

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

STÉFANIE CRISTINA DE OLIVEIRA

POLIPLOIDIZAÇÃO E CALOGÊNESE *IN VITRO* DE *Jatropha curcas* L.

ALEGRE, ES

2012

STÉFANIE CRISTINA DE OLIVEIRA

POLIPLOIDIZAÇÃO E CALOGÊNESE *IN VITRO* DE *Jatropha curcas* L.

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr Wellington Ronildo Clarindo.

Coorientador(es): Prof. Dr^a. Andreia Barcelos Passos Lima, Prof. Dr. Carlos Roberto de Carvalho

ALEGRE, ES

JULHO – 2012

STÉFANIE CRISTINA DE OLIVEIRA

POLIPLOIDIZAÇÃO E CALOGÊNESE *IN VITRO* DE *Jatropha curcas* L.

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada: 27 de julho de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Wellington Ronildo Clarindo
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador



Prof. Dr. Carlos Roberto Carvalho
Universidade Federal de Viçosa
Co-orientador



Prof. Dr^a. Milene Miranda Praça-Fontes
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr^a. Larissa Fonseca Andrade-Vieira
Universidade Federal do Espírito Santo



Pesquisadora Dr^a. Maria Andréia Corrêa Mendonça
Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica
e Extensão Rural - INCAPER

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

O48p Oliveira, Stéfanie Cristina de, 1986-
Poliploidização e calogênese in vitro de *Jatropha curcas* L. / Stéfanie
Cristina de Oliveira. – 2012.
72 f. : il.

Orientador: Wellington Ronildo Clarindo.
Coorientadores: Carlos Roberto de Carvalho; Andreia Barcelos Passos
Lima.
Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Pinhão-mansô. 2. Genética vegetal. 3. Biotecnologia agrícola.
I. Clarindo, Wellington Ronildo. II. Carvalho, Carlos Roberto de. III. Lima,
Andreia Barcelos Passos. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro
de Ciências Agrárias. V. Título.

CDU: 63

Esta dissertação é dedicada a meu avô, José Otaviano de Oliveira (*in memoriam*), exemplo de determinação, trabalho, simplicidade e força de vontade, de quem guardo eterna admiração e ensinamentos.

DEDICO

“Seja a mudança que você quer ver no mundo”
Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus, por tudo.

À Universidade Federal do Espírito Santo, especificamente ao Centro de Ciências Agrárias, pela oportunidade de realização de meus estudos.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À minha querida família, pelo amor incondicional e por estar sempre ao meu lado em todas as minhas conquistas. Em especial, aos meus pais Márcia e José Francisco e meus irmãos, Lucas e Diego.

A mais nova família: Amilton, meu grande companheiro, e nossa filha Marjorie, que ilumina nossas vidas e me impulsiona nas buscas de meus sonhos e conquistas.

Ao professor Dr. Wellington Ronildo Clarindo, pela orientação, dedicação, atenção, paciência e ensinamentos que jamais serão esquecidos, meu eterno agradecimento e admiração. À professora Dr^a. Andreia Barcelos Passos Lima e professor Dr. Carlos Roberto Carvalho, pela coorientação e enorme colaboração na realização deste trabalho.

A todos os professores que contribuíram com seus conhecimentos em prol de meu crescimento profissional nesses dois anos e, principalmente, pelos bons momentos vividos.

Aos membros examinadores da banca, Prof. Carlos, Prof^a. Milene, Prof^a. Larissa, Dr^a. Maria Andréia, pelas sugestões e ajuda para o engrandecimento de meu trabalho.

Aos meus amigos, que considero verdadeiros irmãos, Andrei e João Paulo, que contribuíram em todo meu percurso, deixaram os dias mais alegres e me confortaram também nas horas difíceis, a minha eterna gratidão e admiração.

Aos meus queridos amigos, Thaíse, Cândido, Naninha, Aline, Joana, Geovana, Daniele, Mariela, Anelise, Samara, Letícia, Mariana, Renata, Paula, Natielia, Onair, Namara, Paulo Roberto, Paulo Henrique, Michelle, Elias, Victor, Tony, Walas, Maria Andréia, José Dias, Ludymila, Liana, Alan, Josimar, Christiane, obrigada pela disponibilidade, prontidão e carinho. Às minhas queridas amigas, Sara e Nathale, por fazerem parte de muitos momentos de alegria e muito estudo.

À Dona Idalina, que considero como minha segunda mãe, pelo acolhimento, bondade, amizade.

BIOGRAFIA

Stéfanie Cristina de Oliveira, filha de José Francisco de Oliveira e Márcia Cristina de Oliveira, nasceu em Barbacena, Minas Gerais, em 08 de julho de 1986. Aos 18 anos, ingressou no curso de Biotecnologia, na Universidade Presidente Antônio Carlos – UNIPAC, na cidade de Barbacena, MG. Aos 22 anos de idade, obteve o título de bacharel em Biotecnologia. No segundo semestre de 2010, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, atuando na área de Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas, mais especificamente, na área de Citogenética e Cultura de Tecidos de Plantas, sob a orientação do Prof. Dr. Wellington Ronildo Clarindo, submetendo-se à defesa de dissertação em julho de 2012.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Características gerais de <i>Jatropha curcas</i> L.....	16
2.2 Importância agroeconômica de <i>J. curcas</i> no cenário mundial.....	18
2.3 Aspectos citogenéticos e citométricos de <i>J. curcas</i>	20
2.4 Aspectos da propagação <i>in vitro</i> de <i>J. curcas</i>	22
2.5 Poliploidização <i>in vitro</i> : uma importante ferramenta no melhoramento de plantas.....	24
3. OBJETIVOS	28
4. REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO I <i>In vitro</i> polyploidization from shoot tips of <i>Jatropha curcas</i> L.: a biodiesel plant	38
1. Abstract.....	39
2. Introduction.....	40
3. Materials and methods.....	41
3.1 Plant material.....	41
3.2 2C-value and karyotype of <i>J. curcas</i>	41
3.3 <i>In vitro</i> recovery of <i>J. curcas</i> shoot tips.....	42
3.4 <i>In vitro</i> multiplication and assessment of DNA ploidy level.....	42
3.5 <i>In vitro</i> polyploidization.....	43
4. Results.....	44
4.1 2C-value and karyotype of <i>J. curcas</i>	44
4.2 <i>In vitro</i> recovery of <i>J. curcas</i> shoot tips.....	46
4.3 <i>In vitro</i> multiplication and assessment of DNA ploidy level.....	46
4.4 <i>In vitro</i> polyploidization.....	46
5. Discussion.....	51
5.1 2C-value and karyotype of <i>J. curcas</i>	51
5.2 <i>In vitro</i> recovery of <i>J. curcas</i> shoot tips.....	52
5.3 <i>In vitro</i> multiplication and assessment of DNA ploidy level	53
5.4 <i>In vitro</i> polyploidization.....	54

6. Acknowledgements.....	55
7. References.....	55
CAPÍTULO II Establishment of calli culture from leaf explants of <i>Jatropha</i>	
<i>curcas</i> L.....	61
1. Abstract.....	62
2. Introduction.....	63
3. Materials and methods.....	64
3.1 Plant material.....	64
3.2 Calli induction.....	64
3.3 Statistical analysis.....	65
4. Results.....	65
5. Discussion and conclusion.....	67
6. Acknowledgements.....	68
7. References.....	68
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72

OLIVEIRA, Stéfanie Cristina, M.Sc., Universidade Federal do Espírito Santo, julho de 2012. **Poliploidização e calogênese *in vitro* de *Jatropha curcas* L.** Orientador: Dr. Wellington Ronildo Clarindo. Coorientadores: Dr^a. Andreia Barcelos Passos Lima e Dr. Carlos Roberto de Carvalho.

RESUMO

O uso de bioenergia tem sido apontado como uma estratégia para diminuição da utilização de combustíveis fósseis. Fundamentado nesse fato, muitos países, incluindo o Brasil, aumentaram os esforços para financiar pesquisas com espécies vegetais produtoras de biocombustíveis. Dentre essas espécies, *Jatropha curcas* L. destaca-se pelo alto potencial para produção de óleo. Visando à propagação clonal e massal de acessos elite de *J. curcas*, técnicas de cultura de tecidos têm sido aplicadas. Entretanto, diferentes autores frisaram a necessidade de ampliação de estudos envolvendo ferramentas da cultura de tecidos vegetais, dentre elas a poliploidização *in vitro*. A indução de poliploides *in vitro* é uma importante ferramenta no melhoramento genético de plantas, por possibilitar a obtenção de maior variabilidade de materiais com possíveis incrementos de características agronômicas desejáveis. Nesse sentido, um dos objetivos deste trabalho foi estabelecer um protocolo de indução *in vitro* de plântulas poliploides da variedade 'Gonçalo' ($2C = 0.85 \text{ pg}$, $2n = 2x = 22$ cromossomos). Os resultados de citometria de fluxo evidenciaram que tetraploides e mixoploides foram obtidos a partir de ápices caulinares tratados com diferentes concentrações de colchicina e tempos de exposição. Fundamentado em três parâmetros (número de plântulas sobreviventes, tetraploides e mixoploides), o tratamento envolvendo 0,5 mM de colchicina a um pulso de 96 horas foi considerado o mais adequado. Com base nesse resultado, um segundo experimento de poliploidização foi realizado somente com a dosagem de 0,5 mM com pulsos de 96, 120, 144 e 168 horas. Os resultados confirmaram que a concentração de 0,5 mM por 96 horas é ideal para indução de tetraploides de *J. curcas* 'Gonçalo'. Plântulas mixoploides também foram encontradas nos tratamentos com 0,5 mM de colchicina aos pulsos de 96, 120 e 144 horas. Visto a relevância da propagação clonal e massal de acessos elite de *J. curcas*, inclusive das plântulas poliploides obtidas no primeiro estudo, o presente trabalho também teve como objetivo induzir a calogênese *in vitro* a partir de explantes foliares. Os resultados mostraram que a combinação ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D)/cinetina (KN)

promoveu maior número de explantes com calos friáveis quando comparado à combinação ácido indol-3-butírico (AIB)/KN. Dessa forma, o procedimento envolvendo a combinação auxina/citocinina é fundamental para gerar calos friáveis, os quais representam a base para estabelecimento de um sistema embriogênico *in vitro* de acessos elite. Pela primeira vez, um sistema de cultura de tecidos foi adaptado para indução, propagação e recuperação de tetraploides e mixoploides de *J. curcas* 'Gonçalo'. Além disso, os dados gerados contribuem para criação e ampliação de bancos de germoplasma *in vitro* da espécie.

Palavras-chaves: poliploidização *in vitro*, citometria de fluxo, tetraploides, mixoploides, calogênese.

OLIVEIRA, Stéfanie Cristina, M.Sc., Federal University of Espírito Santo, July 2012.
***In vitro* polyploidization and callogenesis of *Jatropha curcas* L.** Advisor: Dr. Wellington Ronildo Clarindo. Co-advisors: Dr^a. Andreia Barcelos Passos Lima and Dr. Carlos Roberto Carvalho.

ABSTRACT

The use of bioenergy has been suggested as a strategy for reducing the utilization of fossil fuels. Thereafter, many countries, including Brazil, have increased efforts to fund the research of plant species for biofuel production. Among these species, *Jatropha curcas* L. stands out mainly due to its high potential for oil production. Thus, tissue culture techniques have been applied aiming at the mass and clonal propagation of *J. curcas* elite lines. However, different authors have emphasized the necessity of expanding studies that involve plant tissue culture tools such as *in vitro* polyploidization. In this sense, the present study sought to establish a protocol for *in vitro* induction of polyploid seedlings from shoot tips of the variety 'Gonzalo' ($2C = 0.85 \text{ pg}$, $2n = 2x = 22$ chromosomes). Flow cytometry revealed mixoploids and tetraploids obtained from shoot tips treated with different colchicine concentrations and exposure times. Based on three criteria (survival rate of the explants, and numbers of tetraploid and mixoploid plantlets), the treatment with 0.5 mM colchicine in a 96 hour pulse was statistically considered the most appropriate. Based on these data, a second polyploidization experiment was carried out, using a dosage of 0.5 mM colchicine in pulses of 96, 120, 144 and 168 hours. The results confirmed that the concentration of 0.5 mM for 96 hours was the ideal treatment for *J. curcas* 'Gonçalo' tetraploid induction. Mixoploid seedlings were also detected in the treatments with 0.5 mM colchicine in pulses of 96, 120 and 144 hours. Considering the relevance of mass and clonal multiplication of elite *J. curcas* accessions, and the polyploid seedlings obtained in the first investigation, this study further aimed to establish *in vitro* callogenesis from leaf explants. The results showed that the combination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and kinetin (Kn) provided greater number of explants with friable calli in relation to the combination indol-3-butyric acid (IBA) and Kn. Thus, 2,4-D/Kn was the treatment of choice to generate friable calli, which are essential for somatic embryogenesis. Ultimately, a tissue culture system was adapted for induction, propagation and recovery of *in vitro* tetraploids from the *J. curcas* variety 'Gonçalo', as well as other inbred lines. Besides

providing a new protocol for polyploidy generation, this study also contributed to the germplasm of *J. curcas* and the achievement of genetic variability through obtainment of tetraploid and mixoploid seedlings.

Keywords: *In vitro* polyploidization, flow cytometry, tetraploids, mixoploids, callogenesis.

1. INTRODUÇÃO

Estudos sobre a utilização de fontes renováveis de energia têm sido intensificados nos últimos anos, incentivados, principalmente, pela escassez e alta do preço do petróleo, bem como pelas preocupações com as mudanças climáticas globais. Nesse contexto, a produção e o uso do biodiesel têm sido fomentado pelo Governo Federal Brasileiro por meio do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) (Nunes 2010).

O biodiesel pode ser produzido por diversas fontes de origem vegetal, dentre elas, destaca-se o pinhão-manso, *Jatropha curcas* L., pertencente à família Euphorbiaceae (Nunes 2010). Segundo Carvalho et al. (2008), *J. curcas* possui um genoma relativamente pequeno, com $2n = 22$ cromossomos (metacêntricos e submetacêntricos), conteúdo de DNA nuclear equivalente a $2C = 0,85$ picogramas e relação de bases AT = 61,3% e GC = 38,7%.

J. curcas é um arbusto perene de origem na América Latina e difundido em todas as regiões tropicais do mundo (Deore e Johnson 2008). A resistência à seca, a adaptação a várias condições climáticas e de solo, a rápida taxa de crescimento e perenidade são características preferíveis para a seleção e cultivo dessa espécie (Roy e Kumar 1990; Roy 1998;).

As sementes de *J. curcas* são de grande interesse comercial em virtude do óleo armazenado e do potencial desse como biocombustível. Para explorá-lo em uma extensão máxima, é necessário selecionar o melhor genótipo para teores e qualidade de óleo (Kalimuthu et al. 2007). O óleo de *J. curcas* contém ácido linolênico e ácido oleico, que juntos respondem por até 80% da composição. O biocombustível de *J. curcas* é limpo, não tóxico, apresenta maior qualidade da combustão, econômico e de baixo custo de produção (Jha et al. 2007).

Em virtude da relevância econômica de *J. curcas*, ferramentas biotecnológicas vêm sendo empregadas para fornecer subsídios aos programas de melhoramento e de conservação *ex e in situ*, e para o estabelecimento de bancos de germoplasma de *J. curcas* (Sujatha et al. 2005; Deore e Johnson 2008; Kaewpoo e Te-Chato 2010; Kalimuthu et al. 2007; Khemkladngoen et al. 2011). Nesse contexto, técnicas de cultura de tecidos vegetais destacam-se por possibilitar a preservação de germoplasma, propagação rápida e melhoria da cultura no que se refere à produtividade e, conseqüentemente, lucratividade (Thepsamran et al. 2006). Além

disso, a cultura de tecidos, mais especificamente a micropropagação, pode propiciar a produção comercial contínua de mudas de pinhão-manso, bem como gerar variabilidade, fundamental para o melhoramento genético (Nunes 2010).

Uma das principais aplicações da cultura de tecidos nos programas de melhoramento é a indução de poliploides *in vitro*, visto que a obtenção desses organismos tem sido empregada para produção de novas variedades (Koutoulis et al. 2005).

A poliploidização *in vitro* muitas vezes resulta em indivíduos com características morfológicas superiores aos indivíduos diploides (planta doadora de explante), como maior adaptabilidade e tolerância a estresses abióticos. Além disso, os poliploides têm um nível de expressão gênica superior, acarretando alterações morfológicas e anatômicas interessantes, como aumento dos frutos, aumento do tamanho das folhas e flores, durabilidade e maior intensidade de cor dos frutos e flores (Dhooghe et al. 2011).

Protocolos de poliploidização *in vitro* consistem de várias etapas. O primeiro passo é o tratamento do material vegetal com os agentes antitubulínicos, seguidos da multiplicação, e posterior verificação da eficiência do processo. Fatores como o tempo de exposição, concentração do agente antitubulínico, tipo de explante, o genótipo e a técnica empregada na confirmação dos poliploides, são decisivas para a eficiência de indução de poliploidia (Dhooghe et al. 2011).

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho é estabelecer um protocolo de poliploidização *in vitro* a partir de ápices caulinares de *J. curcas*, com a finalidade de promover maior variabilidade de plantas essenciais ao abastecimento de bancos de germoplasma da espécie, disponibilizando-as aos programas de melhoramento. Em segundo plano, a partir dos materiais do campo induzir calogênese em folhas para posterior utilização desses calos em sistemas embriogênicos. Protocolo este, útil para a propagação dos materiais obtidos nos experimentos de poliploidização (plântulas diploides, tetraploides, mixoploides).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características gerais de *Jatropha curcas* L.

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) pertence à família Euphorbiaceae. O gênero *Jatropha* compreende aproximadamente 175 espécies, nativas da América do Sul e Central (Mukherjee et al. 2011). *Jatropha* deriva da palavra grega “iátrós” (médico) e “trophé” (alimento), implicando em seus valores medicinais (Divakara et al. 2010; Pandey et al. 2012). Linneaus foi quem primeiramente nomeou o pinhão-manso em *curcas*, no ano de 1753, em “Species Plantarum” (Divakara et al. 2010).

J. curcas recebe vários nomes populares como: *pinhão-manso*, *pinhão-paraguaio*, *mandiguaçu* (Brasil), *purging nut*, *physic nut* (Inglaterra), *purgueira* (Portugal), *bagbherenda*, *jangli arandi*, *safed arand*, *bagaranda* (Índia), *yu-lu-tzu* (China), *sabudam* (Tailândia) (Divakara et al. 2010).

De acordo com Kumar e Sharma (2008), esse gênero é muito diversificado morfológicamente e suas espécies, além de serem amplamente distribuídas nas regiões tropicais secas da América, foram também introduzidas na Ásia e África, sendo hoje, cultivadas em todo o mundo. Características como a rusticidade, resistência à seca, ampla adaptabilidade a fatores edafoclimáticos e facilidade de propagação contribuem na distribuição de *J. curcas* para além de suas fronteiras de origem (Saturnino et al. 2005; Carvalho et al. 2008; Boora e Dhillon, 2010).

Makkar e Becker (2009) relataram que *J. curcas* possui um crescimento ótimo em temperaturas que variam de 25 a 35° C. Essa espécie tolera temperaturas acima de 40° C como, por exemplo, em plantações na província de Luxor no Alto Egito, onde as temperaturas excedem aos 40° C em 260 dias do ano. Entretanto, *J. curcas* pode ser encontrado em regiões de altitude elevada onde ocorrem geadas leves.

Quanto às suas características morfológicas, *J. curcas* é um arbusto que pode atingir uma altura de três a cinco metros e, em condições favoráveis, chegar entre oito a dez metros (Divakara et al. 2010). O tronco possui diâmetro de aproximadamente 20 cm, raízes curtas, pouco ramificadas, caule liso. Suas folhas são verdes, esparsas, alternas e brilhantes, em forma de palma com três a cinco lóbulos e pecioladas (Arruda et al. 2004) (Fig 1).



Figura 1– Aspecto geral de plantas de *Jatropha curcas* L. 'Gonçalo' com idade aproximadamente de 2 meses, cultivadas em vasos na casa de vegetação do CCA-UFES. Barra = 3 cm.

J. curcas apresenta floração monoica, produzindo flores masculinas e femininas na mesma inflorescência (Divakara et al. 2010), ocasionalmente, ocorrem flores hermafroditas (Kumar e Sharma, 2008). As raras flores hermafroditas podem ser autopolinizadoras, entretanto, a polinização geralmente é realizada por insetos, especialmente abelhas. Cada inflorescência produz um grupo de aproximadamente 10 ou mais frutos ovoides (Kumar e Sharma, 2008) (Fig. 2).

De acordo com Peixoto (1973) e Arruda et al. (2004), o pinhão-mansão pode ser usado para diversos fins: como cerca viva, como suporte para plantas trepadeiras como a baunilha (*Vanilla aromática*) e como fixador de dunas em orlas marítimas. A raiz principal de *J. curcas* pode estabilizar o solo contra deslizamentos, enquanto as raízes superficiais, previnem e controlam a erosão do solo causada pelo vento ou pela água (Pandey et al. 2012).

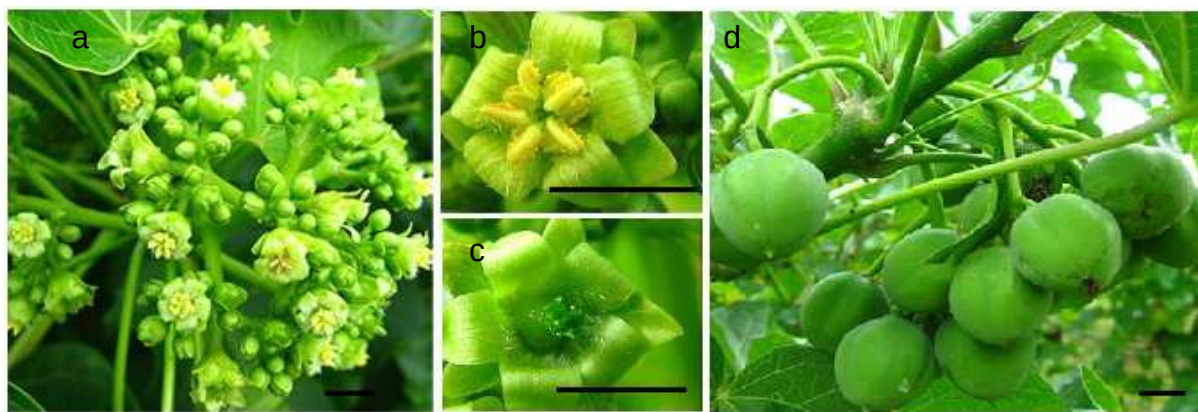


Figura 2 – Aspecto geral do sistema reprodutivo de *Jatropha curcas* L. a) Inflorescência. b) flor masculina; c) flor feminina; d) frutos de *J. curcas* em maturação (adaptado de Pan e Xu; 2011). Barra = 1cm.

Propriedades medicinais também são encontradas em *J. curcas*. O látex serve como cicatrizante e tem ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Streptococcus pyogenus* e *Candida albicans* (Pandey et al. 2012). As folhas são utilizadas para combater doenças de pele e as sementes atuam como purgativo. No entanto, quando ingeridas em excesso, podem ser perigosas à saúde (Arruda et al. 2004).

Além de sua utilização na medicina, *J. curcas* é uma matéria-prima promissora para a produção de biodiesel (Sirisomboon et al. 2007; Makkar e Becker 2009; Islam et al. 2011; Jingura 2011). O óleo de *J. curcas* é uma alternativa viável para a fabricação de biodiesel, uma vez que possui propriedades físico-químicas e desempenho comparáveis aos combustíveis de origem fóssil (Islam et al. 2011). O biodiesel gerado a partir do óleo de *J. curcas*, após transesterificação, atende aos padrões exigidos pelos países americanos e europeus (Tiwari et al. 2007).

2.2 Importância agroeconômica de *J. curcas* no cenário mundial

Os combustíveis fósseis trazem consequências ambientais negativas, o que tem estimulado a procura de biocombustíveis renováveis. Para que se torne uma alternativa viável, um combustível deve fornecer benefícios ambientais, ser economicamente competitivo e reproduzível em grande quantidade sem comprometer o fornecimento de alimentos (Koh et al. 2011).

Nesse contexto, a busca por culturas potenciais à produção de biocombustíveis tem aumentado recentemente (Demirbas 2003; Gunstone 2004; Pinto et al. 2005). Dentre as oleaginosas, *J. curcas* vem se destacando como uma cultura alternativa no cenário mundial (Pandey et al. 2012), preenchendo os requisitos mencionados por Koh et al (2011). Tal destaque se deve, principalmente, a sua alta produtividade, com um conteúdo de óleo relativamente elevado em suas sementes (30-40%) e uma composição lipídica semelhante à do combustível fóssil (Deore e Johnson 2008; Divakara et al. 2010).

A utilização de *J. curcas* no mundo é retratada em artigos científicos que enfatizam sua importância e os benefícios, principalmente em relação à agricultura familiar, em países como China (Yang et al. 2012), Índia (Pandey et al. 2012), Indonésia, Nicarágua e Brasil (Divakara et al. 2010).

De acordo com dados da FAO (2010), plantios de *J. curcas* cobrem uma área global de 900 mil hectares. Desse total, mais de 85% das plantações de *J. curcas* estão na Ásia, principalmente na Índia, China e Indonésia. A África contém 12 % desse total (120 mil hectares), principalmente em Madagascar e Zâmbia. A América Latina possui cerca de 20 mil hectares de *J. curcas*, principalmente no Brasil. A área plantada está projetada para crescer para 12,8 milhões de hectares até 2015 (FAO 2010).

Na Índia, o governo fomenta a produção de variedades com alta qualidade, buscando teores de óleo superiores e uma produção de 3-5 toneladas de sementes por hectare (Swarup et al. 2006). De acordo com Jain e Sharma (2010), *J. curcas* está se tornando a futura fonte de biodiesel para a Índia. A comissão do governo desse país iniciou um programa de crescimento de *J. curcas* para a produção de biodiesel, em virtude de sua produtividade rusticidade e adaptabilidade à região (Jain e Sharma 2010).

De acordo com Yang et al. (2012), o governo chinês também tem apoiado, nos recentes anos, a produção em larga escala de *J. curcas*. O Ministério da Ciência e Tecnologia chinês tem priorizado o cultivo dessa cultura, criando projetos fundamentais para pesquisas voltadas ao melhoramento genético e planejamento das regiões adequadas de cultivo (Yang et al. 2012).

Países africanos como o Zimbábue têm mostrado interesse na produção de *J. curcas* como a principal matéria-prima para o seu programa de produção de biodiesel (Jingura 2011). Desde o ano de 2005, a produção dessa cultura tem

ganhado impulsos, sendo a meta produzir, pelo menos, 365 mil toneladas de sementes por ano (Jingura 2011).

A utilização de combustíveis alternativos no Brasil tem sido estimulada pelo governo por meio do Programa Brasileiro de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB). O PNPB foi criado por meio da Lei 11.097 em janeiro de 2005. Essa lei dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira de forma a atender os percentuais mínimos de óleo exigidos (BRASIL, Lei 11.097). O artigo 15 desta lei estimula o fomento destinado a projetos voltados à produção de biocombustíveis.

Em janeiro de 2008, foi publicada no Diário Oficial da União a Instrução Normativa nº 14, que autoriza a inscrição de *J. curcas* no Registro Nacional de Cultivares, medida que alavancou o estabelecimento da cultura no Brasil (MAPA 2012).

Em relação aos avanços dessa cultura no estado do Espírito Santo, a introdução de materiais genéticos de *J. curcas* para pesquisas ocorreu nos anos de 2003 e 2004, o que culminou em campos de observações nas Fazendas Experimentais do INCAPER em Viana e Linhares e em propriedades particulares nos municípios de São Mateus, Colatina e Conceição da Barra (INCAPER 2011).

Toledo et al. (2009), estudando o zoneamento agroclimático de *J. curcas* no Espírito Santo, reportam que 14,10% da área do estado está apta para a implantação da cultura, o que compreende 6.513,54 Km², distribuídos em frações nos 34 dos 78 municípios.

Embora a cultura de *J. curcas* esteja bastante difundida, muitos desafios em prol do cultivo do pinhão-mansão estão lançados. A demanda por programas de melhoramento, a busca de cultivares cada vez mais produtivas, bem como o conhecimento e caracterização dos diversos acessos em bancos de germoplasma por meio de ferramentas biotecnológicas ainda são requeridos.

2.3 Aspectos citogenéticos e citométricos de *J. curcas*

Informações com base no número cromossômico são extremamente relevantes para determinar relações entre as espécies de plantas, além de representar o primeiro conjunto de dados que levam à compreensão do genoma de qualquer espécie (Mukherjee et al. 2011).

A citogenética vegetal contribui com os programas de melhoramento, disponibilizando informações úteis com base na origem de poliploides, estudos de alterações cromossômicas decorrentes da propagação *in vitro*, caracterização de diversos acessos em bancos de germoplasma além de gerar dados taxonômicos.

Além da citogenética, a citometria de fluxo (CF) é uma ferramenta muito útil para estudos relacionados ao genoma de plantas (nível de ploidia, conteúdo de DNA, verificação da estabilidade de ploidia) e de extrema importância para programas de melhoramento, especialmente, quando surge a necessidade de caracterizar determinado acesso e avaliar plantas decorrentes do processo de propagação *in vitro* (Ochatt et al. 2011).

Poucos estudos em relação à citogenética e citometria foram realizados para *J. curcas*. De acordo com dados de Mukherjee et al. (2011) e IPCN (2012), a maioria das populações de *J. curcas* apresenta $2n = 2x = 22$ cromossomos. Entretanto, há relatos da ocorrência de populações de *J. curcas* com 44 cromossomos (Soontornchainaksaeng e Jenttikul 2003; IPCN 2012).

Soontornchainaksaeng e Jenjittikul (2003) relataram a cariologia de microsporócitos de 5 espécies de *Jatropha* presentes na Tailândia. Esses autores destacaram que as espécies estudadas, incluindo *J. curcas*, apresentaram uma configuração meiótica semelhante, um número cromossômico de $2n = 2x = 22$ e um número básico de $x = 11$.

Carvalho et al. (2008), utilizando a técnica de dissociação celular seguida de secagem ao ar e análise de imagem, obtiveram o cariótipo da variedade, e utilizando a CF caracterizaram o tamanho do genoma, a composição de bases de *J. curcas* 'Gonçalo'. Preparações cromossômicas de alta qualidade foram obtidas pelos mesmos autores, que mostraram que a variedade 'Gonçalo' apresenta $2n = 2x = 22$ cromossomos, variando em comprimento total entre 1,71 e 1,24 μm . Destes, 5 cromossomos foram classificados como metacêntricos (1, 2, 5, 6 e 11) e 6 submetacêntricos (3, 4, 7, 8, 9, 10). Os autores, utilizando a CF, concluíram que essa variedade apresenta um valor 2C nuclear equivalente a 0,85 pg, além de uma porcentagem de bases AT = 61,3% e CG = 38,7%.

Dahmer et al. (2009), empregando a técnica de esmagamento, também realizaram estudos com cromossomos mitóticos de 5 populações de *J. curcas*: 'Filomena', 'Bento', 'Oracília', 'Paraguassú' e 'Gonçalo'. Todas as populações

avaliadas apresentaram mesmo número cromossômico de $2n = 2x = 22$, conforme relatado por Carvalho et al. (2008) e Soontornchainaksaeng e Jenjittikul (2003).

Mergonar et al. (2010) analisaram cinco populações de *J. curcas* ocorrentes em Alta Floresta – MT por meio de bandeamento AgNOR. Os resultados obtidos possibilitaram a identificação da região organizadora nucleolar, localizada próxima ao centrômero nos cromossomos 1 e 3.

Estudos acerca da citogenética vegetal são realizados não só com o intuito de caracterizar determinados genótipos, como é o caso de *J. curcas*, mas também, com a finalidade de verificar a estabilidade genética de plantas micropropagadas (Thiem e Śliwińska 2003). Alterações no nível de ploidia do DNA (poliploidização, aneuploidias ou mixoploidias) estão entre as mais frequentes variações genéticas encontradas em culturas *in vitro* (Thiem e Śliwińska 2003).

A CF foi utilizada por Kaewpoo e Te-Chato (2010), para avaliar a estabilidade de ploidia de plantas micropropagadas a partir de epicótilos e hipocótilos de *J. curcas*. Os resultados encontrados por estes autores mostraram um valor 2C nuclear semelhante para as plantas provenientes dos dois tipos de explantes.

Dessa forma, estudos nesse sentido são de relevância nos processos de propagação *in vitro* de *J. curcas*. A associação das técnicas de CMF e citogenética antes e após a propagação dessa cultura é imprescindível para avaliar a fidelidade genética do genótipo em estudo.

2.4 Aspectos da propagação *in vitro* de *J. curcas*

Com os plantios comerciais de *J. curcas* aumentando, cresce a demanda de materiais homogêneos e de alto rendimento agrônomo. A grande maioria das culturas de *J. curcas* provém da propagação por estaquia e sementes. Porém, esses métodos possuem inúmeras limitações quando se trata de plantios em larga escala, em virtude, principalmente, da limitação de mudas produzidas e da baixa viabilidade das sementes (Kumar e Reddy 2012).

Outro fator a ser considerado na propagação convencional se deve a polinização cruzada, que gera sementes de potencial genético desconhecido (Jingura 2011). A principal limitação no cultivo em larga escala como cultura energética é a baixa e inconstante produção de sementes em virtude da natureza

heterozigótica das plantas (Mukherjee et al. 2011). Consequentemente, a uniformidade genética em materiais de plantação é inconstante, não sendo possível garantir qualidade nos teores de óleo (Mukherjee et al. 2011; Kumar e Reddy 2012).

J. curcas apresenta grande variabilidade da produtividade entre plantas individuais. Os rendimentos de semente variam de 200 g para mais 2 kg por planta (Jingura 2011). Nesse sentido, a produtividade poderia ser melhorada por meio do emprego de ferramentas biotecnológicas (Kumar e Sharma 2008). A biotecnologia vegetal tornou-se cada vez mais importante em nível global por oferecer oportunidades para aumentar a sustentabilidade, rentabilidade e a competição internacional na agricultura (Rani e Raina 2000).

Nesse contexto, o cultivo de clones de *J. curcas* de alto rendimento assume importância para atender o fornecimento em larga escala, procurando assegurar a contínua qualidade do material de plantio (Sujatha et al. 2005, Singh et al. 2010).

Técnicas de cultura de tecidos têm sido desenvolvidas visando à propagação e conservação de genótipos selecionados (Engelmann 1991; Kumar e Sharma 2008). Essas técnicas fornecem alta taxa de multiplicação, em comparação com procedimentos convencionais de propagação, minimizam o risco de infecções ocasionadas por fungos, vírus e insetos-pragas, além de reduzir a erosão genética (Kumar e Sharma 2008). Em definição, a cultura de tecidos compreende um grupo heterogêneo de técnicas mediante as quais um explante é cultivado assepticamente em um meio de composição quimicamente definido sob condições ambientais controladas (Roca et al. 1991).

Segundo Mukherjee et al. (2011), a literatura apresenta estudos acerca da propagação *in vitro* de *J. curcas*, como protocolos de organogênese direta e indireta, a sistemas de embriogênese, a partir de diferentes explantes.

Protocolos de organogênese direta foram desenvolvidos por diversos autores. Rajore e Batra (2005) induziram brotações em ápices caulinares, a partir da combinação de 6 - benzilaminopurina (BAP), ácido indol-3-acético (AIA), sulfato de adenina e glutamina. Em 2007, Kalimuthu et al. induziram brotos utilizando explantes nodais em meio suplementado com combinações de reguladores de crescimento como o BAP, cinetina (KN) e AIA. Deore e Jonhson (2008) induziram brotos adventícios a partir de explantes foliares de *J. curcas*, utilizando thidiazuron (TDZ), BAP e ácido indol-3-butírico (AIB). Kaempoo e Te chato (2010) desenvolveram um

protocolo de indução de brotos a partir de epicótilos em meio suplementado com KN e TDZ e hipocótilos em meio contendo KN e AIB.

Kumar et al. (2011) desenvolveram protocolo de regeneração direta a partir de pecíolos de *J. curcas* suplementados em meio de cultivo com diferentes concentrações de TDZ. Sharma et al. (2011), avaliando diferentes genótipos tóxicos e não-tóxicos de *J. curcas*, obtiveram alta taxa de brotação em meio suplementado com TDZ, utilizando hipocótilos como explantes. Kumar e Reddy (2012) avaliaram a organogênese direta de pecíolos cotiledonares de 3 genótipos elite de *J. curcas* suplementados com TDZ.

Protocolos de organogênese indireta são reportados por Varshney e Johnson (2010), em meio suplementado com BAP, Kn, AIB, polivinil pirrolidona (PVP) e ácido cítrico, utilizando embriões imaturos. Rajore e Batra (2007) induziram organogênese a partir de cultura de calos de *J. curcas* em meio MS suplementado com BAP e AIB.

Trabalhos de embriogênese somática indireta em *J. curcas* são relatados por Jha et al (2007). Esses autores induziram a formação de calos com KN e posterior indução de embriões globulares em meio MS suplementado com KN e AIB, seguidos da adição de sulfato de adenina para maturação desses embriões, utilizando fragmentos foliares como explantes.

Cai et al. (2011) utilizaram embriões zigóticos para a indução da embriogênese de 3 acessos de *J. curcas* de um banco de germoplasma na China. Os autores utilizaram meio de cultura suplementado com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), e um segundo meio líquido, sem reguladores de crescimento, porém acrescido de asparagina e glutamina para maturação dos embriões.

2.5 Poliploidização *in vitro*: uma importante ferramenta no melhoramento de plantas

Uma das principais aplicações da cultura de tecidos aos programas de melhoramento é a indução de poliploides *in vitro*, visto que a obtenção desses organismos é empregada para produção de novas variedades (Koutoulis et al. 2005).

Com o desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos e citogenética, a poliploidização *in vitro* tornou-se o principal método para indução de plantas poliploides (Zhang et al. 2008). A poliploidização natural ou artificial é uma característica comum do genoma de plantas (Hanchok 2005). Os organismos poliploides normalmente têm o seu padrão de expressão gênica alterado em virtude do “efeito gigas”, o que pode promover a adaptação a uma ampla variedade de habitats em comparação com seus progenitores diploides (Otto e Whitton 2000). O padrão diferencial da expressão gênica nas plantas poliploides também pode acarretar o aumento celular, promovendo um incremento na produtividade e no tamanho de órgãos vegetais (Gao et al. 2002; Jesus-Gonzales e Weathers 2003).

A poliploidia resulta em uma ampla gama de efeitos sobre as plantas, incluindo aumento significativo de frutos e flores, flores com maior durabilidade, quebra de barreiras de hibridação, ausência ou diminuição do número de sementes, tolerância ao estresse e maior resistência à pragas (Sanford 1983; Predieri 2001).

A estratégia de poliploidização também possibilita a duplicação cromossômica de híbridos interespecíficos. Nos programas de melhoramento de diversas culturas, a hibridação interespecífica tem sido empregada para transferir características importantes de progenitores pertencentes a espécies distintas. Todavia, os híbridos são estéreis ou sub-estéreis, em virtude das diferenças do conjunto cromossômico dos parentais envolvidos. Nesse sentido, a fertilidade dos híbridos pode ser restaurada pela duplicação do número cromossômico (Carvalho et al. 2005).

Vários agentes antitubulínicos, como orizalina, colchicina e trifluralina podem ser utilizados na indução de poliploidia, sendo a colchicina o mais empregado. A colchicina é um alcaloide extraído de *Colchicum autumnale* L. capaz de ligar-se aos dímeros de tubulina, resultando na formação de um complexo colchicina-tubulina e impedindo a polimerização dos microtúbulos (Panda et al. 1995; Caperta et al. 2006). Esse fato impossibilita a segregação das cromátides irmãs na anáfase e a citocinese.

A poliploidização é um processo complexo, no qual não existe um protocolo geral definido. O sucesso da técnica está atrelado a fatores que vão desde a fase de indução até protocolos de confirmação do nível de ploidia. De acordo com Dhooghe et al. (2011), além dos agentes antitubulínicos, outros fatores devem ser considerados para a indução da poliploidização, como: a) concentração, b) o tipo de

explante, c) tempo de exposição aos antitubulínicos, d) o método de aplicação (pulso ou contínuo), e) genótipo (planta doadora de explantes) (Dhooghe et al. 2011).

Um sistema eficiente para obtenção de poliploides *in vitro* requer, também, a aplicação de métodos efetivos para averiguação e monitoramento do nível de ploidia. Em comparação com o método direto por contagem cromossômica e indireto por análise comparativa dos aspectos morfológicos, a citometria de fluxo (método direto) apresenta a grande vantagem, por ser um método rápido, confiável e apropriado para analisar um elevado número de plantas em tempo hábil e em sintonia com a cultura de tecidos (Brutovská et al. 1998; Roux et al. 2003; Loureiro et al. 2007; Clarindo et al. 2008). Entretanto, além dos métodos citométricos, as investigações citogenéticas também são realizadas em plantas selecionadas pela citometria de fluxo para confirmação do número cromossômico (Praça et al. 2009).

A citometria de fluxo (CF) é o método de verificação de ploidia mais abordado atualmente. Trata-se de uma ferramenta prática, para o rastreo do nível de ploidia de DNA (Doležel 1997; Clarindo et al. 2008; Ochatt 2008). Dessa forma, a citometria de fluxo é extremamente vantajosa para análises de muitos indivíduos (Praça et al. 2009). Trata-se de uma ferramenta única, que envolve a utilização de parâmetros ópticos de células e partículas subcelulares (Doležel 2007).

A CF em plantas possui vasta aplicação, dentre estas, podemos citar a estimacão do conteúdo de DNA, determinacão da composicão de pares de bases e determinacão do nível de ploidia (Doležel 2007). Essa ferramenta é adequada para a determinacão da variacão de ploidia em amostras como culturas de plantas propagadas *in vitro* (Doležel 2007). A avaliacaão da estabilidade de ploidia *in vitro* está entre as primeiras aplicacões da CF no melhoramento de plantas (Doležel 2007).

Com o objetivo de incrementar característicás agronômicas interessantes, a poliploidizacão *in vitro* de lenhosas tem sido reportada em *Morus alba* (Chakraborti et al.1998), *Morus multicaulis* (Xi-Ling et al. 2011), *Zizyphus jujuba* (Gu et al. 2005), *Chaenomeles japonica* (Stanys et al. 2006), *Citrus* (Zeng 2006), *Phlox subulata* (Zhang et al. 2008), *Paulownia tomentosa* (Tang et al. 2010), *Elaeis guineensis* (Samala e Te-chato, 2012), utilizando colchicina.

Essa metodologia tem sido reportada em lenhosas como no caso das fruteiras, para restaurar a fertilidade de híbridos, para aumentar o tamanho dos frutos (Chakraborti et al.1998; Stanys et al. 2006) e diminuir o número de sementes

(Stanys et al. 2006). A poliploidização em outros tipos de lenhosas como o caso da *Paulownia tomentosa* (produtora de madeira de alta qualidade para a fabricação de móveis, instrumentos musicais, além da utilização medicinal), tem como principal objetivo diminuir a susceptibilidade a doenças como a vassoura de bruxa, a floração precoce e garantir plantas com maior resistência e qualidade (Tang et al. 2010).

A poliploidização de lenhosas como pinhão-mansão, pode promover o incremento da variabilidade genética gerando novos materiais importantes aos programas de melhoramento.

3. OBJETIVOS

Até o presente momento, não há relatos sobre a indução de poliploides em *J. curcas*. Baseado nesse fato, o principal objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo de poliploidização *in vitro* dessa espécie e em seguida, estabelecer um protocolo de indução de calos a partir de fragmentos foliares de *J. curcas*. Os objetivos específicos foram os seguintes:

- a) caracterizar, por meio de ferramentas citogenéticas e de citometria de fluxo (CF), o acesso de *J. curcas* 'Gonçalo' que será utilizado como doador de explantes;
- b) verificar por meio da CF, possíveis alterações no nível de ploidia de DNA das plântulas propagadas em meio de regeneração de ápices sem colchicina;
- c) verificar por meio de métodos da CF, o nível de ploidia de DNA das plantas provenientes do procedimento de poliploidização *in vitro*;
- d) selecionar o melhor tratamento de indução de calos para posterior utilização desse protocolo nos experimentos de propagação *in vitro* de poliploides.

4 REFERÊNCIAS

Arruda FP, Beltrão NEM, Andrade AP, Pereira WE, Severino LS (2004) Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. Rev Bras Ol Fibras 8:789-799.

Boora IKS, Dhillon RS. (2010) Evaluation of genetic diversity in *Jatropha curcas* L. using RAPD markers. Indian J Biotech, 9.

Brito G, Lopes T, Loureiro J, Rodriguez E, Santos C (2010) Assessment of genetic stability of two micropropagated wild olive species using flow cytometry and microsatellite markers. Trees 24:723-732.

Brutovská R, Čellárová E, Doležel J (1998) Cytogenetic variability of *in vitro* regenerated *Hypericum perforatum* L. plants and their seed progenies. Plant Sci, 133:221-229.

Cai L, Fu L, Ji L (2011) Regeneration of *Jatropha curcas* through efficient somatic embryogenesis and suspension culture. GM Crops 2:110-117.

Brasil. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução de biodiesel na matriz energética brasileira. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, nº10, 14 de janeiro de 2005. Seção I, p. 8-9

Carpeta AD, Delgado M, Ressurreição F, Meister A, Jones RN, Viegas W, Houbens A (2006) Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. Protoplasma 227:147-153.

Carvalho JFP, Carvalho CR, Otoni WC (2005) *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). Plant Cell Tiss Org 80:69-75.

Carvalho CR, Clarindo WR, Praça MM, Araújo FS, Carels N (2008) Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. Plant Sci 174:613-617.

Chakraborti SP, Vijayan K, Roy BN, Qadri SMH (1998). *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). Plant Cell Rep 17:799-803.

Clarindo WR, Carvalho CR, Araújo FS, Abreu IS, Otoni WC (2008) Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry. Plant Cell Tiss Org 92:207-214.

Dahmer N, Schifino-Wittmann MT, Dias LAS. (2009) Chromosome numbers of *Jatropha curcas* L.: an important agrofuel plant. Crop Breeding Appl Biotech 9:386-389.

Datta MM, Mukherjee P, Ghosh B, Jha TB (2007) *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.) Curr Sci 93:1438-1442.

Demirbas A (2003) Chemical and fuel properties of seventeen vegetable oils. Energ Source 25:721-728.

Deore AC, Johnson TS (2008) High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. Plant Biotechnol Rep 2:7–11.

Dhooghe E, van Laere K, Eeckhaut T, Leus L.; van Huylenbroeck J (2011) Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. Plant Cell Tiss Org 04:359-373.

Divakara BN, Upadhyaya HD, Wani SP, Gowda CLL (2010) Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: a review. Appl Energ 87:32-742.

Doležel J (1997) Application of flow cytometry for the study of plant genomes. J Appl Genetics 38:285-302.

Doležel J, Greilhuber J, Suda J (2007) Flow cytometry with plants: an overview. In: Doležel J, Greilhuber J, Suda J (eds) Flow cytometry with plant cells. Analysis of genes, chromosomes and genomes. Wiley, Weinheim, pp 41-65.

Engelmann F. (1991) *In vitro* conservation of tropical plant germplasm: a review. *Euphytica* 57:227-243.

FAO. Integrated Crop Management (2010). *Jatropha*: A Smallholder Bioenergy crop the potential for pro-poor development. Richard Brittain, NeBambi Lutaladio.

Gao SL, Chen BJ, Zhu DN (2002) *In vitro* production and identification of autotetraploids of *Scutellaria baicalensis*. *Plant Cell Tiss Org* 70:289-293.

Gunstone FD (2004) Rapeseed and Canola Oil: Production, Processing, properties and uses. Blackwell, London.

Gu XF, Yang AF, Meng H, Zhang JR (2005) *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua. *Plant Cell Rep* 24:671-676.

Hancock JF (2005) Contributions of domesticated plant studies to our understanding of plant evolution. *Ann Bot-London* 96:953-963.

INCAPER (2011) Polo de pinhão manso do Estado do Espírito Santo. Documento nº 193. Vitória, ES.

IPCN Chromosome Reports 2012 Index to plant chromosome numbers. 2012. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/12800067?projectid=9>>. Acesso em: 01 jun. 2012.

Islam AKMA, Yaakob Z, Anuar N (2011) *Jatropha*: a multipurpose plant with considerable potential for the tropics. *Sci Res Essay* 6:2597-2605.

Jain S, Sharma MP. (2010) Prospects of biodiesel from *Jatropha* in India: a review. *Renew Sust Energ Rev* 4:763–771.

Jesus-Gonzalez L, Weathers PJ (2003) Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. *Plant Cell Rep* 21:809-813.

Jingura RM. (2011) Technical options for optimization of production of *Jatropha* as a biofuel feedstock in arid and semi-arid areas of Zimbabwe. Biomass Bioenerg 35:2127-2132.

Jha TB, Mukherjee P, Datta MM. (2007) Mukul Manjari Datta Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant Plant Biotech Rep 1:135-140.

Kaewpoo M, Te-chato S (2010) Study on ploidy level of micropropagated *Jatropha curcas* L. via flow cytometry. J Agr Technol 6:391-400.

Kalimuthu K, Paulsamy S, Senthilkumar R, Sathya M (2007) *In vitro* propagation of the biodiesel plant *Jatropha curcas* L. Plant Tiss Cult Biotech17:137-147.

Khemkladngoen N, Cartagena J, Shibagaki K (2011) Adventitious shoot regeneration from juvenile cotyledons of a biodiesel producing Plant, *Jatropha curcas* L. J Biosci Bioeng 111:67-70.

Koh MY, Mohd. Ghazi TI (2011) A review of biodiesel production from *Jatropha curcas* L. oil. Renew Sust Energ Rev15:2240-2251.

Koutoulis A, Roy AT, Price A, Sherriff L, Leggett G (2005) DNA ploidy level of colchicines-treated hops (*Humulus lupulus* L.). Sci Hortic-Amsterdam 105: 263-268.

Kumar N, Reddy MP (2010) Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of *Jatropha curcas*: a biofuel plant. Ann Appl Biol 156:367-375.

Kumar N, Vijay Anand KG, Reddy MP (2011) *In vitro* regeneration from petiole explants of non-toxic *Jatropha curcas*. Ind Crop Prod 33:146-151.

Kumar A, Sharma S (2008) An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. Ind CropProd 28:1-10.

Kumar N, Reddy MP (2012) Thidiazuron (TDZ) induced plant regeneration from cotyledonary petiole explants of elite genotypes of *Jatropha curcas*: a candidate biodiesel plant. Ind Crop Prod 39:62-68.

Linnaeus C. (1753) Species plantarum. In: *Jatropha*. Impensis Stockholm: Laurentii Salvii, 1006-1007.

Loureiro J, Capelo A, Brito G, Rodriguez E, Silva S, Pinto G, Santos C. (2007) Micropropagation of *Juniperus phoenicea* from adult plants explants and analysis of ploidy stability using flow cytometry. Biol Plantarum 51:7-14.

Makkar HPS, Becker K. (2009) *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. Eur J Lipid Sci Tech 111:773-787.

MAPA Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Instrução Normativa N° 4, de 14 de janeiro de 2008. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18392>> Acesso em 27 jun 2012.

Mergonar MAS, Karsburg IV, Bona DAO (2010) Identificação da Região Organizadora Nucleolar de *Jatropha curcas* L. estudos, Goiânia 37:755-766.

Mukherjee P, Varshney A, Johnson TS, Jha TB (2011) *Jatropha curcas*: a review on biotechnological status and challenges. Plant Biotechnol Rep 5:197-215.

Nunes FC. Organogênese e Características Morfoanatômicas de Pinhão-mansô. 2010. Tese (Doutorado apresentada em Agronomia e Fitotecnia) - Universidade de Federal de Lavras. Programa de Pós-graduação em Agronomia e Fitotecnia, 19 de fevereiro de 2010, pp 101.

Ochatt SJ (2008) Flow Cytometry in Plant Breeding. Cytometry 73:581-598.

Ochatt SJ, Patat-Ochatt EM, Moessner A (2011) Ploidy level determination within the context of *in vitro* breeding. Plant Cell Tiss Org 104:329-341.

Otto SP, Whitton J. Polyploid Incidence and Evolution. Annu Rev Genet 34:401-437.

Pan BZ, Xu ZF (2011) Benzyladenine treatment significantly increases the seed yield of the biofuel plant *Jatropha curcas*. J Plant Growth Regul 30:166-174.

Panda D, Goode BL, Feinstein SC, Wilson L (1995) Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau. Biochemistry-US 34:11117-11127.

Pandey VC, Singh K, Singh JS, Kumar A, Singh B, Singh RP (2012) *Jatropha curcas*: a potential biofuel plant for sustainable environmental development. Renew Sust Energ Rev 16:2870-2883.

Peixoto AR (1973) Plantas oleaginosas arbóreas. São Paulo: Nobel, 284p.

Pinto AC, Guarieiro LLN, Rezende MJC, Ribeiro NM, Torres EA, Lopes WA, Pereira PAP, Andrade JB (2005) Biodiesel: an overview. J Brazil Chem Soc 16:1313-1330.

Praça MM, Carvalho CR, Clarindo WC (2009) A practical and reliable procedure for *in vitro* induction of tetraploid tomato. Sci Hortic-Amsterdam 122:501-505.

Predieri S (2001) Mutation induction and tissue culture in improving fruits. Plant Cell Tiss Org 64:185-210.

Purkayastha J, Sugla T, Paul A, Solleti SK, Mazumdar P, Basu A, Mohommad A, Ahmed Z, Sahoo L (2010) Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. Biol Plantarum 54:13-20.

Qin WL, Yi Wei-DaL, Shu-Lin P, Ying XU, Lin T, Fang C (2004) Plant regeneration from epicotyl explants of *Jatropha curcas*. J Plant Physiol Mol Biol 30:475-478.

Rajore S, Batra A (2005) Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas*. J Plant Biochem Biot 14:73–75.

Rani V, Raina SN. (2000) Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal. In Vitro Cell Dev-PI 36:319-330.

Roca WM, Mroginski LA (1991) Cultivo de tejidos en la agricultura - Fundamentos y aplicaciones. CIAT- Centro Internacional de Agricultura Tropical. (eds.). Cali, Colômbia. pp 969.

Roux N, Toloza A, Radecki Z, Zapata-arias FJ, Doležel J. (2003) Rapid detection of aneuploidy using flow cytometry. Plant Cell Rep 21:483-490.

Roy S.(1998) Bio-fuel production from *Jatropha curcas*. In: Kopetz H, Weber T, Palz W, Chartier P, Ferrero, PL. (eds.). Biomass for Energy & Industry, Proceeding of International Conference, Carmen, Rimpf, Germany, 613-615.

Roy S, Kumar A. (1990) Prospects of wood energy production semiarid arid regions of Rajasthan. In: Grassi G, Gosses G, dos Santos G. (eds.). Biomass for energy and Industry. Elsevier Applied Sci. Publications, London and New York, 2: 2.1153-2.1156.

Samala S, Te-chato S (2012) Ploidy induction through secondary somatic embryo (SSE) of oil palm by colchicine treatment. Journal of Agricultural Technology 8:337-352.

Sanford JC.(1983). Ploidy manipulations. In: Moore JN, Janick J. (eds.). Methods in Fruit Breeding. Purdue Univ. Press, West Lafayette, pp. 100-123.

Sardana J, Batra A, Ali DJ (2000) An expeditious method for regeneration of somatic embryos in *Jatropha curcas* L. Phytomorphology 50:239-242.

Saturnino HM, Pacheco DD, Kakida J, Tominaga N, Gonçalves NP(2005) Cultura do pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) Informe agropecuário, Belo Horizonte 26 229:44-78.

Sharma S, Kumar N, Reddy MP (2011) Regeneration in *Jatropha curcas*: Factors affecting the efficiency of *in vitro* regeneration. Ind Crop Prod 34:943-951.

Singh A, Reddy MP, Chikara J, Singh S. (2010) A simple regeneration protocol from stem explants of *Jatropha curcas* - a biodiesel plant. Ind Crop Prod 31:209-213.

Sirisomboon P, Kitchaiya T, Pholpho T, Mahuttanyavanitch W (2007) Physical and mechanical properties of *Jatropha curcas* L. fruits, nuts and kernels. Bio Systems Eng 97:201-207.

Soontornchainaksaeng P, Jenjittikul T (2003) Karyology of *Jatropha* (Euphorbiaceae) in Thailand. Thai For. Bull (Bot.) 31:105-112.

Stanys V, Weckman A, Staniene G, Duchovskis P (2006) *In vitro* induction of polyploidy in Japanese quince (*Chaenomeles japonica*). Plant Cell Tiss Org 84: 263-268.

Sujatha M, Makkar HPS, Becker K (2005) Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. Plant Growth Regul 47:83–90.

Swarup R (2006) Quality planting material and seed standards in *Jatropha*. In: Singh B, Swaminathan R, Ponraj V, (eds). Proceedings of the biodiesel conference toward energy independence-focus on *Jatropha*, June 9-10, Rashtrapati Bhawan, Hyderabad, India, p. 129-35.

Tang Z-Q, Chen D-L, Song Z-L, He YC, Cai D-T (2010) *In vitro* induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. Plant Cell Tiss Org 102:213–220.

Thepsamran N, Thepsithar C, Thongpukdee A. (2006) *In vitro* multiple shoot induction of physic nut (*Jatropha curcas*). Nakhon Pathom: Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University, Thailand.

Thiem B, Śliwińska E. (2003) Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) *in vitro* cultures. Plant Sci 164:129-134.

Tiwari AK, Kumar A, Raheman H (2007). Biodiesel production from *Jatropha* (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: an optimized process. Biomass Bioenerg 31:569-575.

Toledo JV, Martins LD, Klippel VH, Pezzopane JEM, Tomaz MA, Amaral JFT. (2009) Zoneamento agroclimático para a cultura do pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) e da mamona (*Ricinus communis* L.) no estado do Espírito Santo. ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido 05:41-51.

Varshney A, Johnson TS (2010) Efficient plant regeneration from immature embryo cultures of *Jatropha curcas*, a biodiesel plant. Plant Biotech Rep 4:139-148.

Xi-Ling W, Jin-Xing Z, Mao-De Y, Zhen-Gang L, Xiau-Yun J, Qi-You L. (2011) Highly efficient plant regeneration and *in vitro* polyploid induction using hypocotyl explants from diploid mulberry (*Morus multicaulis* Poir.). In Vitro Cell Dev-Pl 47:434-440.

Yang C-Y, Fang Z, Li B, Long Y-F (2012) Review and prospects of *Jatropha* biodiesel industry in China. Renew Sust Energ Rev16:2178-2190.

Zeng S-H, Chen C-W, Hong L, Liu J-H, Deng X-X. (2006) *In vitro* induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicine in *Citrus*. Plant Cell Tiss Org 87:85-93.

Zhang Z, Dai H, Xiao M, Liu X. (2008). *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. Euphytica159, 59-65.

CAPÍTULO I

***In vitro* polyploidization from shoot tips of *Jatropha curcas* L.: a biodiesel plant.**

Authors: Stéfanie Cristina de Oliveira¹, Andrei Caíque Pires Nunes¹, Carlos Roberto Carvalho², Wellington Ronildo Clarindo^{1,✉}

¹Laboratório de Citogenética Vegetal e Cultura de Tecidos, Departamento de Biologia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, CEP: 29500-000 Alegre, ES, Brazil.

²Laboratório de Citogenética e Citometria, Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa, CEP: 36570-000 Viçosa, MG, Brazil.

✉Corresponding author: e-mail: wellington.clarindo@ufes.br

Tel.: +55 28 3552-8626

1. Abstract

Jatropha curcas L. has been considered one of the most promising alternatives for biofuel production and, thus, a relevant economic crop. In this context, *in vitro* tissue culture techniques such as organogenesis and embryogenesis have been conducted for mass clonal propagation of elite *J. curcas* lines. However, despite advancements, *in vitro* induction of polyploids has not yet been related for this crop. In this sense, the present study attempted to induce polyploidy in plantlets generated from shoot tips of *J. curcas* 'Gonçalo' ($2n = 2x = 22$ chromosomes, $2C = 0.85$ pg). For this purpose, some criteria were adopted for selection of the most adequate colchicine treatment: (a) survival rate of the explants, and (b) number of tetraploid and (c) mixoploid plantlets. Tetraploid and mixoploid plantlets were obtained from different treatments, with 0.5 mM colchicine for 96 h being the most efficient. The plantlets were recovered and clonally propagated in tissue culture medium supplemented with indole-3-acetic acid (IAA) and 6-benzylaminopurine (BAP). These results show that the tissue culture procedures were adequate for induction, propagation and recovery of tetraploid and mixoploid plantlets. Moreover, DNA ploidy level screening by flow cytometry was a practical and rapid strategy for selection of diploid, mixoploid and tetraploid plantlets. The tissue culture system presented here represents a reliable methodology for *in vitro* polyploid induction of this and other elite lines of *J. curcas*.

Keywords: *Jatropha curcas*, biofuel plant, *in vitro* polyploidization, DNA ploidy level, flow cytometry, tetraploid plantlets.

2. Introduction

The genus *Jatropha* (family Euphorbiaceae, subfamily Crotonoideae, tribe Joannesieae) comprises over 175 native species, occurring in South to Central America (Mukherjee et al. 2011), Asia and Africa (Kumar and Reddy 2012). In particular, the species *Jatropha curcas* L. has recently been pointed out as a relevant economic crop (Datta et al. 2007; Kumar and Reddy 2012; Mastan et al. 2012; Eijck et al. 2012). The most important aspect of this species is its large potential for biofuel production, owing to high oil content of the seed, rapid growth and stiffness of the plant (Mukherjee et al. 2011) and the low oil production cost (Jha et al. 2007).

Due to the increasing demand for biofuel, breeding programs of *J. curcas* have been established in distinct countries, for instance Brazil, India, Senegal and Cape Verde (Divakara et al. 2010). In this context, *in vitro* tissue culture techniques have mainly been performed for mass clonal propagation of *J. curcas* elite lines (Kalimuthu et al. 2007; Kumar et al. 2011). For this purpose, *in vitro* regeneration of *J. curcas* plantlets has been achieved mainly through organogenesis (Rajore and Batra 2005; Jha et al. 2007; Kalimuthu et al. 2007; Deore and Johnson 2008; Kumar and Reddy 2012) and embryogenesis procedures (Jha et al. 2007; Cai et al. 2011).

For some species, new elite plants have been obtained by *in vitro* polyploidization, which has received special attention as an important tool for plant breeding programs (Zhang et al. 2008). Polyploid plantlets, especially tetraploid ones, have been successfully recovered mainly for vegetable, ornamental and medicinal crops (Dhooghe et al. 2011). Chromosome doubling efficiency, and ultimately polyploidy induction, depends on various factors, such as: (a) species; (b) type of explant; (c) type and concentration of the anti-tubulinic agent, as well as exposure time; and (d) tissue culture medium for polyploidization and propagation (Dhooghe et al. 2011).

An efficient *in vitro* polyploidization system also requires effective methods for direct screening and monitoring of DNA ploidy level. Flow cytometry (FCM) is the quickest and most reliable method for this purpose, given that the DNA ploidy level can be determined for several plantlets in a short time (Clarindo et al. 2008). According to Ochatt (2008), application of FCM in plant science increased significantly with the use of innovative and interesting techniques for basic research and commercial breeding.

Considering the relevance of protocols for *in vitro* polyploidization of *J. curcas*, the present study attempted to induce polyploidy from shoot tips of this relevant biofuel species.

3. Materials and methods

3.1 Plant material

Seeds of *J. curcas* 'Gonçalo' were collected at a crop area located in Resende Costa, Minas Gerais, Brazil. *Solanum lycopersicum* L. 'Stupické' (primary standard for FCM, 2C = 2.00 pg; Praça-Fontes et al. 2011b) were kindly supplied by Dr. Jaroslav Doležal (Experimental Institute of Botany, Czech Republic).

3.2 2C-value and karyotype of *J. curcas*

The genome size of *J. curcas* was measured from nuclei suspensions extracted and stained according to procedure described by Carvalho et al. (2008). The suspensions were analyzed with a Partec PAS[®] cytometer (Partec[®] GmbH, Munster, Germany), equipped with a laser source (488 nm). Flow cytometer parameters (i.e. gain and channel) were determined before each measurement, based on external FCM analyses of primary standard (*S. lycopersicum* 'Stupické') and sample (*J. curcas*). Six independent repetitions, accounting for more than 10,000 nuclei, were carried out at each analysis.

2C-value of *J. curcas* was calculated by dividing the mean channel of the G₀/G₁ fluorescence peak from the primary standard by the mean channel of the G₀/G₁ peak from each sample. Genome size mean value in picograms (pg) was converted to base pairs (bp), considering that 1 pg DNA corresponds to 0.978 x 10⁹ bp (Doležal et al. 2003).

For karyotype characterization of *J. curcas* explant donor, metaphasic chromosomes were obtained from root tips treated according to Carvalho et al. (2008). The slides were prepared using the cell dissociation method, followed by air-drying technique (Carvalho et al. 2007). Subsequently, the slides were stained with a 5% Giemsa solution (Merck[®]) in phosphate buffer (pH 6.8) for 5 min, washed twice in distilled water (dH₂O), air-dried and placed on a hot plate at 50 °C for 3 min.

Images of metaphase chromosomes were captured with a Media Cybernetics® Camera Evolution™ charge-coupled device (CCD) video camera, mounted on a Nikon80i microscope (Nikon, Japan).

3.3 *In vitro* recovery of *J. curcas* shoot tips

For shoot tip recovery, *J. curcas* seeds were disinfected by immersion in 70% ethanol (Merck®) for 1 min, followed by 2.5% sodium hypochlorite for 20 min and rinsing three times with autoclaved dH₂O. After pericarp removal under laminar flow hood, the seeds were disinfected again for 20 min with 2.5% sodium hypochlorite solution containing one drop of Tween (Merck®) per 100 ml. Next, the seeds were washed with autoclaved dH₂O and inoculated into medium M1 (Table 1).

Table 1 – Composition of the tissue culture media – M1: germination medium, M2: proliferation medium, M3: polyploidization liquid medium.

Compound	M1	M2	M3
MS salts (Sigma®)	4,3 g l ⁻¹	4.3 g l ⁻¹	2.15 g l ⁻¹
MS vitamins*	10 ml l ⁻¹	10 ml l ⁻¹	10 ml l ⁻¹
Adenine sulfate (Fluka®)	—	0.025 g l ⁻¹	—
Glutamine (Sigma®)	—	0.1 g l ⁻¹	—
BAP (Sigma®)	—	0.002 g l ⁻¹	—
IAA (Vetec®)	—	0.0005 g l ⁻¹	—
Sucrose (Sigma®)	30 g l ⁻¹	30 g l ⁻¹	30 g l ⁻¹
Agar (Sigma®)	7 g l ⁻¹	7 g l ⁻¹	—
pH	5.7	5.7	5.7

*Stock solution composed of glycine (0.20 g l⁻¹), nicotinic acid (0.05 g l⁻¹), pyridoxine (0.05 g l⁻¹) and thiamine (0.01 g l⁻¹).

3.4 *In vitro* multiplication and assessment of DNA ploidy level

After 30 days in medium M1, shoot tips of the seedlings germinated *in vitro* were excised and inoculated into bottles containing 100 ml of medium M2 (Table 1).

These cultures were maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ under 16/8 h light/dark regime, with $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ light radiation.

As medium M2 (Table 1) was supplemented with indole-3-acetic acid (IAA) and 6-benzylaminopurine (BAP) (Rajore and Batra 2005; Mukherjee et al. 2011), the shoot tips were used to verify the occurrence of numeric chromosomal aberration, eu- and aneuploidy, associated with somaclonal variation.

For this purpose, leaf samples were collected from *J. curcas* plants seed-raised in greenhouse (control) and from plantlets propagated in medium M2 for 120 days (samples). Nuclei suspensions of control and samples were prepared as described by Clarindo et al. (2008) and CyStain UV Ploidy Partec[®] protocols. These suspensions were analyzed with a Partec-PAS[®] flow cytometer, equipped with an UV lamp emitting at 388 nm and a TK 420 filter. The FlowMax[®] software (Partec[®]) was used for data analyses. More than 10,000 nuclei were analyzed, and three independent replications were performed for determination of DNA ploidy level in each *J. curcas* plantlet.

3.5 *In vitro* polyploidization

Shoot tip explants were excised from the plantlets obtained in medium M1 and placed in Erlenmeyer flasks containing 10 ml of liquid polyploidization medium (Praça et al. 2009) M3 (Table 1). This medium was supplemented with different concentrations (Table 2a) of filter-sterilized colchicine (Sigma[®]). The flasks were shaken (40 rpm, at $25 \pm 1^\circ\text{C}$) in a growth room for different time periods (Table 2). Each flask contained three shoot tip explants, corresponding to three replicates for each treatment. After the set times, the explants were rinsed five times with autoclaved dH₂O and inoculated into medium M2 (Table 1). Cultures were maintained at 25°C under a 16/8 h light/dark regime, with $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light radiation provided by two fluorescent lamps (20 W, Osram[®]).

The shoot tips were propagated for four months, being subcultured every 30 days into fresh medium M2. During each subculture, the leaves were excised and the new shoots isolated. For polyploidy screening, leaves were excised from all *J. curcas* plantlets (samples; Table 2a) recovered in medium M2. *J. curcas* plants seed-raised in greenhouse were used as diploid standards (control). Nuclei suspensions of controls and samples were prepared and analyzed by FCM, as described above.

Polyploidization efficiency was statistically analyzed by the *t*-test method, using the Assistat 7.6 beta statistical software (Silva 2012). Based on statistical comparisons, a second *in vitro* polyploidization procedure was performed using the most efficient colchicine concentration (Table 2b).

4. Results

4.1 2C-value and karyotype of *J. curcas*

The fluorescence peaks of G_0/G_1 nuclei of *J. curcas* and *S. lycopersicum* showed coefficient of variation (CV) lower than 5%. With the fluorescence peaks of G_0/G_1 nuclei from the standard *S. lycopersicum* ($2C = 2.00$ pg; Praça-Fontes et al. 2011b) being turned to channel 300 (Fig 1a), the mean 2C value for all *J. curcas* 'Gonçalo' plants was equivalent to $0.85 \text{ pg} \pm 0.01$ (0.83×10^9 bp).

J. curcas root tips treated with 4 μM amiprophos-methyl (APM, microtubule inhibitor) and macerated in 1:10 pectinase solution for 2.5 h provided metaphases adequate for morphometric analysis. The metaphases presented well-spread chromosomes with well-defined constrictions, without cytoplasmic background and chromatin damage (Fig. 1b). Morphometric analysis showed that *J. curcas* 'Gonçalo' has $2n = 22$ chromosomes, with total length ranging from 1.60 to 1.14 μm .

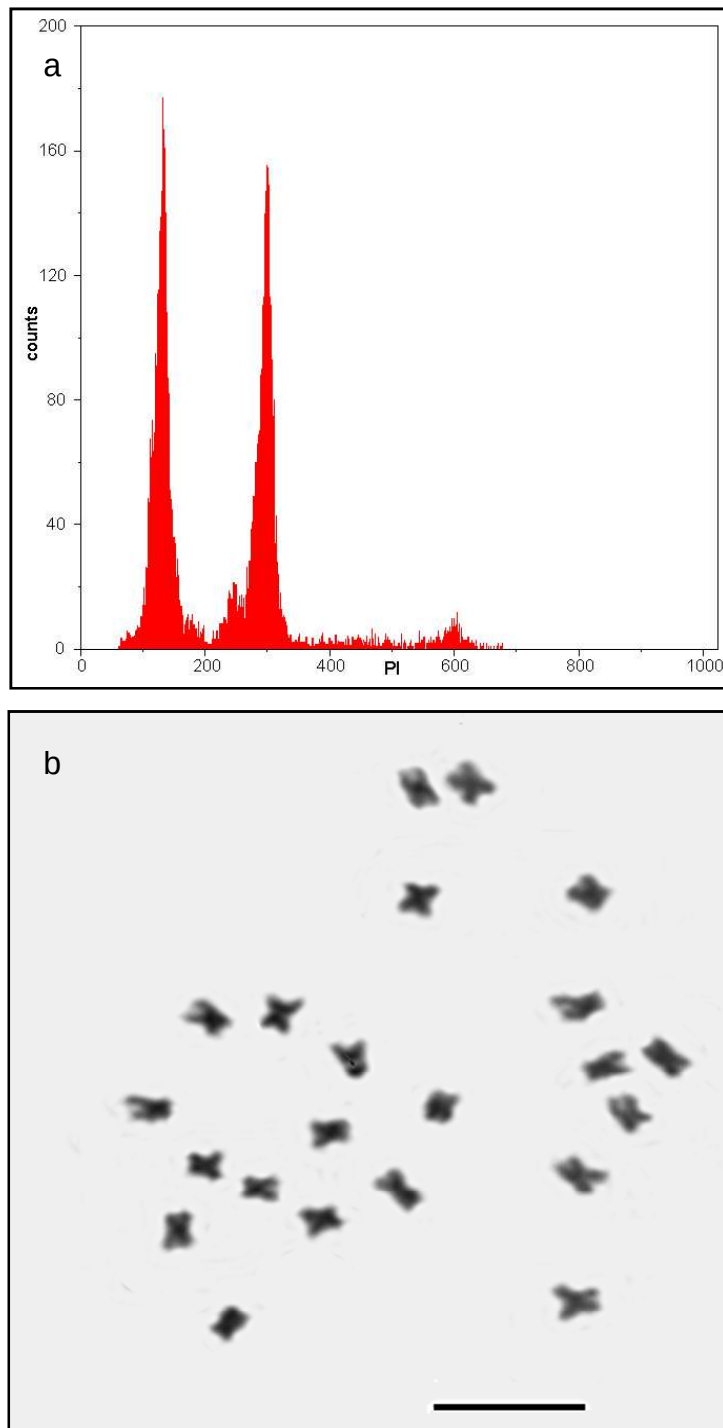


Figure 1. Characterization of *J. curcas* 'Gonçalo' explants donor: a) Mean nuclear DNA content of *J. curcas* plants estimated at 0,85 pg. Representative histogram showing peaks relating to G_0/G_1 nuclei, with a coefficient of variation of less than 5 %, obtained by staining of nuclear suspension with propidium iodide. The peak positioned at the channel 300 refers to the internal standard G_0/G_1 nuclei *S. lycopersicum* ($2C = 2.00$ pg) and on 127 G_0/G_1 nuclei of *J. curcas*. b) Chromosomes from *J. curcas* root-tips treated with 4.0 μ M amiprophos-methyl during 14 h at 4°C. Metaphase chromosomes, stained with Giemsa 5%, displaying well-defined centromeric constrictions. Bar = 5 μ m

4.2 *In vitro* recovery of *J. curcas* shoot tips

Owing to the disinfestation procedure and handling of seeds under aseptic conditions, no contamination was detected during the *in vitro* process. After eight days in medium M1 (Table 1), *J. curcas* seeds germinated with a rate of 86.66% and speed of germination (SG) of 4.86. Consequently, plantlets were regenerated after 30 days, providing enough shoot tips for propagation and multiplication in medium M2 and *in vitro* polyploidization in medium M3.

4.3 *In vitro* multiplication and assessment of DNA ploidy level

Shoot tips were transferred to medium M2 and cultivated for 120 days, with monthly subcultures. After four subcultures in M2, the shoot tips showed a mean multiplication rate of 4.5 shoots per explant.

Leaves from the plantlets were collected for analysis of DNA ploidy level stability by FCM. *In vitro* (samples) and greenhouse (control; 2C = 0.85 pg; 2x = 22 chromosomes) plantlets exhibited G₀/G₁ peaks in the same channel (Fig. 1a). This way, it could be verified that numeric chromosomal aberration (eu- and/or aneuploidy) has not occurred during propagation and multiplication of *J. curcas* plantlets in medium M2.

4.4 *In vitro* polyploidization

In vitro polyploidization was conducted in two approaches. The first was performed to select the most adequate colchicine concentration. For this purpose, some criteria were adopted: (a) survival rate of the explants, and (b) number of tetraploid and (c) mixoploid plantlets.

The survival rate of explants not treated with the anti-mitotic agent colchicine, or treated with 0.5 mM for 24 h, was 100%. With increasing concentration, the survival rate statistically decreased, reaching 0% when the explants were treated with a colchicine concentration of 1.5 mM for 72h (Table 2a).

Table 2 - Survival rate, and number of mixoploid and tetraploid *J. curcas* plantlets obtained after polyploidization treatments.

Table 2a – First polyploidization approach.

Colchicine concentration (mM)	Treatment duration (h)	N° of individuals treated	Survival rate (%)	N° of regenerated plantlets*	N° diploids (%)***	N° tetraploids (%)***	N° mixoploids (%)***
0	24	9	100 ^a	27 ^a	27 (100)	0 ^b (0)	0 ^b (0)
	48	9	100 ^a	25 ^{a,b}	25 (100)	0 ^b (0)	0 ^b (0)
	72	9	100 ^a	25 ^{a,b}	25 (100)	0 ^b (0)	0 ^b (0)
	96	9	100 ^a	26 ^{a,b}	26 (100)	0 ^b (0)	0 ^b (0)
0.5	24	9	100 ^a	24 ^{a,b}	24 (100)	0 ^b (0)	0 ^b (0)
	48	9	66.66 ^b	22 ^{b,c}	22 (100)	0 ^b (0)	0 ^b (0)
	72	9	22.22 ^d	10 ^e	9 (90)	0 ^b (0)	1 ^b (10)
	96	9	66.66 ^b	21 ^c	12 (57.15)	3 ^a (14.28)	6 ^a (28.57)
1.5	24	9	66.66 ^b	12 ^{d,e}	12 (100)	0 ^b (0)	0 ^b (0)
	48	9	66.66 ^b	12 ^{d,e}	10 (83.34)	2 ^a (16.66)	0 ^b (0)
	72	9	33.33 ^c	15 ^d	15 (100)	0 ^b (0)	0 ^b (0)
	96	9	0.0 ^d	0 ^f	0 (0)	0 ^b (0)	0 ^b (0)
2.5	24 – 96**	9	0.0 ^d	0 ^f	0 (0)	0 ^b (0)	0 ^b (0)

Table 2b – Second polyploidization approach.

Colchicine concentration (mM)	Treatment duration (h)	N° of individuals treated	Survival rate (%)	N° of regenerated plantlets*	N° diploids (%)***	N° tetraploids (%)***	N° mixoploids (%)***
0	96	20	100 ^a	20 ^a	20 (100)	0 ^b (0)	0 ^b (0)
	120	20	100 ^a	20 ^a	20 (100)	0 ^b (0)	0 ^b (0)
	144	20	100 ^a	20 ^a	20 (100)	0 ^b (0)	0 ^b (0)
	168	20	100 ^a	20 ^a	20 (100)	0 ^b (0)	0 ^b (0)
0.5	96	20	65 ^b	13 ^b	0	7 ^a (53.85)	6 ^a (46.15)
	120	20	35 ^c	7 ^c	3 (42.85)	3 ^b (42.85)	1 ^b (14.3)
	144	20	35 ^c	7 ^c	5 (71.42)	0 ^b (0)	2 ^b (28.58)
	168	20	20 ^c	4 ^c	4 (100)	0 ^b (0)	0 ^b (0)

In the columns for each polyploidization approach, means followed by the same letter are not significantly different at the $p \leq 0.05$ by *t*-test

*Plantlets regenerated after four subsequent subcultures totalizing 120 days.

** As all explants treated with 2.5 mM colchicine concentration died, the data were summarized.

*** Number (%) of diploid, tetraploid, and mixoploid plantlets.

Shoot tips treated with colchicine showed a lower growth and multiplication rate, yielding few regenerated plantlets in comparison to explants not treated with colchicine. In consideration of the vegetative development, DNA ploidy level of the plantlets was assessed by FCM only after 4 subcultures in medium M2, totaling 120 days.

J. curcas plantlets cultured in medium M3 without colchicine, as well as greenhouse plants (control; $2C = 0.85$ pg; $2x = 22$ chromosomes), exhibited G_0/G_1 peaks in the same channel (Fig. 2a). Therefore, these plantlets (Fig. 1b) showed the same DNA ploidy level. Similarly, some explants treated with colchicine generated seedlings that provided FCM histograms with the same profile in comparison to the control (Table 2a, Fig. 2a). Based on this, these plantlets were also considered diploid.

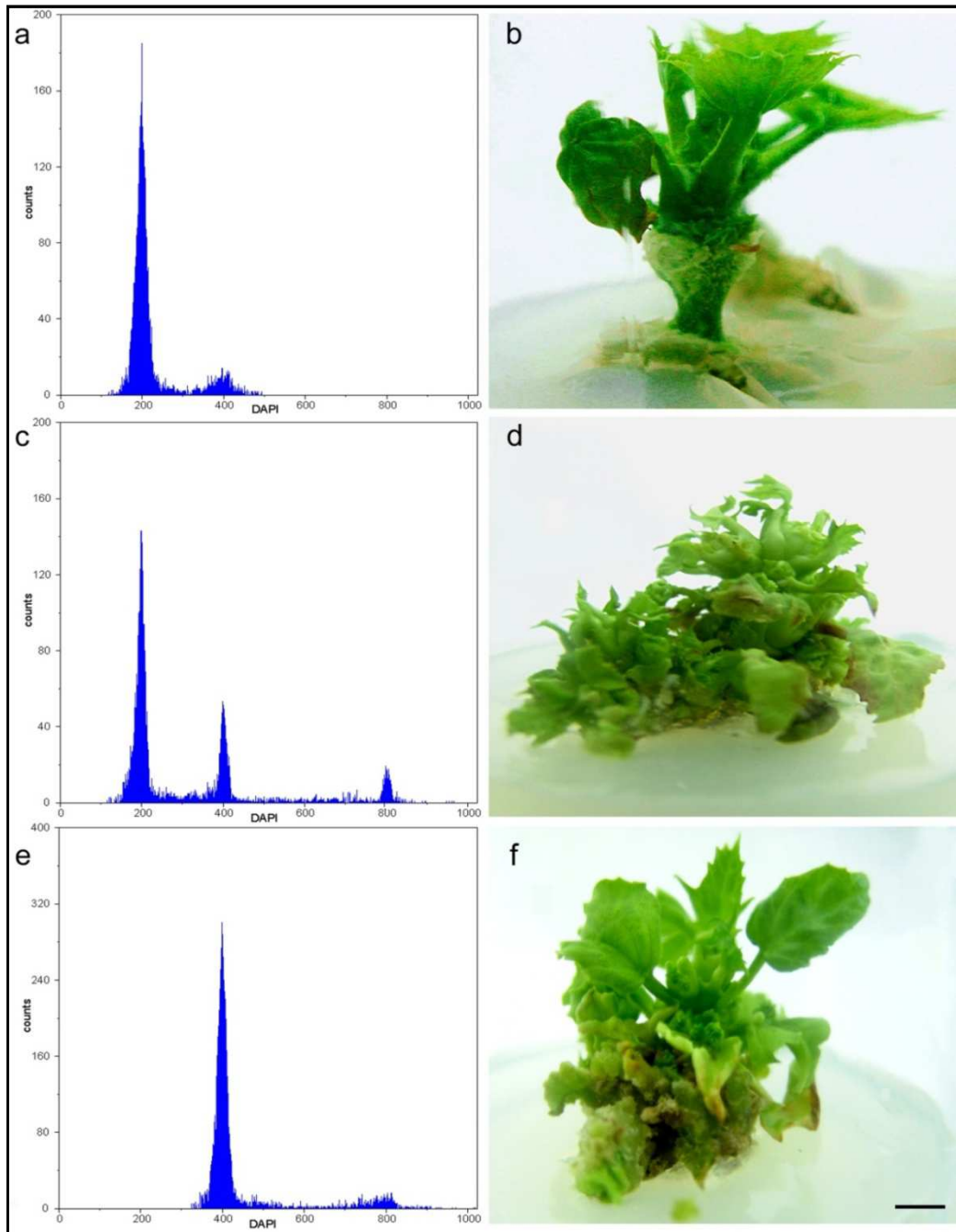


Figure 2. *J. curcas* plantlets obtained by *in vitro* polyploidization, and cultivated in M2 medium (Table 1), and respective FCM histograms. (a) Histogram showing G_0/G_1 peak (channel 200) of the diploid samples ($2C = 2X$). (b) Diploid plantlet representing the regenerants that showed the same DNA ploidy level of the control plants ($2C = 2X$). (c) Histogram showing G_1/G_0 peak (channel 200 and 400) of the mixoploid samples ($2C = 2X$ and $2C = 4X$, respectively). (d) Mixoploid plantlet representing the regenerants that showed DNA ploidy level $2C = 2X$ and $2C = 4X$. (e) Histogram showing G_1/G_0 peak (channel 400) of the tetraploid samples ($2C = 4X$). (f) Tetraploid plantlet representing the regenerants that showed DNA ploidy level $2C = 4X$. Bar = 1 cm.

Mixoploid plantlets of *J. curcas* (Fig. 2c, d) were obtained in colchicine concentration of 0.5 mM for 72h (10.00%) and 0.5 mM for 96h (28.57%). These plantlets exhibited G_0/G_1 peaks equivalent to nuclei $2C = 2X$ and $2C = 4X$ (Fig. 2c).

FCM analysis also evidenced tetraploid plantlets of *J. curcas* (Fig. 1e, f). In comparison to control and plantlets cultured in medium M3 without colchicine, these plantlets exhibited G_0/G_1 peaks equivalent to nuclei $2C = 4X$ (Fig. 2f). Tetraploids were observed in the treatment with 0.5 mM colchicine for 96 h (14.28%), and 1.5 mM with exposure time of 48 h (16.66%) (Table 2a).

In regard of the three criteria (number of tetraploid and mixoploid plantlets, and survival rate), the treatment with 0.5 mM colchicine for 96 h was considered the most adequate for polyploidy induction in *J. curcas* shoot tips. Considering this result, a second polyploidization approach was set (Table 2b), increasing the treatment time (96, 120, 144, 168 h) and maintaining the colchicine concentration (0.5 mM).

As in the first polyploidization procedure, approximately 65% of the explants survived in the 0.5 mM/96 h treatment. Survival rate statistically decreased with the increase in exposure time (Table 2b). The second polyploidization experiment confirmed that the 0.5 mM/96 h treatment is efficient for the production of tetraploids (Table 2b). Analysis of DNA ploidy level by FCM evidenced that this treatment provided 53.85% of tetraploids. This treatment also generated 46.15% of mixoploid regenerants. Tetraploids were also obtained in the exposure time of 120 h, though with smaller percentage (42.85%) (Table 2b). The mixoploid and tetraploid plantlets have been *in vitro* multiplied, and some *ex vitro* acclimatized.

5. Discussion

5.1 2C-value and karyotype of *J. curcas*

Considering that some authors have reported the occurrence of *J. curcas* tetraploid plants (Soontornchainaksaeng and Jenjittikul 2003; Mukherjee et al. 2011), the first concern was to measure the 2C-value and characterize the karyotype of *J. curcas* 'Gonçalo' explant donors.

As reported by Carvalho et al. (2008), the FCM procedure provided fluorescence peaks of G_0/G_1 nuclei showing CVs below 5%. This value has been considered adequate for FCM assessments in plants (Doležel and Bartoš 2005;

Praça-Fontes et al. 2011a). In accordance with Praça-Fontes et al. (2011a), an appropriate preparation of nuclei suspensions is imperative to provide stoichiometrically stained nuclei and, consequently, low CV values, as obtained in the present work.

S. lycopersicum 'Stupické' was chosen as primary standard for 2C-value measurement. This standard has been regarded as suitable for analyses involving plants rich in phenolic compounds (Clarindo et al. 2012), such as *J. curcas*. Using FCM, Praça-Fontes et al. (2011a) revisited the DNA C-value of seven species often used as primary standard. In a cascade-like manner, from *Arabidopsis thaliana* to *Allium cepa*, these authors demonstrated that *S. lycopersicum* is an ideal primary reference standard.

The mean nuclear DNA content value of $2C = 0.85$ pg found here for *J. curcas* was identical to the value reported by Carvalho et al. (2008). This result confirms that the nuclear genome size of *J. curcas*, as well as that of *Euphorbia peplus* L. ($2C = 0.7$ pg), is relatively small compared to other Euphorbiaceae species (Bennett and Leitch 2011). Corroborating with the FCM data, karyotype analysis showed that *J. curcas* 'Gonçalo' had $2n = 2x = 22$ chromosomes, which is considered relatively small (Carvalho et al. 2008).

The previous FCM and cytogenetic approaches showed that *J. curcas* 'Gonçalo' has a stable genome ($2x = 22$ chromosomes, $2C = 0.85$ pg). Since no pre-existing ploidy variation was evidenced, this line was considered adequate for *in vitro* polyploidy induction.

5.2 *In vitro* recovery of *J. curcas* shoot tips

The disinfestation process was efficient to provide aseptic cultures of *J. curcas*. Seeds of this species have a high incidence of fungi (e.g. *Alternaria* sp., *Macrophomina* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* spp.), even after a surface disinfection process (Vanzolini et al. 2010). Considering this, the removal of the pericarp, followed by disinfection in laminar flow, was crucial to ensure totally aseptic seeds.

As attested by the high germination rate (86.66%), medium M1 yielded sufficient amount of seedlings for subsequent excision of shoot tips. Distinct authors (Kalimuthu et al. 2007; Deore and Johnson 2008; Kaewpoo and Te-chato 2010) have

also considered M1 an efficient medium for germination of zygotic embryos and seeds of *J. curcas*.

Besides the high germination rate, *J. curcas* seeds showed a SG of 4.86 after eight days in medium M1. This data reflects the efficiency of medium M1 to promote healthy seedlings. Gairola et al. (2011) reported a germination rate of 62.50% and a SG of 4.85 in *J. curcas* seeds sown in vermiculite substrate. Thus, the *in vitro* conditions were adequate for seed germination of this species.

5.3 *In vitro* multiplication and assessment of DNA ploidy level

In accordance with Rajore and Batra (2005), medium M2 was ideal for clonal propagation and multiplication of *J. curcas* shoot tips. After four subcultures (120 days) in M2, the mean multiplication rate was 4.5 shoots per explant. This result indicates that the BAP/IAA combination in medium M2 increased shoot frequency, being crucial for the success of *in vitro* propagation and multiplication of *J. curcas*.

The type and concentration of growth regulators, as well as subculture frequency, can promote the occurrence of numeric chromosomal aberrations (eu- and/or aneuploidy) associated to somaclonal variation. Auxins and cytokinins, such as BAP and IAA, are the main growth regulators that act to control cell division and tissue differentiation (Fehér et al. 2003). These regulators interfere in cell cycle control and may lead to genetic variability (Bairu et al. 2011).

As the medium M2 was supplemented with auxin and cytokinin regulators, leaves from plantlets propagated in this medium were used to assess DNA ploidy level. The nuclei suspension of these plantlets provided G_0/G_1 peaks in the same channel as the control plants (Fig. 1a). In this sense, medium M2 (Rajore and Batra 2005) did not promote any numeric chromosomal aberration (eu- and/or aneuploidy) during propagation and multiplication of *J. curcas* plantlets. Therefore, the *in vitro* tissue culture conditions conserved the nuclear genome stability and homogeneity of propagated and multiplied *J. curcas* plantlets. As related by Fiuk et al. (2010), ploidy maintenance during *in vitro* condition is a relevant prerequisite for clonal propagation.

Kour et al. (2009) and Larkin and Scowcroft (1981) mentioned that variability can manifest at cytological level. For this reason, FCM is commonly used for detection of DNA ploidy level variation (Endemann et al. 2001; Loureiro et al. 2005; Loureiro et al. 2007; Clarindo et al. 2008; Jin et al. 2008; Brito et al. 2010). Besides,

FCM analysis is the most practical, reliable and efficient method for this purpose (Dolezel 1997; Clarindo et al. 2008; Praça et al. 2009). Therefore, DNA ploidy level screening of *J. curcas* plantlet samples could be done rapidly, in a working day, without requirement of dividing cells.

5.4 *In vitro* polyploidization

The polyploidization experiments were conducted to find colchicine concentrations with limited toxic effect. The effect of colchicine on the survival rate depended upon concentrations of this compound and duration of treatment (Samala and Te-chato 2012).

Previous experiments performed in our laboratory showed that colchicine concentrations of 3.5 mM, 5.0 mM and 6.5 mM at treatment periods of 24 – 72 h were highly toxic to shoot tips (data not shown). These explants died in the first week in medium M2. Thereafter, other concentrations and exposure times were tested (Table 2a) so as to obtain surviving explants, as well as tetraploid and mixoploid plantlets.

Considering the three adopted criteria, treatment with 0.5 mM colchicine for 96 h was considered the most adequate for polyploidization (Table 2a). Based on this result, a new polyploidization approach was performed, in which the colchicine concentration was maintained (Table 2b).

The survival rate of *J. curcas* explants decreased with increasing colchicine concentration and exposure time (Tables 2a, b). This result was also found in other polyploidization approaches from woody plants (Chakraborti et al. 1998; Gu et al. 2005; Stanys et al. 2006; Xi-Ling et al. 2011; Samala and Te-chato 2012).

Tetraploid plantlets were obtained from different treatments, with 0.5 mM colchicine for 96 h being statistically the most efficient (Tables 2a, b). From this treatment, 53.85% of *J. curcas* tetraploid plantlets were recovered (Fig. 1f, Table 2b). Tetraploid plantlets of the woody species *Phlox subulata* L. were regenerated by Zhang et al. (2008) also using 0.5 mM colchicine.

Most of the mixoploid plantlets were also obtained in the treatment with 0.5 mM colchicine for 96 h (Tables 2). Though *in vitro* polyploidization generally yields mixoploid plantlets (Chen and Gao 2007), the mixoploid state has been considered reversible, since some plants return to the diploid condition or become tetraploid

plants (Awoloye et al. 1994; Väinölä 2000). Due to the simultaneous occurrence of cells with varying ploidy, embryogenesis systems can be established to enable recovery of plantlets showing a single and stable ploidy level (Chen and Gao 2007).

In this study, a tissue culture procedure was adapted for induction, propagation and recovery of tetraploid plantlets of *J. curcas*. Moreover, nuclear DNA ploidy screening by FCM was a practical and rapid strategy for selection of diploid, mixoploid and tetraploid plantlets. The method presented here is also reliable for routine *in vitro* production of polyploids of other *J. curcas* elite lines.

6. Acknowledgements

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, DF, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES, Vitória, ES, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Belo Horizonte, MG, Brazil), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, DF, Brazil) for financial support.

7. References

Awoloye F, van Duren M, Dolezel J, Novak FJ (1994) Nuclear DNA content and *in vitro* induced somatic polyploidization cassava (*Manihot esculenta* Crantz) breeding. Euphytica 76:195–202. doi: 10.1007/BF00022164

Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regul 63:147-173. doi:10.1007/s10725-010-9554-x

Bennett MD, Leitch IJ (2011) Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. Ann Bot 107:467-590. doi:10.1093/aob/mcq258

Brito G, Lopes T, Loureiro J, Rodriguez E, Santos C (2010) Assessment of genetic stability of two micropropagated wild olive species using flow cytometry and

microsatellite markers. *Trees-Struct Funct* 24:723-732. doi: 10.1007/s00468-010-0442-9

Cai L, Fu L, Ji L (2011) Regeneration of *Jatropha curcas* through efficient somatic embryogenesis and suspension culture. *GM Crops* 2:110-117

Carvalho CR, Clarindo WR, Almeida PM (2007) Plant cytogenetics: still looking for the perfect mitotic chromosomes. *The Nucleus* 50:453-462

Carvalho CR, Clarindo WR, Praça MM, Araújo FS, Carels N (2008) Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. *Plant Sci* 174:613-617. doi: 10.1016/j.plantsci.2008.03.010

Chakraborti SP, Vijayan K, Roy BN, Qadri SMH (1998) *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). *Plant Cell Rep* 17:799-803

Chen L, Gao S (2007) *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus*. *Sci Horticult* 112:339-344

Clarindo WR, Carvalho CR, Araújo FS, Abreu IS, Otoni WC (2008) Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 92:207-214. doi: 10.1007/s11240-007-9325-1

Clarindo WR, Carvalho CR, Mendonça MAC (2012) Cytogenetic and flow cytometry data expand knowledge of genome evolution in three *Coffea* species. *Plant Syst Evol* 298:835-844. doi: 10.1007/s00606-012-095-7

Datta MM, Mukherjee P, Ghosh B, Jha TM (2007) *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). *Curr Sci India* 93:1438-1442

Deore AC, Johnson TS (2008) High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnol Rep* 2:7–11. doi: 10.1007/s11816-008-0042-y

Divakara BN, Upadhyaya HD, Wani SP, Gowda CLL (2010) Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: a review. Appl Energ 87: 32-742. doi: 10.1016/j.apenergy.2009.07.013

Dhooghe E, Van Laere K, Eeckhaut T, Leus L, van Huylenbroeck J (2011) Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. Plant Cell Tiss Organ Cult 104:359-373. doi: 10.1007/s11240-010-9786-5

Doležel J (1997) Application of flow cytometry for the study of plant genomes. J Appl Genetics 38:285-302

Doležel J, Bartoš J, Voglmayr H, Greilhuber J (2003) Nuclear DNA and genome size of trout and human. Cytometry 51:127–128

Doležel J, Bartoš J (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. Ann Bot 95: 99-110. doi: 10.1093/aob/mci005

Eijck J, Smeets E, Faaij A (2012) *Jatropha*: a promising crop for Africa's biofuel production? In: Janssen R, Rutz D (eds) Bioenergy for sustainable development in Africa, pp 27-40. doi: 10.1007/978-94-007-2181-4-3

Endemann M, Hristoforoglu K, Stauber T, Wilhelm E (2001) Assessment of age-related polyploidy in *Quercus robur* L. somatic embryos and regenerated plants using DNA flow cytometry. Biol Plant 44:339-345

Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell Tiss Organ Cult 74:201-228. doi: 10.1023/A:1024033216561

Fiuk A, Bednarek PT, Rybczyński JJ (2010) Flow Cytometry, HPLC-RP, and metAFLP analyses to assess genetic variability in somatic embryo-derived plantlets of *Gentiana pannonica* Scop. Plant Mol Biol Rep 28:413–420. doi: 10.1007/s11105-009-0167-3

Gairola KC, Nautiyal AR, Dwivedi AK (2011) Effect of temperatures and germination media on seed germination of *Jatropha curcas* Linn. *Advances in BioResearch* 2:66-71

Gu XF, Yang AF, Meng H, Zhang JR (2005) *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua. *Plant Cell Rep* 24: 671-676. doi: 10.1007/s00299-005-0017-1

Jin S, Mushke R, Zhu H, Tu L, Lin Z, Zhang Y, Zhang X (2008) Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell Rep*, 27:1303–1316. doi: 10.1007/s00299-008-0557-2

Jha TB, Mukherjee P, Datta MM (2007) Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotechnol Rep*, 1:135-140. doi: 10.1007/s11816-007-0027-2

Kaewpoo M, Te-chato S (2010) Study on ploidy level of micropropagated *Jatropha curcas* L. via flow cytometry. *J Agricult Technol*, 6(2): 391-400

Kalimuthu K, Paulsamy S, Senthilkumar R, Sathya M (2007) *In vitro* propagation of the biodiesel plant *Jatropha curcas* L.. *Plant Tissue Cult Biotech*,17(2):137-147

Kour G, Kour B, Kaul S, Dhar MK (2009) Genetic and epigenetic instability of amplification-prone sequences of a novel B chromosome induced by tissue culture in *Plantago lagopus* L. *Plant Cell Rep*, 28:1857-1867. doi: 10.1007/s00299-009-0789-9

Kumar N, Vijay Anand KG, Reddy MP (2011) *In vitro* regeneration from petiole explants of non-toxic *Jatropha curcas*. *Ind Crop Prod*, 33:146–151. doi: 10.1016/j.indcrop.2010.09.013

Kumar N, Reddy MP (2012) Thidiazuron (TDZ) induced plant regeneration from cotyledonary petiole explants of elite genotypes of *Jatropha curcas*: a candidate biodiesel plant. *Ind Crop Prod*, 39:62-68. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.02.011

Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60:197-214

Loureiro J, Pinto G, Lopes T, Doležel J, Santos C (2005) Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. *Planta*, 221: 815–822. doi: 10.1007/s00425-005-1492-x

Loureiro J, Rodriguez E, Costa A, Santos C (2007) Nuclear DNA content estimations in wild olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sylvestris* Brot.) and Portuguese cultivars of *O. europaea* using flow cytometry. *Genet Resour Crop, Evol* 54:21-25. doi: 10.1007/s10722-006-9115-3

Mastan SG, Sudheer PDVN, Rahman H, Ghosh A, Rathore MS, Prakash CR, Chikara J (2012) Molecular characterization of intra-population variability of *Jatropha curcas* L. using DNA based molecular markers. *Mol Biol Rep*, 39:4383-4390. doi: 10.1007/s11033-011-1226-z

Mukherjee P, Varshney A, Johnson TS, Jha TB (2011) *Jatropha curcas*: a review on biotechnological status and challenges. *Plant Biotechnol Rep* 5:197-215. doi: 10.1007/s11816-011-0175-2

Ochatt SJ (2008) Flow cytometry in plant breeding. *Cytometry*, 73:581-598. doi: 10.1002/cyto.a.20562

Praça MM, Carvalho CR, Clarindo WC (2009) A practical and reliable procedure for *in vitro* induction of tetraploid tomato. *Sci Horticult*, 122:501-505. doi: 10.1016/j.scienta.2009.05.032

Praça-Fontes MM, Carvalho CR, Clarindo WR, Cruz CD (2011a) Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards”. *Plant Cell Rep*, 30:1183-1191. doi: 10.1007/s00299-011-1026-x

Praça-Fontes MM, Carvalho CR, Clarindo WR (2011b) C-value reassessment of plant standards: an image cytometry approach. *Plant Cell Rep*, 30:2303–2312. doi: 10.1007/s00299-011-1135-6

Rajore S, Batra A (2005) Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas*. *J Plant Biochem Biot*, 14:73–75

Samala S, Te-chato S (2012) Ploidy induction through secondary somatic embryo (SSE) of oil palm by colchicine treatment. *J Agricult Technol* 8:337-352

Soontornchainaksaeng P, Jenjittikul T (2003) Karyology of *Jatropha* (Euphorbiaceae) in Thailand. *Thai For Bull (Bot)* 31:105-112

Silva FAS (2012) Programa ASSISTAT – Aplicativo Computacional em Estatística. DEAG-CTRN-UFCG, Campina Grande-PB, Brasil

Stanys V, Weckman A, Staniene G, Duchovskis P (2006) *In vitro* induction of polyploidy in Japanese quince (*Chaenomeles japonica*). *Plant Cell Tiss Org*, 84: 263–268. doi: 10.1007/s11240-005-9029-3

Väinölä A (2000) Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. *Euphytica* 112: 239-244

Vanzolini S, Meorin EBK, Silva RA, Nakagawa J (2010) Qualidade sanitária e germinação de sementes de pinhão-mansão. *Revista Brasileira de Sementes* 32:1-9

Xi-Ling W, Jin-Xing Z, Mao-De Y, Zhen-Gang L, Xiao-Yun J, Qi-You L (2011) Highly efficient plant regeneration and *in vitro* polyploid induction using hypocotyl explants from diploid mulberry (*Morus multicaulis* Poir.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 47:434-440. doi: 10.1007/s11627-010-9328-1

Zhang Z, Dai H, Xiao M, Liu X (2008) *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. *Euphytica* 159:59-65. doi: 10.1007/s10681-007-9457-8

CAPÍTULO II

Establishment of calli culture from leaf explants of *Jatropha curcas* L.

Authors: Stéfanie Cristina de Oliveira¹, Andrei Caíque Pires Nunes¹, Wellington Ronildo Clarindo^{1,✉}

¹Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos, Departamento de Biologia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, CEP: 29500-000, Alegre, ES, Brazil.

✉Corresponding author: e-mail: wellington.clarindo@ufes.br

Tel.: +55 28 3552-8626

1. Abstract

Jatropha curcas L., family Euphorbiaceae, has been pointed out as a promising alternative for biofuel production, owing to the high oil content of the seed, rapid growth and low oil production cost. The expansion of *J. curcas* crops has induced an increasing demand for homogenous elite lines. In this regard, strategies based on tissue culture techniques have been established for clonal and mass propagation and regeneration of elite lines. In these procedures, a callus induction step is required. In this context, the aim of this work was to establish calli cultures from leaf explants of *J. curcas* 'Gonçalo'. For this purpose, leaf explants were inoculated in two different media, supplemented with either 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/kinetin (2,4-D/Kn) or indolebutyric acid/kinetin (IBA/Kn). The results showed that medium containing 2,4-D/Kn yielded 100% of explants with friable, pale yellow calli. Therefore, the auxin 2,4-D was considered more efficient for callus induction than IBA (68.4%). Since callogenesis represents the basis for somatic embryogenesis, the present study established a fast growing callus protocol using two different auxins. In this context, exogenous auxins, mainly 2,4-D, were effective for callus induction, prompting the proliferation of *J. curcas* cells.

Keywords: callogenesis, auxin, cytokinin, somatic embryogenesis.

2. Introduction

Jatropha curcas, family Euphorbiaceae, is widely distributed in its center of origin as well as cultivated areas in Central and South America, Africa, India and Southeast Asia (Kumar and Sharma 2008; Pandey et al. 2012). This species has been pointed out as a promising alternative for biofuel production, due to the high oil content of the seed (Deore and Johnson 2008), rapid growth in arid and rainfall zones, pathogen resistance and low oil production cost (Jain and Sharma 2010; Mukherjee et al. 2011).

Owing to the expansion of commercial *J. curcas* crops, the demand for homogenous elite lines with high agronomic revenue is increasing (Kumar and Reddy 2012). However, the main limitation for large-scale cultivation of *J. curcas* as an energy crop lies on the seminal and cutting propagation methods adopted for this species (Singh et al. 2010; Mukherjee et al. 2011). These methods have been restricted to crop cultivation of *J. curcas*, due to inconstant seed yield and lower drought and disease resistance (Kumar and Reddy 2012). For different crops, these problems have been resolved by tissue culture techniques, which have been effective for clonal and mass propagation of elite lines. Among such techniques, somatic embryogenesis has been used to regenerate whole plants, in large number, being thus characterized as an important tool for breeding programs (Jha et al. 2007). This system relies on friable callus induction, an intermediate stage of indirect embryogenesis. This process arises from cell dedifferentiation to set a new developmental program, inducing cell division and proliferation (Fehér et al. 2003).

Different plant growth regulators (PGR), alone or in combination, play an important role in the process of callus induction and proliferation (Varshney and Johnson 2010). For instance, the auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) has been regarded as ideal for callus induction (Fehér et al. 2003; Goralski et al. 2005; Thomas and Chaturvedi 2008; Pinto et al. 2010). This regulator acts on callus mass formation for embryogenic establishment and dedifferentiation into somatic embryos (Pinto et al. 2010).

The present work was conducted to establish a calli culture from leaves of *J. curcas*.

3. Materials and methods

3.1 Plant material

Leaves were excised from 4-month-old *J. curcas* 'Gonçalo' plants grown in greenhouse at the Universidade Federal do Espírito Santo (ES, Brazil). Leaves were pulverized with a solution containing 2.0 g l⁻¹ Agrimycin[®] PM (Pfizer), 0.5 ml l⁻¹ Ethion 500 (Bayer CropScience[®]), 10.0 ml l⁻¹ Assist[®] (BASF) and 1.0 g l⁻¹ Curathane (Dow AgroSciences). After 24 h, leaves near the shoot apical meristem were collected for culture establishment. These leaves were washed with liquid detergent and rinsed with running water for 2 h.

Under a laminar flow hood, the leaves were disinfected by immersion in 70% ethanol (Merck[®]), for 20 s, and 1.5% sodium hypochlorite (Merck[®]) solution (containing 10 drops l⁻¹ of Tween 20, Sigma[®]), for 20 min, then rinsed four times with sterile dH₂O (Clarindo et al. 2008).

3.2 Calli induction

The leaves were cut into 1 cm² and cultured with the adaxial surface in contact with M1 medium (Table 1), for friable callus induction. The leaf segments were placed into Petri dishes (Prolab[®]) containing 15 ml medium. All cultures were incubated and maintained in the dark at a temperature of 25 ± 1°C. After four weeks of culture, half of the explants were transferred to medium M2, and the other half was placed in medium M3 (Table 1). After 8 weeks of culture at 25 ± 1°C in the dark, the number of responsive explants, showing calli, was determined.

Table 1 – Composition of tissue culture media: M1 – callus induction medium; M2 and M3 – callus proliferation medium.

Compound	M1	M2	M3
MS salts (Sigma [®])	4.3 g l ⁻¹	4.3 g l ⁻¹	4.3 g l ⁻¹
MS vitamins*	10 ml l ⁻¹	10 ml l ⁻¹	10 ml l ⁻¹
Kinetin (Kn, Vetec [®])	9.3 µM	2.3 µM	2.3 µM
2,4-D (Sigma [®])	—	—	1 µM
Indolebutyric acid (IBA, Vetec [®])	—	1 µM	—
Sucrose (Sigma [®])	30 g l ⁻¹	30 g l ⁻¹	30 g l ⁻¹
Phytigel (Sigma [®])	2.8 g l ⁻¹	2.8 g l ⁻¹	2.8 g l ⁻¹
pH	5.7	5.7	5.7

*Stock solution composed of 0.20 g l⁻¹ glycine (Vetec[®]), 0.05 g l⁻¹ nicotinic acid (Vetec[®]), 0.05 g l⁻¹ pyridoxine (Vetec[®]) and 0.01 g l⁻¹ thiamine (Vetec[®]).

3.3 Statistical analysis

The experiments were set up using a randomized design. The data were expressed as mean ± standard error (SE) and compared using *t* test, 5% probability level. Callogenesis efficiency was statistically analyzed using the statistical software Assistat 7.6 beta (Silva 2012). For each treatment (media M2 and M3) were used 14 Petri dishes, each containing five explants.

4. Results

Initial callus evidence was observed in the first month of culture in media M2 and M3, being M3 more effective in calli induction and proliferation (Fig. 1a, b).

No contamination was detected during callogenesis induction. Thus, the young leaves showed no endogenous contamination. Calli were found in the nervure and margin regions of the explants. After 60 day of culture, explants in medium M3 had greater number of calli than those cultured in medium M2 (Fig. 1c, d, Table 2).

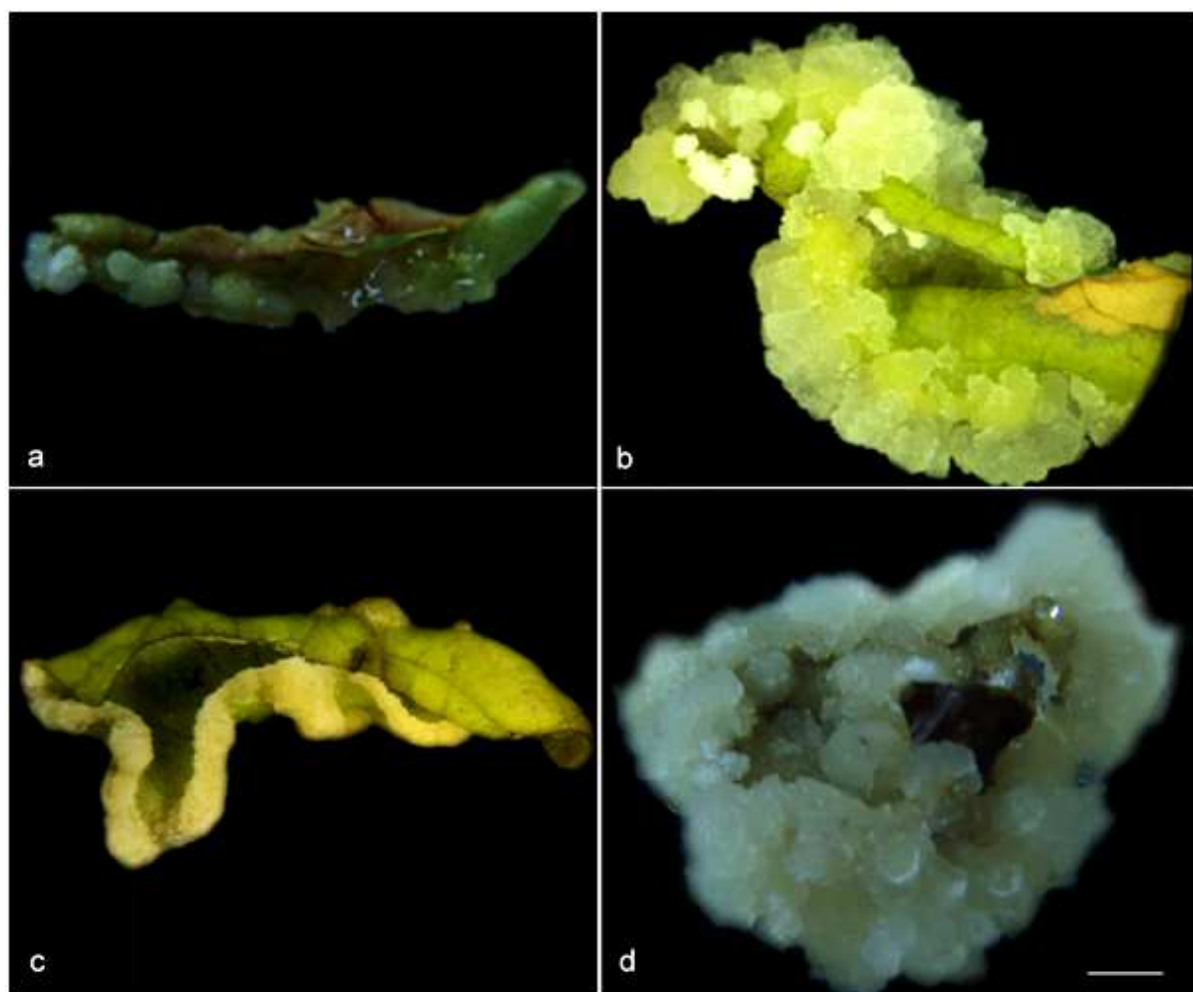


Figure 1. *J. curcas* leaf explants inoculated in: a) medium M2 supplemented with IBA/Kn, after 4 weeks of culture; b) medium M3 supplemented with 2,4-D/Kn, after 4 weeks of culture; c) medium M2, after 8 weeks of culture, displaying pale yellow calli; and d) medium M3, after 8 weeks of culture, exhibiting pale yellow, friable calli. Calli were observed in the nervure and margin regions of the explants. Bar = 0.5 cm.

Table 2 – Percentage of leaf explants showing callus in media M2 and M3.

Medium	Number of responsive explants (%)	Callus characteristics
M2	68.4 ^b	Friable, pale yellow
M3	100.0 ^a	Friable, pale yellow

Means followed by the same letter are not significantly different at $p \leq 0.05$ by *t*-test.

5. Discussion and conclusion

In this study, leaf explants were used for callus induction in *J. curcas*. For the same purpose, other explants have also been reported in this species, such as: epicotyls (Qin et al 2004; Kaewpoo and Te-chato 2010), hypocotyl (Sujatha and Mukta 1996; Soomro and Memon 2007; Kaewpoo and Te-chato 2010), immature zygotic embryos (Varshney and Johnson 2010; Cai et al. 2011) and endosperm (Cai et al. 2011). However, the use of leaf segments is considered more adequate when callus induction is required for clonal propagation of elite lines (Sujatha and Mukta 1996; Martin 2004; Soomro and Memon 2007; Jha et al. 2007; Clarindo et al. 2012).

As suggested by Jha et al. (2007), the medium M1 was adopted for initial callus induction from leaf explants. This medium was supplemented with Kn, a synthetic cytokinin (Ck). Other approaches performed for callogenesis induction in distinct wood species also reported culture of the leaf explants during one month in medium supplemented with only one Ck (van Boxtel and Berthouly 1996; Clarindo et al. 2012). In accordance with Jiménez (2005), Cks are important for callus formation, and Kn has been considered the second most frequently employed Ck for this purpose.

Friable and pale yellow calli were obtained in the media M2 and M3 (Fig. 1a – d), which were supplemented with IBA/Kn and 2,4-D/Kn, respectively. The calli were observed in the nervure and margin regions of the explants (Fig. 1a – d), suggesting that the callogenic competence is confined to these areas. Therefore, the tissue culture procedure combining the use of Cks and auxins (Varshney and Johnson 2010) was considered important for the callogenesis process in leaf explants of *J. curcas*.

According to Fehér et al. (2003) and Jiménez (2005), auxins and CKs are key factors for callogenic response, probably because these PGRs strongly participate in the reactivation, regulation and maintenance of cell division. As demonstrated here, cell proliferation enables the establishment of friable calli.

Medium M3 yielded 100% of responsive explants (Table 2), evidencing the effective action of 2,4-D in relation to IBA (68.4%). Evaluating the effect of different auxin types on leaf explants of *Valeriana jatamansi*, Das et al. (2012) found that 2,4-D provided a higher percentage of calli in comparison to IBA. As also observed by

Martin (2004) in leaves of *Centella asiatica*, friable calli of *J. curcas* showed relatively rapid growth (one month, Fig. 1b) in the medium supplemented with 2,4-D/Kn (M3). 2,4-D has been regarded as the most efficient synthetic auxin, being thus preferred to improve callus induction (Fehér et al. 2003; Jiménez 2005; Thomas and Chaturverdi 2008; Pinto et al. 2010; Clarindo et al. 2012). Ball et al. (1993) and Goralski et al. (2005) distinguished this auxin as an inductor of cell proliferation and callus formation, being more efficient in comparison to others auxins, especially natural ones. Fehér et al. (2003) highlighted that exogenous 2,4-D induces substantial accumulation of endogenous auxin, such as indole-3-acetic acid (IAA), promoting a high cell proliferation rate.

Though callogenic response was superior in medium M3, medium M2, supplemented with IBA/Kn, also supplied friable, pale yellow calli (Table 2). Varshney and Johnson (2010) evidenced that the combination IBA/Kn was appropriate for calli induction from immature zygotic embryo of *J. curcas*. However, these authors reported the occurrence of 28.6% responsive explants, differing in relation to the present study, in which 68.4% (Table 2) of the leaf explants exhibited calli.

Considering that callogenesis represents the basis for somatic embryogenesis, the present study established a fast growing callus protocol. In this context, the exogenous auxins, mainly 2,4-D, were effective for callus induction, promoting the proliferation of *J. curcas* cells.

6. Acknowledgements

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, DF, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES, Vitória, ES, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Belo Horizonte, MG, Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, DF, Brazil) for financial support.

7. References

Ball ST, Zhou H, Konzak CF (1993) Influence of 2,4-D, IAA, and duration of callus induction in anther cultures of spring wheat. Plant Sci90 195-200.

Berthouly M, Michaux-Ferrière NM (1996) High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Induction conditions and histological evolution. Plant Cell Tiss Org 44:169-176. doi:10.1007/BF00048196

Cai L, Fu L, Ji L (2011) Regeneration of *Jatropha curcas* through efficient somatic embryogenesis and suspension culture. GM Crops 2:110-117.

Clarindo WR, Carvalho CR, Araújo FS, Abreu IS, Otoni WC (2008) Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry. Plant Cell Tiss Org, 92:207-214. doi: 10.1007/s11240-007-9325-1

Clarindo WR, Carvalho CR, Mendonça MAC (2012) Cytogenetic and flow cytometry data expand knowledge of genome evolution in three *Coffea* species. Plant Syst Evol 298:835-844. doi: 10.1007/s00606-012-0595-7

Das J, Mao AA, Handique PJ (2012) Callus-mediated organogenesis and effect of growth regulators on production of different valepotriates in Indian valerian (*Valeriana jatamansi* Jones.). Acta Physiol Plant 1-9. doi:10.1007/s11738-012-1047-2

Deore AC, Johnson TS (2008) High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. Plant Biotechnol Rep 2:7-11. doi: 10.1007/s11816-008-0042-y

Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell Tiss Org 74:201-228. doi:10.1023/A:1024033216561

Goralski G, Popielarska M, Slesak H, Siwinska D, Batycka M (2005) Organogenesis in endosperm of *Actinidia deliciosa* cv. Hayward cultured *in vitro*. Acta Biol Crac Ser Bot 47:121-128.

Jain S, Sharma MP (2010) Prospects of biodiesel from *Jatropha* in India: A review. Renew Sust Energ Rev 14:763-771.

Jha TB, Mukherjee P, Datta MM (2007) Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotechnol Rep* 1:135-140. doi: 10.1007/s11816-007-0027-2.

Jiménez VM (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul* 47:91-110 doi: 10.1007/s10725-005-3478-x

Kaewpoo M, Te-chato, S (2010) Study on ploidy level of micropropagated *Jatropha curcas* L. via flow cytometry. *J Agr Technol* 6:391-400.

Kalimuthu K, Paulsamy S, Senthilkumar R, Sathya M (2007) *In vitro* Propagation of the Biodiesel Plant *Jatropha curcas* L. *Plant Tiss Cult. e Biotech*, 17:137-147.

Kumar N, Reddy MP (2012) Thidiazuron (TDZ) induced plant regeneration from cotyledonary petiole explants of elite genotypes of *Jatropha curcas*: a candidate biodiesel plant. *Ind Crop Prod* 39:62-68 doi: 10.1016/j.indcrop.2012.02.011

Kumar A, Sharma S (2008) An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. *Ind Crop Prod* 28:1-10.

Martin KP (2004) Plant regeneration through somatic embryogenesis in medicinally important *Centella asiatica* L. *In Vitro Cell Dev-Bi* 40:586-591. doi: 10.1079/IVP2004573

Michalczyk L, Cooke TJ, Cohen JD (1992) Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochemistry* 31:1097-103.

Mukherjee P, Varshney A, Johnson TS, Jha TB (2011) *Jatropha curcas*: a review on biotechnological status and challenges. *Plant Biotechnol Rep* 5:197-215. doi: 10.1007/s11816-011-0175-2

Pandey VC, Singh K, Singh JS, Kumar A, Singh B, Singh RP (2012) *Jatropha curcas*: A potential biofuel plant for sustainable environmental development. *Renew Sust Energ Rev*16:2870-2883. doi:10.1016/j.rser.2012.02.004

Pinto DLP, Barros BA, Viccini LF, Campos JMS, Silva ML, Otoni WC (2010) Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. *Plant Cell Tiss Org* 103:71-79. doi: 10.1007/s11240-010-9756-y

Qin W, Wei-Da L, Yi L, Shu-Lin P, Ying X, Lin T, Fang C (2004) Plant regeneration from epicotyl explant of *Jatropha curcas*. *J Plant Mol Biol*30:475-478.

Singh A, Reddy MP, Chikara J, Singh S (2010) A simple regeneration protocol from stem explants of *Jatropha curcas* - a biodiesel plant. *Ind Crop Prod* 31:209-213.

Soomro R, Memon RA (2007) Establishment of callus and suspension culture in *Jatropha curcas*. *Pak J Bot* 39:2431-2441.

Sujatha, M., Mukta, N (1996) Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tiss Org*44:135-141. doi: 10.1007/BF00048191

Thomas TD, Chaturvedi R (2008) Endosperm culture: a novel method for triploid plant production. *Plant Cell Tiss Org* 93:1-14. doi 10.1007/s11240-008-9336-6

van Boxtel J, Berthouly M (1996) High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. *Plant Cell Tiss Org* 44:4-17. doi:10.1007/bf00045907

Varshney A, Johnson TS (2010) Efficient plant regeneration from immature embryo cultures of *Jatropha curcas*, a biodiesel plant. *Plant Biotech Rep* 4:139–148. doi: 10.1007/s11816-010-0129-0

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pela primeira vez, é reportado um protocolo de indução de tetraploides para *J. curcas*, com base em três fatores: sobrevivência, números de tetraploides e mixoploides.

Chegou-se à conclusão de que a concentração necessária de colchicina para indução de plântulas tetraploides é de 0,5 mM a um pulso de 96 horas.

Análises de citometria de fluxo e citogenética permitiram a caracterização do acesso 'Gonçalo' doador de explante ($2n=2x=22$ cromossomos e $2C = 0,85$ pg).

O sistema de cultura de tecidos abordado no presente estudo permitiu a obtenção de quantidades suficientes de ápices caulinares para a poliploidização *in vitro* e verificação do nível de ploidia de DNA das plântulas regeneradas em meio isento de colchicina.

Os resultados de citometria de fluxo mostraram que o meio para proliferação dos ápices não ocasionou alterações no nível de ploidia do DNA das plântulas regeneradas quando comparados à planta controle (planta doadora de explante 'Gonçalo'). Dessa forma, o meio de cultura escolhido para a realização deste experimento é ideal, em virtude da manutenção da fidelidade genética, podendo inferir que as alterações de ploidia decorrem somente dos tratamentos com colchicina.

O protocolo de calogênese propiciou a multiplicação clonal e massal dos fragmentos foliares do campo, sendo a combinação 2,4-D/KN a mais responsiva. Uma vez concluído, o mesmo pode ser utilizado aos fragmentos foliares das plântulas provenientes dos tratamentos de poliploidização. Essa técnica apresenta inúmeras vantagens, incluindo o armazenamento dos materiais obtidos em um espaço reduzido, a contribuição para bancos de germoplasma para espécies de *J. curcas*, e consequentemente, a manutenção dos recursos genéticos disponibilizados no presente estudo.