



Cultura de tecidos em feijão caupi

Renata Priscila Almeida Silva¹; Emerson Lucio Gomes Silva²; José Arnaud da Silva Junior³; Cleiton de Paula Soares⁴; Anaíze Borges Henriques⁵; Jean Luiz Simões-Araújo⁶; Marcia Soares Vidal⁷; Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses⁸

Resumo

O Brasil é o terceiro produtor de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) no mundo, sendo a região nordeste do país responsável pela maior área e produção. Uma vez que o feijão-caupi é uma planta de grande valor para a agricultura sustentável no Brasil, varias técnicas de cultura de tecidos *in vitro* tem sido aplicadas, com o objetivo de desenvolver protocolos para facilitar os programas de melhoramento e biotecnológicos. A regeneração eficiente dos tecidos vegetais através de organogênese a partir de células feijão-caupi é um pré-requisito para a engenharia genética, que pode ser posteriormente aplicado na agricultura. A disponibilidade de protocolos eficientes de cultura de tecidos de plantas de feijão-caupi permite a obtenção de plantas geneticamente modificadas,

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, Brasil. re.priscilaalmeida@hotmail.com

²Bacharelando do curso de Agroecologia – Universidade Estadual da Paraíba, Lagoa Seca – PB, Brasil. emersonlucio16@hotmail.com

³Bacharel em Comunicação Social – Especialização em Marketing, Universidade Potiguar – RN, Brasil, josearnaudjr@gmail.com

⁴Doutor em Biotecnologia Vegetal – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, Brasil. cleitinho_depaula@yahoo.com

⁵Depto. de Botânica, Instituto de Biologia, Centro de Ciências da Saúde, -, UFRJ. Rio de Janeiro - RJ - Brasil - CEP: abh@biologia.ufrj.br

⁶Embrapa Agrobiologia, Engenheiro Agrônomo, PhD em Genética. Rodovia BR 465, km 7. Seropédica - RJ - Brasil - CEP: 23890-000. jean.araujo@embrapa.br

⁷Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, Bióloga, DSc. em Genética. Rodovia BR 465, km 7. Seropédica - RJ - Brasil - CEP: 23890-000. marcia.vidal@embrapa.br

⁸Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, Brasil, carlos@ccaa.uepb.edu.br



mais rapidamente, diminuindo assim o tempo para obter uma nova cultivar. Este documento descreve várias técnicas utilizadas para a cultura de tecidos feijão-caupi.

Abstract

Tissue culture in cowpea or Cowpea tissue culture

Brazil is the third producer of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) in the world, being the northeast region of the country responsible for the largest area and production. Since cowpea is a plant of great value for sustainable farming in Brazil, *in vitro* tissue culture has been applied, aiming to develop protocols to facilitate breeding and biotechnology. The efficient regeneration of plant tissues via organogenesis from cowpea cells is a prerequisite for genetic engineering, that may be subsequently applied in agriculture. The availability of efficient tissue culture protocols for cowpea plants allows us to obtain genetically modified plants more rapidly, thereby decreasing the time to get a new cultivar. This document describes several techniques used for cowpea tissue culture.

Introdução

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), cuja origem está ligada ao continente africano (RACHIE & RAWAL, 1976), foi introduzido no Brasil, nas regiões tropicais encontrando características edafoclimáticas distintas (quente/úmida na região Norte e quente/seca na região Nordeste) adequadas ao seu desenvolvimento (ARAÚJO *et al.*, 1988), no século XVII, pelos colonizadores portugueses e pelos escravos africanos, provavelmente na Bahia (FREIRE FILHO, 1988).

Constitui-se uma cultura de subsistência do pequeno agricultor, contribuindo com alimento rico em proteínas, semelhante ao feijão. Hoje é possível encontrar uma grande variabilidade de caracteres morfológicos, em função do seu cultivo há tanto tempo por pequenos agricultores (ARAÚJO *et al.*, 1988).

As técnicas de cultura *in vitro* são de fundamental importância, pois através destas é possível propagar de forma rápida espécies e/ou variedades de interesse e, ainda, podem servir como ferramenta auxiliar na eliminação de patógenos, obtendo



assim matrizes com qualidade genética e sanitária comprovada; no entanto, para o uso prático da micropropagação é necessário otimizar as condições de cultura para cada espécie e/ou variedade (ROGALSKI, GUERRA, SILVA, 2003).

A cultura de tecidos vegetais é, dentre os campos da biotecnologia, aquele que tem dado mais resultados práticos, em que se fundamenta no princípio da totipotência celular, ou seja, a capacidade de uma célula regenerar o fenótipo do organismo completo e diferenciado do qual ela é derivada.

Qualquer técnica de cultivo *in vitro* tem como fim primário, dirigir o crescimento e o desenvolvimento do explante manipulado em seu redor. Este controle se executa, basicamente, mediante a adição de substâncias de diversas naturezas, principalmente reguladores do crescimento, ao meio de cultivo ou, também, variando a concentração de determinados nutrientes ou através do controle das condições de iluminação e temperatura (CARVALHO; MOREIRA; VIEIRA, 1999).

A cultura de tecidos em caupi representa uma técnica de grande importância para esta planta, tendo-se em vista a necessidade para o melhoramento do caupi, onde se pode acelerar o processo de obtenção de novas cultivares e, se for o caso, incorporar outros genes, para o melhoramento genético.

A aplicação da engenharia genética para o melhoramento de caupi tem sido limitada por causa da sua natureza recalcitrante em manipulações *in vitro* e da conseqüente escassez de sistemas de regeneração aplicáveis aos genótipos comerciais de caupi (CHRISTOU, 1995). Alguns protocolos de regeneração de caupi vêm sendo desenvolvidos (PELLEGRINESCHI, 1997; BRAR *et al.*, 1999; CARVALHO *et al.*, 2000), no entanto, tais protocolos não podem, necessariamente, ser aplicados a outras cultivares da mesma espécie, pois o potencial regenerativo depende não apenas do tipo de explante ou da composição do meio, mas também do genótipo da cultivar (NABORS *et al.*, 1983).

Os estudos biotecnológicos em caupi visam o melhoramento destas plantas e o conseqüente aumento de sua produção através da tecnologia de inserção de genes. Para tanto, são necessários protocolos de regeneração *in vitro*, via embriogênese somática ou organogênese e de transformação genética do feijão caupi.



Algumas das técnicas de cultura de tecidos são: micropropagação ou propagação clonal, erradicação de patógenos, conservação de germoplasma *in vitro*, produção de sementes sintéticas ou artificiais, cultura de anteras ou micrósporos, cultura de embriões zigóticos e cultura de protoplastos. A seguir serão descritos alguns trabalhos realizados no âmbito de algumas técnicas de cultura de tecidos envolvendo o feijão caupi.

Micropropagação

De acordo com Santos (2003) denomina-se micropropagação o conjunto de técnicas de cultura de tecidos usadas para a multiplicação de plantas a partir de pequenos explantes. A propagação clonal permite a obtenção de um grande número de plantas num espaço físico e temporal pequeno, sendo estes indivíduos geneticamente idênticos à planta doadora dos explantes. Através da micropropagação a identidade genética do material propagado é mantida, não sendo introduzida variabilidade genética. Existem duas técnicas de micropropagação: por embriogênese somática e por organogênese.

No feijão caupi, a técnica de micropropagação pode ser empregada para conservação de germoplasma, multiplicação de novas cultivares e para produção de clones para sua avaliação contra doenças e pragas.

Embriogênese Somática

Sob condições *in vitro*, células presentes em explantes provenientes de diferentes tecidos e tratados com uma combinação de auxinas e citocininas ou, em outros casos, apenas por auxinas, podem passar por um processo de desdiferenciação e adquirir caráter embriogênico. Células embriogênicamente competentes são um excelente alvo para transformação genética, pois uma vez transformadas, elas podem ser induzidas a se diferenciar em embriões, permitindo então a obtenção de plantas transgênicas.

A capacidade de indução da desdiferenciação celular é uma das mais importantes características exploradas no cultivo *in vitro* das plantas e encontra-se associada às principais técnicas de melhoramento não convencional (FEHÉR *et al.*, 2002). Dentre as técnicas mais utilizadas, a seleção *in vitro* de mutantes induzidos ou



provenientes da variação somaclonal e a produção de transgênicos destacam-se no desenvolvimento de novas cultivares; contudo, para a utilização destas metodologias, faz-se necessário o prévio estabelecimento das condições necessárias para a regeneração de plantas via calos (principal tipo de explante utilizado para obtenção de variação somaclonal e de transgênicos).

Oliveira *et al.* (2005), trabalhando com a cultivar de feijão caupi IPA207 observaram o efeito dos hormônios 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) na formação de calos com potencial regenerativo para a cultura *in vitro*. Trabalhando com os seguintes tratamentos: meio MS controle sem adição de hormônio; meio MS com adição de 2,4-D na concentração de 1 mg.l^{-1} ; meio MS com adição de 2,4-D na concentração de 1 mg.l^{-1} e de BAP na concentração de $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$; e meio MS com adição de BAP na concentração de $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$, avaliaram o desenvolvimento e o aspecto dos calos formados a partir dos diferentes explantes (eixo embrionário e cotilédones) e meios de cultura. Do tratamento somente com meio MS sem hormônio obtiveram apenas 40% dos eixos embrionários com sinais de formação de pequenos calos em uma das extremidades do explante. Nos eixos embrionários restantes (60%) foi observada regeneração direta de ápices caulinares e/ou raízes, já os explantes dos cotilédones não apresentaram sinais de regeneração ou de formação de calos. No tratamento contendo meio MS com adição de 2,4-D na concentração de 1 mg.l^{-1} , foi observado a formação de calos em 100% dos eixos embrionários, entretanto, 20% dos explantes formaram pequenos calos em uma das extremidades, enquanto que nos 80% restante houve formação de calo em todo explante. Com relação aos explantes dos cotilédones no meio MS com 1 mg.l^{-1} de 2,4-D, observaram que apenas 20% dos cotilédones apresentaram algum sinal da formação de calos na extremidade em que o embrião estava ligado. Para o tratamento onde foram associados os dois hormônios observou a presença de calos em 100% dos eixos embrionários, porém apenas 25% dos cotilédones foram capazes de formar calo. No tratamento onde o meio foi apenas suplantado com BAP não observou a formação de calo em nenhum tipo de explante, apenas de regeneração direta de alguns.

Ramakrishnan *et al.* (2005) trabalhando no desenvolvimento de protocolos de embriogênese somática e também na determinação de concentrações ideais de alguns



agentes seletivos a serem utilizados nos experimentos de transformação genética do feijão caupi, encontraram calos embriogênicos e embriões somáticos em diversos estádios de desenvolvimento, entretanto não observaram conversão destes em plantas. Os autores observaram que em meio sólido, as folhas primárias produziram as melhores respostas na indução de calos embriogênicos. O meio que mais originou estruturas embrionárias nos estádios iniciais de desenvolvimento a partir de folhas primárias foi composto de meio MS completo suplementado com 3% de sacarose, 100 mg.l⁻¹ de L-glutamina, 100 mg.l⁻¹ de caseína hidrolisada, 0,7% de ágar, 0,5 mg.l⁻¹ de 2,4-D e pH 5,8. Já nas suspensões celulares, eixos embrionários de embriões zigóticos maduros foram os que mais originaram estruturas embrionárias. Nas devidas suspensões, os meios que mais originaram estruturas embrionárias em estádios avançados de desenvolvimento foram os meios compostos de sais e vitaminas MS suplementado com 3% de sacarose e contendo 0,5 mg.l⁻¹ de 2,4-D sozinho ou combinado com 0,1 mg.l⁻¹ de cinetina (Kin).

Oliveira et al., (2006), avaliando o potencial morfogenético *in vitro* de diferentes explantes de quatro cultivares de caupi, “João Paulo II”, “Epace 10”, “Pitiúba” e “Setentão”, através das respostas de explantes excisados diretamente de sementes (embriões zigóticos e cotilédones) ou a partir de hipocótilos de plântulas germinadas *in vitro*, cultivados em meios suplementados com diferentes reguladores de crescimento [2,4-D, TDZ (tidiazuron) e BAP], observaram que efeitos significativos, na formação de calos, para cultivar e tratamento, em explantes de hipocótilos, onde o meio MS suplantado com 9 µM de 2,4-D, a cultivar “João Paulo II” não diferiu significativamente das cultivares “Setentão” e “Epace 10”, diferindo apenas de “Pitiúba”. “Setentão” e “Epace 10” não diferiram significativamente da cultivar “Pitiúba”. No meio MS onde a suplementação foi feita com 20 µM de TDZ, “João Paulo II” e “Setentão” não diferiram entre si para médias de formação de calos, porém, o João Paulo II diferiu de “Epace 10” e “Pitiúba”. “Setentão” e “Epace 10” não diferiram entre si para formação de calos. “Pitiúba” diferenciou-se da cultivar João Paulo II nesse tratamento. Para as cultivares “João Paulo II” e “Setentão”, o efeito dos tratamentos com 2,4-D e TDZ não diferiu significativamente, porém, para as cultivares “Pitiúba” e “Epace 10”, o tratamento com 2,4-D diferiu significativamente do tratamento com TDZ. Os calos cultivados em meio com 2,4-D apresentaram uma coloração verde clara e textura compacta, aspecto



característico de calos embriogénicos. Os calos cultivados em meio com TDZ apresentaram calos com coloração verde escura e textura friável, característica essa que identifica calos não-embriogénicos segundo Oropeza *et al.* (2001). Já para explantes de cotilédones e embriões zigóticos apenas observaram resultados significativos para os meios MS suplantados com com 20 μM de TDZ, onde as cultivares de caupi, “João Paulo II”, “Pitiúba” e “Epace 10” não diferiram significativamente entre si para formação de brotos.

Trabalhos realizados por Odutayo *et al.* (2005) com indução de múltiplos brotos de embriões derivados de cultura de calos de feijão caupi, encontraram que o desenvolvimento de brotos únicos na maioria das culturas que continham 1 mM de BAP, depois de três semanas de incubação. O desenvolvimento de múltiplos brotos que variam de dois a quatro brotos na maioria das culturas (e aproximadamente cinco brotos em duas culturas) contendo uma concentração mais alta de BAP (4 mM) foi observado depois de três semanas de incubação, depois que o calo foi sub-cultivado. Os autores observaram o desenvolvimento de calos com aproximadamente sete dias de cultura.

Brar *et al.* (1997), desenvolveram um sistema de micropropagação para caupi, trabalhando com avaliações sobre a resposta de explantes de caupi a várias combinações de citocininas e auxinas, com a finalidade de identificar tratamentos que conduzam a múltiplo brotamento. Trabalhando com meio MS contendo BAP a 1,0; 2,5 ou 5,0 mg.l^{-1} (4,4; 11,1 ou 22,2 μM) ou 6-furfurilaminopurina (cinetina) a 1,0; 2,5 ou 5,0 mg.l^{-1} (4,6; 11,6 ou 23,2 μM) combinados com 2,4-D a 0,01; 0,1 ou 0,5 mg.l^{-1} (0,05; 0,5 ou 2,3 μM) ou ácido naftalenoacético (NAA) a 0,01; 0,1 ou 0,5 mg.l^{-1} (0,05; 0,5 ou 2,7 μM). Encontraram que, dependendo do tratamento hormonal, os explantes exibiram diferentes respostas, como: multiplicação dos brotos, alongamento dos brotos, calogênese e/ou rizogênese. O múltiplo brotamento foi obtido em médio de MS contendo BA ou cinetina combinado com NAA ou 2,4-D. O maior número de brotos foi produzido com 5 mg.l^{-1} de BAP (22,2 μM) combinado com 0,01 mg.l^{-1} de NAA (0,05 μM). O processo de calogênese aconteceu em todos os tratamentos, mas a rizogênese foi completamente inibida no conteúdo médio de BA.

Brar *et al.* (1999), motivados pela ausência de um sistema de regeneração eficiente para cultivares norte-americanas de caupi trabalharam em cima do



desenvolvimento de sistema de regeneração baseado em três etapas: 1) exposição inicial dos explantes cotiledonares a uma alta concentração de reguladores de crescimento tipo BAP (meio de iniciação); 2) transferência destes a uma concentração menor de BAP para regeneração do broto (meio de regeneração); e 3) enraizamento e estabelecimento da planta. Onde avaliaram o potencial de regeneração de 36 genótipos do germoplasma de caupi, o efeito da concentração de BAP, acrescentado ao meio inicial, sobre a regeneração, e a identificação de uma fase ótima para o tempo de regeneração. O meio de iniciação foi suplantado com 15 mg (66,6 μM) de BAP por placa (25 ml). O meio de iniciação (25 ml de meio por placa) conteve concentrações altas de BAP (15 a 35 mg.l^{-1} ; 66,6 a 155,3 μM). Depois de 5 a 15 dias, dependendo do experimento, os explantes foram transferidos para o meio de regeneração (25 ml de meio por placa) contendo 0 ou 1 mg.l^{-1} de BAP (4,4 μM). O meio para o alongamento e enraizamento não continha nenhum regulador de crescimento. Dentro de três dias depois de cultivados no meio de iniciação, os explantes cotiledonares se expandiram e freqüentemente apresentaram-se verdes. Em alguns casos, os cotilédones ficaram com uma coloração marrom, porem isso não foi um indicativo de inviabilidade. A Transferência dos cotilédones do meio de iniciação (alta concentração de BAP) para meio de regeneração (baixa concentração de BAP) estimulou formação de calos e a regeneração de brotos subseqüentemente. A regeneração dos brotos começou dentro de uma semana depois de transferência para o meio de regeneração e continuou até 3 semanas. Tendo em vista que o meio de regeneração contendo 1 mg.l^{-1} de BAP, apresentou melhores resultados esta concentração foi utilizada em experimentos subseqüentes.

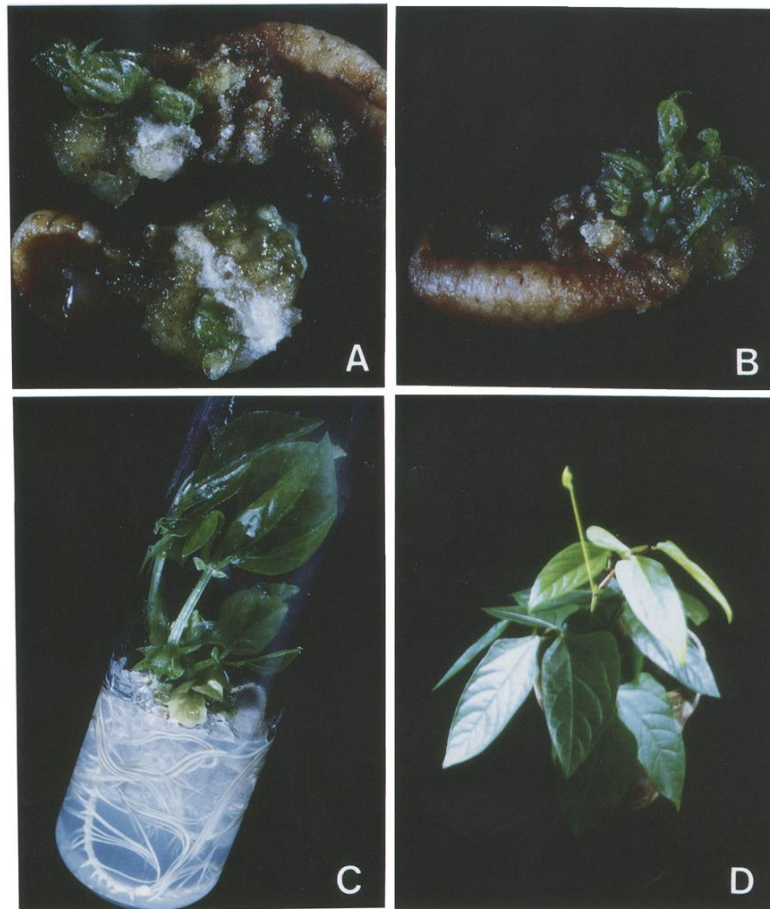


Figura 01. Regeneração *in vitro* em caupi. **A.** Formação de Calo associado à explantes cotiledonares depois de 14 dias em meio de regeneração. **B.** Agrupamentos de brotos regenerados de um explante cotiledonar de caupi, depois de 21 d em meio de regeneração. **C.** Broto depois da transferência para meio de enraizamento. **D.** Planta de caupi produzida *in vitro*. FONTE: Brar *et al.* (1999)

Brar *et al.* (1999), também revelaram uma correlação entre o protocolo utilizado e os 36 genótipos estudados, encontrando uma variabilidade, com respeito a regeneração *in vitro*, entre os genótipo de caupi testado. Dos 36 genótipos avaliados para potencial de regeneração, só 17 genótipos (47%) responderam favoravelmente. Ainda os mesmos autores ressaltam que investigaram também a relação entre concentração de BAP e período de iniciação, onde encontraram que, a regeneração de ambos dos genótipos foi inibida com o aumento da concentração de BAP e da duração da fase de iniciação. Porém em contraste com a porcentagem de regeneração onde concentração de BAP e a duração de fase de iniciação tiveram efeitos significantes, o número de brotos produzidos foi influenciado significativamente só pela concentração



de BAP. Depois de duas semanas, 85% dos brotos produziram raízes. Em terra, 100% das plantas sobreviveram sem aberrações de fenotípicas, cresceram e amadureceram produzindo sementes viáveis.

Pellegrineschi *et al.* (1997a), trabalharam no desenvolvimento de um meio basal que atendesse as exigências para o desenvolvimento normal de embriões imaturos de caupi. O estudo utilizou embriões em diferentes fases de desenvolvimento (4, 8, 10 e 18 dias depois da polinização). Também foram avaliados os efeitos da inclusão de diferentes fontes de nutrientes (ex. nitrogênio e carboidratos), ação de fitormônios e vitaminas no meio de cultura utilizada no desenvolvimento do embrião, onde os autores desejavam determinar a composição que mais favorável para recuperação da planta. Os autores utilizaram as combinações de reguladores de crescimento apresentadas na tabela 1.

Tabela 01. Equilíbrio dos reguladores de crescimento usados. FONTE: Pellegrineschi *et al.* (1997)

Tratamentos	Citocininas (mg.l ⁻¹)			Auxinas (mg.l ⁻¹)	
	Zeatina	Cinetina	BAP	IAA	NAA
Níveis	1,0; 0,5 e 0,1	-	-	-	-
Níveis e combinações	1,0; 0,5 e 0,1	1,0; 0,5 e 0,1	-	-	-
Níveis e combinações	1,0; 0,5 e 0,1	1,0; 0,5 e 0,1	1,0; 0,5 e 0,1	-	-
Níveis	-	1,0; 0,5 e 0,1	-	-	-
Níveis e combinações	-	1,0; 0,5, 0,1	1, 0,5, 0,1	-	-
Níveis e combinações	1,0; 0,5 e 0,1	-	1,0; 0,5 e 0,1	-	-
Níveis	-	-	1,0; 0,5 e 0,1	-	-
Níveis	-	-	-	1,0; 0,5 e 0,1	-
Níveis e combinações	-	-	-	1,0; 0,5 e 0,1	1,0; 0,5 e 0,1
Níveis	-	-	-	-	1,0; 0,5 e 0,1



Pellegrineschi *et al.* (1997a), observaram que ocorreu um aumento de nitrogênio orgânico no meio de cultura onde foi adicionado caseína hidrolisada, onde isso produziu efeitos positivos e aumentou a porcentagem final da recuperação de plantas. Entre os açúcares testados, sacarose foi o mais favorável para crescimento do embrião. Com a adição de frutose ou glicose ao meio, a frequência de embriões desenvolvidos e a recuperação das plantas foi reduzida. Os embriões crescidos em meio com a presença contínua de auxinas produziram calos abundantes. O outro tratamento em que se usa citocininas ocorreu um aumento na frequência de resposta do embrião. Há baixas concentrações de citocininas, os embriões começaram a produzir raízes, mas a parte apical não se desenvolveu. Concentrações altas de citocininas melhoraram o crescimento do embrião, porém aos 12 dias depois de polinização, as plantas começaram a perder as folhas e mostraram crescimento aberrante. Depois de 20 dias, as plantas se degeneraram ou morreram. O tempo de exposição aos reguladores de crescimento também contribuiu bastante para a significância dos resultados, onde os melhores resultados foram obtidos nos embriões expostos por mais tempo aos tratamentos. Embriões expostos à mistura dos três tipos de citocininas na concentração mais alta obtiveram os melhores resultados. A exposição dos embriões de 8 e 10 dias depois da polinização, para a mistura de citocininas produziram múltiplo brotamento. Nos tratamentos em que se utilizou diferentes tipos de vitaminas, os embriões 4 dias tiveram a melhor resposta com o tratamento, produzindo a maior taxa de plantas desenvolvidas, e subsequente recuperação. Com a mistura de vitamina B5, o embrião também respondeu com o desenvolvendo de algumas plantinhas, mas a taxa de recuperação decresceu. Em embriões mais velhos que 12 dias, o efeito das vitaminas sobre o crescimento foi menos evidente.

Organogênese

Pellegrineschi (1997b) trabalhando com experimentos de organogênese em feijão caupi, avaliou o efeito do meio basal desenvolvido por Pellegrineschi *et al.* (1997a), agora suplantando com diferentes tipos de vitaminas, isso levando a formulação de um meio basal fortalecido (FBM), contendo meio basal com 3% sacarose, mistura de vitaminas do meio MS e 0,05% de caseína hidrolisada. O FBM foi



usado para avaliação dos tratamentos hormonais. Onde foram testadas duas auxinas (IAA e NAA) e três citocininas (zeatina, cinetina e BAP). Estes foram avaliados em várias combinações. Também foram examinados os efeitos da adição de duas combinações que possuem um papel central na divisão celular e morfogenia da planta (timina e putrescina). A timina adicional foi suplantada em todos os tratamentos hormonais a uma concentração de 160 mg.l^{-1} . Semelhantemente, a putrescina foi suplantada a um numero maior de concentrações (0, 80, 160 e 360 mg.l^{-1}). Os vários tratamentos hormonais com e sem combinações adicionais promoveu a avaliação do potencial deles para induzir organogênese. Foram avaliadas três exposições a estes tratamentos: (1) exposição contínua (CE); (2) exposição de choque (SE) e (3) exposição escalonada (SWE), ou seja, uma exposição a uma concentração alta seguida por uma exposição a concentrações mais baixas. A partir dos resultados obtidos, foi identificado um protocolo para regeneração de plantas de caupi com uma porcentagem alta de recuperação o que possibilitou a transformação genética do caupi. O autor alcançou a regeneração de brotos por organogênese em caupi a partir de explantes de cotilédones e hipocótilos axênicos, oriundos de linhagens avançadas e variedades do programa de melhoramento do caupi.

O protocolo desenvolvido exibiu os seguintes efeitos em caupi: Entre os açúcares testados, sacarose foi o mais favorável para crescimento do broto, produzindo as taxas mais altas de produção de brotos em todas as variedades estudadas. Na presença de frutose, o crescimento de tecido foi mais baixo que sacarose e nenhuma regeneração do broto ocorreu. A glicose induziu uma resposta semelhante a frutose, produzindo uma quantidade menor de calos sem qualquer diferenciação em brotos. O FBM foi importante na indução da resposta morfogenética em hipocótilos e cotilédones para regeneração do germoplasma. A indução da formação de brotos somáticos só foi possível com meio basal em cotilédones. Os hipocótilos não reagiram ou reagirão esporadicamente. A adição de putrescina aumentou a porcentagem de regeneração em explantes (cotilédones e hipocótilos), mas não promoveu nenhuma diferenciação do broto. A timina induziu um efeito comparável a zeatina.

As citocininas aumentaram a frequência de resposta dos explantes a todos os três tratamentos de exposição (CE, SE e SWE). A cinetina induziu a formação de calo

friáveis, mas sem indução de qualquer diferenciação da planta na exposição CE. Em hipocótilos com exposição SE e SWE, a formação de brotos foi obtida com uma concentração de $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP. Em nível mais alto deste hormônio (1 mg.l^{-1} ou mais) foi tóxico e também foram inibidos o desenvolvimento e o alongamento quando o BAP foi usado sem putrescina. Porém, com 160 mg.l^{-1} de putrescina, o hipocótilo e os explantes cotiledonares reagiram bem, produzindo brotos adventícios em uma taxa mais alta. A adição de zeatina no tratamento CE promoveu a formação de brotos adventícios em hipocótilos. Os brotos somáticos transferidos para mesma concentração de BAP e cinetina depois de 10 dias mostraram uma taxa de crescimento ligeiramente reduzida, enquanto produziu plantas aberrantes com uma baixa taxa de recuperação. Com adição de caseína hidrolisada, os hipocótilos reagiram positivamente mostrando uma taxa alta de crescimento e recuperação de plantas. Os cotilédones tiveram a melhor reação morfogênica ao tratamento SWE.

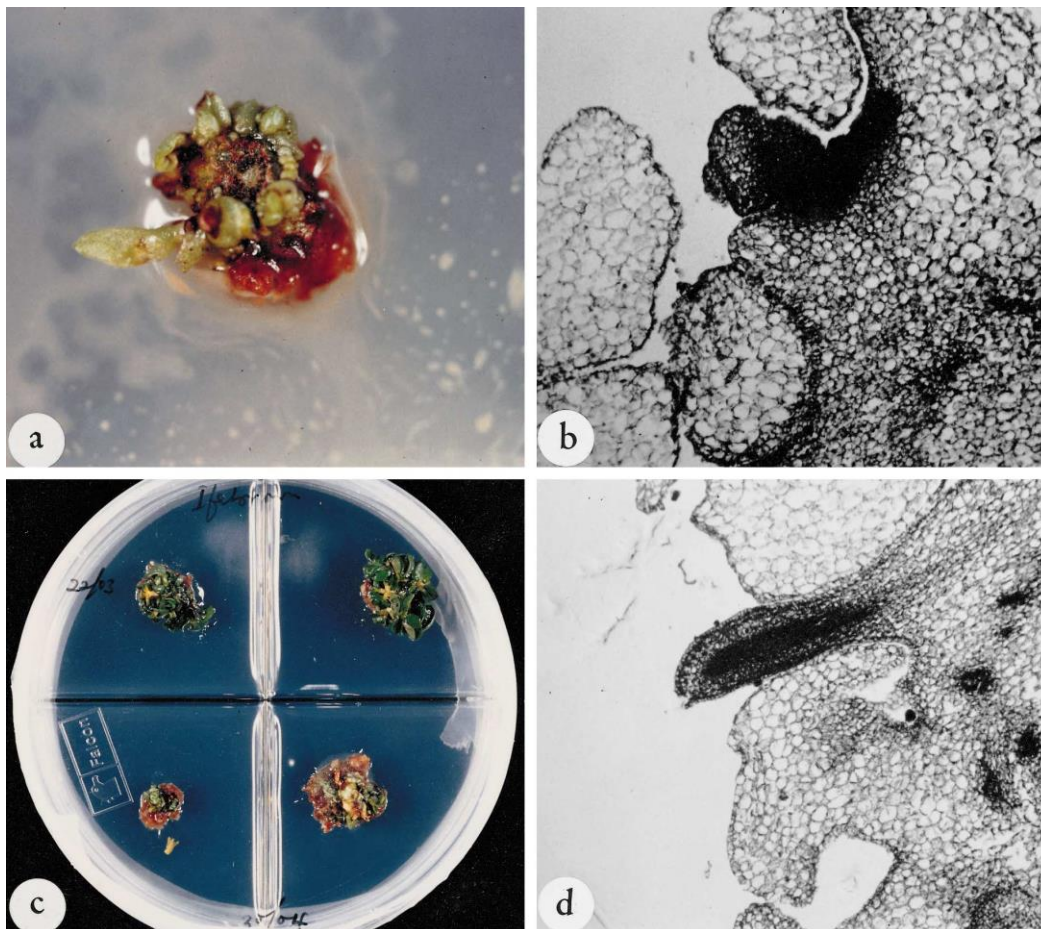




Figura 02. Processo de indução de brotos somáticos. **a.** embrião decapitado, em meio de indução de brotos. **b.** secção transversal de um explante de hipocótilo cultivado em meio de regeneração. Divisões de células foram muito aparentes nas regiões sub-epidermais e corticais. **c.** desenvolvimento do broto somático depois de 45 dias de cultivo. **d.** Secção de explante cotiledonar depois de 20 dias em meio de regeneração. FONTE: Pellegrineschi (1997b)

Os hipocótilos e explantes cotiledonares quando examinados por microscopia óptica não tiveram nenhuma célula meristemática pré-existente para CE. Porém, depois de um período de indução (SE e SWE para hipocótilo e SWE para cotilédone) se pode observar agrupamentos de células se dividindo ativamente. Em explantes de hipocótilo, estes agrupamentos estavam presentes na região sub-epidermal. Em cotilédones, eles estavam espalhados ao redor do corte.

Conclusões

Mediante a apresentação de vários sistemas de regeneração para feijão caupi, observa-se que estudos nesta linha de pesquisa já foram bem explorados. Porém, a eficiência de regeneração e concentração ótima de reguladores vegetais de crescimento é genótipo dependente e, por isso, se torna necessário o desenvolvimento de uma metodologia para o número de cultivares comercialmente utilizada no Brasil e no mundo.

Repetições destes experimentos devem ser realizadas a fim de confirmar os resultados obtidos, para outras cultivares existentes. Entretanto, algumas observações podem sugerir algumas mudanças a serem efetuadas a fim de melhorar o procedimento de cultivo *in vitro* da cultura do caupi.

Referencias Bibliográficas

ARAÚJO, L.P.; WATT, E.E. **O Caupi no Brasil.** Brasília: IITA/EMBRAPA. p.722, 1988.

BRAR, M.S.; AL-KHAYARI, J.M; ANDERSON, E.J. Genotypic response of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) to *in vitro* regeneration from cotyledon explants. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v.35, n.1, p.8-12, 1999.



BRAR, M.S.; AL-KHAYARI, J.M.; SHAMBLIN, C.E.; McNEW, R.W.; MORELOCK, T.E.; ANDERSON, E. J. *In vitro* shoot tip multiplication of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. ***In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***. v.33, p.114-118, 1997.

CARVALHO, J.M.F.C., MOREIRA, J.A.N., VIEIRA, R.M. Cultivo *in vitro* do algodão. In: BELTRÃO, N.E.M. **O agronegócio do algodão no Brasil**. v. 1, Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. p.405- 418, 1999.

CARVALHO, M.H.C.; LE, B.V.; ZUILY-FODIL, Y.; THI, A.T.P.; VAN, K.T.V. Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. ***Plant Science***. v.159, p.223-232, 2000.

CHRISTOU, P. Strategies for variety independent genetic transformation import cereals, legumes and wood species utilizing particle bombardment. ***Euphytica***. v.85, p.13-27, 1995.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; DUDITS, D. Activation of embryogenic cell division in leaf protoplastderived alfalfa cells: the role of auxin and stress. ***Acta Biologica Szegediensis***, v. 46, p.13-14, 2002. <http://www.sci.u-szeged.hu/ABS>.

FREIRE FILHO, F.R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: ARAÚJO, J.P.P. de; WATT, E.E., org. **O caupi no Brasil**. Brasília, EMBRAPA/IITA. p.27-46, 1988.

NABORS, M.W., HEYSER, J.W., DYKES, T.A.; MOTT, K.J. Long duration, high frequency plant regeneration from cereal tissue culture. ***Planta***. v.157, p.385-391, 1983.

ODUTAYO, O.I.; AKINRIMISI, F.B.; OGUNBOSOYE, I; OSO, R.T. Multiple shoot induction from embryo derived callus cultures of cowpea (*Vigna unguiculata* l.) Walp. ***African Journal of Biotechnology***. v.4, n.11, p.1214-1216, 2005.

OLIVEIRA, A.L.; HOULLOU-KIDO L.M.; KIDO E.A.; BENKO-ISEPPON A.M. Efeito de BAP e 2,4 – D na formação de calos em diferentes explantes de feijão caupi. ISSN 1678-8818 Versão Eletrônica. Jan/2005.

OLIVEIRA, V.P.; BENBADIS, A.K.; CARVALHO, A.C.P.P. de. Avaliação da regeneração *in vitro* de explantes de caupi e soja. ***Revista Ciência Agronômica***, v.37, n.2, p.153-159, 2006.

OROPEZA, M.; MARCANO, A.K.; GARCÍA, E. Proteins related with embryogenic potential in callus and cell suspensions of sugarcane (*Saccharum* sp.). ***In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, v.37, p.211-216, 2001.

PELLEGRINESCHI, A.; FATOKUN, C.A.; THOTTAPPILLY, G.; ADEPOJU, A.A. Cowpea embryo rescue.1. Influence of culture media composition on plant recovery from isolated immature embryos. ***Plant Cell Reports***. v.17, p.133-138, 1997a.



PELLEGRINESCHI, A. *In vitro* plant regeneration via organogenesis of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Plant Cell Reports**. v.17, n.2. p.89-95, 1997b.

RACHIE, K.; RAWAL, K.M. Integrated approaches to improving cowpeas, *Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Ibadan: IITA, (**Technical Bulletin, 5**). p.36, 1976.

RAMAKRISHNAN, K.; GNANAM, R.; SIVAKUMAR, P.; MANICKAM, A. *In vitro* somatic embryogenesis from cell suspension cultures of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. **Plant Cell Reports**. v.24, p.449-461, 2005.

ROGALSKI, M., GUERRA , M.P., SILVA, A.L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira 'santa rosa': efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v.25, n.2, p.365-367, 2003.

SANTOS, E.K. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B., BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. 1ª edição, Porto Alegre: Editora da UFRGS, p.415-426, 2003.