

# Efeito do Estádio de Maturação da Semente na Regeneração *in vitro* de *Vigna unguiculata* cv IPA201

Andrea Lima de Oliveira<sup>1</sup>, Éderson Akio Kido<sup>2</sup>, Ana Maria Benko-Iseppon<sup>3</sup>, Laureen Michelle H. Kido<sup>4</sup>

## Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa de importância socioeconômica elevada nas regiões de clima semi-árido do Brasil, já que nessas regiões o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) não possui um crescimento adequado. O feijão-caupi representa 73% de todos os tipos de feijões consumidos na região Nordeste, e em torno de 10% do valor total da produção agrônômica [1]. Além do uso para consumo humano, o feijão-caupi também é utilizado na alimentação animal, adubação verde e proteção do solo. Apesar de sua importância, esta cultura ainda carece de investimento para o desenvolvimento de novas cultivares, mais produtivas e mais adequadas às condições de cultivo. Dentro da biotecnologia, algumas das técnicas de cultura de tecido têm auxiliado significativamente o desenvolvimento de novas cultivares. Estas técnicas permitem encontrar ou desenvolver novas cultivares com características economicamente importantes. A seleção do tipo de explante a ser utilizado é um fator decisivo no sucesso do desenvolvimento de novas cultivares por meio das técnicas de cultura de tecido (transgenia, indução de mutação, duplo haplóide, etc). Este trabalho objetivou avaliar o efeito do estágio fisiológico da semente sobre a resposta regenerativa de diferentes explantes (cotilédones e eixo embrionários) obtidos de sementes de feijão-caupi cv IPA201.

## Material e métodos

Neste experimento foram utilizadas 20 sementes secas e 20 sementes verdes de feijão-caupi cv IPA201. As sementes foram lavadas, separadamente, em água destilada por dez minutos (3 x). Em seguida, as sementes foram desinfestadas em álcool 70% por 1 minuto e em solução de hipoclorito de sódio 10% (v/v) por 20 minutos. As sementes foram, então, lavadas duas vezes em água estéril e mantidas em solução contendo 100 mg de fungicida (KASUMIN) em 200 mL de água estéril, por 24 horas. No dia seguinte, as sementes tiveram seus tegumentos removidos e os eixos embrionários isolados a partir dos embriões dos cotilédones.

Os explantes foram transferidos para frascos contendo meio de cultura MS [2] suplementado com BAP 2 mg.L<sup>-1</sup>, sacarose 30 g.L<sup>-1</sup> e agar 6 g.L<sup>-1</sup>. Cada frasco conteve dois cotilédones e um eixo embrionário provenientes de uma mesma semente. O material

permaneceu em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas por 45 dias, sendo os meios de cultura renovados a cada 15 dias.

## Resultados e discussão

Nos primeiros 30 dias não houve uma grande variação entre o padrão de desenvolvimento dos explantes testados (cotilédones e eixos embrionários) independente do estágio fisiológico (maduras e não maduras). Durante o processo regenerativo foram identificadas algumas alterações morfológicas nos explantes, que podem estar associadas ao início do processo de regeneração. Dentre as modificações observadas, o aumento de tamanho e a alteração na coloração dos explantes parecem ser as principais. Resultados similares foram observados em *Vigna mungo* e *V. radiata* [3]. Todos os explantes que iniciaram o processo regenerativo, independente do estágio fisiológico (sementes maduras ou não), desenvolveram coloração verde e aumentaram de tamanho. Os cotilédones das sementes não maduras (explantes com coloração verde claro) apresentaram sinais da regeneração mais rapidamente que os cotilédones das sementes maduras. As sementes não maduras iniciaram o processo de regeneração uma semana antes dos explantes isolados de sementes maduras. Estes resultados indicam que o estágio fisiológico das sementes pode interferir no potencial regenerativo dos explantes. Diferenças quanto a taxa de regeneração foram também observadas entre os diferentes explantes de uma mesma semente. Ao final de 30 dias foi observado que 20% dos cotilédones (Fig.1) e 75% eixos embrionários de sementes madura iniciaram regeneração (Figs.4A e 4E). Com relação às sementes verdes (Fig.2) 90% dos cotilédones e 70% dos eixos embrionários iniciaram regeneração após 30 dias.

Observou-se também uma diferença quanto à taxa de contaminação. Porém, nas análises feitas aos 45º dia de cultivo, evidenciou-se um alto índice de contaminação endógena por fungo (80%) nas sementes não maduras. Estes resultados indicam que, apesar dos explantes provenientes de sementes não maduras iniciarem o processo de regeneração mais precocemente, o alto nível de contaminação endógena não permite recuperar um grande número de plantas a partir destes materiais. Foi observado, também, que essa contaminação foi muito menor nas sementes maduras (5%). Estes resultados podem estar indicando que a diferença na quantidade de água disponível nos tecidos pode facilitar a sobrevivência dos contaminantes endofíticos nos explantes utilizados no

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 –

cultivo *in vitro*. Sendo assim, para minimizar o efeito da contaminação endofítica é preferível a utilização de sementes maduras (secas) para iniciar o cultivo *in vitro* de feijão-caupi. Sementes maduras de *Capsicum annum* também foram consideradas o melhor estágio de desenvolvimento para indução de regeneração [4]. Outro ponto observado foi que parte dos explantes, provenientes de sementes não maduras, interrompeu o processo regenerativo após 45 dias. Apenas os eixos embrionários deram continuidade à formação de plantas, enquanto que todos os cotilédones oxidaram. Este resultado demonstra haver uma diferença significativa do potencial regenerativo entre explantes de uma mesma semente.

Por outro lado, foi observado que 50% dos cotilédones oxidados, provenientes de sementes maduras, formaram calo (Fig. 4D) e 40% dos eixos embrionários desenvolveram calos em sua superfície. Por outro lado, 60% dos eixos embrionários deram continuidade ao processo de regeneração (Fig. 4B).

Foi observada a formação conjunta de tecidos diferenciados e de calos em alguns explantes (Fig. 4C). Resultados similares foram descritos em diferentes explantes de *V. unguiculata* cultivados na presença de 2,4-D e ANA [5]. Segundo dados da literatura, um dos melhores tecidos para a formação de calos é a epiderme dos embriões, no entanto, o desenvolvimento de células e calos embriogênicos é positivamente influenciado pela composição do meio de cultura [6]. Sendo assim, é possível que a formação de calos nos cotilédones seja devida a restos da epiderme do embrião que tenham permanecido no explante.

Os resultados obtidos com este experimento indicam que o eixo embrionário é o melhor explante para induzir a regeneração de plantas através em feijão-caupi cv. IPA201.

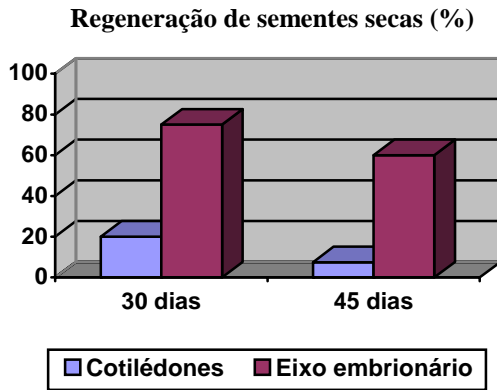
### Agradecimentos

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.

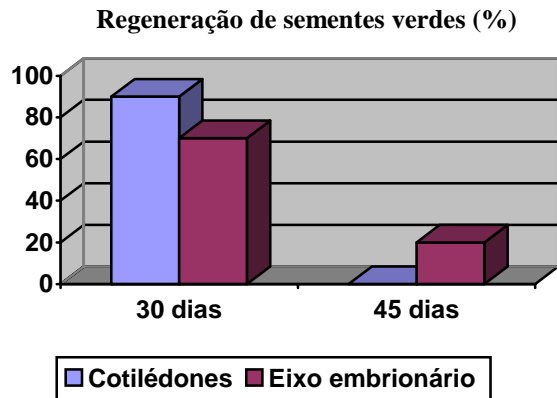
### Referências

- [1] 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*. Petrolina: Embrapa Semi-Árido.
- [2] MURASHIGE T.; SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15 (4): 473-497.
- [3] SEN, J.; GUHA-MUKHERJEE, S. 1998. In vitro induction of multiple shoots and plant regeneration in *Vigna*. *Cell Development Plant Biology*, 34: 276-280.
- [4] EZURA, H.; NISHIMIYA S. AND KASUMI, M. 1993. Efficient regeneration of plants independent of exogenous growth regulators in bell pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Cell Reports*, 12: 676-680.
- [5] CHEEMA, H. K. AND BAWA, J. 1992. Morphogenetics studies *in vitro* in callus cultures of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Acta Hort. (ISHS)* 296:165-170. Homepage: [http://www.actahort.org/books/296/296\\_21.htm](http://www.actahort.org/books/296/296_21.htm)
- [6] MEIJER, E. A.; DE VRIES, S. C.; MORDHORST, A. P. 1999. Co-culture with *Daucus carota* somatic embryos reveals high

2,4-D uptake and release rates of *Arabidopsis thaliana* cultured cells. *Plant Cell Reports*, 18: .656–663.

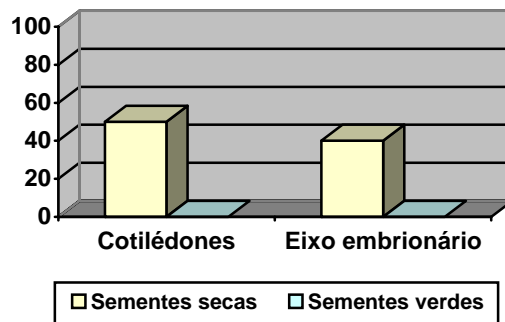


**Figura 1** Regeneração de explantes originários de Sementes secas de *Vigna unguiculata*, analisadas em 30 e 45 dias.

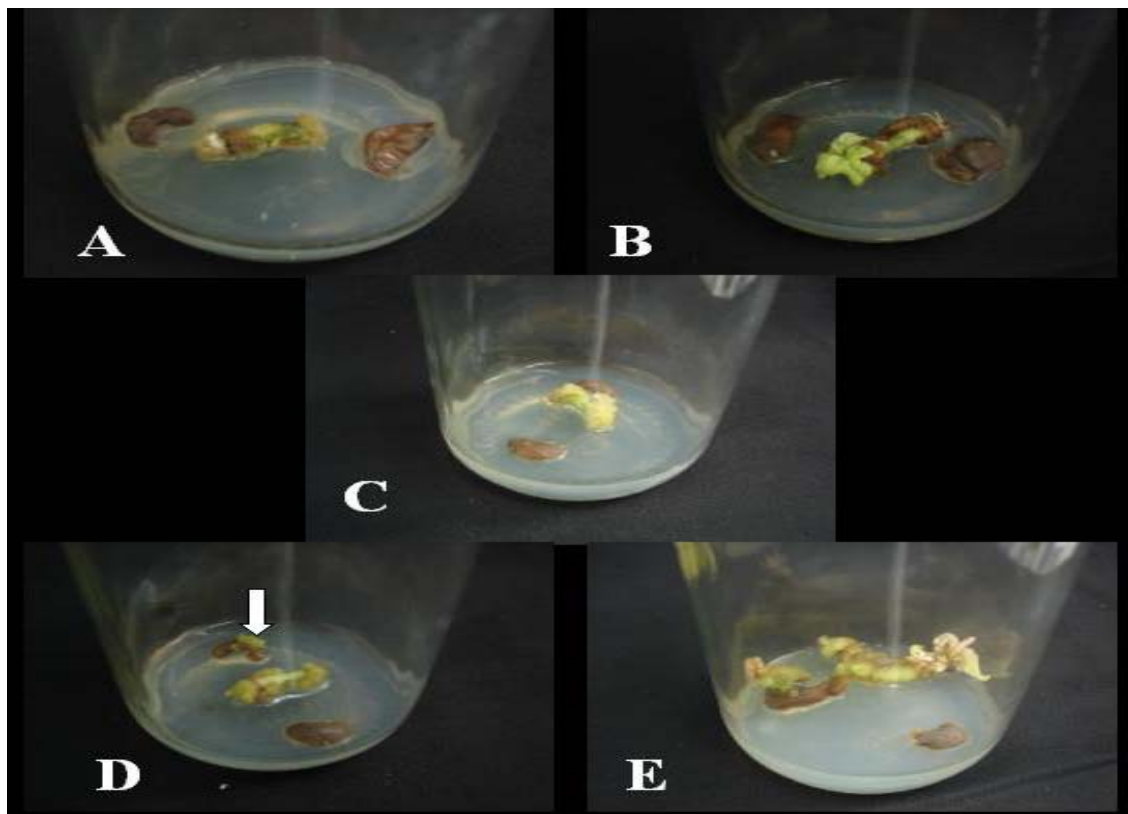


**Figura 2** Regeneração de explantes originários de sementes verdes de *Vigna unguiculata*, analisadas em 30 e 45 dias.

**Formação de calo a partir de explantes diferentes (%)**



**Figura 3** Variação da freqüência de calos em explantes de *Vigna unguiculata* de diferentes estádios.



**Figura 4** Regeneração e formação de calo em *Vigna unguiculata* em presença de BAP. **A:** início de regeneração no eixo embrionário de semente verde no 30º dia. **B:** regeneração de eixo embrionário de semente verde no 45º dia. **C:** formação de calo em eixo embrionário de semente seca. **D:** calo formado a partir de cotilédones de semente seca (ver seta). **E:** regeneração em eixo embrionário e cotilédones de semente seca.