

Análise do Potencial Regenerativo *in vitro* de Diferentes Cultivares de Feijão-Caupi

Hayana Azevedo¹; Laureen Houllou-Kido² e Ana Maria Benko-Iseppon³

Introdução

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa de alto conteúdo protéico, sendo bem adaptada às condições brasileiras de clima e de solo [1]. Dentre as várias espécies pertencentes a esta família, o feijão-caupi se destaca nas regiões semi-áridas do Nordeste Brasileiro, onde o feijão comum não cresce adequadamente. O feijão-caupi representa 73% de todos os tipos de feijão consumidos nesta região e em torno de 10% do valor total da produção agrônômica [2].

Apesar das vantagens já apresentadas pelo feijão-caupi em relação ao feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), o mesmo mostra-se altamente susceptível a pragas (especialmente viroses), tornando a cultura pouco viável devido às perdas, especialmente na estação chuvosa.

Entre as grandes dificuldades na administração de ensaios *in vitro* com *Vigna*, destaca-se a contaminação endógena por fungos e bactérias e a capacidade de regeneração, pelo fato de serem sementes recalcitrantes. Contudo, estudos anteriores mostraram que apesar da característica de recalcitrância comum aos feijões, algumas cultivares respondem positivamente a experimentos de análise de potencial regenerativo sob condições de cultura de tecidos *in vitro*. Tais resultados demonstram a necessidade de estudos avaliando as condições ideais de regeneração das cultivares mais importantes agrônômica e economicamente.

O estabelecimento de condições apropriadas para o cultivo *in vitro* de espécies pertencentes ao gênero *Vigna* pode possibilitar a utilização da transformação genética como ferramenta auxiliar ao melhoramento desta cultura [3].

O presente trabalho teve como objetivo comparar a capacidade de regeneração de diferentes cultivares de *Vigna unguiculata* e tipos de explantes (cotilédones e eixo embrionário) germinadas sob condições *in vitro*.

Material e Métodos

Para os experimentos utilizou-se as cultivares TE-96, BR-14 Mulato, Pitiúba, Canapu Amarelo, IT-85F e IPA 206, da espécie *Vigna unguiculata*. Inicialmente foi adotada a seguinte metodologia de desinfestação: três lavagens com água destilada (5 min cada); imersão em solução de álcool 70% (1 min), seguida pela imersão em solução composta por água sanitária a 15% (20 min), seguida de três lavagens com água esterilizada, adicionando-se na terceira água o bactericida e fungicida

sistêmico Kasumin diluído em água destilada na proporção 2:1 permanecendo no antibiótico por 24 h. A seguir, as sementes foram inoculadas em placas de Petri contendo papel filtro embebido em água com antibiótico (mesma proporção), para início da germinação. Foram utilizadas 20 sementes de cada cultivar, sendo escolhidas as 15 que mostraram melhor vigor na germinação. Em seguida foram isolados cotilédones e eixo embrionário para inoculação em meio para indução de regeneração otimizado para *Vigna* [sais e vitaminas de MS [4], acrescidos de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de ágar e 2 mg.L⁻¹ BAP (6-benzilaminopurina).

Os explantes foram cultivados em sala de crescimento com fotoperíodo e temperatura controlada por 30 dias, possibilitando a identificação de diferenças no potencial de regeneração nas distintas cultivares e seus tecidos.

Uma importante observação a ser feita na metodologia utilizada é que no decorrer da fase de intumescimento até a inoculação, todas as sementes de BR-14 Mulato contaminaram, fazendo-se necessária a repetição dos passos anteriores com novas sementes recém-colhidas em casa de vegetação.

Resultados e Discussão

O potencial regenerativo *in vitro* da espécie *Vigna unguiculata* é pouco conhecido, assim sendo, a cultivar IPA 206 foi escolhida como material controle, uma vez que análises anteriores de nosso grupo revelaram uma resposta positiva sob condições *in vitro*.

Durante o experimento constataram-se diferenças no potencial regenerativo das distintas cultivares com respostas diversas para cada uma delas. Observou-se também que a contaminação endógena foi o principal problema observado durante os testes de regeneração *in vitro*.

Na semana inicial todas as sementes de Canapu Amarelo e TE-96 apresentaram contaminação endógena por bactérias e fungos (Fig. 1), enquanto que na IT-85F 93,3% da amostra encontrava-se contaminada. Nas cultivares restantes, o primeiro indício de regeneração correspondeu ao intumescimento dos tecidos, acompanhado pela alteração da coloração. Contudo, nem todos os cotilédones e eixos embrionários responderam positivamente, ocorrendo necrose total ou parcial.

Ao fim da quarta semana, 66,7% dos cotilédones de BR-14 Mulato necrosaram, 6,7% apresentaram

1. Aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE. CEP: 50670-901. E-mail: arrudah@gmail.com

2. Pesquisadora no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Biologia Molecular da Empresa Pernambucana de Agropecuária (IPA), Av. General San Martin, 1371, Bongi, Recife - PE - CEP 50761-000. E-mail: laureenkido@ipa.br

3. Professora Adjunta do Departamento de Genética na Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE. CEP: 50670-901. E-mail: celiseip@hotlink.com.br

coloração esverdeada e 26,7% indicaram início de formação de calos. Dentre os quinze eixos inoculados desta cultivar, 26,7% necrosaram e outros 26,7% mostraram regeneração direta e indireta via calo, enquanto que 46,6% apenas indicaram a formação de calo (Fig. 2). Dentre os tecidos de Pitiúba, 53,3% dos cotilédones apresentaram necrose e os 46,7% remanescentes formaram calo. 40% dos seus eixos embrionários apresentaram necrose, 33,3% mostraram regeneração direta e indireta e outros 26,7% apenas a formação de calo (Fig.3). A única semente não contaminada de IT-85F apresentou formação de calo em ambos os tecidos (Fig. 4). Já a cultivar IPA 206, para a qual já se conhecem trabalhos com resposta positiva, não respondeu como esperado. Todos os seus cotilédones necrosaram e entre os eixos embrionários, apenas um iniciou a regeneração indireta (Fig. 5).

Foi observado que as cultivares apresentaram respostas diferenciadas tanto entre si, quanto entre seus tecidos. Este resultado indica que a metodologia utilizada deve ser aprimorada de forma específica para cada cultivar trabalhada, não sendo o método padrão o ideal para todos os experimentos de cultivo *in vitro* de *Vigna*. Também foi constatado, que em todos os acessos analisados, os resultados indicam um maior potencial regenerativo dos eixos embrionários, que apresentaram tanto a regeneração direta e indireta simultaneamente, como apenas a regeneração indireta pela formação de calos.

Conclusões

A metodologia utilizada para todas as cultivares, necessita de adequações específicas para cada material a ser analisado. Isso indica que em *V. unguiculata* a adaptação às condições *in vitro* é genótipo-dependente. A

julgar pelo observado em todas as cultivares analisadas, o eixo embrionário constitui-se no melhor explante para indução de regeneração em feijão-caupi.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do programa RENORBIO (Rede Nordeste de Biotecnologia), da Fundação Volkswagen (Bonn, Alemanha), do BNB (banco Nordeste do Brasil), da FACEPE (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco) e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) por apoio financeiro e bolsas de pesquisa. Agradecemos à Embrapa/CPQMN (Centro de Pesquisas do Meio Norte) e ao IPA (Empresa Pernambucana de pesquisa Agropecuária) pela concessão de sementes de seu banco de germoplasma para a realização dos ensaios *in vitro*.

Referências

- [1] LEITE, M.L.; FILHO J.S.V. & RODRIGUES J.D. 1999. Produção e componentes de produção de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), em Botucatu – SP. Revista da Faculdade de Agronomia, Botucatu.
- [2] FREIRE-FILHO, F.R.; RIBEIRO V.Q.; BARRETO P.D. & SANTOS C.A.F. 1999. Melhoramento genético do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) na região nordeste. In: QUEIRÓS, M.A. de, GOEDERT, C.O. & RAMOS, S.R.R., (Eds.). Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro. EMBRAPA, CPATSA, Petrolina.
- [3] AVENIDO, R.A. & HATTORI, K. 1999. Differences in regeneration response from cotyledonary node explants in asiatic *Vigna* species support genomic grouping within subgenus *Ceratotropis* {Piper} Verdc. Plant cell tissue organ culture. 58: 99–110.
- [4] MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum. v.15, p.473-497.

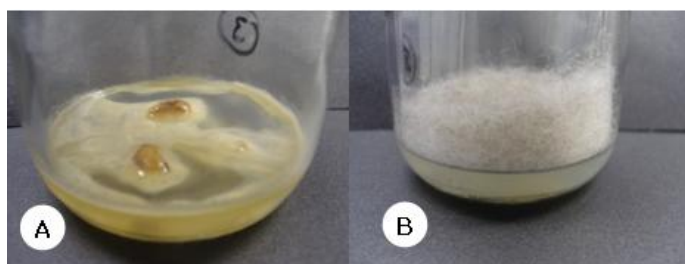


Figura 1 – A, Contaminação por bactérias em Canapu Amarelo (*Vigna unguiculata*). B, Contaminação por fungos em TE-96 (*Vigna unguiculata*).

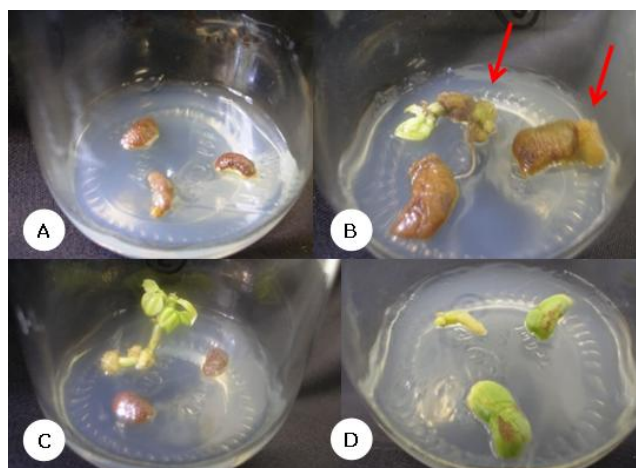


Figura 2 – A, Tecidos necrosados de BR-14 Mulato (*Vigna unguiculata*). B, Ambos os tecidos apresentando formação de calo (no detalhe). C, Eixo embrionário apresentando regeneração direta e indireta. D, Cotilédones esverdeados.

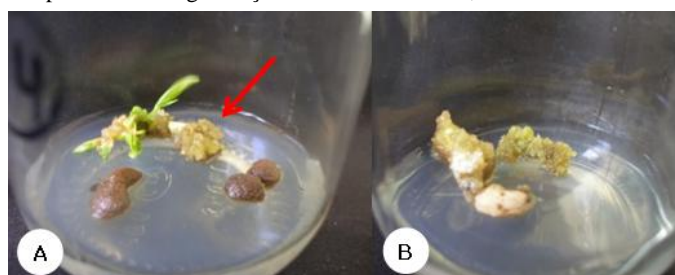


Figura 3 – A, Cotilédones necrosados e Eixo embrionário apresentando regeneração direta e indireta via calo (detalhe) em Pitiúba (*Vigna unguiculata*). B, Formação de calo em todos os tecidos.



Figura 4. Tecidos indicando formação de calo em IT-85F (*Vigna unguiculata*)



Figura 5. Cotilédones necrosados e eixo indicando regeneração indireta via calo em IPA 206 (*Vigna unguiculata*).