tampão estabilizador de microtúbulos (MSB, 50mM PIPES, 5mM EGTA, 5mM MgSO₄.7H₂O, 2.5g KOH, pH 6.9), sendo agitados constantemente por 4 horas, seguida de uma serie de lavagens em tampão MSB (4 X 30 minutos). A etapa de desidratação fora realizada gradativamente com trocas seqüenciais de soluções de etanol a 10, 30, 50, 70, 96 e 100% (etanol absoluto), contendo ditioneitol (DTT, 10 mM). A desidratação com séries de soluções de etanol a 10, 30 e 50% foi realizada em intervalos de 30 minutos sob temperatura ambiente (20-25 °C) e leve agitação. A desidratação em solução de concentração de 70% de etanol foi realizada sem agitação durante o período noturno (overnight) em geladeira (4 °C), enquanto que a desidratação com as séries de etanol à 96% e 100% foi realizadas sob leve agitação durante 1 hora, sob temperatura ambiente. A etapa de infiltração também foi realizada de forma gradativa, com trocas seqüenciais de soluções de etanol: BMM (3:1/ 1:1/ 1:3) a cada 2 h, seguida de uma etapa final apenas com BMM a 100% durante o período noturno (overnight). 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 h ou overnight, em freezer à -20°C.

3.5.2 Seccionamento, Imunomarcção e Microscopia

Os cortes anatômicos das radículas de pinhão manso foram realizados em ultramicrótomo (Reichert-Jung, mod. ULTRACUT E), no qual foram produzidas seções semi-finas com cerca de 1µm de espessura, colocadas sobre gotas de água em lâminas preparativas para microscopia. O enrugamento das seções foi removido estirando-as com vapor de clorofórmio, usando-se um cotonete saturado com clorofórmio, posicionado bem próximo à superfície da seção flutuando sobre a gota de água. Em seguida as lâminas foram postas a aquecer brevemente sobre chapa aquecedora à 60°C até evaporar toda água e haver a fixação das seções plenamente estiradas à lâmina.

As etapas para imunodeteção de tubulina consistiram em sequencias alternadas de lavagens, emblocamentos e incubações em anticorpos. As lâminas foram inicialmente lavadas em acetona (2 X 7 min) para retirada completa da resina de BMM, seguido de lavagens em solução tampão salina de fosfato (PBS – *Phosphate buffered saline*) (2 X 10 min) e bloqueamento das seções com cloreto de hidroxilamônio (HAH, 0,1M) (1 X 5 min) (Sigma-Aldrich, cod. nº 5470-11-1), BSA fração-V (BSA-V - Aurion, cod. nº 900.011) e BSA acetilado (BSAc - Aurion, cod. nº 900.099). As seções foram então incubadas em anticorpo primário monoclonal anti-α-tubulina produzido em camundongos (Clone DM 1A, Sigma-Aldrich, cod. nº T9026) diluído 1:100 (v/v) em BSAc, seguido de lavagens em PBS (4 X 15 min), e nova incubação com anticorpo secundário contra camundongo produzido em caprino e conjugado com Alexa Fluor® 488 (Clone B-5-1-2, Invitrogen – Molecular Probes, cod. nº 32-2588) diluído 1:100 (v/v) em BSAc. Por fim procedeu-se a cobertura das seções com glicerol (CITIFLOUR AF-3, Electron Microscopy, cod. nº 17972-25) e lamínula para a deteção e visualização de tubulina e/ou microtúbulos.

As fotomicrografias das seções foram obtidas através de câmera digital acoplada microscópio de fluorescência Olympus QC Collor 3.

3.6 Morfologia da radícula do embrião

Sementes de pinhão manso foram desinfestadas superficialmente conforme ensaios fisiológicos e colocadas, embebidas em água, em câmara de germinação tipo B.O.D. à 25° C sem fotoperíodo. As radículas foram coletadas nos seguintes períodos de embebição: 0h (semente seca), 24 horas, 48 horas e 72 horas (radículas protruídas e não protruídas). Em seguida foram analisadas e fotografadas em lupa binocular.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização inicial dos lotes

As sementes de pinhão manso do acesso Janaúba apresentaram valor médio de 719,15g para peso fresco de mil sementes contra 684,30g para o acesso de Irará, enquanto que os teores de água nos dois acessos foram de 9,4% e 6,5%, respectivamente (Tabela 3). Estes valores representam diferença significativa entre os dois acessos, que por sua vez são distintos do peso fresco de mil sementes de 466,65g sob teor de água de 8,75%, também verificado em *J. curcas* por Dantas et al. (2007). Entretanto, não foi verificada diferença significativa de massa seca entre as sementes dos dois acessos analisados (Tabela 3), de modo que a diferença entre os acessos para o peso de mil sementes está diretamente relacionada com o teor de água dos mesmos.

Tabela 3. Relação entre Germinabilidade, Teor de umidade, Massa seca e Volume de sementes de pinhão manso (*J. curcas*) provenientes de dois de dois acessos.

Acessos	Peso de mil sementes (g)	Massa Seca (g)	Teor de Umidade (%)
IRARÁ	684,29 b	3,95 a	9,37 a
JANAÚBA	719,15 a	4,03 a	6,53 b
Média Geral	701,72	3,99	7,95
CV (%)	1,23*	3,93 ^{n.s}	5,04*

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

*significativo a 5%, ^{n.s} não significativo.

Os teores de água verificados apresentam-se dentro dos limites de 5 a 10% do peso fresco e manutenção da viabilidade das sementes em estado desidratado, comum às espécies de sementes ortodoxas (ROBERTS, 1973; ELLIS et al., 1990; HONG & ELLIS, 1996). A variação do teor de água verificada entre os acessos analisados pode estar relacionada às condições ambientais dos diferentes locais de produção das sementes, ou ainda às condições de secagem, beneficiamento e armazenamento (BEWLEY & BLACK, 1994), ressaltando que as sementes foram mantidas armazenadas em localidades distintas e em local aberto sem controle das condições de armazenamento até que fossem transferidas para sacos plásticos e submetidas à baixa temperatura (refrigerador) antes das análises laboratoriais. Dentre os diversos fatores possíveis, o maior teor

de umidade das sementes de Irapá pode estar aliado ao fato de ser um lote jovem, colhido recentemente quando comparado ao lote antigo oriundo do acesso de Janaúba armazenado na UFLA, em Lavras, Minas Gerais. A manutenção das sementes por longos períodos, após a coleta, em locais abertos na UFLA pode ter favorecido a redução do teor água nas sementes de Janaúba, em função da baixa umidade relativa do ar, o que é comum na região de Lavras no sul de Minas Gerais.

Quanto às dimensões e análise morfométrica, as sementes do acesso Janaúba apresentaram em média 18,17 mm de comprimento, 10,77 mm de largura e 8,69 mm de espessura, enquanto que as sementes do acesso de Irapá apresentaram, respectivamente, 18,36 mm, 11,37 mm e 8,59 mm (Figura 7).

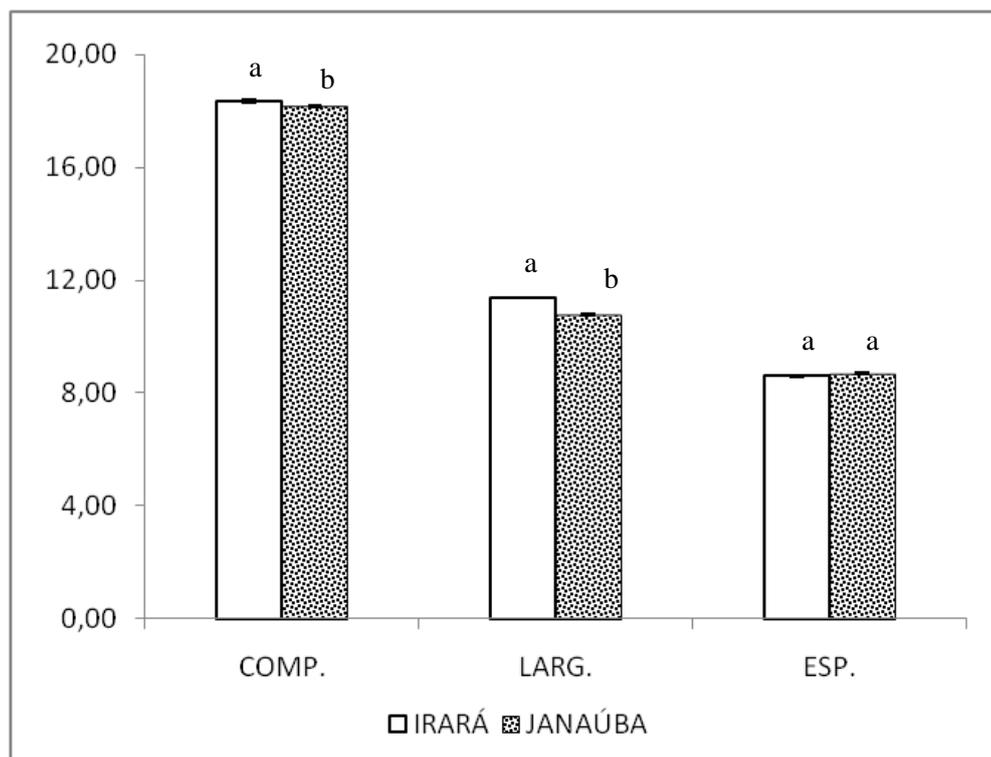


Figura 7. Comparação das medidas de comprimento, largura e espessura (mm) em sementes de *J. curcas* provenientes de dois acessos (Irapá e Janaúba). Colunas com mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

As análises estatísticas demonstraram que há diferença significativa entre o comprimento e largura entre os dois acessos, entretanto não há em relação à espessura. Estas medidas são condizentes com aquelas verificadas por Aquino et al. (2009) estudando a morfometria de sementes de *J. curcas* de diferentes

procedências, os quais encontraram valores de 17,03 a 19,08 mm para comprimento e 8,47 a 8,77 mm para espessura, enquanto que Hui Liu et al. (2009) verificaram 15 a 20 mm de comprimento e 10 a 13 mm de largura. No entanto, Ginwal et al. (2005) verificaram divergências morfológicas e germinativas nas sementes de *J. curcas*, apontando portanto, para a necessidade de seleção e identificação de características físicas, correlacionadas com a qualidade fisiológica, a fim de eliminar as sementes indesejáveis e buscar aprimoramento da qualidade do lote.

Estudos sobre a morfometria de sementes fazem-se necessário visto a importância para identificação botânica, assim como na propagação da espécie. Além de permitir a identificação de genótipos superiores quando aliado a estudos quantitativos de caracteres agronômicos da planta, imprescindíveis para o melhoramento genético (JARVIS et al., 2000; REGO et al., 2007).

4.2 Avaliação fisiológica de sementes não tratadas e de sementes pré-tratadas por osmocondicionamento (efeito da restrição hídrica).

Independente dos resultados para teor de umidade, matéria seca, e dos demais parâmetros analisados, as sementes de pinhão manso oriundas de Irará apresentaram maior porcentagem de germinação (96%), indicando melhor qualidade fisiológica que as sementes oriundas de Janaúba (53%) (Tabela 4).

Tabela 4. Tempo médio (Tm), velocidade média (Vm), índice de velocidade da germinação (IVG) de sementes e Coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) de sementes de *J. curcas* em água e sob restrição hídrica (-0,8MPa) á 25°C..

Tratamentos	Germinabilidade (%)		Tm (dias)		Vm (dias ⁻¹)		IVG (sem. dia ⁻¹)		CUG (dias ⁻²)	
	Irara	Janaúba	Irara	Janaúba	Irara	Janaúba	Irara	Janaúba	Irara	Janaúba
Controle (H₂O)	96 aA	53 bA	3,812 aC	4,047 aB	0,262 aA	0,248 aA	5,415 aA	2,754 bA	0,751 aB	1,332 aA
Osmo -Fresca	67 aB	14 bC	4,282 aB	4,760 aAB	0,235 aB	0,215 aAB	3,354 aB	0,639 bB	0,718 aB	1,350 aA
Osmo - Seca	57 aB	34 bB	4,933 aA	5,359 aA	0,203 aC	0,187 aB	2,371 aC	1,296 bB	1,738 aA	1,319 aA

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%

Este resultado parece refletir um estado de maior deterioração das sementes oriundas de Janaúba, podendo este aspecto ser atribuído às condições de produção e secagem, mas principalmente ao maior período em que o lote de

Sementes envelhecidas, por sua vez, apresentam paredes celulares enfraquecidas e as membranas celulares danificadas, retardando ou perdendo a capacidade para se reorganizarem e reparar os danos resultantes da deterioração durante os momentos iniciais da embebição, sendo assim mais sensíveis aos danos causados por embebição durante o processo germinativo, e passíveis de lixiviação de compostos intracelulares, como resposta de sementes com menor capacidade germinativa (BEWLEY & BLACK, 1994; MARCOS FILHO, 2005).

4.2.1 Efeito da restrição hídrica sobre a embebição e germinação

Em sementes de pinhão manso a reidratação, após tratamento com PEG 8000 no potencial de -0,8 MPa, não aumentou a germinabilidade, bem como não melhorou os outros parâmetros analisados, em ambos os acessos estudados. As sementes oriundas de Irapueta apresentaram germinabilidade de 96, 67 e 57% para os tratamentos controle em água, osmocondicionadas frescas e osmocondicionadas secas, respectivamente. Já as sementes provenientes de Janaúba apresentaram 53, 14 e 34% de germinabilidade para os mesmos tratamentos (Tabela 4). É significativo o decréscimo na qualidade das sementes do acesso Irapueta que passaram por osmocondicionamento, sendo este aspecto refletido na queda das porcentagens de germinação e nas variáveis Tm e IVG que foram negativamente afetadas pelo tratamento, apesar dos valores para o CUG terem se elevado nas sementes osmocondicionadas secas (Tabela 4).

Esses resultados indicam que sementes vigorosas aparentemente respondem de forma inversa ao que é esperado para o osmocondicionamento, havendo redução do vigor. De modo que a eficiência do condicionamento depende da qualidade inicial da semente, sendo que lotes com alta qualidade fisiológica não respondem aos tratamentos de osmocondicionamento com os efeitos positivos característicos de envigoramento ou *priming* (ROSSETO et al., 2002; SOUZA, 2009).

Para sementes de pinhão manso, o potencial osmótico de -0,8 MPa inibe a germinação. Loureiro et al. (2007) verificaram que no potencial osmótico de -0,6 MPa houve uma brusca redução no valor desta variável, chegando a nulidade no potencial de -0,8 MPa. No entanto, a intensidade da resposta germinativa ao estresse hídrico é variável entre as sementes de diferentes espécies. Silva et al., (2005) estudando o efeito do estresse hídrico sobre a germinação de sementes de faveleira (*Cnidoscolus juercifolius*), espécie também pertencente a família Euphorbiaceae e endêmica do semiárido nordestino, constataram que as sementes apresentaram um limite de tolerância maior, verificando a completa inibição da germinação a partir do potencial de -0,9 MPa. A inibição na protrusão da raiz primária decorrente de menor disponibilidade de água relaciona-se, freqüentemente, a reduções na atividade de algumas enzimas com prejuízo ao metabolismo geral das sementes (BEWLEY & BLACK, 1994).

Para o lote Janaúba, as variáveis Vm e CUG não foram afetadas em nenhum dos tratamentos, contudo observou-se uma pequena melhora do Tm e na porcentagem de germinação das sementes osmocondicionadas secas em relação ao controle e às osmocondicionadas frescas, e uma queda nos valores do IVG em relação ao controle (Tabela 4). Vale ressaltar que o valor do IVG é influenciado pelo número total de sementes que germinam na condição do ensaio que está sendo conduzido, e, portanto, é adequado para comparações somente quando as amostras ou tratamentos apresentarem o mesmo número de sementes germinadas (SANTANA & RANAL, 2004). As sementes oriundas de Irapueta apresentaram diferença significativa quando submetidas ao tratamento de osmocondicionamento. Já nas sementes provenientes do acesso Janaúba, pode-se verificar mais de 50% de incremento nos valores de emergência para as sementes osmocondicionadas secas quando comparadas às osmocondicionadas frescas.

Um dos sintomas de declínio do vigor pode ser a redução da velocidade e, frequentemente, aumento do tempo necessário a germinação das sementes, além da própria germinabilidade (SOUZA, 2009). As sementes tendem a perder vigor quanto mais extenso for o período de armazenamento, principalmente sob condições inadequadas. No entanto, o condicionamento osmótico pode recuperar

e aumentar o vigor de sementes envelhecidas, sendo por isso também chamado de “envigoramento” ou *priming* (ROSSETO et al., 2002). Esse perfil de resposta positiva poder ser verificado em sementes mais velhas de *Physallis angulata*, as quais responderam melhor ao osmocondicionamento em virtude do efeito de envigoramento, tanto em condições controladas de laboratório quanto no campo, sujeitas as variações ambientais (SOUZA, 2009).

Nunes et al.(2007), avaliando o efeito do condicionamento osmótico em sementes de *J. curcas* nos potenciais de -0,6 e -1,0 MPa, concluíram que o priming ou condicionamento osmótico não contribuiu para uniformidade na germinação e no vigor das sementes, independentemente do lote analisado. Quando uma semente se hidrata, uma série de mudanças fisiológicas e bioquímicas ocorrem no embrião. Uma embebição prolongada, particularmente sob baixos potenciais hídricos, apresenta uma influência bastante acentuada na velocidade, sincronia e porcentagem de germinação das sementes. As sementes de *J. curcas*, avaliadas nesse estudo, demonstraram baixa tolerância à condições de restrição hídrica (seca), independente da qualidade fisiológica inicial das sementes oriundas de diferentes localidades.

4.3 Morfologia do eixo embrionário e da radícula

Para detalhar a visualização do citoesqueleto microtubular, faz-se necessário uma descrição da morfologia do eixo embrionário, pois esse padrão está diretamente relacionado com a anatomia e com a configuração do citoesqueleto durante as diferentes fases da germinação.

O eixo embrionário das sementes de pinhão manso é axial, espatulado, ou seja, reto com um eixo hipocótilo-radícula cilíndrico. Caracteriza-se ainda por apresentar hipocótilo com diâmetro maior na base, próximo ao colo e menor próximo à inserção dos cotilédones, como descreveu Montero et. al. (2009). Além do meristema da raiz principal, possui quatro protuberâncias meristemáticas na base e região do colo que originarão quatro raízes laterais (Figura 8A). À medida que aumenta o tempo de embebição das sementes em água, as protuberâncias tendem a ficar mais proeminentes e a raiz central com a base espessa, afunilando-se em direção à coifa; (Figura 8B-E).As raízes laterais possuem o

mesmo padrão de desenvolvimento da raiz principal, sendo menos espessas (Figura 8F).

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

Para Carvalho & Nakagawa (2000) o eixo embrionário é a parte mais importante na semente, pois apresenta a capacidade de se desenvolver, graças a presença de tecido meristemático nas suas duas extremidades. Em algumas espécies, abaixo do hipocótilo situa-se apenas o meristema apical da raiz, revestido pela coifa, mas algumas vezes a porção terminal desse eixo adquire características de raiz antes que a sementes germine.

A morfologia do meristema apical da raiz do eixo embrionário de pinhão manso pode estar relacionada com à adaptação a ambientes com restrição hídrica., pois a absorção efetiva de água pela planta se dá através das raízes e é maximizado pelo crescimento destas, assim como dos pêlos radiculares (TAIZ & ZAIGER, 2009). Vale ressaltar que a raiz é o órgão mais sensível aos estresses ambientais. O meristema apical desempenha um papel fundamental na reação imediata a fatores de estresse, ativando cascatas de sinais à outras órgãos da planta (BAGNIEWSKA-ZADWORNA, 2008).

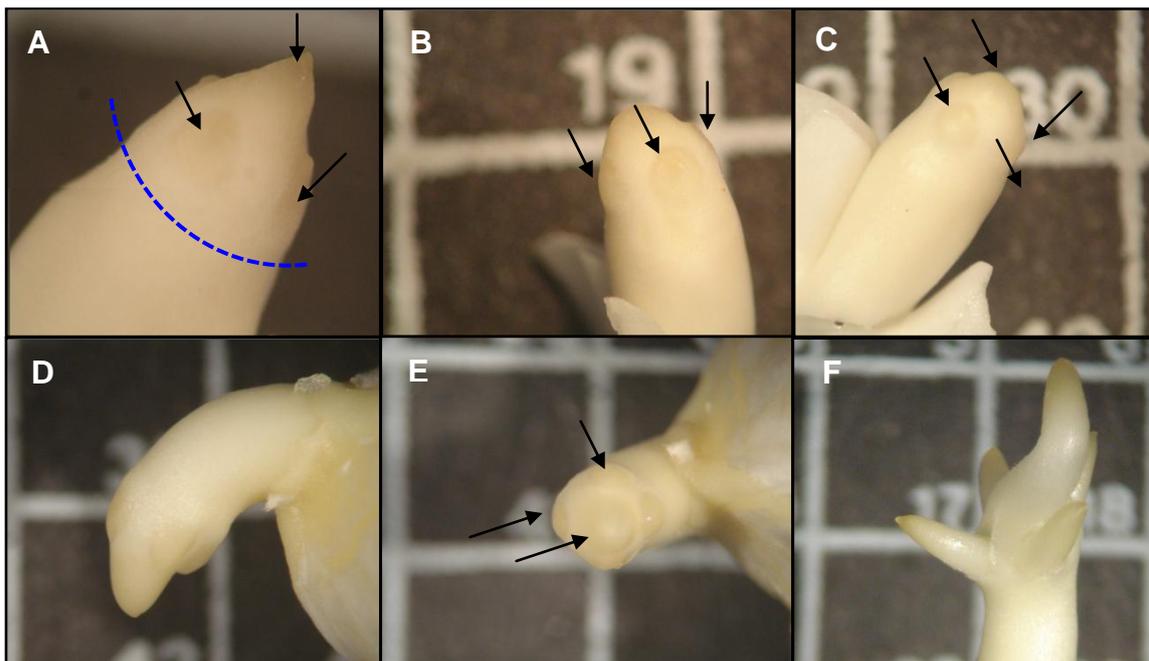


Figura 8. *Morfologia da radícula de pinhão manso em diferentes fases da germinação. (A) Meristema da raiz principal evidenciando quatro protuberâncias meristemáticas. (B, C, D e E) na medida em que aumenta o tempo de embebição das sementes em água (24h, 48h e 72h germinada, respectivamente), as protuberâncias tendem a ficar mais proeminentes e a raiz central com a base espessa, afinando-se em direção à coifa. (F) Num estágio mais avançado de crescimento, as raízes laterais possuem o mesmo padrão de desenvolvimento da raiz principal, porém são menos espessas.*

4.4 Western Blotting de β -tubulina e visualização imunocitoquímica do citoesqueleto microtubular

Verificou-se um acúmulo nos níveis de β -tubulina das amostras estudadas à medida que aumentava o tempo de embebição das sementes. Em embriões de sementes secas foi detectado um sinal muito baixo em ambos os acessos (Figura 9A e 9C). O aumento nos níveis de β -tubulina foi detectado após 24h de embebição e um forte sinal foi detectado a partir de 72h em sementes germinadas (Figura 9A, banda1 e 9C, banda 1'). O uso de tubulina pura de cérebro bovino confirmou que o sinal correspondeu a β -tubulina (massa molecular de 55 KDa).

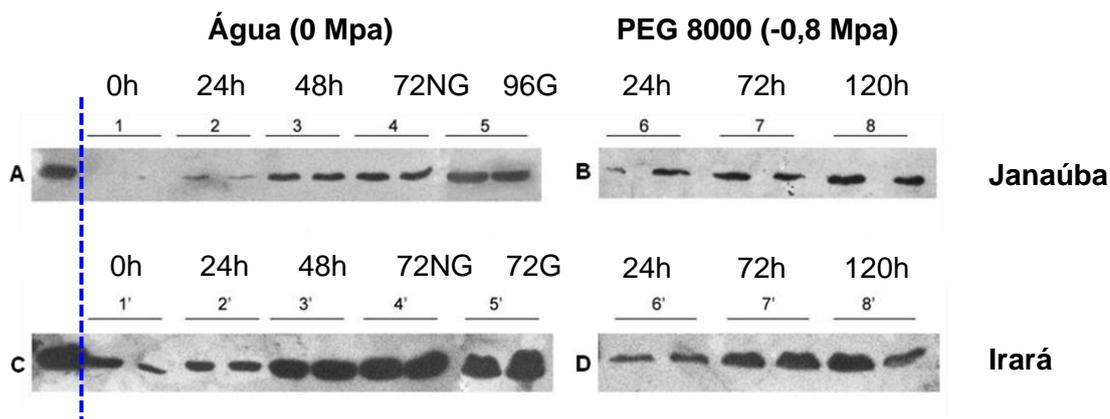


Figura 9. Acúmulo de β -tubulina durante embebição em água e sob restrição hídrica (-0,8 MPa). Acesso Janaúba (A e B) e acesso Irará (C e D).

(A) e (B) Acesso Janaúba: Padrão de tubulina (30ng); 1 - 0h (sementes secas); 2 - 24h em água; 3 - 48h em água; 4 - 72h em água não germinado; 5 - sementes germinadas; 6 - 24h em PEG; 7 - 72h em PEG; 8 - 120h em PEG;

(C) e (D) Acesso Irará: Padrão de tubulina (30ng); 1' - 0h (sementes secas); 2' - 24h em água; 3' - 48h em água; 4' - 72h em água não germinado; 5' - sementes germinadas; 6' - 24h em PEG; 7' - 72h em PEG; 8' - 120h em PEG;

O padrão de acúmulo de β -tubulina, detectado por western blotting, foi comparado com o padrão de configuração do citoesqueleto microtubular detectado por imunohistoquímica. O aumento dessa proteína está relacionado com a progressão do ciclo celular. Embriões de sementes secas não apresentaram microtúbulos organizados (Figura 10A-C). Barrôco *et al.* (2005), estudando embriões de *Arabidopsis*, constatou que a visualização de microtúbulos em embriões de sementes secas é inviável para esta espécie. Porém o arranjo de microtúbulos aumentou gradativamente à medida que as sementes foram embebidas. Em sementes secas de café, somente grânulos de tubulina foram encontrados (DA SILVA *et al.*, 2002).

Em pinhão manso, a partir de 24 horas de embebição, apareceram alguns grânulos fluorescentes de β -tubulina (Figura 10D-F). Estes grânulos tornaram-se bem evidentes a partir de 48h de embebição (Figura 10G-I), formando matrizes curtas e irregularmente orientadas. Após 72h, com a protrusão da radícula (Figura 10J-L), o citoesqueleto foi observado em sua forma cortical. Diversas configurações mitóticas foram registradas como banda pré-profase, fuso mitótico e fragmoplasto.

Essa observação permite inferir que em sementes de pinhão manso o acúmulo de β -tubulina ocorreu concomitantemente com a organização do citoesqueleto microtubular cortical e que o alongamento do embrião acontece exclusivamente por expansão celular, assim como em sementes de *Mendicago truncatula* (FARIA, et al., 2005). Em sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) foram observadas divisões celulares antes da protrusão radicular (DE CASTRO et al., 2000). Em contradição, os níveis de tubulina em sementes de *Vicia faba* permanecem constantes ao longo da germinação e os microtúbulos podem ser despolimerizados até se tornarem visíveis com a germinação (FUJIKURA et al., 1999).

Em *Acer platanooides* L., a atividade do ciclo celular e acúmulo de β -tubulina precedem a expansão e divisão celular e subsequente protrusão da radícula através do tegumento. A ativação do ciclo celular e o acúmulo de β -tubulina nessa espécie foram associados com a quebra de dormência de embriões e poderiam ser indicadores do processo de liberação da dormência em sementes (PAWŁOWSKI et al., 2004).

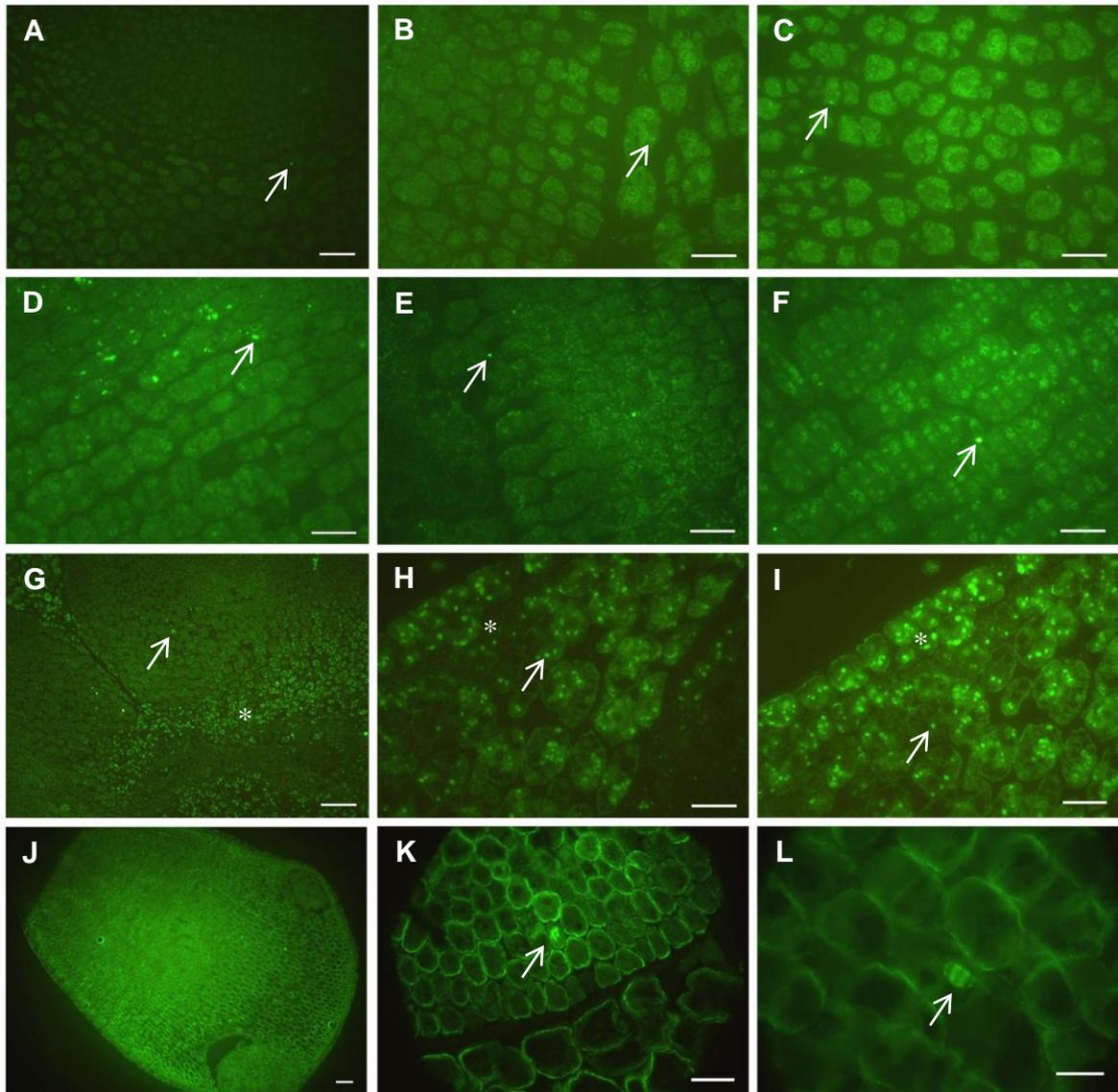


Figura 10. Organização do citoesqueleto microtubular em sementes de pinhão manso embebidas em água. As micrografias de fluorescência apresenta padrões de seções longitudinais de meristema radicular do embrião marcado com Alexa Flúor 488 (as barras indicam 25 μm). (A - C): 0 h (sementes seca); (D – F): 24 h; (G - I): 48 h; (J - L): 72 h (radículas protrudidas).

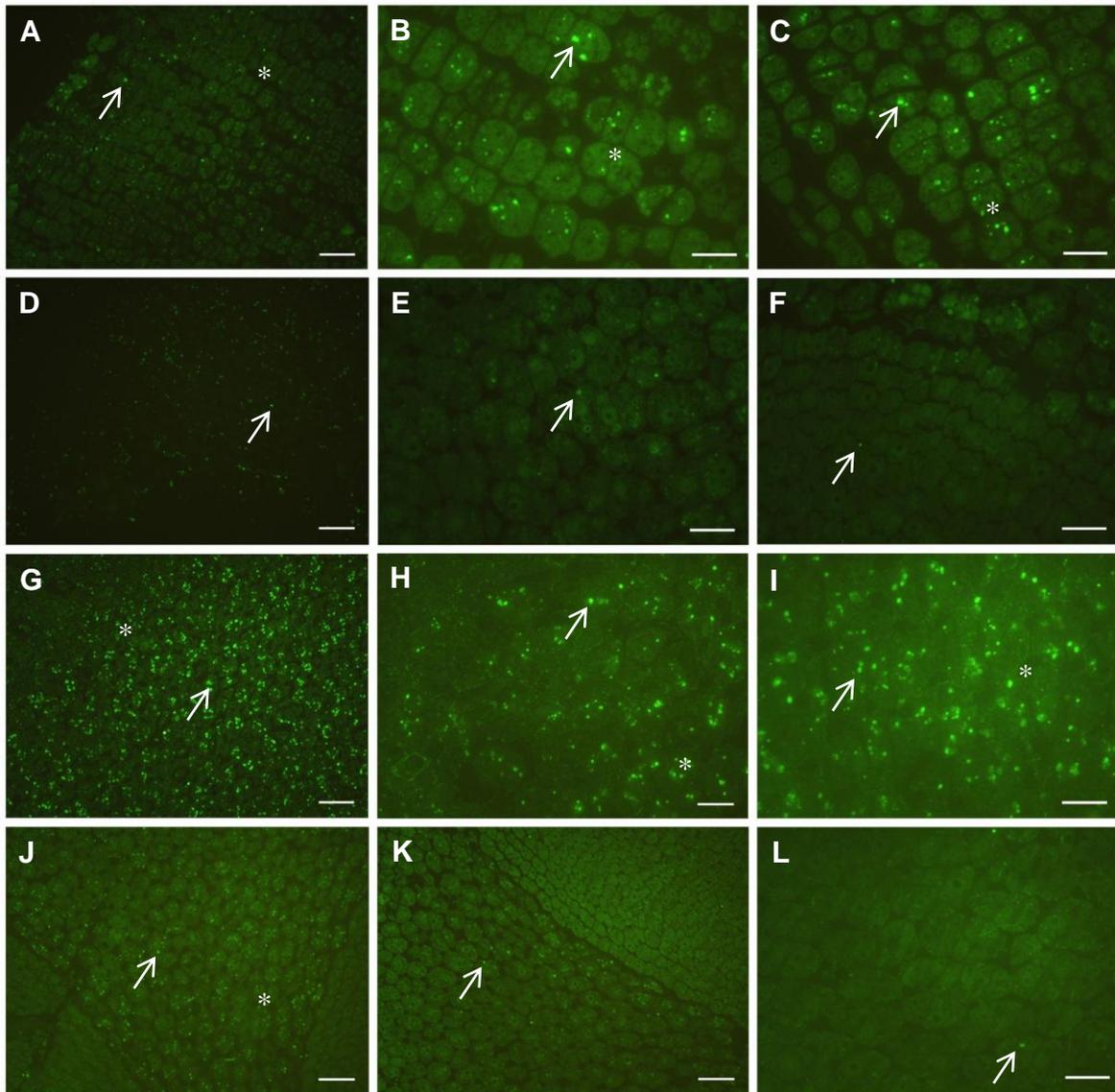


Figura 11. Organização do citoesqueleto microtubular em sementes de pinhão manso sob restrição hídrica (-0,8MPa). As micrografias de fluorescência apresentam padrões de seções longitudinais de meristema radicular do embrião marcado com Alexa Flúor 488 (as barras indicam 25 μm). (A – C): 24 h; (D – F): 72 h; (G - I): 120 h; (J – L): 168 h

Parece ser claro que, em geral, a fase M ou de divisão celular ocorre concomitantemente com, ou após, a protrusão da radícula. Portanto, apenas as iniciais fases do ciclo celular são necessárias para germinação de sementes (BEWLEY & BLACK, 1994). Segundo Vázquez-Ramos e Sánchez (2003) os eventos de um ciclo celular completo não são essenciais para que a germinação ocorra. Assim, a protrusão da radícula não é, metabolicamente, o final do processo de germinação, pois a proliferação celular, uma exigência para o estabelecimento das plântulas, pode não ter sido plenamente desencadeada.

Nas sementes de pinhão manso sob restrição hídrica (-0,8 MPa), quantitativamente os níveis de β -tubulina aumentaram somente a partir de 72h, mantendo-se constantes até 168h (Figuras 9B e 9D). Nas análises imunohistoquímicas, apareceram grânulos fluorescentes de β -tubulina em todos os tempos estudados (Figura 11), sendo mais evidentes após 120h de incubação em PEG 8000 (figura 15G-I). Neste tempo, também é possível verificar algumas matrizes corticais. Este padrão desaparece às 168h (figura 11 J-L), onde apenas pontos fluorescentes voltam a aparecer.

Os resultados obtidos indicam que os microtúbulos corticais participam da adaptação das plantas a estresses ambientais. No entanto, não se sabe como eles controlam a capacidade da planta para resistir a condições de estresse. De acordo com Wang et al. (2007) a despolimerização dos microtúbulos corticais não é apenas uma consequência passiva de estresse, mas desempenha um papel ativo para iniciar a cascata de reações. Assim, a hipersensibilidade do citoesqueleto microtubular poderia ser um parâmetro útil e simples para estimar a intensidade de estresse ambiental.

O impedimento da germinação, através de inibidores da síntese de proteínas ou RNA, tem sido tomado como uma prova de que novas proteínas / mensageiros devem ser sintetizadas *de novo* durante a embebição. Possivelmente há algum tipo de controle que inibe o estabelecimento da fase S, se as condições adequadas para de germinação não forem alcançadas. Diferentes espécies podem ter desenvolvido mecanismos singulares de controle mais adequados para suas características de germinação e habitat (VÁZQUEZ-RAMOS & SÁNCHEZ, 2003).

5. CONCLUSÕES

- Sementes de *J. curcas* não demonstraram tolerância à restrição hídrica (seca) durante a fase inicial do seu ciclo de vida e ao armazenamento prolongado sob condições ambientais não controladas.

- O pré-tratamento por osmocondicionamento a -0,8 MPa não foi eficaz para a melhoria da qualidade e do vigor das sementes de *J. curcas* no período de 7 dias.

- Em sementes de *J. curcas* o acúmulo de tubulina ocorre concomitantemente com a organização do citoesqueleto microtubular cortical durante o período de embebição em água, ao passo que sob restrição hídrica esse processo é retardado, inibindo a reativação do ciclo celular.

- O alongamento da radícula embrionária em sementes de *J. curcas* acontece exclusivamente por expansão celular.

- Divisões celulares ocorrem somente após a protrusão radicular.

- As sementes de *J. curcas* possuem embrião com radícula multimeristemática.

- Todos os meristemas são passíveis de acúmulo de tubulina e citoesqueleto microtubular durante o processo de germinação.

6. REFERÊNCIAS

ACHTEN, W. M. J. et al. *Jatropha* bio-diesel production and use. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v.32, n.12, p.1063-1084, 2008.

AÑEZ, L.M.M. et al. Caracterização morfológica dos frutos, das sementes e do desenvolvimento das plântulas de *Jatropha elliptica* Müll. Arg. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**. v.28, n.3, p.563-568, 2005.

ALVES, J. J. A. **Geoecologia da Caatinga no Semi-Árido do Nordeste Brasileiro**. Climatologia e Estudos da Paisagem, Rio Claro, V. 2 - n.1. 2007, p. 71.

AQUINO, N. F. et al. Morfometria de sementes de *Jatropha curcas* L. em função da procedência. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages, v.8, n.2, p. 142-145, 2009.

ARAÚJO-NETO J. C. ET AL. Caracterização morfológica de frutos e sementes e desenvolvimento pós-seminal de monjoleiro (*Acacia polyphylla* DC.). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 24, nº 1, p.203-211, 2002.

ARRUDA, F. P. de, et al. Cultivo de Pinhão Manso (*Jatropha curca* L.) como Alternativa para o Semi-árido Nordestino. **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.

BAGNIEWSKA-ZADWORNA, A. The root microtubule cytoskeleton and cell cycle analysis through desiccation of *Brassica napus* seedlings. **Protoplasma**, v.233, p.177–185, 2008.

BARLOW, P. W. **The cell division cycle in relation to root organogenesis**. In: *Molecular and Cellular Biology of the Plant Cell Cycle* (Ormrod JC, Francis D, eds). Dordrecht, NL: Kluwer Academic Publishers, p. 179-199, 1993.

BARRÔCO, R. M. et al. The Role of the Cell Cycle Machinery in Resumption, of Postembryonic Development. **Plant Physiology**, v. 137, p.127–140, 2005.

BASKIN, T.I. et al. 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.

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

Biodiversidade, Projeto Mata Branca. **Secretaria do Meio Ambiente**. Disponível em <<http://www.meioambiente.ba.gov.br/conteudo.aspx?s=BIOMATAB&p=BIODIVER>>. Acesso em: 29 de agosto de 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.

BRADFORD, K.J. Manipulation of seed water relation via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **Hort Science**, Alexandria, v.21, n.3, p.1105- 1112, 1986.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária Brasília-DF: Departamento Nacional de Produção Vegetal – SNA/DNPV/CLAV. 2009. 399 p.

CARDOSO, V. J. M. Germinação, p. 386 – 408. In: KERBAUY, G.B. (Org.). **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2004. 451 p.

CARVALHO, B. C. L et al. **Informações técnicas para o cultivo do pinhão-mansão no Estado da Bahia**. Salvador: EBDA, 2009, 79 p.

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

CÓRDOBA, G. A. T. et al. Osmocondicionamento em sementes de *Esenbeckia leiocarpa* ENGL (GUARANTÃ). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 17, nº 2, p. 220-226, 1995.

DANIEL, O. et al. Germinação de sementes e sobrevivência inicial de plântulas de *Astronum concinnum* Schott (Gonçalo-Alves) em condições naturais. **Revista Árvore**, Viçosa, v.12, n.2, p.196-208, 1988.

DANTAS, B. et al. Tecnologia de sementes de Pinhão Manso (*Jatropha curcas*): Avaliações iniciais da qualidade fisiológica. **II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel**. Arquivos eletrônicos, publicações, Agricultura, Brasília, 2007. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/agricultura/69.pdf> . Acesso, em 9 de setembro de 2010.

DA SILVA, E. A. A. **Coffee seed (Coffea arabica cv. Rubi) germination: mechanism and regulation**. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 2002, 105p

DE CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. In: FERREIRA, A. G. & BORGUETTI, F. (Org.) **Germinação: do básico ao aplicado**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 323 p.

DE CASTRO, R. D. et al. Detection of b-tubulin in tomato seeds: optimization of extraction and immunodetection. **Phytochemistry**, v.47, p. 689–694, 1998.

DE CASTRO, R. D. et al. 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, p.327–335, 2000.

DE CASTRO, R. D.; LEAL, L. E. **Levantamento e Caracterização dos Sistemas de Produção e de Acessos de pinhão manso em região do semi-árido brasileiro**. Projeto de dissertação apresentado ao Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais, UESF. Feira de Santana, 2009.

DE CASTRO R. D.; HILHORST, H. W.M. dormancy, germination and the cell cycle indeveloping and imbibing tomato seeds. **R. Bras. Fisiol. Veg.** v. 12, p. 105-136, 2000.

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

DRUMOND, M. A (coordenador) et al. **Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da Caatinga**. Petrolina, 2000. Disponível em: <http://www.biodiversitas.org.br/caatinga/relatorios/uso_sustentavel.pdf>. Acesso em: 29 de agosto de 2010.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. **An intermediate category of seed storage behaviour?**: I., coffee. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.

EULER, H.; D. GORRIZ. **Case study “Jatropha curcas”**. Global Facilitation Unit for Underutilized Species (GFU) and Deutsche Gessellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ), Frankfurt, Germany, 63 p. 2004.

FARIA, J. M. R. et al. 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.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Jatropha: A Smallholder Bioenergy Crop The Potential for Pro-Poor Development**. Org. R. Brittain & NeBambi Litaladio. Vol. 8, Roma, 2010. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/012/i1219e/i1219e00.pdf>. Acesso em 17 de novembro de 2010.

- FUJIKURA, Y. et al. *Vicia faba* germination: synchronized cell growth and localization of nucleolin and α -tubulin. **Seed Sci Res**, v. 9, p.297–304,1999.
- GINWAL, H.S.; RAWAT, P.S.; SRIVASTAVA, R.L. Seed source variation in growth performance and oil yield of *Jatropha curcas* Linn. in Central India. **Silvae Genetica**, Dehradun, v. 53, n. 4, 2004.
- GINWAL, H.S. ; PHARTYAL, S.S. ; RAWAT, P.S. SRIVASTAVA, R.L. Seed source variation in morphology, germination and seedling growth of *Jatropha curcas* Linn. In central India. **Silvae Genetica**, Dehradun,v. 54, n. 2, 2005.
- GIAVENO, C. D. ; OLIVEIRA, R F . **Estresse ambiental**: Conceitos gerais. Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 2003 (publicação eletrônica). Disponível em <<http://www.sbfv.org.br/materialdidatico/download/Estresse1ricardo.pdf>>. Acesso em 01 de Setembro 2010
- GIULIETTI, A. M. et al. **Diversidade e Caracterização de Fanerógamas do Semi-Árido Brasileiro**. Recife, Associação de Plantas do Nordeste, 2006. V. 1. 19 p.
- GODDARD, R. H. et al. Microtubule Components of the Plant Cell Cytoskeleton. **Plant Physiol**. v.104, p. 1-6, 1994.
- GUNNING, B. E. S.; STEER, M. W. **Plant cell biology, structure and function**. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts. 1996.
- HELLER, J. **Physic nut. *Jatropha curcas* L.: promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. 1ª ed.Roma: IPGRI, 1996, 66 p.
- HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 55 p.
- HUI LIU *et al.* A Comparative Analysis of Embryo and Endosperm Proteome from Seeds of *Jatropha curcas*. **Plant Biol**. V.10.1111, p.1744-7909, 2009.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/cartografia/default_territ_area.shtm>.

Acesso em: 29 de agosto de 2010.

JARVIS, D.I. **Los caracteres agromorfológicos y la selección y el mantenimiento queda el agricultor.** In: IPGRI, Training Guide for in situ conservation on-farm. Roma:IPGRI, 2000.p.51-81.

JING H-C, et al. β -Tubulin accumulation and DNA synthesis are sequentially resumed in embryo organs of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds during germination. **Protoplasma** 208: p. 230-239, 1999.

JONGSCHAAP, R.E.E, et al. Claims and Facts on *Jatropha curcas* L., **Plant Research International**, Wageningen, 2007.

KLEINSMITH, L. J. & KISH, V. W. **Principles of Cell and Molecular Biology.** HarperCollins College Publishers, New York, 2^a ed. 1995.

KOST, B. & CHUA N-H. **The Plant Cytoskeleton:** Vacuoles and Cell Walls Make the Difference. *Cell*, Vol. 108, p.9–12, 2002

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.1970

LIMA, G. M. P. et al. **Inselberg: Ilhas terrestres.** EDUFBA, Salvador, Brasil, 2009, 18 p.

LOUREIRO, M. B. et al. **Efeito do Estresse Hídrico Sobre a Germinação de Sementes Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.).** In: **II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel.** Arquivos eletrônicos, publicações, Agricultura, Brasília, 2007. Disponível em <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/agricultura/29.pdf>>. Acesso em: 9 de setembro de 2010.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; Farr, A.L. e Randal, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275. 1951

MAGUIRE, J.D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999a. cap.3, p.3.1-3.24.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia das Sementes de Plantas Cultivadas**.

Piracicaba: Fealq, v. 12, 2005. 495 p.

Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <

<<http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=203>>.

Acesso: 29 de agosto de 2010.

MONTERO, D. S. et al. **Caracterização Morfológica de Sementes e do Desenvolvimento Pós-seminal de *Jatropha curcas* L. (EUPHORBIACEAE)**. In: 60 Congresso Nacional de Botânica, 2009, Feira de Santana - BA. Anais do 60 Congresso Nacional de Botânica, 2009.

MOURA, A. S.; CAMPOS, G. C. C. (coord.). **Cenário para o Bioma Caatinga**. Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Caatinga, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente de Pernambuco, Recife, 2004

NUNES, C.F. et al. Morfologia externa de frutos, sementes e plântulas de pinhão manso. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.44, n.2, p.207-210, 2009.

NUNES, F. B. S. et al. Condicionamento osmótico em sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) In: **II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel**. Arquivos eletrônicos, publicações, Agricultura, Brasília, 2007.

Disponível em:

<<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/agricultura/18.pdf>>. Acesso em:

9 de setembro de 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.

PAWŁOWSKI, T. A., 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.

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

PRADO, D. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M.C. (eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Editora Universitária, UFPE, Recife, Brasil, 2003, 822 p.

PURCINO, A. A. C.; DRUMMOND, O. A. **Pinhão manso**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1986. 7p

REGO S. S. *et al.* Caracterização morfológica do fruto, semente e germinação de *Duranta vestita* Cham. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 474-476, jul. 2007.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 2, p. 499-514, 1973.

RODAL, M. J. N.; SAMPAIO, E. V. S. B.; FIGUEIREDO, M. A. (Ed.) **Manual sobre Métodos de Estudo Florístico e Fitossociológico** – Ecosystema Caatinga - Sociedade Botânica do Brasil, 1992, 24 p.

ROSSETO, C. A. V.; LIMA, T. M.; NAKAGAWA, J. Qualidade fisiológica e potencial de armazenamento de sementes de tomate submetidas ao osmocondicionamento. **Horticultura brasileira**. V. 20, n. 4, p. 630-634, 2002.

SALOMÃO, A.N.; SOUSA-SILVA, J.C.; DAVIDE, A.C.; GONZÁLES, S.; TORRES, R.A.A.; WETZEL, M.M.V.S.; FIRETTI, F.; CALDAS, L.S. **Germinação de Sementes e Produção de Mudanças de Plantas do Cerrado**. In: SALOMÃO, A.N...[et al.]. (Orgs.) Brasília, Rede de Sementes do Cerrado, 2003. 96. p. il.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. **Análise estatística na germinação: um enfoque estatístico**. Brasília: Editora UnB, Brasília, 2004, 248p.

SANTOS, M. J.; MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Biologiareprodutiva de duas espécies de *Jatropha* L.(Euphorbiaceae) em Caatinga, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.28, n.2, p.361-373, 2005.

SATO, M. et al. A cultura do Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.): uso para fins combustíveis e descrição agrônômica. **Revista Varia Scientia**, v.07, n.13, p.47-62, 2009.

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

SHEORAN, I.S. et al. Proteoma analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds. **Proteomics** 5, 3752–3764. 2005.

SILVA, L. M. de M. et al. Estresse hídrico e condicionamento osmótico na qualidade fisiológica de sementes de *Cnidoscolus juercifolius*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9, n.1, p.66-72, 2005.

SILVA, L. M. M.; AGUIAR, I. B.; TERTULIANO, S. S. X. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Cnidoscolus juercifolius* Pax & K. Hoffm (Euphorbiaceae). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v.7, n. 2, p. 1519-5228, 2007.

SOUZA, C. L. M. **Germinabilidade de sementes de *Physalis angulata* L. (Solanaceae) sob condições de estresses abióticos**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009, 52p.

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

TAIZ, Lincoln.; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia Vegetal**. Versão traduzida. 4ª ed. Porto Alegre: 2009. 738 p.

TAYLOR, A. C. **Seed storage, germination and quality**. The physiological of vegetable crops. New York, 1997, p. 1-36

VARELA, F. G.; MATURANA, H. R.; URIBE, R. Autopoiesis: the organization of living systems, its characterisation and a model. **Biosystems**, V.5, P.187-196, 1975.

VÁZQUEZ-RAMOS, J. M.; SÁNCHEZ, M. D. L. P. The cell cycle and germination. **Seed Science Research**, v. 13, p.113–130, 2003.

VERÍSSIMO. A. **Estratégias e Mecanismos Financeiros para Florestas Nativas do Brasil**. Documento Técnico, FAO, Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 2006, p. 13. Disponível em: <www.fao.org/forestry/11892-3-0.pdf>. Acesso em: 29 de agosto de 2010.

VERLUES, P. E. et al. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plan Journal**, v. 45, p. 471–694, 2006.

VILLELA, F. A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietilenoglicol 6000 e ta temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.26, n. 11/12, p.1957-1968, 1991.

VILLELA, F. A. & BECKERT, O. P. Potencial osmotic de soluções de polietileno glycol 8000. **Revista Brasileira de Sementes**, vol.23, nº1, p.267-275, 2001.

WANG, C.; LI, J, YUAN, M. Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in Arabidopsis. **Plant Cell Physiol**, v.48, p.1534–1547, 2007.

WASTENEYS, G.O.; GALWAY, M. E. Remodeling the cytoskeleton for growth and form. **Rev Plant Biol**, v.54, p.691–722, 2003.

WASTENEYS, G. O.; YANG, Z. New views on the plant cytoskeleton. **Plan Physiology**. v.136, p.3384-3391, 2004

WRIGHT, A. J.; GALLAGHER, K., SMITH, L. G. Redundantly at the Cortical Division Site to Promote Preprophase Band Formation and Orient Division Planes in Maize. **The Plant Cell**. v. 21, p. 234–247, 2009

YOON, B.Y.; LANG, H.J.; COBB, B.G. Effects of priming on improve germination under stress. **Horticultural Science**, Calcutá, v.32, n°.2, p. 383-395, 1997.