

Efeito dos Fitorreguladores BAP e 2,4 – D Sobre a Indução de Calos em *Vigna unguiculata*

Andrea Lima de Oliveira¹, Éderson Akio Kido², Ana Maria Benko-Iseppon³, Laureen Michelle H. Kido⁴

Introdução

As leguminosas constituem uma cultura de grande valor econômico e social [1], destacando-se, principalmente, pelo seu valor nutritivo (alto teor de proteínas em sua constituição). Das várias espécies pertencentes a família das leguminosas, destaca-se o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], o qual é cultivado principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. O feijão-caupi é capaz de se adaptar bem a praticamente todos os tipos de solos. Algumas cultivares conseguem se desenvolver em condições de estresse biótico, outras possuem características agrônomicas importantes como: ciclo curto e rusticidade [2]. Porém, pouco se sabe sobre o potencial regenerativo desta espécie quando cultivada *in vitro*. O estabelecimento de um protocolo adequado à indução de calos com potencial regenerativo pode auxiliar a adoção futura de técnicas de melhoramento não convencional (ex. transgenia). Apesar de *V. unguiculata* ser considerada recalcitrante, estudos preliminares a este trabalho, revelaram um alto potencial regenerativo na cultivar IPA201. Este trabalho visou avaliar o efeito dos fitorreguladores BAP e 2,4-D na indução de calos com características regenerativas, utilizando-se cotilédones e eixo embrionário como explantes iniciais.

Material e Métodos

Para a realização deste experimento foram selecionadas 40 sementes da cv IPA201, as quais passaram pelo seguinte processo de desinfestação: lavagem em água destilada três vezes por 15 minutos; imersão em solução de álcool a 70% durante um minuto, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 10% por 20 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas duas vezes em água estéril e colocadas numa solução de água estéril com cefalexina 2,5 mg/ml, permanecendo nesta solução durante 24 horas. Após o ciclo de desinfestação ser completado, o tegumento das sementes foi retirado e o eixo embrionário foi separado dos cotilédones. Os explantes, então, foram inoculados em 40 frascos contendo meio MS [3] suplementado com sacarose (30 g.L⁻¹) e Agar (6 g.L⁻¹) e diferentes combinações de fitorreguladores (0,2

mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D).

Em cada frasco foram inoculados dois cotilédones e um eixo embrionário. Este experimento foi montado com quatro tratamentos contendo 10 frascos cada: tratamento I – meio controle, sem adição de hormônio; tratamento II (adição de 2,4-D); tratamento III (adição de 2,4-D e BAP); tratamento IV (adição de BAP). Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h e temperatura controlada (26 ± 2° C), sendo feita a troca de meio a cada 15 dias.

A partir da quarta troca, a concentração dos hormônios foi quadruplicada, ou seja, a concentração passou a ser 0,8 mg.L⁻¹ de BAP e 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Foram testados as seguintes combinações: tratamento V (adição de 2,4-D), tratamento VI (adição de 2,4-D e BAP), tratamento VII (adição de BAP). Durante o cultivo foram avaliados o desenvolvimento, o aspecto e a coloração dos calos formados a partir dos explantes utilizados.

Resultados

A. Efeito de BAP 0,2 mg. L⁻¹ e 2,4 – D 1 mg. L⁻¹

Os efeitos de BAP e 2,4 – D foram observados tanto associados quanto isolados (Tab. 1). No tratamento I (sem hormônio), observou-se que 100% dos cotilédones não apresentaram formação de calos nem iniciaram o processo de regeneração. Sob as mesmas condições, 50% dos eixos embrionários apresentaram regeneração direta (Fig. 1A) e em 10% observou-se o início de formação de calo. No tratamento II, em relação aos eixos embrionários, evidenciou-se um percentual de 70% para formação de calos, os quais mostraram variações de cor (de ocre a verde), tamanho e aspecto (translúcido, aveludado, alongado e arredondado). Em relação aos cotilédones, evidenciou-se a oxidação em todos os explantes. Já no tratamento III, o qual apresentou uma combinação de 2,4-D e BAP, pôde-se observar que enquanto as concentrações iniciais dos hormônios eram mantidas (2,4-D 1 mg.L⁻¹ e BAP 0,2 mg.L⁻¹) não se formavam calos nos cotilédones. Em 100% dos eixos embrionários ocorreu calogênese. Neste tratamento também foram encontrados calos de coloração, aspecto e tamanho diferenciado. No tratamento IV não houve formação de calos em nenhum dos explantes testados. Com relação aos eixos embrionários verificou-se, inicialmente, que 50% desse tecido havia oxidado e os outros 50% haviam iniciado o processo de regeneração.

1-Estagiária do Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco. Recife – PE. CEP:50670-901, E-mail: alimadeoliveira@yahoo.com.br

2 – Professor Responsável pelo Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco. Recife – PE. CEP:50670-901, E-mail: ederson.kido@gmail.com

3- Professor Responsável pelo Laboratório de Genética Vegetal do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco. Recife – PE. CEP:50670-901, E-mail: celisep@hotmail.com.br

4- Pesquisadora do Laboratório de Genômica e Cultura de Tecidos e Biologia Molecular, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária. Recife – PE. CEP:50670-000, E-mail: laureenkido@ipa.com

B. Efeito de BAP 0,8 mg. L⁻¹ e 2,4-D 4 mg. L⁻¹

No tratamento V (meio com 2,4-D), verificou-se que apenas 20% dos cotilédones deram início a formação de calos, nas extremidades de onde o eixo embrionário foi removido, após a concentração de 2,4-D ter sido quadruplicada. Notou-se neste tratamento que os calos, surgidos de eixos embrionários, aumentaram rapidamente de tamanho a partir do aumento da concentração hormonal (Fig. 1B). Apenas no tratamento VI, com o aumento das concentrações de BAP e 2,4-D (0,8 mg.L⁻¹ e 4 mg.L⁻¹, respectivamente) percebeu-se que em 50% dos cotilédones havia formação de calos nas extremidades onde havia resíduos de tecido embrionário. Foi observado que os calos formados dos eixos embrionários cresceram mais rapidamente nesta nova concentração hormonal (Fig. 1C). No tratamento VI (meio com BAP) percebeu-se que em 70% dos cotilédones houve formação de calos nas extremidades que apresentavam tecido embrionário residual, após elevação da concentração de BAP (de 0,2 mg.L⁻¹ para 0,8 mg.L⁻¹). Foi observado que, em 70% dos eixos embrionários iniciou-se a formação de calos sob esta nova concentração (Fig. 1D); isso ocorreu com todos os explantes oxidados e em 20% dos que estavam em processo de regeneração.

Discussão

Os resultados obtidos indicaram que o BAP na concentração de 0,2 mg.L⁻¹ só é eficiente na indução de calos quando associado ao 2,4-D. Resultado similar foi descrito por Brar et al [4], que conseguiram induzir a formação de calos em ápices caulinares de *V. unguiculata* cultivados na presença do 2,4-D, combinado ou não com outros fitorreguladores (BA, TDZ e KIN).

Porém, nossos resultados indicaram que quando a concentração de BAP é elevada a 0,8 mg.L⁻¹ houve uma eficiente indução de calos mesmo em explantes cultivados em meio desprovido de 2,4-D. Estes resultados indicam que o BAP sozinho, a 0,8 mg.L⁻¹, também é capaz de induzir calos de forma similar ao 2,4-D. Não foram encontrados na literatura resultados similares para espécies pertencentes ao gênero *Vigna*. Por outro lado, independente do tipo de explante de *V. unguiculata* testado, o 2,4-D foi o fitorregulador mais eficiente na indução de multiplicação de células indiferenciadas.

Foi observado neste experimento que, em uma baixa concentração hormonal, os eixos embrionários são o melhor tipo de explante para a formação de calos. Por outro lado, utilizando-se uma concentração

mais elevada dos fitorreguladores, os cotilédones se mostram um tecido bastante favorável ao desenvolvimento de calos.

Como o ponto de formação dos calos correspondeu exatamente a região em que o embrião foi retirado do cotilédone, é possível que resquícios de tecido embrionário sejam a origem dos calos. Cotilédones de *V. sinensis* também se mostraram ser o melhor explante para indução de calos a partir de protoplasto [5].

Os trabalhos descritos em literatura explorando a indução de calos em espécies do gênero *Vigna* [6,7,8] utilizam de folhas jovens e de cotilédones para indução de calos. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que os eixos embrionários são também explantes viáveis para indução de calos com características organogênicas.

Agradecimentos

Ao IPA – Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – pelo fornecimento da cv IPA201, a Dra. Laureen Michelle H. Kido pelas orientações, e ao Dr. Éderson Akio Kido, responsável pelo laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética da UFPE. FACEPE, CNPq, BNB, MCT, FINEP.

Referências

- [1] SIMON, M.V. 2002. *Caracterização Genética de Acessos de Vigna Savi (Fabaceae) com Marcadores de DNA*. 65f. Tese (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- [2] EMBRAPA MEIO-NORTE: *Sistemas de Produção*, 2 ISSN 1678-8818. 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/importancia.htm>
- [3] MURASHIGE T.; SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15(4):473-497.
- [4] BRAR M. S.; AL-KHAYRI J. M.; SHAMBLIN C. E.; MCNEW R. W.; MORELOCK T. E. ; ANDERSON E. J. 1997. In vitro shoot tip multiplication of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *In vitro cellular & Developmental Biology Plant*, 33(2):114-118.
- [5] XUE-BAO LI, ZHI-HONG XU & ZHI-MING WEI. 1995. Plant regeneration from protoplasts of immature *Vigna sinensis* cotyledons via somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 5: 282-286.
- [6] EAPEN S. & GEORGE L. 1990. Ontogeny of Somatic Embryos of *Vigna aconitifolia*, *Vigna mungo* and *Vigna radiata*. *Ann Bot.* 66:219-226.
- [7] KAVIRAJ, C. P.; KIRAN, G.; VENUGOPAL, R. B.; KISHOR, P. B. KAVI; RAO, SRINATH. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledonary explants of green gram [*Vigna radiata* (L.) Wilezek] – A recalcitrant grain legume. *In Vitro Cellular & Development Biology Plant*, 42:134-138.
- [8] KUMAR, A. S.; GAMBORG, O. L. & NABORS, M. W. 1988. Plant regeneration from cell suspension cultures of *Vigna aconitifolia*. *Plant Cell Reports*, 7:138-141.

Tabela 1. Respostas dos cotilédones e eixos embrionários de *V. unguiculata* aos tratamentos com diferentes fitorreguladores antes e depois da concentração do meio ser alterada.

| Tratamentos | Cotilédones | Eixo embrionário |
|--|----------------------------------|--|
| I. Sem hormônio | ----- | ----- |
| II. 2,4 - D 1 mg.L ⁻¹ | Não formou calo | Formou calo em 70% dos explantes. |
| III. 2,4 - D 1 mg.L ⁻¹ + BAP 0,2 mg.L ⁻¹ | Não formou calo | Formou calo em 100% dos explantes. |
| IV. BAP 0,2 mg.L ⁻¹ | Não formou calo | Não formou calo. |
| V. 2,4 - D 4 mg.L ⁻¹ | Formou calo em 20% dos explantes | Os calos existentes aumentaram de volume num menor intervalo de tempo. |
| VI. 2,4 - D 4 mg.L ⁻¹ + BAP 0,8 mg.L ⁻¹ | Formou calo em 50% dos explantes | Os calos existentes aumentaram de volume num menor intervalo de tempo. |
| VII. BAP 0,8 mg.L ⁻¹ | Formou calo em 70% dos explantes | Formou calo em 70% dos Explantes. |

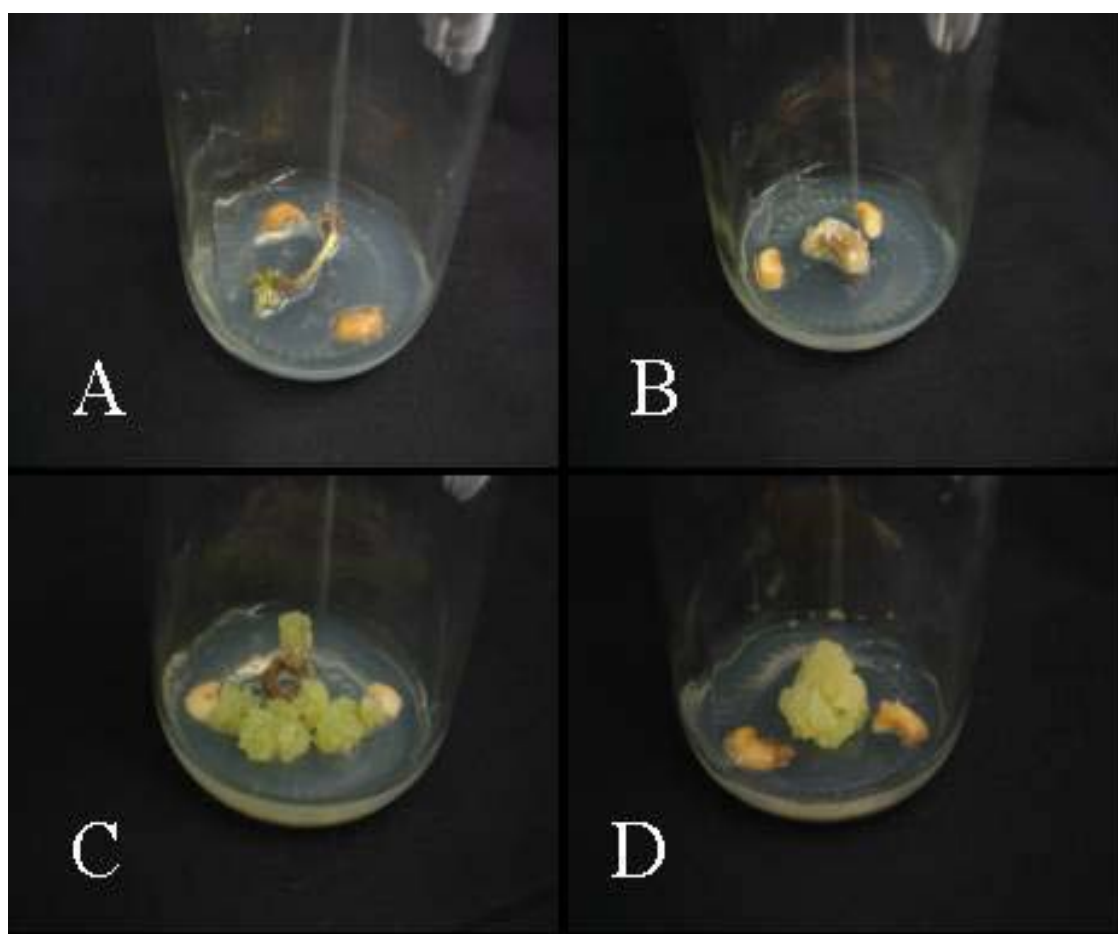


Figura 1 Diferentes respostas aos fitorreguladores 2,4 - D e BAP após elevação da concentração hormonal em *Vigna unguiculata*. **A:** Tratamento I (sem hormônio). **B:** Tratamento V (2,4 - D). **C:** Tratamento VI (2,4 - D e BAP). **D:** Tratamento VII (BAP).