

**ANA PAULA DE SOUZA ANDRADE**

**ORGANOGÊNESE *in vitro* EM FEIJÃO GUANDU (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009**

**ANA PAULA DE SOUZA ANDRADE**

**ORGANOGÊNESE *in vitro* EM FEIJÃO GUANDU (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**APROVADA: 19 de fevereiro de 2009.**

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
(Co-orientador)

---

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike  
(Co-orientador)

---

Prof<sup>ª</sup>. Marília Contin Ventrella

---

Prof. José Eustáquio de S. Carneiro

---

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel  
(Orientador)

**A DEUS,**

Aos meus pais, Adanir e Luiza, e ao meu irmão, André Luiz, **dedico** este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela onipotência, onipresença e por todas as graças concedidas.

À minha família, em especial aos meus pais, pelo amor, apoio e dedicação em todos os momentos de minha vida.

Ao meu irmão André Luiz e minha cunhada Ana Paula pela força e incentivo sempre.

Ao meu namorado Marcelo, pela paciência, amor e compreensão nos momentos de ausência e estresse.

À Universidade Federal de Viçosa, e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela formação e oportunidade de realização deste treinamento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel pela oportunidade, confiança e orientação.

Aos professores Wagner Campos Otoni, Sérgio Yoshimitsu Motoike e Marília Contin Ventrella pela disponibilidade, aconselhamentos, sempre com valiosas sugestões.

Ao professor Cláudio Horst Bruckner, por permitir a realização dos trabalhos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais do Departamento de Fitotecnia.

Ao professor Aloísio Xavier pela orientação e ensinamentos durante a graduação, contribuindo para minha formação acadêmica.

Aos membros da banca examinadora pelas críticas e sugestões.

Aos funcionários Márcio e Cenira, pela ajuda e boa vontade sempre.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais (Fruticultura), Cândida, Mychelle, Patrícia, Marcone e em especial à Cristiane e Elisa pela ajuda na anatomia.

Aos colegas Moysés, Lourdes e Ana Cláudia, pela ajuda com as análises estatísticas.

À “amiga irmã” Daniela Paim, pela amizade, incentivo, companheirismo, apoio e por sempre ouvir meus desabafos durante todos esses anos de caminhada em Viçosa.

Às amigas Fabiana e Miranda pelos ensinamentos, cumplicidade e conselhos.

Aos novos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal, Patrícia França, Advânio Inácio e Victor Coelho, pela ajuda e disponibilidade nos momentos em que precisei.

Aos colegas do Laboratório de Genômica, Cynthia, Michelle, Gustavo, Ricardo, Lívia, Sandra, Jamile, Valéria, Valdir, Guilherme, Tadeu e Luís, pela convivência, horas de risos e ajuda.

Às inesquecíveis irmãs de república e CORAÇÃO, Cleide, Camila (“Milete”), Maíra (“Xuxu”), pela amizade, apoio, companheirismo e pelos bons e maus momentos compartilhados que só contribuíram para o meu crescimento pessoal.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos (BIOAGRO), Crislene, Iulla, Leandro, Virgílio e Elyabe, pelos bons momentos durante os cafezinhos dos “intervalos”.

Aos demais amigos que, mesmo distantes, estiveram sempre torcendo por mim.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muitíssimo obrigada!

## **BIOGRAFIA**

ANA PAULA DE SOUZA ANDRADE, filha de Adanir Coelho de Andrade e Luiza de Souza Tavares, nasceu em 22 de novembro de 1982, na cidade de Coronel Fabriciano, Minas Gerais.

Em outubro de 2006, graduou-se em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 2007, ingressou-se no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de Mestrado na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2009.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE ABREVIATURAS .....	viii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
1. Introdução Geral.....	1
2. Revisão de Literatura .....	3
2.2. Ferrugem Asiática da Soja.....	6
2.3. Organogênese in vitro de feijão guandu .....	8
3. Referências Bibliográficas .....	13

### CAPÍTULO 1

---

Indução de brotações adventícias a partir de embriões zigóticos maduros de feijão guandu ( <i>Cajanus cajan</i> L. Millsp.) por BAP e TDZ	
1. Introdução .....	18
2. Material e Métodos .....	20
2.1. Material vegetal .....	20
2.1.1. Obtenção dos explantes .....	20
2.2. Meios de cultura e condições de cultivo .....	21
2.3. Condução e avaliações experimentais .....	22
2.4. Histologia.....	23
3. Resultados .....	24
3.1. Efeito dos meios de cultura nas respostas morfogênicas.....	24
3.2. Histologia.....	26
4. Discussão .....	36
5. Referências Bibliográficas .....	42

## CAPÍTULO 2

---

Indução de brotações adventícias em segmentos de epicótilo de feijão guandu ( <i>Cajanus cajan</i> L. Millsp.) germinado <i>in vitro</i> por BAP, TDZ e AgNO <sub>3</sub>	
1. Introdução .....	47
2. Material e Métodos .....	49
2.1. Material vegetal .....	49
2.1.1. Germinação <i>in vitro</i> das sementes e obtenção dos explantes .....	49
2.2. Meios de cultura e condições de cultivo .....	50
2.3. Condução e avaliações experimentais .....	51
2.4. Histologia.....	52
3. Resultados .....	53
3.1. Efeito dos meios de cultura nas respostas morfogênicas.....	53
3.1.1. Formação de raízes .....	53
3.1.2. Calogênese nos extremos proximal e distal.....	53
3.1.3. Formação de brotações .....	54
3.2. Histologia.....	54
4. Discussão .....	60
5. Referências Bibliográficas .....	65
CONCLUSÕES GERAIS .....	70
ANEXO.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIA: ácido 3-indolacético

AIB: ácido indol-3-butírico

ANA: ácido  $\alpha$ -naftalenoacético

BAP: 6-benzilaminopurina

Cinetina: 6-furfurilaminopurina

GA<sub>3</sub>: ácido giberélico

TDZ: 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)uréia

Zeatina: N-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil)aminopurina

2-iP: isopenteniladenina

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

## RESUMO

ANDRADE, Ana Paula de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Organogênese *in vitro* em feijão guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.)**. Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-orientadores: Wagner Campos Otoni e Sérgio Yoshimitsu Motoike.

O presente estudo objetivou avaliar os efeitos dos reguladores de crescimento BAP e TDZ na indução de brotações adventícias de feijão guandu (cultivares “Anão” e “Fava Larga”) a partir de embriões zigóticos e segmentos de epicótilo de plântulas germinadas *in vitro*. Na indução de brotações a partir de eixos embrionários, ao final de 30 dias de cultivo foram avaliados o percentual de calejamento, o número de raízes e brotações formadas em ambas as extremidades (proximal e distal) bem como a presença de contaminação e de explantes sem reposta. A formação de raízes se manteve restrita aos explantes cultivados em meio MSØ e na extremidade proximal. Nos explantes cultivados em meio MS acrescido de citocininas, de maneira geral, independente da concentração de BAP e, ou, TDZ testadas, observou-se intensa formação de calo na extremidade proximal. Em ambos os cultivares o meio de cultura suplementado com a combinação de BAP e TDZ nas concentrações de 4,44 µM e 2,27 µM respectivamente, possibilitou a formação de maior número de brotações por explante na extremidade distal, mas essas apresentaram tamanho reduzido. Apesar de haver formação de menor número de brotações nos explantes cultivados em meios acrescidos de apenas BAP (2,22 µM) ou TDZ (2,27 µM), essas apresentaram folhas mais expandidas e aspecto vigoroso. Na indução de brotações a partir de segmentos de epicótilo obtidos assepticamente de plântulas com 7 dias de idade, avaliou-se ao final de 32 dias de cultivo o número de raízes e de brotações formadas em ambas as extremidades. A intensidade, coloração e textura dos calos foram avaliadas visualmente e descritas de forma geral. Novamente, a formação de

raízes foi observada no extremo basal dos explantes cultivados em meio MSØ sendo que, na presença de AgNO<sub>3</sub>, observou-se a formação de maior número de raízes por explante comparado ao meio controle sem AgNO<sub>3</sub>. Em ambos os cultivares e em ambas as extremidades dos explantes, o meio acrescido da combinação das duas citocininas (2,22 µM de BAP e 2,27 µM de TDZ) possibilitou a formação de calos visualmente maiores, sendo que na presença de AgNO<sub>3</sub> a formação de calo foi menor. As brotações se restringiram ao extremo basal dos explantes cultivados em meio acrescido de citocininas e AgNO<sub>3</sub>, sendo que esta combinação possibilitou a formação de maior número de brotações. Seções histológicas revelaram a origem adventícia das brotações via organogênese direta nos explantes embrionários e via indireta nos explantes do epicótilo. Conclui-se que a utilização do eixo embrionário, segmentos de epicótilo e das citocininas BAP e TDZ na indução de brotações adventícias de feijão guandu cvs. “Anão” e “Fava Larga” é promissora; a utilização de AgNO<sub>3</sub> se faz necessário para a indução de brotações a partir de segmentos de epicótilo; e embora a adição de precursores bem como a mensuração dos níveis de etileno não tenham sido realizados, as respostas obtidas no presente estudo podem estar relacionadas ao efeito deste hormônio. Os resultados obtidos neste trabalho fornecem subsídios a estudos complementares, necessários para o aperfeiçoamento da eficiência de regeneração *in vitro* de feijão guandu, bem como das fases de alongamento e aclimatização *ex vitro*.

## ABSTRACT

ANDRADE, Ana Paula de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2009. ***In vitro* organogenesis in the pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.)**. Adviser: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-advisers: Wagner Campos Otoni and Sérgio Yoshimitsu Motoike.

The present study was carried out to evaluate the effects of the growth regulators BAP and TDZ on the induction of adventitious shoots of the pigeon pea (cultivars "Anão" and "Fava Larga"). So, zygotic embryos and epicotyledonary segments from *in vitro*-germinated plantlets were used. In the shoot induction from embryonic axes, the following variables were evaluated at the end of 30 days under culture: the percent callus, the number of roots and shoots formed at both ends (proximal and distal), as well as the presence of contamination and explants without response. The formation of roots were restricted to the explants cultured in the MSØ medium and at the proximal end. In the explants cultured in the MS medium added with cytokinins, an intensive callus formation was generally observed at the proximal end. In both cultivars, the culture medium supplemented with combination of BAP and TDZ at concentrations 4.44µM and 2.27µM respectively, made possible the formation of higher shoot numbers by explant at distal end, but they were reduced-sized shoots. Although the lower number of shoots in the explants cultured in mediums added with only BAP (2.22µM) or TDZ (2.27µM), they showed more expanded leaves and vigorous aspect. In shoot induction from the epicotyl segments aseptically obtained from plantlets aged 7 days, the number of roots and shoots formed at both ends were evaluated on the 32<sup>o</sup> day. The intensity, coloration and texture of the callus were visually evaluated and generally described. Again, the root formations were observed at the basal end of the explants cultured in MSØ medium, whereas a higher number of root formation by explant were observed, compared to

the control medium without AgNO<sub>3</sub>. In both cultivars and both ends of the explants, the medium added with combination of two cytokinins (2.22μM BAP and 2.27μM TDZ) made possible the formation of callus that were visually higher, but at the presence of AgNO<sub>3</sub> occurred lower callus formation. The shoot were restricted to basal end of the explants cultured in the medium added with cytokinins and AgNO<sub>3</sub>, and this combination made possible the formation of higher shoot number. Histological sections revealed the adventitious origin of the shoots via direct organogenesis in the embryonic explants, as well as indirect via in the epicotyl explants. According to the results, the following conclusions were drawn: the use of the embryonic axis, epicotyl segments and both BAP and TDZ cytokinins in inducing the adventitious shoots of the pigeon pea (cultivars "Anão" and "Fava Larga") is promising; the use of AgNO<sub>3</sub> is necessary to induce the shoots from the epicotyl segments; and although the addition of precursors and the measurement of the ethylene levels have not been accomplished, the responses obtained in this study may be related to the effect of this hormone. Those data will be useful as base for the accomplishment of complementary studies that are targeted to the improvement of the efficiency in the *in vitro* regeneration of the pigeon pea, as well as the *ex vitro* elongation and acclimatization phases.

## 1. Introdução Geral

A ferrugem asiática da soja é uma doença policíclica causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, e nos últimos anos disseminou-se por ampla área de exploração desta cultura na América do Sul ocasionando grandes prejuízos (Yorinori et al., 2005). Além da soja, *P. pachyrhizi* é capaz de infectar mais de 90 espécies e pelo menos 43 gêneros (Yeh et al., 1982). A utilização de variedades de soja resistentes seria a medida de controle mais desejável, todavia, isto tem sido dificultado devido à variabilidade genética do fungo e pela ausência de fontes de resistência de amplo espectro (Stokstad, 2004).

Recentemente, foi relatada a suscetibilidade do feijão guandu a *P. pachyrhizi* e, diferentemente do que é verificado na soja, foram identificados genótipos de guandu imunes ao isolado deste fungo (Nogueira, 2007).

A possibilidade da utilização do feijão guandu (*Cajanus cajan* L.) como "planta-modelo" em estudos que busquem elucidar mecanismos de resistência de plantas a ferrugem asiática da soja é de grande valor, podendo o feijão guandu servir como importante fonte alternativa de genes de resistência a *P. pachyrhizi*. Tal alternativa é exequível por meio da transformação genética da soja com os genes de resistência do guandu. Esta transferência intergenérica é possível desde que os gêneros sejam taxonomicamente relacionados (Tai et al., 1999). Os gêneros *Vigna*, *Phaseolus* e *Cajanus* pertencentes à sub-família *Papilionoidae* são os mais próximos de *Glycine* (Choi et al., 2004), tornando possível esta transferência, uma vez que tem-se observado em outros patossistemas, que os genes R são capazes de manter sua funcionalidade quando transferidos para espécies taxonomicamente relacionadas (Rommens et al., 1995; Tai et al., 1999).

A clonagem posicional é a técnica comumente utilizada na clonagem de genes de resistência. Após a clonagem da região genômica que contém o gene R, uma etapa fundamental é a análise dos genes candidatos por meio da transformação genética. Assim, a disponibilidade de um sistema de transformação genética para guandu é pré-requisito para a clonagem de genes nesta planta.

Para tanto uma das ferramentas que pode contribuir grandemente para esses avanços é a transformação genética do feijão guandu.

O processo de transformação genética apresenta como potenciais de aplicação o melhoramento genético, bem como o de pesquisa básica, permitindo o estudo da

função e regulação da expressão gênica (Birch, 1997; Prescott et al, 1998; Newell, 2000). Um dos pré-requisitos para a transformação genética é o estabelecimento de um protocolo reproduzível e aplicável de regeneração *in vitro*, bem como de aclimatização e produção das mudas em ambiente *ex vitro*. Daí a importância da cultura de tecidos, uma vez que o sucesso de programas de transformação estável de genes depende da capacidade de regeneração da espécie em estudo (Ferreira et al., 1998). Assim, o estabelecimento de um protocolo de regeneração *in vitro* de cultivares de feijão guandu suscetíveis a *P. pachyrhizi* se faz necessário, pois, uma vez estabelecido, possibilitará o estudo funcional de genes candidatos que conferem resistência à ferrugem asiática da soja.

A transformação genética de espécies leguminosas em geral tem sido dificultada uma vez que elas são consideradas recalcitrantes quando manipuladas *in vitro* (Christou, 1997; Satyavathi et al., 2003; Polowick et al., 2004; Saini e Jaiwal, 2005), o que dificulta o processo de regeneração.

A recalcitrância corresponde à incapacidade de células vegetais, tecidos e órgãos de responder ao cultivo *in vitro*, e ela pode ocorrer em todos os estádios de um regime de cultivo. A resposta obtida ao se cultivar um material *in vitro*, é influenciada por três fatores principais: 1) o estado fisiológico do material doador de explante; 2) manipulações *in vitro*, como composição do meio basal (compostos orgânicos e inorgânicos), presença de fitorreguladores, tipo de agente gelificante, pH, e outros fatores físicos tais como qualidade da luz, fotoperíodo e temperatura; e 3) estresse fisiológico apresentado pelo explante quando cultivado em condições *in vitro*, como por exemplo, a oxidação (Benson 2000).

Outra limitação aliada ao cultivo *in vitro* de feijão guandu diz respeito ao genótipo com o qual se deseja trabalhar, podendo-se dizer que a cultura de tecidos é genótipo-dependente. As respostas obtidas por diversos autores variaram também em função do tipo explante, meios de cultura e diferentes reguladores de crescimento utilizados.

Esses fatores podem e devem ser manipulados com intuito de se obter sucesso no processo de cultivo *in vitro* de espécies leguminosas como o feijão guandu.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. Feijão guandu

O feijão guandu (*Cajanus cajan* L.) Millspaugh ( $2n = 2x = 22$ ), leguminosa forrageira, pertence à família Fabaceae (anteriormente denominada Leguminosae), subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae e à subtribo Cajaninae (Cronquist, 1981). É uma das principais leguminosas cultivadas nos trópicos e subtropicais, sendo extensivamente plantada na Índia e em vários países da Ásia, África e América Latina (Ratnaparkhe e Gupta, 2007). No ano de 2007 a Índia foi responsável por uma produção mundial de 2,5 milhões de toneladas de grãos, apresentando uma área plantada de aproximadamente 3,5 milhões de hectares (FAOSTAT, 2008). Essa espécie tem como centro de origem e diversidade genética a Índia, onde foi domesticada a cerca de 1500 anos a.C. Possui os seguintes nomes comuns: Guandul, poroto guandul, poroto paraguayo, sachacafé, falso café, arveja (Argentina); feijão guandu (Brasil); quinchoncho (Venezuela); frijol de árbol (México); Cumandái (Paraguai); red gram, tur, arhar, dahl (Índia); catjang, kachang (Ásia); pigeon pea (Austrália); pigeon pea, angola pea (Reino Unido); e puerto rican bean, pigeon pea (Hawaii) (Fuller e Harvery, 2006).

As plantas são perenes, eretas, arbustivas e diferem amplamente entre si principalmente quanto ao ciclo de desenvolvimento, à altura máxima alcançada pela planta, ao potencial produtivo de fitomassa e de grãos, e a coloração da flor, vagem e sementes (Houérou, 2007; Souza et al., 2007).

Com ramos de coloração verde ou púrpura, todas apresentam caule lenhoso e cilíndrico. As folhas são trifolioladas, e com folíolos lanceolados ou elípticos, de 4 a 10 cm de comprimento e 3 cm de largura, recobertos por pubescência aveludada na face abaxial assim como o caule e ramos. Possui sistema radicular profundo e vigoroso, tendo como destaque uma raiz pivotante que pode penetrar um ou mais metros no solo. Numerosas raízes finas secundárias, localizadas nos 30 cm da camada superior do solo, apresentam nódulos de bactérias simbiotes (Souza et al., 2007).

As flores são de coloração amarelo ou amarelo-alaranjado, podendo apresentar traços (estrias) púrpuras ou avermelhadas. São ainda hermafroditas, podendo variar de 1,5 a 1,8 cm de comprimento distribuídas ao longo do ramo ou concentradas em racemos terminais (com 5 a 10 flores), caracterizando assim a

inflorescência. As vagens são indeiscentes e possuem formato oblongo achatado e terminam em um pequeno bico na extremidade, podendo alcançar 8 cm de comprimento e 1,4 cm de largura. Quando maduras, as vagens possuem coloração marrom, palha, púrpura ou verde salpicada de marrom, e podem conter de 2 a 9 sementes. As sementes são de formato aproximadamente redondo, lisas, com 4 a 8 mm de diâmetro, e possuem cor verde ou púrpura quando imaturas; quando maduras, apresentam coloração que vai de branco, amarelo, castanho a preto, podendo ainda ser salpicadas de marrom ou púrpura dependendo do cultivar (Houérou, 2007; Souza et al., 2007).

A morfologia floral é do tipo cleistogâmico, típico de plantas autofecundadas, sendo assim, o sistema reprodutivo do guandu predominantemente autógeno. Embora a biologia floral da espécie favoreça a autopolinização, altas taxas de polinização cruzada podem ocorrer naturalmente como resultado da combinação de alguns fatores. Saxena et al. (1990) atribuem a essa ocorrência o tipo e eficiência da população local de insetos, a proximidade de plantas de diferentes genótipos, hábito de florescimento, distância do campo de produção de sementes, velocidade e direção predominante dos ventos na região, dentre outros.

Entre as leguminosas, o guandu ocupa mundialmente o sexto lugar em importância alimentar e agrícola em função da grande variedade, além da capacidade de produzir grandes colheitas de sementes ricas em proteínas mesmo em solo de baixa fertilidade (Souza et al., 2007). De acordo com a literatura a produção de grãos pode variar de 500 a 1500 Kg/ha, podendo alcançar 3 t/ha, dependendo da variedade, do sistema de cultivo e época de semeadura. O teor protéico dos grãos varia de 12,4 a 29,7%, com média de 21,2% sendo considerado como excelente para a alimentação humana (grãos secos ou verdes, e vagens), constituindo fração importante da dieta de populações da Índia, Bahamas, Porto Rico, Trinidad e Tobago e Panamá (Remanandan, 1990, citado por Santos et al., 1999).

A cultura foi introduzida no Brasil possivelmente por escravos, e por sua tolerância a condições adversas como estresse hídrico e a capacidade de crescer em solos pobres, possibilitaram que seu cultivo se difundisse pelo país. No Brasil é frequentemente cultivada em associação com outras culturas em áreas de agricultura de subsistência de regiões semi-áridas, sendo utilizada na alimentação animal e humana (Souza et al., 2007).

De acordo com Udedibie e Igwe (1989), citados por Godoy et al. (1997), o guandu possui extraordinária capacidade de produção de forragem, nas formas de banco de proteínas, de feno, silagem, pastejo direto e de grãos. Pode ser ainda empregado como adubo verde, tanto em rotação quanto em associação com outras culturas. Alguns cultivares de guandu pode produzir mais de 30 t/ha/ano de matéria verde (caule, ramos e folhas) sob condições favoráveis de clima e solo (Souza et al., 2007). A característica apresentada pelo guandu, de crescer em períodos adversos que limitam o crescimento de outras forrageiras, constitui-se em valiosa alternativa para a obtenção de alimentos de boa qualidade e redução de custos com colheita e armazenamento de forragem no período de entressafra (Rao et al., 2002).

O guandu também é citado como “melhorador de solos”, dado a sua capacidade de acessar fosfatos insolúveis em solos com baixo teor de fósforo, aumentando assim a disponibilidade de fósforo solúvel para outras culturas que não têm essa capacidade de extração. É ainda capaz de assimilar mais nitrogênio por unidade de biomassa vegetal do que muitas outras leguminosas, podendo formar associação simbiótica com bactérias do gênero *Rhizobium*. Esta simbiose ocorre nos nódulos localizados nas raízes, onde há uma relação de troca na qual a planta fornece energia para a bactéria e recebe amônia produzida pelo *Rhizobium* a partir da fixação do nitrogênio atmosférico (Nene e Sheila, 1990; Ratnaparkhe e Gupta, 2007). Além do mais, possui um vigoroso sistema radicular, profundo e ramificado, que possibilita o rompimento de camadas adensadas de solos, atuando assim como biodescompactador (Nene e Sheila, 1990; Santos et al., 1999; Souza et al., 2007).

Beltrame e Rodrigues (2007), em trabalho com feijão guandu na restauração de florestas tropicais, observaram efeito positivo de seu uso para tal finalidade, tendo em vista que o guandu auxiliou de maneira geral no desenvolvimento de espécies florestais, reduzindo a mortalidade e aumentando a área basal e altura média das plantas.

No que diz respeito ao ataque de pragas e doenças, diversas espécies de lagartas, que atacam flores, vagens e sementes em desenvolvimento, representam uma ameaça freqüente às culturas de guandu, mesmo não sendo pragas exclusivas da cultura. Ratnaparkhe e Gupta (2007) dão destaque a duas principais pragas que atacam a espécie, causando grandes perdas anuais. Uma delas pertencente ao gênero *Helicoverpa* (espécie *H. armigera*), que ataca vagens e flores, e é comumente encontrada nos trópicos e sub-trópicos da Ásia. A outra diz respeito à espécie

*Melanagromyza obtuse* M., um díptero que ataca as sementes, sendo uma praga também restrita ao continente asiático. Souza et al. (2007) também citam algumas espécies do gênero *Helicoverpa*, tais como *H. virescens* (lagarta-da-maçã) e *H. zea* (lagarta-da-espiga). A lagarta-falsa-medideira (*Anticarsia gemmatilis*) e a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) atacam também as folhas das plantas de guandu. Outro grupo de pragas de grande importância é constituído pelos insetos que perfuram as sementes, espécies de gorgulho e caruncho pertencentes à família *Bruchidae*. De acordo com estes mesmos autores, algumas cultivares são também susceptíveis a fungos do solo, como *Fusarium* spp., principalmente no início do desenvolvimento das plantas. Salientam ainda, que no Brasil não há produtos registrados no Ministério da Agricultura, da Pecuária e do Abastecimento para o controle dessas pragas e patógenos.

Rosa (2006) afirma que a baixa produtividade da cultura pode ser devida a diversos fatores, dentre eles a ocorrência de doenças, e que a podridão cinzenta do caule, causada por *Macrophomina phaseolina* vem ocupando um lugar de destaque na cultura do guandu.

Em recente trabalho realizado por Nogueira (2007), foram identificados alguns genótipos de guandu imunes e outros suscetíveis a um isolado monopustular de *Phakopsora pachyrhizi*, fungo causador da ferrugem asiática da soja. Dentre os genótipos suscetíveis, dois correspondem a cultivares dos quais são encontradas sementes comerciais no Brasil.

## 2.2. Ferrugem Asiática da Soja

A ferrugem asiática da soja, causada por *Phakopsora pachyrhizi* é a principal doença fúngica da cultura da soja no Brasil tendo sua importância aumentada nos últimos anos em função de sua introdução nas principais áreas de cultivo da soja no mundo e pela falta de variedades resistentes (Hartman et al., 2005).

A primeira constatação da ferrugem asiática em lavouras de soja no Brasil ocorreu na safra 2001/02 e rapidamente se espalhou pelas principais regiões produtoras, dada a eficiente disseminação do patógeno pelo vento. Desde então o fungo se dispersou pela América do Sul sendo relatado em 2003 na Bolívia, e na Argentina, Uruguai e Colômbia, no ano de 2004. No mesmo ano de 2004, o fungo foi constatado em lavouras de soja nos Estados Unidos (Schneider et al., 2005).

*P. pachyrhizi* é um fungo biotrófico pertencente ao filo Basidiomycota, classe Urediniomycetes, ordem Uredinales, família Phakopsoraceae, e ocorre no Hemisfério Leste desde 1902, sendo considerado um fungo patogênico altamente agressivo. Esse fungo causou danos na ordem de 10-14% na Tailândia, 10-90% na Índia, 10-50% no sul da China, 23-90% em Taiwan e 40% no Japão (Sinclair e Hartman, 1999).

As perdas em grãos provocadas pela doença no Brasil na safra de 2007/08 somaram o equivalente a 418,5 mil toneladas o que representa um prejuízo de US\$ 204,5 milhões. A média nacional de aplicações de fungicidas para o controle da ferrugem asiática e das demais doenças neste período foi estimada em 2,2 aplicações/ha, sendo o valor médio de cada aplicação de US\$ 43/ha totalizando um custo de US\$ 1,97 bilhão para o controle da ferrugem asiática (Godoy, 2008).

O processo de infecção empregado por *P. pachyrhizi* se inicia com a disseminação dos esporos que foram produzidos nas plantas que serviram como hospedeiras na entressafra. Os esporos são disseminados pelo vento e se depositam sobre as folhas das plantas de soja. Caso as condições estejam favoráveis, temperatura entre 18°C e 26°C e molhamento foliar os esporos germinam (formação do apressório) e o fungo penetra o tecido diretamente através da cutícula e começa a colonizar os tecidos da folha. Aos oito dias após a penetração, é possível visualizar as urédias, principalmente na face abaxial das folhas e finalmente a liberação de novos esporos (uredósporos). Plantas severamente infectadas apresentam como sintoma a desfolha precoce, o que compromete a formação e o enchimento de vagens bem como o peso final dos grãos (Yang et al., 1991).

A utilização de variedades de soja resistentes ao fungo causador da ferrugem asiática seria a medida de controle mais desejável. Contudo, o desenvolvimento de cultivares resistentes tem sido dificultado pela variabilidade genética do fungo e pela ausência de fontes de resistência de amplo espectro (Stokstad, 2004). Quatro genes de resistência já foram descritos (*Rpp1* a *Rpp4*), todavia, isolados capazes de suplantá-los já são conhecidos (Hartman et al., 2005). Estes mesmos autores afirmam que nenhum material com nível de resistência adequada ao patógeno foi identificado pela triagem de 940 cultivares de soja e de 12.000 acessos do banco de germoplasma do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos.

Assim, na ausência de cultivares resistentes, medidas de manejo como a utilização de cultivares de ciclo precoce e semeaduras na época recomendada, o

monitoramento constante da lavoura associado ao controle químico com fungicidas têm sido recomendadas com intuito de diminuir os danos causados pela doença.

### 2.3. Organogênese *in vitro* de feijão guandu

Uma das possíveis formas de regeneração *in vitro* é a organogênese, processo pelo qual tecidos vegetais produzem órgãos adventícios unipolares. A organogênese pode ocorrer diretamente a partir de células do explante de origem ou indiretamente, sobre uma massa de células não organizadas, denominada de calo (Thorpe et al., 1991; Bonga e Von Aderkas, 1992; Burritt e Leung, 1996; Gahan e George, 2008).

O processo de organogênese é considerado complexo, e de acordo com Sugiyama (1999) depende da ação de reguladores de crescimento exógenos, em particular citocininas e auxinas, como também da habilidade do tecido em responder às mudanças hormonais durante o período de cultivo.

As citocininas são essenciais para o crescimento e desenvolvimento vegetal sendo também, de grande importância para as manipulações de células e tecidos vegetais *in vitro* (Mok et al., 2000). Atribui-se a essa classe de fitoreguladores um amplo espectro de atividades fisiológicas: são requeridas em processos que envolvem a divisão celular; a morfogênese *in vitro*; a proliferação e crescimento de gemas axilares impedindo a dominância apical; a expansão foliar entre outras (As citocininas comumente usadas na cultura de tecidos são BAP, TDZ, cinetina, 2-iP e zeatina, sendo as duas últimas citocininas naturais Bonga e Von Aderkas, 1992; Raven, 1992; Salisbury e Ross, 1992; Brum et al., 2002; van Staden et al., 2008).

As auxinas por sua vez, estão envolvidas nos processo de divisão e alongamento celular, bem como na síntese de parede, promovendo ainda o crescimento de calos, principalmente em combinação com citocininas. A principal auxina natural é o AIA, e as auxinas sintéticas mais utilizadas são 2,4-D, dicamba, AIB e ANA (Machacova et al., 2008).

A maneira complexa pela qual os reguladores e as células vegetais interagem indica que se o tecido não está em um estágio responsivo, esse não irá responder adequadamente aos reguladores de crescimento exógenos, não importando em quais concentrações e combinações eles são utilizados (Coenen e Lomax, 1997).

Em geral três fases são reconhecidas no processo de organogênese. Na primeira fase, as células do explante adquirem competência organogênica, a qual é

definida como a habilidade das células a responderem a sinais hormonais. As células competentes são canalizadas e determinadas para a formação de órgãos específicos em resposta aos fitorreguladores exógenos caracterizando assim a segunda fase. E por fim, a terceira fase, que corresponde ao crescimento e expressão desse potencial na formação de órgãos propriamente ditos (Sugiyama, 1999; Ziv 1999).

O sistema de regeneração *in vitro* via organogênese em feijão guandu tem sido estudado por diversos autores, com o objetivo de se obter protocolos reproduzíveis que possibilitem a transformação genética da espécie e, por conseguinte, a obtenção de cultivares resistentes, principalmente a insetos que causam perdas significativas na produção dos grãos.

George e Eapen (1994) estudaram a regeneração de plantas de guandu via organogênese a partir de diversos explantes como cotilédones e eixos embrionários imaturos, folhas primárias, segmentos caulinares e raiz, obtidos de plântulas germinadas *in vitro*. Os explantes foram cultivados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com BAP (4,4 ou 22,2  $\mu\text{M}$ ) e AIA (0,6  $\mu\text{M}$ ). Houve formação de brotações de forma indireta somente a partir de explantes foliares e em ambas as concentrações de BAP utilizadas em combinação com AIA. Nos demais explantes não houve a formação de brotações ou houve formação apenas de protuberâncias, mas que não se desenvolveram mesmo após serem transferidas para o meio de mesma composição inicial.

Um método de regeneração *de novo* via organogênese de cultivares de guandu foi obtido por Mohan e Krishnamurthy (1998), utilizando-se segmentos cotiledonares distais de sementes maduras como explante. Um grande número de brotações foi induzido diretamente a partir dos explantes de ambos os cultivares quando cultivados em seis diferentes meios basais adicionados de 22,2  $\mu\text{M}$  de BAP, 2,3  $\mu\text{M}$  de cinetina e 271  $\mu\text{M}$  de sulfato de adenina, após 3-4 semanas de cultivo. As brotações se desenvolveram quando transferidas para o mesmo meio basal, mas com a concentração de citocininas e de sulfato de adenina reduzida à décima parte.

Segmentos foliares (0,5 mm) de cultivares de guandu foram cultivados em meio MS suplementado com TDZ combinado ou não com AIA. Após 25 dias de cultivo os explantes foram transferidos para novo meio de mesma composição, mas com a concentração de TDZ reduzida à metade. Ao final de 50 dias de cultivo as brotações tornaram-se distintas, com elevada frequência brotações regeneradas nos

tratamentos correspondentes ao meio MS suplementado apenas com TDZ; a presença de AIA não alterou o número médio de brotações por cultura. (Eapen et al. 1998).

A regeneração de plantas viáveis também foi obtida a partir de eixos embrionários maduros de guandu (Franklin et al., 2000). O meio de indução utilizado foi composto por sais MS e vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), suplementado com diferentes concentrações de BAP e ANA. Os explantes também foram submetidos a 3 diferentes condições de luz (escuro total, fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro e luz contínua). A concentração de 8,86  $\mu\text{M}$  de BAP combinada com 1,07  $\mu\text{M}$  de ANA mostrou ser ótima, produzindo maior número de brotações por explante e que a condição de escuro total foi ideal para a formação das mesmas, sendo que na condição de luz contínua não houve formação de brotação mesmo após 150 dias de cultivo.

Lawrence et al. (2001) também obtiveram sucesso na frequência de regeneração de brotações via organogênese a partir de eixos embrionários maduros e segmentos foliares de plântulas germinadas *in vitro*, ao utilizarem meio MS acrescido de BAP e AIA. A indução de múltiplas brotações ocorreu de forma indireta em ambos os explantes após um período de 4-5 semanas.

Em meio MS modificado suplementado com diferentes citocininas em diferentes concentrações, segmentos das duas primeiras folhas completamente expandidas e da primeira folha trifoliolada foram utilizados como explantes. Entre as citocininas testadas somente BAP foi efetiva na indução e diferenciação direta de múltiplas brotações após 45 dias de cultivo, enquanto que cinetina induziu calogênese e 2-iP causou oxidação das culturas. O melhor resultado (em média 12 brotações por explante) foi obtido utilizando-se a combinação de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,57  $\mu\text{M}$  de AIA e segmentos do primeiro par de folhas. Segmentos da folha trifoliolada somente expadiram, não sendo observada a formação de brotações (Misra, 2002).

O efeito do TDZ na regeneração *in vitro* de guandu via organogênese foi estudado por Singh et al. (2003). Quando as sementes foram cultivadas em meio MS acrescido de TDZ (0,05-1,0  $\mu\text{M}$ ) houve formação de múltiplas brotações na região corresponde ao nó cotiledonar. A concentração ótima de TDZ na indução das brotações foi de 0,05  $\mu\text{M}$ , onde uma máxima frequência e um maior número médio de brotações por explante foram obtidos em um dos cultivares testados.

As citocininas BAP, cinetina e 2-iP foram utilizadas isoladamente ou em combinação na regeneração de múltiplas brotações a partir de explantes foliares cultivados em meio MS por 21 dias. Os autores obtiveram elevada frequência de explantes com formação de brotações (95%) em meio MS suplementado com 5,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 5,0  $\mu\text{M}$  de cinetina. Em geral, a combinação de BAP com cinetina foi mais eficiente na indução de múltiplas brotações quando comparada com as demais combinações. Após a indução, as brotações foram transferidas para o meio de alongamento composto por sais e vitaminas MS acrescido de 0,58  $\mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$  por um período de 3-5 dias. Quando as brotações atingiram 3 cm de comprimento, foram transferidas para o meio de enraizamento (meio basal MS com reduzida concentração de sacarose, 1% e 1,14  $\mu\text{M}$  de AIA). A utilização deste sistema de regeneração em estudos adicionais de transformação genética de guandu via biobalística foi demonstrado, onde 50% das plantas selecionadas mostraram a integração e expressão do gene utilizado (Dayal et al., 2003).

Um protocolo de regeneração via organogênese direta de plantas de guandu 'ICPL 93115' foi desenvolvido por Yadav e Padmaja (2003). Segmentos foliares (0,5-1,0 cm) foram obtidos de plântulas com 10 dias de idade e plaqueados com a face abaxial voltada para o meio de cultura. O meio de cultura utilizado foi composto por sais e vitaminas MS, e BAP em diferentes concentrações. O número máximo de brotações por explante (16,5) foi obtido quando estes foram incubados em meio suplementado com 22,2  $\mu\text{M}$  de BAP.

Sharma et al. (2006) desenvolveram um método eficiente para a obtenção de plantas transgênicas de guandu ao incorporar o gene *cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis* no genoma da planta pela transformação genética mediada por *Agrobacterium*. O protocolo de regeneração *in vitro* obtido se baseou na formação de brotações adventícias via organogênese direta na região do nó cotiledonar de plântulas germinadas *in vitro*. Isso foi possível com a utilização do meio MS suplementado com elevada concentração de BAP (22,0  $\mu\text{M}$ ) o que possibilitou a supressão das gemas pré-existentes nessa região e formação de novas brotações via organogênese. Esse tratamento possibilitou uma frequência de resposta de 85,7%. Entre os transformantes putativos selecionados no meio de indução, 60% deles mostraram ser positivos com relação à integração do gene. De acordo com os autores, a obtenção desse protocolo oferece imenso potencial de obtenção de plantas transgênicas do cultivar 'ICPL87'.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivos:

- avaliar o efeito das citocininas BAP e TDZ na indução de brotações adventícias a partir de embriões zigóticos maduros de guandu;
- avaliar o efeito das citocininas BAP e TDZ sozinhas e em combinação com  $\text{AgNO}_3$  na indução de brotações adventícias a partir de segmentos de epicótilo de plântulas de guandu germinadas *in vitro*;
- e caracterizar anatomicamente a organogênese *in vitro* em guandu, visando localizar as áreas meristemáticas bem como os tecidos que dão origem as gemas adventícias.

### 3. Referências Bibliográficas

BELTRAME, T. P., RODRIGUES, E. **Feijão guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) na restauração de florestas tropicais**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 28, n. 1, p. 19-28, jan/mar. 2007. Disponível em: <[http://www.uel.br/proppg/semina/pdf/semina\\_28\\_1\\_19\\_3.pdf](http://www.uel.br/proppg/semina/pdf/semina_28_1_19_3.pdf)>. Acesso em: 18 jan. 2008.

BENSON, E. E. In vitro plant recalcitrance: an introduction. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 36: 141-148, 2000.

BIRCH, R.G. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 48:297-326, 1997.

BONGA, J. M.; VON ADERKAS, P. **In vitro culture of trees**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. 236p.

BRUM, G. R.; SILVA, A. B. da; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, 1403-1409, 2002.

BURRIT, D. J.; LEUNG, D. W. M. Organogenesis in cultured petiole explants of *Begonia X erythrophylla*: the timing and specificity of the inductive stimuli. **Journal of Experimental Botany**, 47: 557-567, 1996.

CHOI, H-K., MUN, J-H., KIM, D-J., ZHU, H., BAEK, J-M., MUDGE, J., ROE, B., ELLIS, N., DOYLE, J., KISS, G. B., YOUNG, N. D. & COOK, D. R. Estimating genome conservation between crop and model legume species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 43: 15289-15294, 2004.

CHRISTOU, P. Biotechnology applied to grain legumes. **Field Crops Research**, 53: 83-97, 1997.

COENEN, C.; LOMAX, T. L. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. **Trends in Plant Science**, 9: 351-356, 1997.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia Press, 1981. 1262 p.

DAYAL, S.; LAVANYA, M.; DEVI, P.; SHARMA, K. K. An efficient protocol for shoot regeneration and genetic transformation of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] using leaf explants. **Plant Cell Reports**, 21: 1072-1079, 2003.

EAPEN, S.; TIVAREKAR, S.; GEORGE, L. Thidiazuron-induced shoot regeneration in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 53: 217-220, 1998.

FAOSTAT: FAO agriculture database. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em:

< <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>>. Acesso em: 15 nov. 2008.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicação da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.;

FRANKLIN, G.; JEYACHANDRAN, R.; IGNACIMUTHU, S. Factors affecting regeneration of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) from mature embryonal axes. **Plant Growth Regulation**, 30: 31-36, 2000.

FULLER, D. D.; HARVEY, E. L. The archeobotany of Indian pulses: identification, processing and evidence for cultivation. **Environmental Archeology**, 11: 219-246, 2006.

GAHAN, P.B., GEORGE, E. F. Adventitious regeneration. In: GEORGE, F. E.; HALL, M. A., de KLERK, J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture – The Background**. 3. ed. Springer, 2008. v.1, p. 355-402.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, 50: 151-158, 1968.

GEORGE, L; EAPEN, S. Organogenesis and embryogenesis from diverse explants in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). **Plant Cell Reports**, 13: 417-420, 1994.

GODOY, C. Embrapa Soja divulga balanço sobre a ferrugem na safra 2007/08. Notícias Embrapa Soja, publicação online. Disponível em:

[http://www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver\\_noticia.php?cod\\_noticia=469&desl=1](http://www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver_noticia.php?cod_noticia=469&desl=1)

Acesso em: 08 out. 2008.

GODOY, R.; BATISTA, L. A. R.; NEGREIROS, G. F.; CARVALHO, J. R. P. Avaliação agronômica e seleção de germoplasma de guandu forrageiro (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) proveniente da Índia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 26: 447-453, 1997.

HARTMAN, G. L.; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D. Breeding for resistance to soybean rust. **Plant Disease**, 89: 664-666, 2005.

HOUÉROU, L. *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Gbase/data/Pf000150.HTM>>. Acesso em: 23 jan. 2008.

LAWRENCE, P. K.; KOUNDAL, K. R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) and molecular analysis of regenerated plants. **Current Science**, 80: 1428-1432, 2001.

MACHACOVA, I.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E. F. Plant growth regulators I: Introduction; Auxins, their analogues and inhibitors. In: GEORGE, F. E.; HALL, M.

A., de KLERK, J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture – The Background**. 3. ed. Springer, 2008. v.1, p. 175-204.

MISRA, P. Direct differentiation of shoot buds from leaf explants of *Cajanus cajan* L. **Biologia Plantarum**, 45: 347-351, 2002.

MOHAN, M. L.; KRISHNAMURTHY, K. V. Plant regeneration in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] by organogenesis. **Plant Cell Reports**, 17: 705-710, 1998.

MOK, M. C.; MARTIN, R. C.; MOK, D. W. S. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 36: 102-107, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.

NENE, Y.L.; SHEILA, V.K. Pigeonpea: geography and importance. In: NENE, Y.L.; HALL, S.D.; SHEILA, V.K., ed. **The Pigeonpea**. Cambridge: CAB International/ICRISAT, 1990. p. 1-14.

NEWELL, C. A. Plant transformation technology: Developments and applications. **Molecular Biotechnology**, 16: 53-65, 2000.

NOGUEIRA, S. R. **Resistência de plantas hospedeiras e identificação de genes diferencialmente expressos na interação Soja - *Phakopsora pachyrhizi***. Viçosa, MG: UFV, 2007, 110 f.: il. (Tese Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

POLOWICK, P. L.; BALISKI, D.S.; MAHON, J. D. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.): gene integration, expression and inheritance. **Plant Cell Reports**, 23:485-491, 2004.

PRESCOTT, A.; BRIDDON, R.; HARWOOD, W. Plant transformation. **Molecular Biomethods Handbook**. Humana Press, 1998. v. 1, p. 251-269.

RAO, S. C.; COLEMAN, S. W.; MAYEUX, H. S. Forage production and nutritive value of selected pigeon pea ecotypes in the southern Great Plains. **Crop Science**, 42: 1259-1263, 2002.

RATNAPARKHE, M. B.; GUPTA, V. S. Pigeon pea. **Pulses, Sugar and Tuber Crops**. Springer Berlin Heidelberg, 2007. v. 1, p. 133-145.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHORN, S. E. (Eds.). **Biology of plants**. New York: Worth Publications, 1992, 724 p.

ROMMENS, C. M. T.; SALMERON, J. M.; OLDROYD, G. E. D.; STASKAWICZ, B. J. Intergeneric transfer and functional expression of the tomato disease resistance gene *Pto*. **The Plant Cell**, 7: 1537-1544, 1995.

ROSA, J. **Seleção de genótipo de guandu para resistência a *Macrophomina phaseolina* e esporulação do fungo.** Unesp, 2006, 60 p. (Dissertação Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, SP, 2006.

SAINI, R.; JAIWAL, P. K. Transformation of a recalcitrant grain legume, *Vigna mungo* L. Hepper, using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to shoot apical meristem cultures. **Plant Cell Reports**, 24: 164-171, 2005.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology.** 4 ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992, 682 p.

SANTOS, C. A. F.; MENEZES, E. A.; ARAÚJO, F. P. de. Introdução, coleta e caracterização de recursos genéticos de guandu para produção de grãos e forragem. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Org.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro.** 1a ed. Petrolina: Embrapa Semi-árido, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/index.html>>. Acesso em: 22 jan. 2008.

SATYAVATHI, V. V.; PRASAD, V.; SHAILA, A. M. S.; SITA, G. L. Expression of hemagglutinin protein of Rinderpest virus in transgenic pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] plants. **Plant Cell Reports**, 21: 651-658, 2003.

SAXENA, K. B.; SINGH, L.; GUPTA, M. D. Variation for natural out-crossing in pigeonpea. **Euphytica**, 46: 143-148, 1990.

SCHNEIDER, R. W.; HOLLIER, C. A.; WHITAM, H.K. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the Continental United States. **Plant Disease**, 89: 774, 2005.

SHARMA, K. K.; LAVANYA, M.; ANJIAH, V. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) expressing the synthetic BT cry1Ab gene. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 42: 165, 173, 2006.

SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L. Soybean rust. In: HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B. & RUPE, J. C. (Eds.). **Compendium of soybean diseases.** 4. ed. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society. p. 25-26, 1999.

SINGH, N. D.; SAHOO, L.; SARIN, N. B.; JAIWAL, P. K. The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.). **Plant Science**, 164: 341-347, 2003.

SOUZA, F. H. D.; FRIGERI, F.; MOREIRA, A.; GODOY, R. **Produção de sementes de guandu.** Documentos 69. 1ª Edição. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. Disponível em: <<http://www.cppse.embrapa.br/servicos/publicacao gratuita/documentos/Documentos 69pdf/view>>. Acesso em: 18 jan. 2008.

- STOKSTAD, E. Plant pathologists gear up or battle with dread fungus. **Science**, 306: 1672-1673, 2004.
- SUGIYAMA, M. Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**, 2: 61-64, 1999.
- TAI, T. H.; DAHLBECK, D. K.; CLARK, E. T.; GAJIWALA, P.; PASION, R.; WHALEN, M. C.; STALL, R. E.; STASKAWICZ, B. J. Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 96: 14153-14158, 1999.
- THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Eds.). **Micropropagation, technology and application**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.311-336.
- VAN STANDEN, J.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E. F. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. In: GEORGE, F. E.; HALL, M. A., de KLERK, J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture – The Background**. 3. ed. Springer, 2008. v.1, p. 205-226.
- YADAV, P. B. S.; PADMAJA, V. Shoot organogenesis and plantlet regeneration from leaf segments of pigeonpea. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 73: 197-200, 2003.
- YANG, X. B.; TSCHANZ, A. T.; DOWLER, W. M.; WANG, T. C. Development of yield loss models in relation to reductions of components of soybeans infected with *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, 81: 1420-1426, 1991.
- YEH, C. C.; SINCLAIR, J. B.; TSCHANZ, A. T. *Phakopsora pachyrhizi*: Uredial development, uredospore production and factors affecting teliospore formation on soybeans. **Australian Journal of Agricultural Research**, 33: 25-31, 1982.
- YORINORI, J. T.; YORINORI, M. A.; GODOY, C. V. Seleção de cultivares de soja resistentes à ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*). **Anais, XXX Reunião Sul de Soja da Região Sul**. Cruz Alta, RS. p. 94, 2002.
- ZIV, M. Developmental and structural patterns of *in vitro* plants. In: SOH, W. Y.; BHOJWANI, S. S. (Eds.). **Morphogenesis in plant tissue cultures**. London: Kluwer Academic Publishers, 1999. p.235-253.

## CAPÍTULO 1

### Indução de brotações adventícias a partir de embriões zigóticos maduros de feijão guandu (*Cajanus cajan* L. Millsp.) por BAP e TDZ

#### 1. Introdução

O guandu (*Cajanus cajan* L) é uma das principais leguminosas cultivada nos trópicos e subtropicais, sendo frequentemente citada como uma espécie de múltiplo uso (Godoy et al., 1997; Rao et al., 2002; Souza et al., 2007). Recentemente, foi relatada a suscetibilidade do guandu a *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem asiática da soja e, diferentemente do que é verificado na soja, genótipos de guandu resistentes ao isolado deste fungo foram identificados (Nogueira, 2007). Neste contexto, a utilização do guandu como “planta modelo” em estudos que envolvam a identificação e isolamento de genes candidatos que possam conferir resistência à ferrugem asiática da soja se torna possível, sendo o estabelecimento de um protocolo de regeneração *in vitro* um pré-requisito para trabalhos dessa natureza.

O sistema de regeneração via organogênese em feijão guandu, tem sido estudado por muitos autores, e diversos cultivares foram testados quanto a sua capacidade de regeneração a partir de inúmeras fontes de explantes como cotilédones (Mohan e Krishnamurthy, 1998), eixo embrionário (Franklin et al., 2000; Lawrence e Koundal, 2001; Mohan e Krishnamurthy, 2003; Satyavathi et al., 2003; Surekha et al., 2005), segmentos foliares (Eapen et al., 1998; Yadav e Padmaja, 2003; Misra, 2002; Dayal et al., 2003) e nó-cotiledonar (Shiva-prakash et al., 1994; Singh et al., 2003; Thu et al., 2003; Sharma et al., 2006). As respostas obtidas nesses trabalhos variaram em função do material genético (diferentes cultivares), da fonte de explante, bem como o meio de cultura utilizado suplementado com diferentes fitorreguladores e suas diferentes concentrações e/ou combinações.

Em trabalhos visando a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* a partir de eixos embrionários de *Cajanus cajan* (Franklin et al., 2000; Lawrence e Koundal, 2001; Mohan e Krishnamurthy, 2003; Satyavathi et al., 2003; Surekha et al., 2005), *Cicer arietinum* L. (Fontana et al., 1993; Polowick et al., 2004), *Glycine max* (Liu et al., 2004), *Vigna mungo* (Saini e Jaiwal, 2005), *Vigna unguiculata* (Ivo et al., 2008), os autores relataram o potencial desse explante em comparação a outros como nó cotiledonar, folhas, hipocótilos e cotilédones.

Das várias classes de reguladores de crescimento conhecidas, as auxinas e citocininas são, sem dúvida, as mais importantes na regulação do crescimento e da morfogênese na cultura de células, tecidos e órgãos vegetais (Bonga e Von Aderkas, 1992; van Staden et al., 2008).

As citocininas naturais bem como as muitas sintéticas, contêm na posição N<sup>6</sup> um radical adenínico como é o caso do BAP, uma citocinina sintética que parece ser a mais adequada para a multiplicação de parte aérea, indução de gemas adventícias e formação de brotos (Grattaplagia e Machado, 1998). Diversos trabalhos com leguminosas corroboram com esta afirmação, onde a utilização do BAP possibilitou a regeneração de brotações em *Cajanus cajan* (Shiva-prakash et al., 1994; Satyavathy et al., 2003; Yadav e Padmaja, 2003; Thu et al., 2003; Surekha et al., 2005; Sharma et al., 2006), *Cicer arietinum* (Polissety et al., 1997; Polowick et al., 2004), *Glycine max* (Dan e Reichert, 1998; Olhoft et al., 2003; Paz et al., 2004 e 2006; Shan et al., 2005; Hong et al., 2007), *Vigna mungo* (Saini e Jaiwal, 2002 e 2005) e *Vigna unguiculata* (Ivo et al., 2008).

O TDZ também tem mostrado grande capacidade em estimular a formação de brotações adventícias em diferentes espécies de leguminosas, como em *Arachis hipogaea* (Kanyand et al., 1994), *Cajanus cajan* (Eapen et al., 1998; Singh et al., 2003), *Cicer arietinum* (Malik e Saxena, 1992a), *Glycine max* (Keneda et al., 1997; Yoshida, 2002), *Lens culinaris* (Malik e Saxena, 1992a), *Phaseolus angularis* (Mohamed et al., 2006), *Phaseolus vulgaris* (Malik e Saxena, 1992b; Mohamed et al., 1992; Carvalho et al., 2000), *Pisum sativum* (Malik e Saxena, 1992a), e *Vigna mungo* (Das et al., 1998).

Desta maneira, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de BAP e TDZ (isoladamente ou em combinação) na indução de gemas adventícias a partir de eixos embrionários maduros dos cultivares comerciais de feijão guandu, Anão e Fava Larga.

## 2. Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais do Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

### 2.1. Material vegetal

Como material vegetal foram utilizadas sementes de cultivares comerciais de feijão guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.), Anão e Fava Larga, identificadas como suscetíveis a *Phakopsora pachyrhizi* por Nogueira (2007). As sementes foram obtidas da empresa Prósementes<sup>®</sup>, Araçatuba-SP, dada a necessidade de se ter muitas sementes para a realização dos experimentos.

O cultivar Anão (IAPAR-43) foi obtido através de ciclos de seleção massal em população anã precoce proveniente da Colômbia e introduzida no Brasil através do Centro Nacional de Pesquisa em Arroz e Feijão, da EMBRAPA. O ciclo até o florescimento é de 90 a 120 dias quando a semeadura efetuada em outubro, e as plantas podem atingir de 1,00 a 1,20 m de altura. Foi desenvolvido para a produção de grãos de alto valor nutritivo, sendo utilizado com sucesso na alimentação de aves ou em forma de forragem para bovinos e ainda, na alimentação humana equivalendo nutricionalmente ao feijão comum.

O cultivar Fava Larga (IAC- Fava Larga) é resultante de seleção massal efetuada em diversos cultivares no período 1982-1985, em material introduzido na então Seção de Leguminosas do Instituto Agrônomo desde 1953, com avaliações regionais em Campinas, Ribeirão Preto e Pindorama. Possui o ciclo longo (280 dias até 1ª colheita na semeadura efetuada em outubro), podendo as plantas atingir até 3,0 m de altura. Pode ser utilizado na alimentação humana (grãos verdes ou secos) e animal (pastagem no inverno para forragem ou feno, grãos), quebra-ventos ou para sombreamento temporário de cultivos perenes.

#### 2.1.1. Obtenção dos explantes

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% (v/v) durante 2 minutos e, em seguida, foram

imersas em hipoclorito de sódio comercial puro (Super Globo, Brasil) por 20 minutos, enxaguadas 8 vezes em água deionizada e autoclavada. Por fim, as sementes foram embebidas em água estéril por um período de aproximadamente 16 h em regime de escuro à temperatura de  $27 \pm 2$  °C.

Após o período de embebição, as sementes tiveram o tegumento retirado e os embriões foram cuidadosamente isolados dos cotilédones (Figura 1A) com auxílio de lupa binocular (ZEISS®) e bisturi sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar. Os embriões foram cortados transversalmente acima da região referente ao nó cotiledonar e abaixo da plúmula, obtendo-se dessa forma o explante denominado neste trabalho de eixo embrionário decapitado. A extremidade mais próxima à radícula foi chamada de extremidade proximal, e a mais distante (próxima à plúmula) de extremidade distal (Figura 1B).

## 2.2. Meios de cultura e condições de cultivo

Os explantes foram inoculados em placas de Petri estéreis de poliestireno cristal de 90 x 15 mm (J. Prolab, Brasil) contendo 25 mL de meio básico composto por sais e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 6,5 g L<sup>-1</sup> de ágar Merck® como agente gelificante.

Com o objetivo de avaliar o efeito das citocininas BAP e TDZ na indução de gemas adventícias, foram testadas as concentrações de 2,22 µM e 4,44 µM de BAP, e 2,27 µM e 4,54 µM de TDZ (isoladamente ou em combinação) (Quadro 1). Como controle foi utilizado o meio MS basal sem a adição de reguladores de crescimento, totalizando assim 6 meios de cultivo testados. O pH foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  seguido de autoclavagem (121 °C, 1,5 atm de pressão, por 20 minutos). Após a inoculação dos explantes, as placas foram seladas com duas voltas de filme PVC (Rolopac®).

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, à temperatura de  $27 \pm 2$  °C sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, irradiância de  $\pm 52$  µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> provida por lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram®, Brasil).

**Quadro 1** - Combinações das concentrações de BAP e TDZ utilizadas na indução de gemas adventícias a partir de eixos embrionários maduros decapitados de feijão guandu (*Cajanus cajan*).

Meios de cultura	Combinações	
	BAP ( $\mu\text{M}$ )	TDZ ( $\mu\text{M}$ )
0	0	0
1	2,22	0
2	2,22	4,54
3	2,22	2,27
4	4,44	2,27
5	0	2,27

A fonte de explante bem como as citocininas e as respectivas concentrações testadas foram tomadas com base em trabalhos preliminares.

### 2.3. Condução e avaliações experimentais

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 6 (2 cultivares x 6 meios de cultivo) totalizando 12 tratamentos. Foram utilizadas 5 repetições por tratamento, e 12 explantes por repetição, totalizando assim 60 explantes por tratamento. A posição original do explante foi mantida com intuito de se avaliar a resposta morfogênica nas extremidades proximal e distal de cada explante.

Uma análise morfológica foi realizada, com base em observações visuais (coloração e textura dos calos), aos 7 e 30 dias de cultivo. Ao final de 30 dias, avaliaram-se a presença de calo (expresso em percentual), e o número de raízes e brotações formadas em ambas as extremidades de todos os explantes. Quanto ao número de brotações formadas, atribuiu-se notas, sendo nota 0 para os explantes onde não houve formação de brotação, nota 1 para os explantes que tiveram de 1 a 5 brotações formadas, nota 2 para os explantes que tiveram de 6 a 10 brotações, e nota 3 para aqueles que tiveram formação de mais de 10 brotações por explantes. Avaliou-se ainda a presença de contaminação e de explantes sem reação (ambos expressos em termos percentuais totais). As observações visuais foram realizadas, mediante auxílio de lupa binocular (ZEISS®).

Os dados obtidos das variáveis, número de raízes e brotações formadas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de comparação de médias Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Para análise dos dados utilizou-se o programa estatístico Genes (Cruz, 2006).

#### 2.4. Histologia

Com o objetivo de se confirmar a ocorrência do processo organogênico e identificar os tecidos que deram origem às gemas adventícias, regiões dos explantes onde houve a formação das gemas foram isoladas, fixadas em solução de Karnovsk (Karnovsk, 1965) por um período de 72 horas. As amostras foram desidratadas em série etílica crescente, infiltradas em metacrilato (Historesin, Leica) segundo as recomendações do fabricante.

Seções longitudinais de 7  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidas das amostras utilizando-se micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 - Leica), equipado com navalhas de vidro. Os cortes foram corados com azul de toluidina pH 4,0 (O'Brien e McCully, 1981) por 10 minutos e motados em resina sintética Permount<sup>®</sup>. O explante no tempo zero também foi submetido ao processo descrito acima de modo a confirmar a ausência de gemas pré-existentes no mesmo.

As observações e a obtenção das imagens foram realizadas em fotomicroscópio Olympus AX70 com sistema U-photo, câmera e microcomputador com o software Spot-Basic.

### 3. Resultados

#### 3.1. Efeito dos meios de cultura nas respostas morfogênicas

Na primeira semana de cultivo, observou-se acentuado intumescimento da maioria dos explantes, sobretudo na extremidade proximal, quando cultivados em meio de cultura acrescido de citocinina (independente das concentrações testadas), e estes apresentaram coloração verde claro (Figuras 1C-D). Nesse mesmo período houve a formação de raízes apenas na extremidade proximal da maioria dos explantes cultivados no meio controle (sem adição de fitorreguladores) (Figuras 1E-F).

Ao final de 30 dias de cultivo, a formação de raízes se manteve restrita aos explantes cultivados em meio MSØ e na extremidade proximal. Não houve diferença significativa com relação ao número de raízes formadas entre os cultivares testados ( $F= 0,2278$ ,  $P= 100,0$ ) (Tabela 1a, anexo).

Nos explantes cultivados em meio MS acrescido de citocininas, de maneira geral, independente da concentração de BAP e/ou TDZ testadas, observou-se intensa formação de calo na extremidade proximal e em elevados percentuais, variando de 90 a 93,3%, para o cultivar Anão, e de 91,7 a 95 %, para o cultivar Fava Larga (Figura 2A). Os valores percentuais maiores (93,3 e 95%) foram obtidos quando os explantes foram cultivados em meio MS suplementado com 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP + 4,54  $\mu\text{M}$  de TDZ (Figura 2A). O calo formado nessas condições apresentou textura predominantemente compacta, coloração verde claro e presença de algumas regiões brancas de aspecto esponjoso (Figuras 4A, C, E, I e 5A, I). Por outro lado, na ausência de reguladores no meio de cultivo, a formação de calo nessa mesma região, foi observada em valores percentuais bem menores (21,7 e 28,3% para os cultivares Anão e Fava Larga, respectivamente) (Figura 2A).

No que se refere à formação de calo na extremidade distal, essa ocorreu também nos explantes cultivados em meio com citocinina, mas em percentuais bem menores quando comparados àqueles obtidos na extremidade proximal. Para a extremidade distal nestas condições, os percentuais variaram de 13,3 a 28,3% para o cultivar Anão e de 13,3 a 40% para o Fava Larga (Figura 2B). Os meios de cultivo que proporcionaram maior número de explantes com calogênese nessa extremidade foram os acrescidos somente com 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP ou 2,27  $\mu\text{M}$  de TDZ para o

cultivar Anão (ambos com 28,3%), e o meio suplementado apenas com 2,27  $\mu\text{M}$  de TDZ, para o cultivar Fava Larga (40%) (Figura 2B). Em contrapartida, não se observou calogênese nessa extremidade quando os explantes dos dois cultivares foram cultivados em meio controle (Figura 2B).

Com relação à indução de brotações, essas se formaram apenas na extremidade distal dos explantes cultivados em meio MS provido de reguladores de crescimento (BAP e/ou TDZ em todas as combinações testadas), de ambos os cultivares, não havendo formação das mesmas no meio controle.

Não houve efeito significativo da interação entre os cultivares e os meios de cultura testados, não havendo também diferença significativa entre os cultivares em relação formação de brotações ( $F= 0,9524$ ,  $P= 100,0$  e  $F= 8,7873$ ,  $P= 0,0047$  respectivamente) (Tabela 2, anexo). Por outro lado, os meios de cultura proporcionaram diferenças significativas quanto ao número de brotações formadas ( $F= 49,1163$ ,  $P= 0$ ) (tabela 2, anexo). Tanto para o cultivar Fava Larga quanto para o Anão o meio de cultura acrescido de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP + 2,27  $\mu\text{M}$  de TDZ possibilitou a formação de maior número de brotações por explante. Vale ressaltar que, nesse meio, a média das notas atribuídas aos explantes do cultivar Fava Larga foi superior àquela atribuída ao cultivar Anão (1,47 e 1,13, respectivamente); e para o cultivar Anão este mesmo meio não diferiu estatisticamente do meio com adição de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP + 4,54  $\mu\text{M}$  de TDZ (Figura 3).

A adição de apenas BAP ou TDZ nas concentrações de 2,22 e 2,27  $\mu\text{M}$  respectivamente, proporcionaram a formação de menor número de brotações por explante, não diferindo entre si estatisticamente nos dois cultivares testados (Figura 3).

Com relação à caracterização visual das brotações formadas, apesar da combinação de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP + 2,27  $\mu\text{M}$  de TDZ ter proporcionado a formação de múltiplas brotações, essas apresentaram tamanho muito reduzido (Figuras 4G e 5G), o que não foi desejável na etapa seguinte do processo de regeneração. As demais combinações entre BAP e TDZ também proporcionaram a formação de brotações com aspecto semelhante (Figuras 4C, 4E, 5C e 5E) ao contrário daquelas formadas em meio acrescido apenas de BAP (2,22  $\mu\text{M}$ ) ou TDZ (2,27  $\mu\text{M}$ ), que apresentaram folhas mais expandidas (Figuras 4A, 4I, 5A e 5I).

De acordo com a Figura 6 pode-se concluir que a adição de BAP (2,22  $\mu\text{M}$ ) proporcionou maior frequência de explantes que formaram brotações (56,7% para o

cultivar Anão e 61,7% para o cultivar Fava Larga), seguido pelo meio acrescido de 2,27  $\mu\text{M}$  de TDZ (48,3 e 55% para os cultivares Anão e Fava Larga, respectivamente).

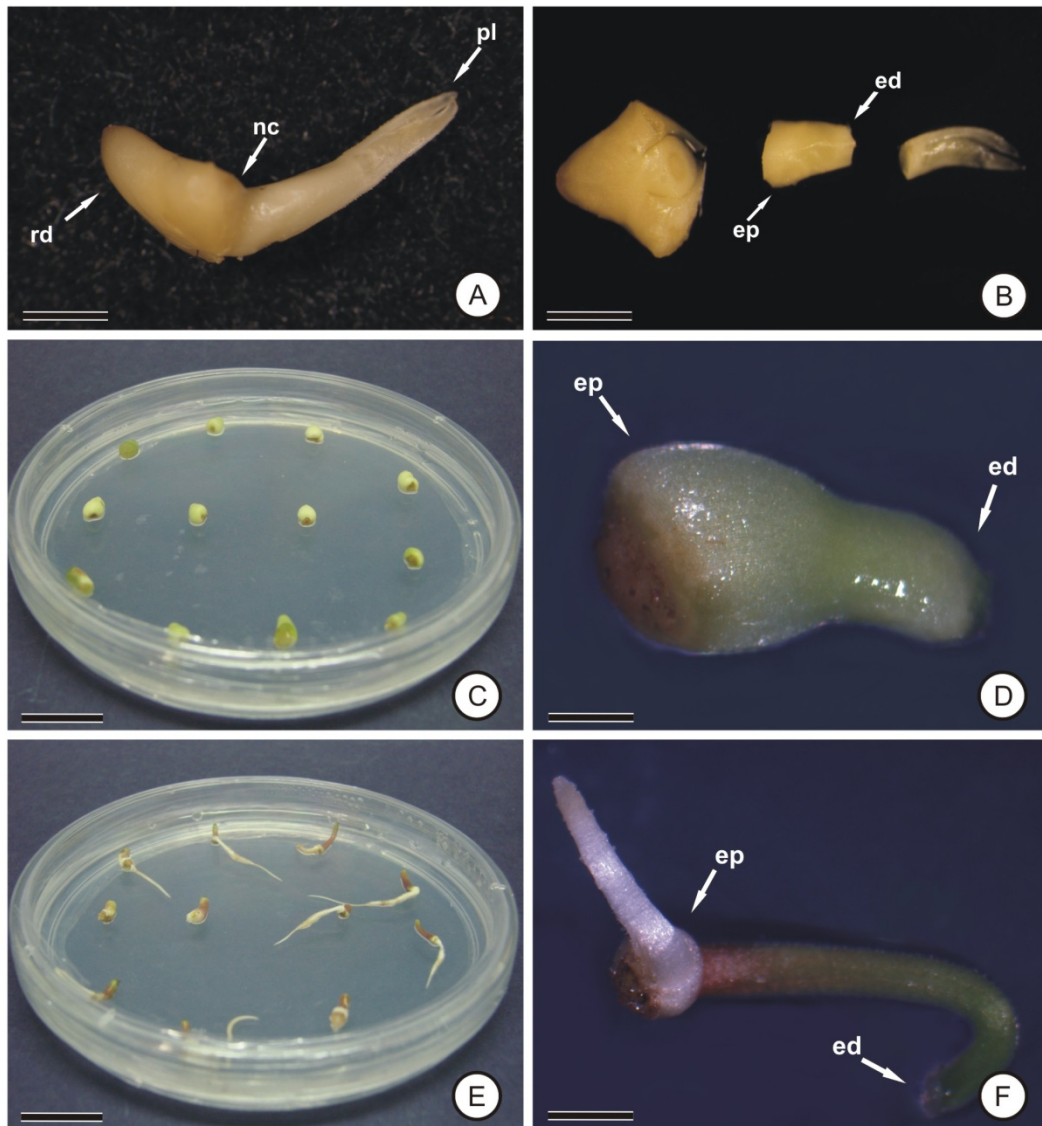
O número de explantes contaminados e sem resposta foi expresso em termos percentuais totais, uma vez que estas observações não foram em função dos meios de cultura testados. Esses percentuais apresentaram valores baixos nos dois cultivares (Figuras 7A-B). A contaminação encontrada foi bacteriana e os explantes considerados sem resposta apresentaram-se totalmente oxidados. Para a maioria dos explantes, independente do meio de cultivo, observou-se também oxidação nas extremidades dos mesmos em contato com o meio.

### 3.2. Histologia

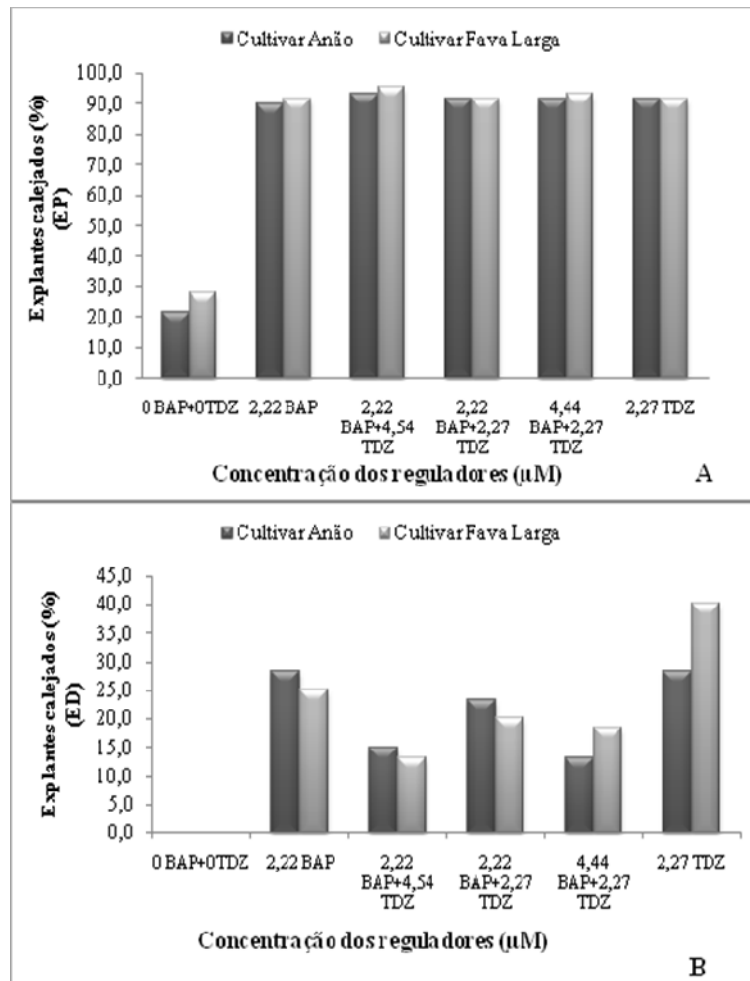
A análise histológica do explante de origem (tempo zero) possibilitou a confirmação da ausência de gemas pré-existentes em ambas as extremidades proximal e distal (Figura 8A). Essa análise permitiu concluir que as múltiplas brotações formadas no extremo distal, foram geradas *de novo* pela ação dos fitorreguladores.

As análises histológicas realizadas nos explantes cultivados nos diferentes meios de indução confirmaram a ocorrência da diferenciação de meristema apical de parte aérea, com gema apical e primórdios foliares bem definidos independente da combinação de fitorreguladores testada (Figuras 4B, D, F, H, J e 5B, D, F, H, J). Em ambos os cultivares, observou-se que a diferenciação das brotações ocorreu a partir do tecido vascular do material de origem (procâmbio), sem a formação de calo, caracterizando dessa forma um processo de regeneração direta. A partir dessas análises pôde-se observar que a diferenciação das gemas seguiu o padrão típico de organogênese, apresentando continuidade vascular com o tecido de origem, confirmando assim sua origem adventícia (Figura 8B).

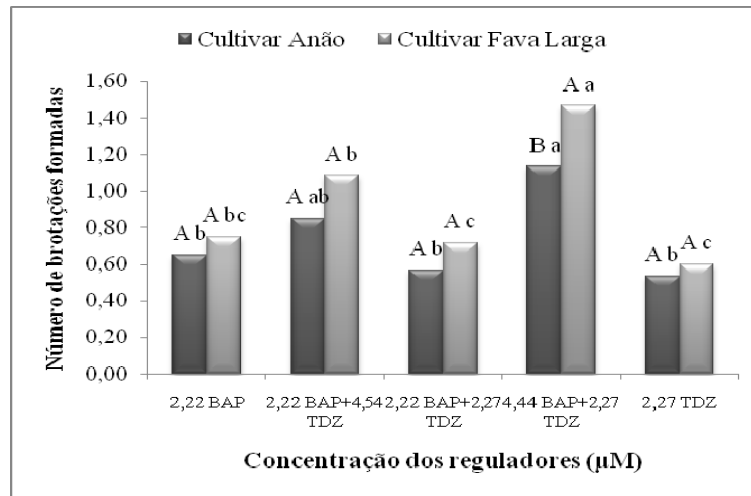
As células meristemáticas formadas apresentaram padrão característico: tamanho pequeno, isodiamétricas, paredes delgadas, citoplasma denso e núcleo proeminente (Figura 8C). A diferenciação dos tecidos nos primórdios foliares é apresentada na Figura 8D, onde se observa a formação da epiderme, parênquima clorofiliano, tecido vascular e estômatos, bem como a presença de tricomas.



**Figura 1.** Resposta morfogênica de explantes embrionários de *Cajanus cajan* L. cultivados *in vitro*. **A** – Embrião zigótico maduro utilizado como explante. rd: radícula; nc: nó cotiledonar; pl: plúmula (Barra = 1,5 mm); **B** – Detalhe do explante seccionado. ep: extremidade proximal; ed: extremidade distal (Barra = 1,5 mm). **C** – Explantes após uma semana de cultivo em meio contendo citocinina independente da combinação testada (Barra = 15 mm). **D** – Explante intumescido na extremidade proximal após uma semana de cultivo em meio contendo citocinina independente da combinação testada. ep: extremidade proximal; ed: extremidade distal (Barra = 4 mm). **E** - Explantes após uma semana de cultivo em meio controle (Barra = 15 mm). **F** – Formação de raiz na extremidade proximal após uma semana de cultivo em meio controle. ep: extremidade proximal; ed: extremidade distal (Barra = 4 mm).

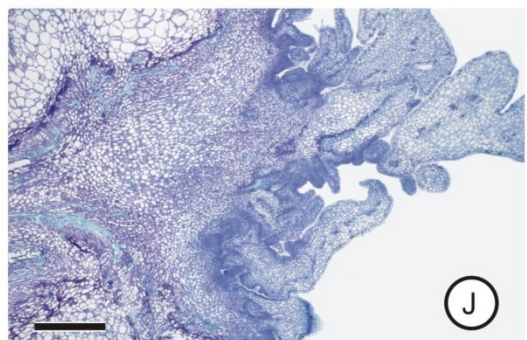
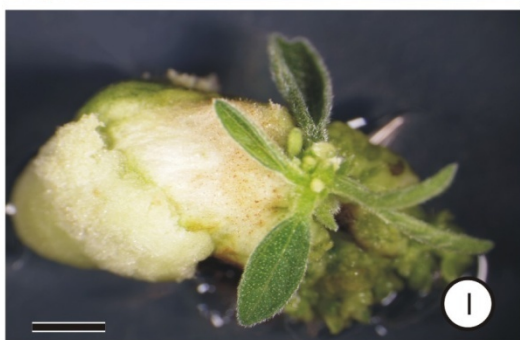
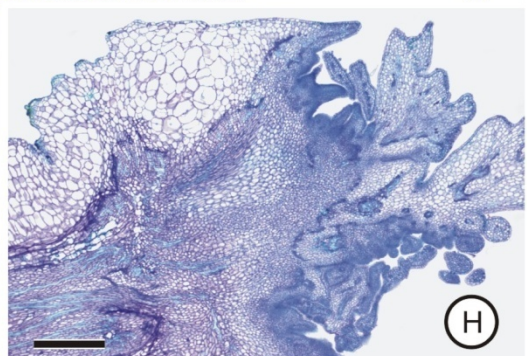
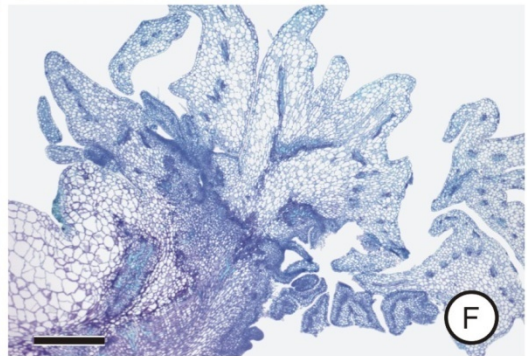
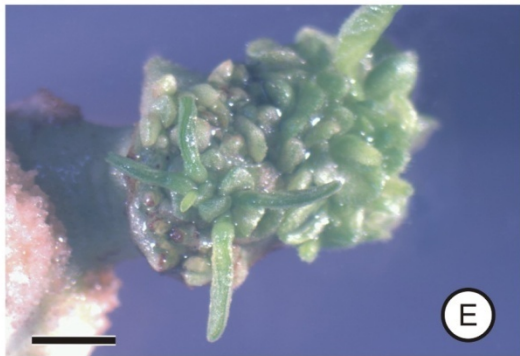
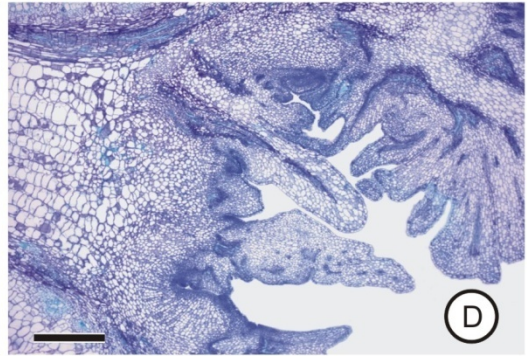
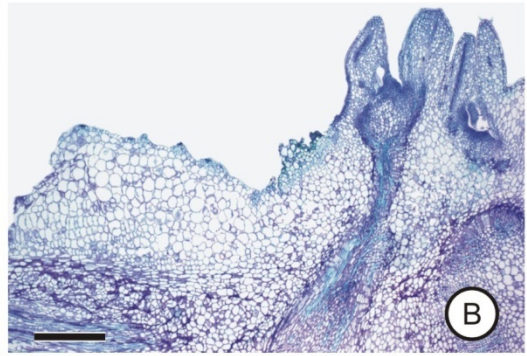
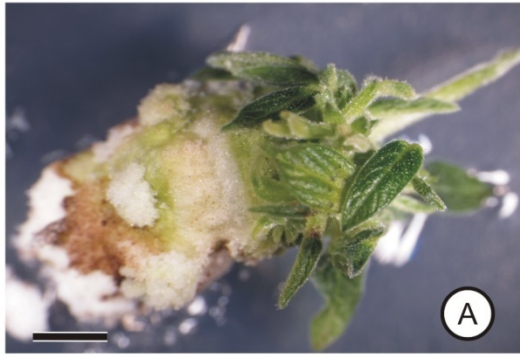


**Figura 2.** Calogênese em eixos embrionários decapitados de *C. cajan* (cultivares Anão e Fava Larga) cultivados em diferentes meios. (A) Extremidade proximal (EP); (B) Extremidade distal (ED). Valores expressos em termos percentuais.

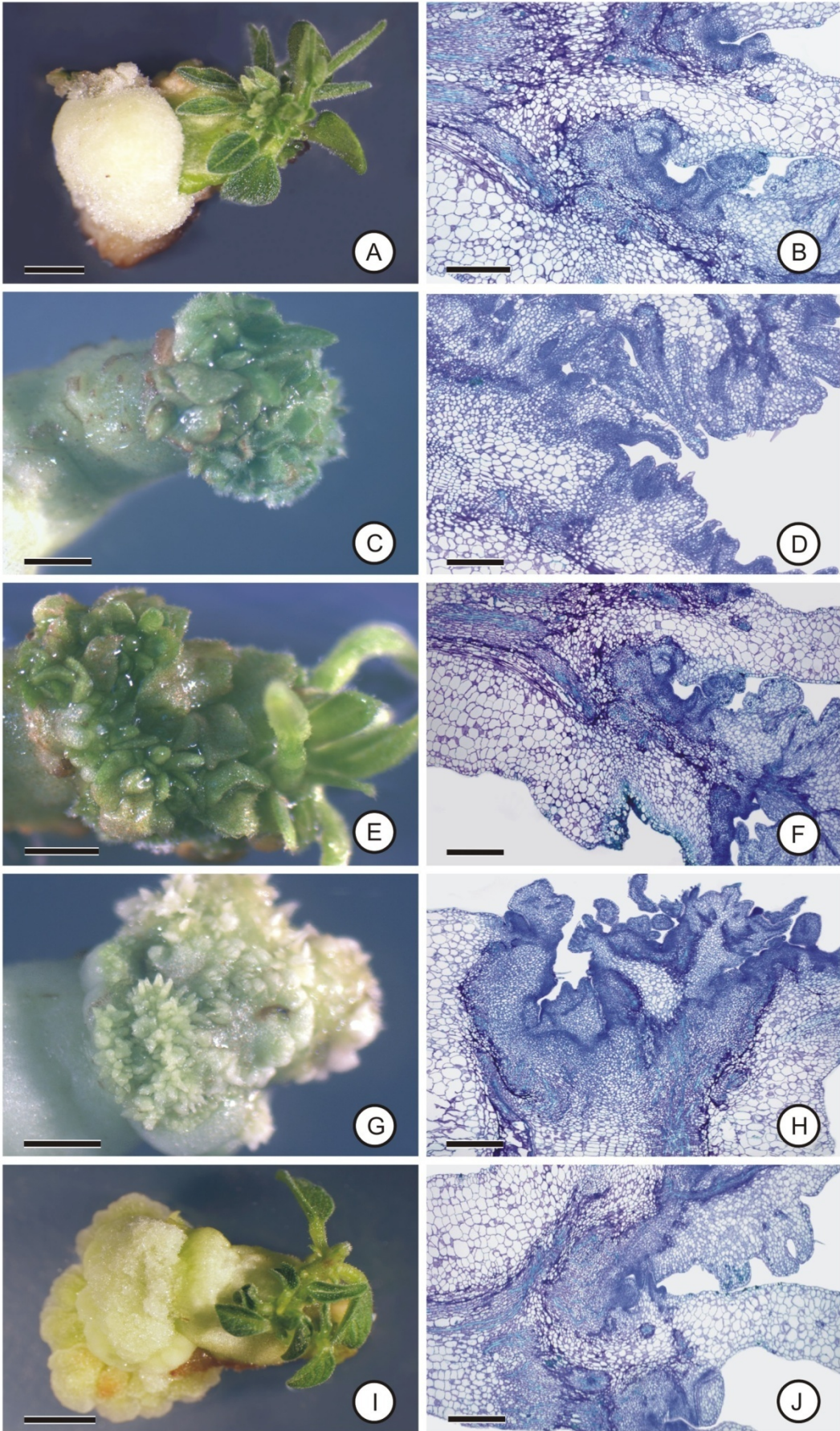


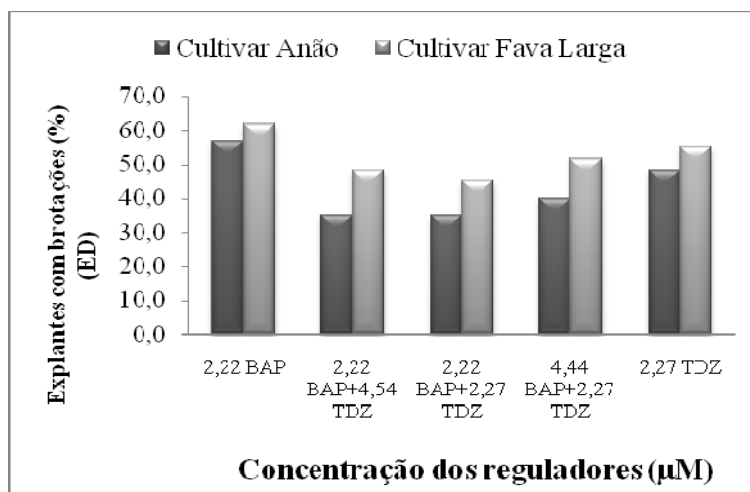
**Figura 3.** Formação de brotações na extremidade distal de eixos embrionários decapitados de *C. cajan* (cultivares Anão e Fava Larga) cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP e TDZ. Para cada cultivar, as médias seguidas de uma mesma letra minúscula, dentro de cada tipo de meio de cultivo testado, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Entre os cultivares, as médias seguidas de uma mesma letra maiúscula, dentro de cada tipo de meio de cultivo testado, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

**Figura 4.** Oganogênese na extremidade distal de explantes embrionários decaptados de *Cajanus cajan* L. cv. Anão após 30 dias de cultivo. **A, C, E, G, I** – Aspecto geral das brotações. **B, D, F, H, J** – Seções longitudinais. Brotações adventícias obtidas em meio MS acrescido de: 2,22  $\mu$ M de BAP (**A e B**); 2,22  $\mu$ M de BAP + 4,54  $\mu$ M de TDZ (**C e D**); 22,22  $\mu$ M de BAP + 2,27  $\mu$ M de TDZ (**E e F**); 4,44  $\mu$ M de BAP + 2,27  $\mu$ M de TDZ (**G e H**); 2,27  $\mu$ M de TDZ (**I e J**). Barras = 2,0 mm (**A e I**); 3,0 mm (**G**); 4,0 mm (**C e E**); 400  $\mu$ m (**B, D, F, H e J**).

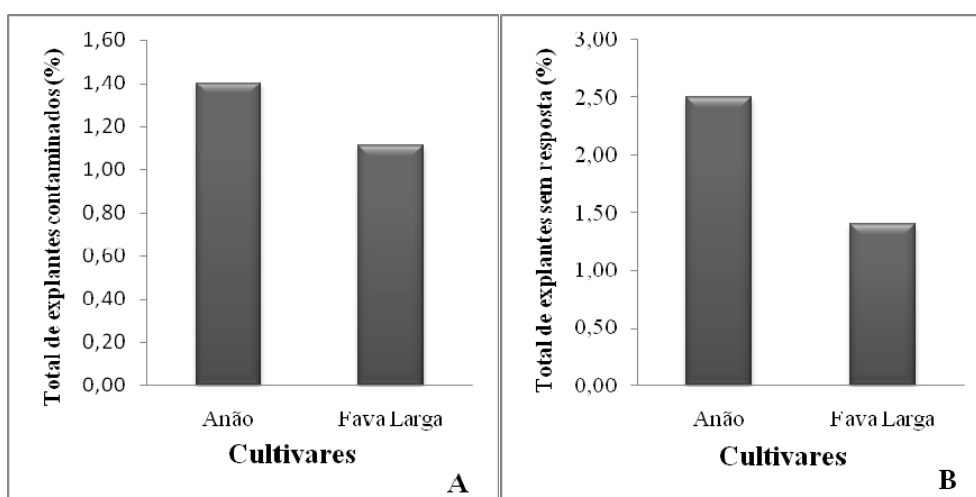


**Figura 5.** Oganogênese na extremidade distal de explantes embrionários decaptados de *Cajanus cajan* L. cv. Fava Larga após 30 dias de cultivo. **A, C, E, G, I** – Aspecto geral das brotações. **B, D, F, H, J** – Seções longitudinais. Brotações adventícias obtidas em meio MS acrescido de: 2,22  $\mu$ M de BAP (**A e B**); 2,22  $\mu$ M de BAP + 4,54  $\mu$ M de TDZ (**C e D**); 22,22  $\mu$ M de BAP + 2,27  $\mu$ M de TDZ (**E e F**); 4,44  $\mu$ M de BAP + 2,27  $\mu$ M de TDZ (**G e H**); 2,27  $\mu$ M de TDZ (**I e J**). Barras = 2,0 mm (**A**); 3,0 mm (**C, E, G e I**); 200  $\mu$ m (**D**); 300  $\mu$ m (**B**); 400  $\mu$ m (**F, H e J**).

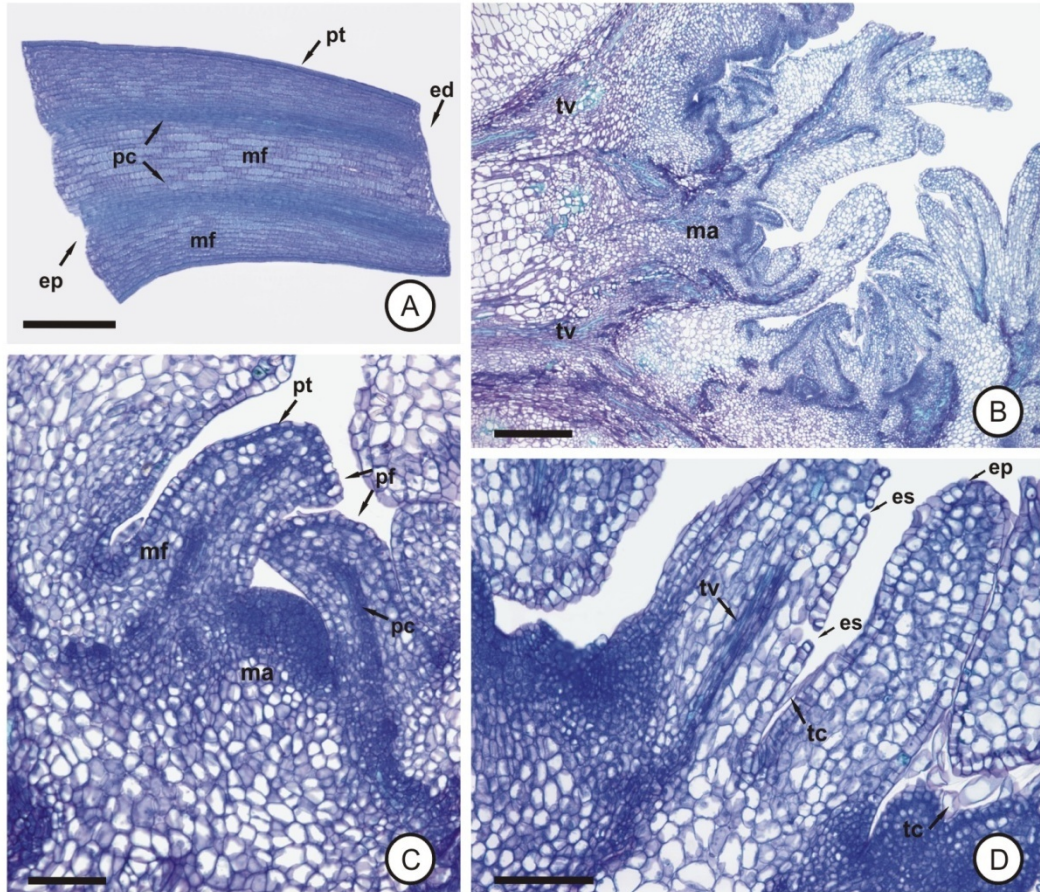




**Figura 6.** Formação de brotações na extremidade distal de eixos embrionários decapitados de *C. cajan* (cultivares Anão e Fava Larga) cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP e TDZ. Valores expressos em termos percentuais.



**Figura 7.** Total de explantes contaminados (A) e sem resposta (B). Valores expressos em percentuais totais para ambos os cultivares (Anão e Fava Larga).



**Figura 8.** Organogênese na extremidade distal de explantes embrionários decaptados de *Cajanus cajan* L. após 30 dias de cultivo *in vitro*. **A-D** – Seções longitudinais. **A** – Embrião zigótico decaptado utilizado como explante; **B** – explante cultivado em meio acrescido de citocinina detalhando a formação direta de gemas adventícias a partir do procâmbio e conexão vascular com o tecido de origem; **C** – Detalhe do meristema apical de parte aérea; **D** – Diferenciação dos tecidos nos primórdios foliares. Barras = 100  $\mu\text{m}$  (**C** e **D**); 300  $\mu\text{m}$  (**A**); 400  $\mu\text{m}$  (**B**). ep: extremidade proximal; ed: extremidade distal; mf: meristema fundamental; pc: procâmbio; pt: protoderme; ma: meristema apical; tv: tecido vascular; pf: primórdio foliar; ep: epiderme; es: estômatos; tc: tricoma.

#### 4. Discussão

Sabe-se que são vários os fatores que influenciam o comportamento do explante em cultura, sendo que um deles refere-se ao balanço hormonal entre auxinas e citocininas. Preece (2008) menciona que muitos estudos acerca do cultivo *in vitro* de espécies vegetais, focam na manipulação do meio de cultura, seja variando a composição dos sais e agentes gelificantes, bem como a concentração e o tipo de fitorreguladores utilizados. Contudo, o crescimento *in vitro* e os processos morfogênicos são também governados por propriedades intrínsecas ao explante, como, por exemplo, o balanço hormonal endógeno. Assim, o balanço hormonal inerente ao explante vai interagir com os estímulos externos fornecendo a resposta morfogênica.

A inoculação dos explantes em meio desprovido de reguladores de crescimento (MSØ) resultou na formação de raízes e esta se restringiu à extremidade proximal dos explantes. Uma razão auxina:citocinina elevada inerente ao explante pode ser a explicação para a formação de raízes em meio MSØ, visto que um dos efeitos da auxina é a promoção de raízes adventícias que podem surgir a partir de agregados celulares que renovam sua atividade de divisão celular. Deve-se considerar ainda o fato de que, a biossíntese de auxina está associada aos tecidos com rápida divisão celular e crescimento (especialmente nas partes aéreas) e que seu transporte ocorre da extremidade apical para a basal (Taiz e Zeiger, 2004; Machacova et al., 2008), o que poderia justificar então a formação das raízes apenas no extremo proximal dos explantes.

Resultados semelhantes foram obtidos ao se cultivar eixos embrionários decapitados de espécies do gênero *Phaseolus* em meio basal constituído por sais e vitaminas B5 desprovido de reguladores de crescimento. A formação de raízes no extremo basal dos explantes foi observada em quatro das seis espécies estudadas (Mohamed et al., 1991).

Ao final de 30 dias de cultivo foi possível observar elevados percentuais (90% ou mais) de calejamento na extremidade proximal dos explantes mantidos em meio com adição de BAP e /ou TDZ e em ambos os cultivares. No meio controle o mesmo não ocorreu uma vez que os valores percentuais referentes à formação de calo nesta região foram menores do que 30%.

Morre et al. (1998), ao detalharem um procedimento de regeneração *in vitro* de algodão a partir de eixos embrionários decapitados, observaram a formação de calo na base da maioria dos explantes quando estes foram cultivados em meio de indução composto por sais de MS e vitaminas B5 suplementado com elevadas concentrações de BAP ao final de 20 dias de cultivo.

A formação de calos na extremidade basal de eixos embrionários de *Vigna mungo* também foi observada em quantidade variável nos explantes inoculados em meio basal MSB5 (sais MS e vitaminas B5) acrescido com BAP (0,5-15,0  $\mu\text{M}$ ) (Saini e Jaiwal, 2005).

A formação de calo em elevados percentuais no extremo proximal dos explantes cultivados em meios contendo citocinina sugere, mais uma vez, que o balanço hormonal exógeno interagiu de forma significativa com os níveis endógenos, desencadeando tal resposta morfogênica. Provavelmente, a relação auxina:citocinina endógena ocorreu sim de maneira elevada nessa região do explante (como já discutido na formação de raiz) que ao permanecer em contato com meio de cultura suplementado com citocininas, veio a se estabelecer em proporções que favoreceram o processo de calogênese.

A formação de calo no extremo distal pode ser explicada pela mesma interação, mas de forma contrária. Nessa extremidade a relação auxina:citocinina endógena deve ser menor do que aquela presente no extremo proximal. Por isso menores concentrações de citocininas exógenas (meios suplementados com 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP ou 2,27  $\mu\text{M}$  de TDZ) foram suficientes para promover a formação de calo nessas extremidades em maiores frequências. Esses percentuais foram menores do que os observados no extremo proximal, o que sugere também que, além do balanço hormonal endógeno inerente a cada extremidade, as células presentes na porção mais apical dos explantes podem corresponder à células que normalmente adquirem competência para uma rota diferente daquela que culmina na formação de calo.

A adição das citocininas BAP e TDZ no meio de cultivo mostrou-se eficiente na indução de brotações a partir de eixos embrionários decapitados de feijão guandu. Como observado, as brotações se formaram apenas na extremidade distal e o meio de cultivo suplementado com a combinação dessas duas citocininas nas concentrações de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,27  $\mu\text{M}$  de TDZ, promoveu a formação de maior número de brotações quando comparado aos demais meios de cultura em ambos os cultivares comerciais testados.

O efeito sinérgico entre a combinação de BAP e TDZ na indução de múltiplas brotações corroboram com aqueles encontrados no cultivo de explantes de outras espécies leguminosas sob condições semelhantes. Nós cotiledonares de fava (*Vicia faba* L.) inoculados em meio MS suplementado com BAP em combinação com TDZ (8,88 e 9,08  $\mu\text{M}$  respectivamente) produziu maior número de brotações (em média 15,7 brotações/explante) após 30 dias de cultivo. Brotações induzidas em elevadas concentrações de BAP e/ou TDZ apresentaram tamanho reduzido, com folhas pouco expandidas (finas) e morfologia anormal, devido possivelmente a um excesso de BAP e TDZ nos sítios de ligação o que ocasionou toxidez às células vegetais (Khalafalla e Hattori, 1999). Estas observações estão de acordo com os resultados desse trabalho, uma vez que o tamanho das brotações formadas em meio contendo combinações de BAP e TDZ mostrou-se reduzido. Dessa forma, essas combinações e, em especial a combinação de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,27  $\mu\text{M}$  de TDZ, podem ser consideradas tóxicas para as células em cultivo de explantes embrionários dos cultivares Anão e Fava Larga. Resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos com ervilha, grão-de-bico e lentilha (Malik e Saxena, 1992a).

A indução de múltiplas brotações dado ao efeito sinérgico do uso combinado de BAP e TDZ foi relatado em outras espécies leguminosas como *Glycine max* (Franklin et al., 2004) e *Vigna radiata* (Amutha et al., 2003).

Nos trabalhos onde se observou um efeito sinérgico na indução de brotações em meio acrescido com combinações de BAP e TDZ (Malik e Saxena, 1992a; Khalafalla e Hattori, 1999; Amutha et al., 2003), os autores atribuíram a essa resposta, o modelo proposto previamente por Nielsen et al. (1995). De acordo com esse modelo, ambas as citocininas BAP e TDZ podem se ligar a um receptor, uma “proteína receptora de citocinina” (CBP, “*Cytokinin-binding protein*”) a qual possui dois sítios de ligação. Em um sítio se liga as citocininas derivadas de adenina, enquanto o outro é capaz de se ligar à citocininas derivadas de feniluréia. Por esta razão, a adição combinada de ambas, proporciona uma maior formação de brotações, devido à ativação dos dois sítios de resposta da CBP. Provavelmente, o resultado obtido no presente trabalho se deve a esse fato.

Ao se utilizar BAP e TDZ isoladamente, observou-se também a formação de brotações adventícias em um maior número de explantes, o que permite considerar essas citocininas como fatores determinantes para o êxito da resposta morfogênica *in vitro* de feijão guandu. As brotações formadas na presença apenas de BAP ou TDZ

nas concentrações já mencionadas, mostraram-se mais expandidas e aptas ao processo de alongamento.

Com base na literatura revisada, são vários os trabalhos onde os autores obtiveram sucesso na indução de brotações ao inocularem explantes de diferentes cultivares de *Cajanus cajan* L. em meio suplementado com BAP ou TDZ (Eapen et al., 1998; Singh et al., 2003; Thu et al., 2003; Yadav e Padmaja, 2003; Surekha et al. 2005). Apesar de algumas concentrações e fontes de explantes utilizadas nesses trabalhos terem sido diferentes daquelas testadas no presente estudo, os resultados obtidos aqui só reforçam o importante papel das citoninas BAP e TDZ na regeneração *in vitro* de feijão guandu, e que, as diferenças quanto ao requerimento delas no meio de cultura pode ser devido à diferenças nos níveis endógenos dos reguladores entre os diferentes tipos de explantes e cultivares testados.

A utilização de eixos embrionários na indução de gemas adventícias tem sido relatada com êxito em diferentes cultivares de *C. cajan* L. em meio de cultura acrescido de fitorreguladores.

Franklin et al. (2000) obtiveram plantas viáveis regeneradas via organogênese a partir de embriões maduros de 4 cultivares de guandu. As brotações se formaram na região apical dos eixos embrionários decapitados (retirada inicial da plúmula) após 20 dias de incubação em meio de indução (BAP + ANA). Para o cultivar VBN2 observou-se a formação de 9,5 brotações por explante, com frequência de 62,5%.

Eixos embrionários decapitados mostraram-se superiores ao explante foliar quando cultivados em meio MS suplementado com BAP e AIA (frequências de regeneração de 59 e 20% respectivamente) (Lawrence e Koundal, 2001).

Elevada frequência de regeneração a partir de eixos embrionários de *Cajanus cajan* L. quando cultivados em meio de indução de brotações, também foi relatada em outros trabalhos (Mohan e Krishnamurthy 2003; Satyavathi et al. 2003) sendo os protocolos estabelecidos utilizados em estudos de transformação genética.

No presente trabalho, ao se utilizar eixos embrionários decapitados, foi possível observar que, após o período de 30 dias de cultivo, os percentuais de explantes que formaram brotações mostraram-se relativamente elevados em todos os meios testados e em ambos os cultivares estando de acordo com aqueles abordados anteriormente, onde maiores frequências de regeneração foram obtidas a partir desse explante.

Outros trabalhos com soja (Liu et al., 2004), grão-de-bico (Polowick et al., 2004), feijão-mungo (Saini e Jaiwal, 2005) e feijão-caupi (Ivo et al., 2008), tratam da utilização de eixos embrionários maduros decapitados no processo de transformação genética dessas espécies, dada a eficiência dos mesmos na regeneração de brotações adventícias.

A oxidação observada nas extremidades dos explantes (onde se realizou os cortes) em contato com o meio não restringiu o potencial morfogênico dos explantes. A ausência de resposta encontrada, mesmo que em baixos percentuais, pode ser conferida a um certo grau de maturação das sementes de onde se obteve esses explantes em particular, os quais já poderiam ter perdido a viabilidade. Além disso, possíveis danos ou injúrias físicas causadas nos explantes durante o preparo dos mesmos podem ter contribuído para ausência de respostas morfogênicas.

O índice de contaminação também se mostrou baixo, indicando que a metodologia utilizada para desinfestação das sementes e isolamento dos embriões foram eficientes, e que, possivelmente, a contaminação por bactéria foi de caráter endófito.

As análises histológicas realizadas nos explantes revelaram a origem adventícia das brotações formadas, sendo o tecido vascular (procâmbio) do explante de origem a região responsiva. Confirmou-se, ainda, que o processo de organogênese ocorreu de forma direta, sem a formação de calo, constituindo num processo vantajoso. Esses resultados corroboram com os obtidos por Saini e Jaiwal (2002 e 2005) e Liu et al. (2004). Nestes trabalhos os autores comentam a importância de se ter um processo de organogênese via direta, uma vez que a ocorrência de variação somaclonal é menor.

As regiões meristemáticas observadas no presente estudo se distinguiram do restante do explante por apresentarem intensa divisão celular, com formação de grupos de células pequenas, isodiamétricas, núcleo proeminente e paredes delgadas.

Diante do exposto pode-se concluir que a utilização do eixo embrionário decapitado como explante e das citocininas BAP e TDZ na regeneração *in vitro* de feijão guandu (cultivares Anão e Fava Larga) via organogênese direta é promissora, visto que houve a formação de múltiplas brotações em todos os meios acrescidos com estas citocininas.

Os dados aqui apresentados servirão de base para novos testes e serão de grande utilidade, contribuindo para o estabelecimento e otimização de protocolos de

regeneração desses cultivares em especial. Propõem-se a utilização de outras concentrações de BAP e TDZ, até mesmo concentrações menores do que àquelas utilizadas no presente estudo. Apesar de não se ter observado diferença significativa entre os cultivares testados, sugere-se a utilização do cultivar Anão por possuir pequeno porte, facilitando assim trabalhos futuros em casa de vegetação.

## 5. Referências Bibliográficas

AMUTHA, S.; GANAPATHI, A.; MURUGANANTHAM, M. *In vitro* organogenesis and plant formation in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 72: 203-207, 2003.

BONGA, J. M.; VON ADERKAS, P. **In vitro culture of trees**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. 236p.

CRUZ, C. D. **Programa Genes – Aplicativo computacional em genética e estatística**. 2006. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm>>.

DAN, Y.; REICHERT, N. A. Organogenic regeneration of soybean from hypocotyl explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 34: 14-21, 1998.

DAS, D. K.; SHIVA PRAKASH, N.; BHALLA-SARIN, N. An efficient regeneration system of black gram (*Vigna mungo* L.) through organogenesis. **Plant Science**, 134: 199-206, 1998.

DAYAL, S.; LAVANYA, M.; DEVI, P.; SHARMA, K. K. An efficient protocol for shoot regeneration and genetic transformation of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp] using leaf explants. **Plant Cell Reports**, 21: 1072-1079, 2003.

EAPEN, S.; TIVAREKAR, S.; GEORGE, L. Thidiazuron-induced shoot organogenesis in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 53: 217-220, 1998.

FONTANA, G. S.; SANTINI, L.; CARETTO, S.; FRUGIS, G.; MARIOTTI, D. Genetic transformation in the grain legume *Cicer arietinum* L. (chickpea). **Plant Cell Reports**, 12: 194-198, 1993.

FRANKLIN, G.; CARPENTER, L.; DAVIS, E.; REDDY, C. S. AL-ABED, D.; ALAIWI, W. A.; PARANI, M.; SMITH, B.; GOLDMAN, S. L.; SAIRAM, R. V. Factors influencing regeneration of soybean from mature and immature cotyledons. **Plant Growth Regulation**, 43: 73-79, 2004.

FRANKLIN, G.; JEYACHANDRAN, R.; IGNACIMUTHU, S. Factors affecting regeneration of pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) from mature embryonal axes. **Plant Growth Regulation**, 30: 31-36, 2000.

GODOY, R., BATISTA, L. A. R., NEGREIROS, G. F., CARVALHO, J. R. P. Avaliação agronômica e seleção de germoplasma de guandu forrageiro (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) proveniente da Índia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 26: 447-453, 1997.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p.183-260.

HONG, H. P.; ZHANG, H.; OLHOFT, P.; HILL, S.; WILEY, H.; TOREN, E.; HILLEBRAND, H.; JONES, T.; CHENG, M. Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 43:558-568, 2007.

IVO, N. L.; NASCIMENTO, C. P.; VIEIRA, L. S.; CAMPOS, F. A. P.; ARAGÃO, F. J. L. Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. **Plant Cell Reports**, 27: 1475-1483, 2008.

KANYAND, M.; DESSAI, A. P.; PRAKASH, C. S. Thidiazuron promotes high frequency regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plants *in vitro*. **Plant Cell Reports**, 14: 1-5, 1994.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, 27: 137-138, 1965.

KENEDA, Y.; TABEL, Y.; NISHIMURA, S.; HARADA, K.; AKIHAMA, T.; KITAMURA, K. A. Combination of thidiazuron end basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybean (*Glycine max*). **Plant Cell Reports**, 17: 8-12, 1997.

KHALAFALLA, M. M.; HATTORI, K. A combination of thidiazuron and benzyladenine promotes multiple shoot production from cotyledonary node explants of faba bean (*Vicia faba* L.). **Plant Growth Regulation**, 27: 145-148, 1999.

LAWRENCE, P. K.; KOUNDAL, K. R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) and molecular analysis of regenerated plants. **Current Science**, 80: 1428-1432, 2001.

LIU, H.; YANG, C.; WEI, Z. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system. **Planta**, 219:1042-1049, 2004.

MACHACOVA, I.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E. F. Plant growth regulators I: Introduction; Auxins, their analogues and inhibitors. In: GEORGE, F. E.; HALL, M. A., de KLERK, J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture – The Background**. 3. ed. Springer, 2008. v.1, p. 175-204.

MALIK, K. A.; SAXENA, P. K. Thidiazuron induces high-frequency shoot regeneration in intact seedling of pea (*Pisum sativum*) chickpea (*Cicer arietinum*) and lentil (*Lens culinaris*). **Australian Journal of Plant Physiology**, 19:731-740, 1992a.

MALIK, K. A.; SAXENA, P. K. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: High-frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N<sup>6</sup>-benzylaminopurine and thidiazuron. **Planta**, 186:384-389, 1992b.

MISRA, P. Direct differentiation of shoot buds from leaf explants of *Cajanus cajan* L. **Biologia Plantarum**, 45: 347-351, 2002.

MOHAMED, M. F.; READ, P. E.; COYNE, D. P. Plant regeneration *in vitro* from embryonic axes of common and therapy beans. **Bean Improvement Cooperative**, 34:149-151, 1991.

MOHAMED, M. F.; READ, P. E.; COYNE, D. P. Dark preconditioning, CCPU, and thidiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explants of common and faba bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 117: 668-672, 1992.

MOHAMED, S. V.; SUNG, J-M.; JENG, T-L.; WANG, C-S. Organogenesis of *Phaseolus angularis* L.: high efficiency of adventitious shoot regeneration from etiolated seedlings in the presence of N<sup>6</sup>-benzylaminopurine and thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 86: 187-199, 2006.

MOHAN, M. L.; KRISHNAMURTHY, K. V. Plant regeneration in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] by organogenesis. **Plant Cell Reports**, 17: 705-710, 1998.

MOHAN, M. L.; KRISHNAMURTHY, K. V. Plant regeneration from decapitated mature embryo axis and *Agrobacterium* mediated genetic transformation of pigeon pea. **Biologia Plantarum**, 46: 519-527, 2003.

MORRE, J. L.; PERMINGEAT, H. R.; ROMAGNOLI, M. V.; HEISTERBORG, C. M.; VALLEJOS, R. H. Multiple shoot induction and plant regeneration from embryonic axes of cotton. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 54: 131-136, 1998.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.

NIELSEN, J. M.; HANSEN, J.; BRAND, K. Sinergism of thidiazuron and benzyladenine in axillary shoot formation depends on sequence application in *Miscanthus x ogiformis* "Giganteus". **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 41:165-170, 1995.

NOGUEIRA, S. R. **Resistência de plantas hospedeiras e identificação de genesdiferencialmente expressos na interação Soja - *Phakopsora pachyrhizi***. Viçosa, MG: UFV, 2007, 110 f.: il. (Tese Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

O'BRIEN, T. P., McCULLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne- Australia: Termarcarphy Pty Ltd., 45p., 1981.

OLHOFT, P. M.; FLAGEL, L. E. DONOVAN, C. M.; SOMERS, D. A. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. **Planta**, 216: 723-735, 2003.

PAZ, M. M.; SHOU, H.; GUO, Z.; ZHANG, Z.; BANERJEE, A. K.; WANG, K. Assesment conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. **Euphytica**, 136: 167-179, 2004.

PAZ, M. M.; MARTINEZ, J. C.; KALVING, A. B.; FONGER, T. M.; WANG, K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. **Plant Cell Reports**, 25: 206-213, 2006.

POLISETTY, R.; PAUL, V.; DEVESHWAR, J. J.; KHETARPAL, S.; SURESH, K.; CHANDRA, R. Multiple shoot induction by benzyladenine and complete plant regeneration from seed explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant Cell Reports**, 16: 565-571, 1997.

POLOWICK, P. L.; BALISKI, D.S.; MAHON, J. D. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.): gene integration, expression and inheritance. **Plant Cell Reports**, 23:485-491, 2004.

PREECE, J. Stock plant physiological factors affecting growth and morphogenesis. In: GEORGE, F. E.; HALL, M. A., de KLERK, J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture – The Background**. 3. ed. Springer, 2008. v.1, p. 403-422.

RAO, S. C.; COLEMAN, S. W.; MAYEUX, H. S. Forage production and nutritive value of selected pigeon pea ecotypes in the southern Great Plains. **Crop Science**, 42:1259-1263, 2002.

SAINI, R.; JAIWAL, P. K. Age, position in mother seedling, orientation, and polarity of the epicotyls segments of blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) determines its morphogenic response. **Plant Science**, 163: 101-109, 2002.

SAINI, R.; JAIWAL, P. K. Transformation of a recalcitrant grain legume, *Vigna mungo* L. Hepper, usin *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to shoot apical meristem cultures. **Plant Cell Reports**, 24: 164-171, 2005.

SATYAVATHI, V. V.; PRASAD, V.; SHAILA, A. M. S.; SITA, G. L. Expression of hemagglutinin protein of Rinderpest virus in transgenic pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] plants. **Plant Cell Reports**, 21: 651-658, 2003.

SHAN, Z.; RAEMAKERS, K.; TZITZIKAS, E. N.; MA, Z.; VISSER, R. G. F. Development of a highly efficient, repetitive system of organogenesis in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Plant Cell Reports**, 24:507-512, 2005.

SHARMA, K. K.; LAVANYA, M.; ANJIAH, V. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) expressing the synthetic BT *cryIAb* gene. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 42: 165-173, 2006

SHIVA-PRAKASH, N.; PENTAL, D.; BHALLA-SARIN, N. Regeneration of pigeon pea (*Cajanus cajan*) from cotyledonary node via multiple shoot formation. **Plant Cell Reports**, 13: 623-627, 1994.

SINGH, N. D.; SAHOO, L.; SARIN, N. B.; JAIWAL, P. K. The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millsp). **Plant Science**, 164: 341-347, 2003.

SOUZA, F. H. D.; FRIGERI, F.; MOREIRA, A.; GODOY, R. **Produção de sementes de guandu**. Documentos 69. 1ª Edição. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. Disponível em: <<http://www.cppse.embrapa.br/servicos/publicacao gratuita/documentos/Documentos69pdf/view>>. Acesso em: 18 jan. 2008.

SUREKHA, Ch.; BEENA, M. R.; ARUNDHATI, A.; SINGH, P. K.; TULI, R.; DUTTA-GUPTA, A.; KIRTI, P. B. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) using embryonal segments and development of transgenic plants for resistance against Spodoptera. **Plant Science**, 169: 1074-1080, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2004). **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Artmed. Porto Alegre/RS: pp. 449-484.

THU, T. T.; MAI, T. T. X.; DEWAELE, E.; FARSI, S.; TADESSE, Y.; ANGENON, G.; JACOBS, M. *In vitro* regeneration and transformation of pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **Molecular Breeding**, 11:159-168, 2003.

VAN STADEN, J.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E. F. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In: GEORGE, F. E.; HALL, M. A., de KLERK, J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture – The Background**. 3. ed. Springer, 2008. v.1, p. 205-226.

YADAV, P. B. S.; PADMAJA, V. Shoot organogenesis and plantlet regeneration from leaf segments of pigeonpea. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 73: 197-200, 2003.

YOSHIDA, T. Adventitious shoot formation from hypocotyls sections of mature soybean seeds. **Breeding Science**, 52: 1-8, 2002.

## CAPÍTULO 2

### Indução de brotações adventícias em segmentos de epicótilo de feijão guandu (*Cajanus cajan* L. Millsp.) germinado *in vitro* por BAP, TDZ e AgNO<sub>3</sub>

#### 1. Introdução

Os eventos organogênicos acontecem mediante a desdiferenciação e rediferenciação celular dependendo da retomada da atividade meristemática das células em cultivo, sendo considerado um processo complexo, com atuação de vários fatores (Ziv, 1999; Gahan e George, 2008) como, por exemplo, o tipo de explante. Cotilédones, eixos embrionários, folhas primárias, segmentos caulinares obtidos de plântulas germinadas *in vitro* entre outros, correspondem às diferentes fontes de explantes que podem ser utilizadas no processo de regeneração *in vitro*. A utilização de segmentos caulinares como o epicótilo na obtenção de explantes é de grande praticidade, dada a facilidade na preparação dos mesmos e a possibilidade de se ter um maior número de explantes.

O êxito do processo de regeneração de brotações adventícias em *Cajanus cajan* L. não depende apenas dos fatores inerentes ao tecido vegetal, mas também das condições ambientais e do meio de cultura. Neste particular a adição de fitorreguladores no meio exerce um papel crítico no processo, havendo a necessidade de se adicionar citocininas no meio de cultivo, com vistas à formação das brotações, sendo as mais utilizadas BAP (Shiva-prakash et al., 1994; Satyavathi et al., 2003; Yadav e Padmaja, 2003; Thu et al., 2003; Surekha et al., 2005; Sharma et al., 2006 ) e TDZ (Eapen et al., 1998; Singh et al., 2003).

Além da presença de fitorreguladores no meio de cultura, outros fatores podem influenciar no potencial regenerativo de uma espécie como, por exemplo, a produção de alguns compostos gasosos, como o etileno, durante o cultivo *in vitro* (George e Davies, 2008).

O etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) é um hormônio que exerce importante papel no crescimento e desenvolvimento do vegetal (Bleeker e Kende, 2000; Taiz e Zeiger, 2004; Moshkov et al., 2008). Seu efeito é variável, seja promovendo ou inibindo processos morfogênicos *in vitro*, e é dependente da espécie, do tipo de explante, da via regenerativa e presença de outros reguladores no meio de cultivo (Biondi et al., 1998; Moshkov et al., 2008), dentre outros. Ainda, seu acúmulo ou produção pode estar

associado à recalcitrância de algumas espécies *in vitro* (Chi et al., 1991; Pua e Chi, 1993; Kumar et al., 1998a; Benson, 2000).

O efeito inibitório do etileno sob a morfogênese já foi relatado para várias leguminosas: *Arachis hypogaea* L. (Pestana et al., 1999; Ozudogru et al., 2005), *Glycine max* (Wang e Xu, 2008), *Phaseolus vulgaris* (Carvalho et al., 2000), *Vicia faba* (Khalafalla e Hattori, 2000) e *Vigna unguiculata* L. (Brar et al., 1999).

Existem algumas substâncias que são capazes de inibir a biossíntese bem como a ação do etileno. Dentre as substâncias que inibem a ação do etileno, destacam-se os íons prata ( $\text{Ag}^+$ ) aplicados como nitrato de prata e tiosulfato de prata ( $\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2^{3-}$ ), e o dióxido de carbono (Taiz e Zeiger, 2004; Moshkov et al., 2008). Essas substâncias atuam ou competindo com etileno se ligando aos domínios receptores, ou agindo por mecanismos ainda desconhecidos (Moshkov et al., 2008).

Sabendo-se da influência do etileno no cultivo *in vitro*, a utilização de inibidores do etileno pode contribuir de maneira efetiva para o aprimoramento dos protocolos de regeneração *in vitro* de espécies leguminosas recalcitrantes.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo consistiu em avaliar o efeito das citocininas BAP e TDZ em combinação ou não com nitrato de prata, na indução de brotações adventícias em explantes de epicótilo de plântulas de guandu (*Cajanus cajan*, cultivares Anão e Fava Larga) germinadas *in vitro*.

## 2. Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais do Setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

### 2.1. Material vegetal

Foram utilizadas sementes de cultivares comerciais de feijão guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.), Anão e Fava Larga, identificadas como suscetíveis a *Phakopsora pachyrhizi* por Nogueira (2007). As sementes foram obtidas da empresa Prósementes<sup>®</sup>, Araçatuba-SP, dada a necessidade de se ter muitas sementes para a realização dos experimentos.

O cultivar Anão (IAPAR-43) foi obtido através de ciclos de seleção massal em população anã precoce proveniente da Colômbia e introduzida no Brasil através do Centro Nacional de Pesquisa em Arroz e Feijão, da EMBRAPA. O ciclo até o florescimento é de 90 a 120 dias quando a semeadura efetuada em outubro, e as plantas podem atingir de 1,00 a 1,20 m de altura. Foi desenvolvido para a produção de grãos de alto valor nutritivo, sendo utilizado com sucesso na alimentação de aves ou em forma de forragem para bovinos e ainda, na alimentação humana equivalendo nutricionalmente ao feijão comum.

O cultivar Fava Larga (IAC- Fava Larga) é resultante de seleção massal efetuada em diversos cultivares no período 1982-1985, em material introduzido na então Seção de Leguminosas do Instituto Agrônomo desde 1953, com avaliações regionais em Campinas, Ribeirão Preto e Pindorama. Possui o ciclo longo (280 dias até 1ª colheita na semeadura efetuada em outubro), podendo as plantas atingir até 3,0 m de altura. Pode ser utilizado na alimentação humana (grãos verdes ou secos) e animal (pastagem no inverno para forragem ou feno, grãos), quebra-ventos ou para sombreamento temporário de cultivos perenes.

#### 2.1.1. Germinação *in vitro* das sementes e obtenção dos explantes

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% (v/v) durante 2 minutos e, em seguida, foram imersas em hipoclorito de sódio comercial puro (Super Globo, Brasil) por 20

minutos, e enxaguadas 8 vezes em água deionizada e autoclavada. Por fim, as sementes foram embebidas em água estéril por um período de aproximadamente 16 h em regime de escuro a  $27 \pm 2$  °C.

Após o período de embebição, as sementes tiveram o tegumento retirado e foram inoculadas em frascos de cultura (60 x 100 mm), contendo 30 mL de meio de básico de MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 6,5 g L<sup>-1</sup> de ágar Merck® como agente gelificante. Foram colocadas 5 sementes em cada frasco e estes foram mantidos em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas de luz, irradiância de 52 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> provida por três lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram®, Brasil) e a  $27 \pm 2$  °C, por um período de 7 dias.

Foram escolhidas as plântulas que apresentaram, no mínimo, epicótilo com 7,5 cm de comprimento. A partir do epicótilo, foram obtidos 5 segmentos de aproximadamente 1,5 cm de comprimento cada (Figura 1A).

## 2.2. Meios de cultura e condições de cultivo

Os explantes foram inoculados em placas de Petri estéreis de poliestireno cristal de 90 x 15 mm (J. Prolab, Brasil) contendo 25 mL de meio básico constituído de MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 6,5 g L<sup>-1</sup> de ágar Merck® como agente gelificante. Na indução de gemas adventícias foi avaliado o efeito das citocininas BAP e TDZ (2,22 μM e 2,27 μM respectivamente) isoladamente ou em combinação e ainda, com adição ou não de 11,77 μM de AgNO<sub>3</sub> (Quadro 1). Como controle foi utilizado o meio MS desprovido de reguladores de crescimento também com adição ou não de nitrato de prata. O pH foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  seguido de autoclavagem (121 °C, 1,5 atm de pressão, por 20 minutos). Após a inoculação dos explantes, as placas foram seladas com filme de PVC (Rolopac®).

**Quadro 1.** Combinações das concentrações de BAP e TDZ com adição ou não de AgNO<sub>3</sub> utilizadas na indução de gemas adventícias a partir de segmentos de epicótilo de plântulas de feijão guandu (*Cajanus cajan*) germinadas *in vitro*.

Meios de cultura	Combinações		AgNO <sub>3</sub> (μM)
	BAP (μM)	TDZ (μM)	
0	0	0	0
1	2,22	0	0
2	2,22	2,27	0
3	0	2,27	0
4	0	0	11,7
5	2,22	0	11,7
6	2,22	2,27	11,7
7	0	2,27	11,7

Inicialmente as culturas foram mantidas em sala de crescimento em regime de escuro total por 8 dias. Em seguida as placas foram transferidas para a condição de fotoperíodo de 16 horas de luz, irradiância de 52 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> provida por três lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram<sup>®</sup>, Brasil) permanecendo nessa condição por mais 24 dias. Após 16 dias de cultura, os explantes foram transferidos para um novo meio de mesma composição inicial.

A fonte de explante bem como as citocininas e as respectivas concentrações testadas foram tomadas com base em ensaios preliminares.

### 2.3. Condução e avaliações experimentais

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 x 4 (2 cultivares x adição ou não de AgNO<sub>3</sub> x 4 meios de cultivo), totalizando 16 tratamentos. Foram utilizadas 10 repetições por tratamento, sendo que cada repetição consistiu de 10 explantes (2 epicótilos seccionados em 5 segmentos cada) totalizando assim 100 explantes por tratamento. A posição original do explante foi mantida com intuito de se avaliar a resposta morfogênica nas extremidades proximal e distal de cada explante. Para se especificar a posição original do explante no epicótilo, seguiu-se a numeração de 1 a 5, sendo o primeiro

explante o mais próximo ao nó cotiledonar e o último o mais próximo do ápice (Figura 1A).

Foram realizadas avaliações periódicas a cada 8 dias até completar 32 dias de cultivo. Avaliou-se o número de raízes e de brotações formadas em ambas as extremidades de cada explante. A intensidade, coloração e textura dos calos foram descritas de forma geral, sendo consideradas como observações visuais.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de comparação de médias Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Para análise dos dados utilizou-se o programa estatístico Genes (Cruz, 2006).

#### 2.4. Histologia

Com intuito de se confirmar a ocorrência do processo organogênico bem como identificar os tecidos que deram origem às gemas adventícias, regiões dos explantes onde houve a formação das gemas foram isoladas, fixadas em solução de Karnovsk (Karnovsk, 1965) por um período de 72 horas. As amostras foram desidratadas em série etílica crescente, infiltradas em metacrilato (Historesin, Leica) segundo as recomendações do fabricante.

Seções longitudinais de 7  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidas das amostras utilizando-se micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 - Leica), equipado com navalhas de vidro. Os cortes foram corados com azul de toluidina pH 4,0 (O'Brien e McCully, 1981) por 10 minutos e motados em resina sintética Permout®. O explante no tempo zero também foi submetido ao processo descrito acima de modo a confirmar a ausência de gemas pré-existentes no mesmo.

As observações e a obtenção das imagens foram realizadas em fotomicroscópio Olympus AX70 com sistema U-photo, câmera e microcomputador com o software Spot-Basic.

### 3. Resultados

Aos 8 dias de cultivo (permanência no escuro total) observou-se intenso intumescimento dos explantes, sobretudo na extremidade proximal, independente do meio de cultivo testado (Figura 1B), e oxidação fenólica em ambas as extremidades dos explantes em contato com o meio (Figura 1C). Após esse período, respostas morfogênicas passaram a ser observadas até o final do cultivo, aproximadamente 32 dias. Nas condições deste experimento, não se observou gradiente para a formação de raízes, calos e brotações em função da posição dos explantes na plântula de origem.

#### 3.1. Efeito dos meios de cultura nas respostas morfogênicas

##### 3.1.1. Formação de raízes

A formação de raízes foi observada apenas no meio controle (tanto na presença quanto na ausência de  $\text{AgNO}_3$ ), se restringindo ao extremo proximal dos explantes e visualizada macroscopicamente a partir dos 15 dias de cultivo. A interação dupla, cultivar X  $\text{AgNO}_3$  ( $F= 0,0602$ ,  $P= 100,0$ ) não foi significativa a 5% de probabilidade. Apenas a adição ou não de  $\text{AgNO}_3$  proporcionou efeito significativo na formação de raízes ( $F= 106,1940$ ,  $P= 0$ ), sendo estudada isoladamente (Tabela 1b, anexo).

O meio controle suplementado com  $11,77 \mu\text{M}$  de  $\text{AgNO}_3$  possibilitou a formação de maior número de raízes por explante comparado ao meio controle sem adição de  $\text{AgNO}_3$  (em média, 0,56 e 0,14, respectivamente) (Figura 2).

As raízes formadas apresentaram coloração bege claro e no geral, ao final dos 32 dias de cultivo atingiram tamanho superior a 5 cm (Figuras 3A-B).

##### 3.1.2. Calogênese nos extremos proximal e distal

Em ambos os cultivares a formação de calo nas extremidades proximal e distal foi observada em maior intensidade (calos visualmente maiores) nos explantes cultivados em meio de cultura suplementado com  $2,22 \mu\text{M}$  de BAP e  $2,27 \mu\text{M}$  de TDZ tanto na ausência quanto na presença de  $\text{AgNO}_3$ , sendo que o meio controle proporcionou a formação de calos em menor intensidade.

Pôde-se observar de maneira geral que, a adição de  $\text{AgNO}_3$  proporcionou menor formação de calo (calos visualmente menores) quando comparado à ausência do mesmo independente da concentração de fitorreguladores testada.

Na ausência de  $\text{AgNO}_3$  os calos formados em meio controle apresentaram coloração verde claro e textura compacta. Nos meios suplementados com  $2,22 \mu\text{M}$  de BAP ou com  $2,27 \mu\text{M}$  de TDZ os calos formados também apresentaram textura compacta e coloração predominantemente verde claro, ressaltando que no meio acrescido com BAP houve também a formação de algumas regiões brancas de aspecto esponjoso (Figuras 4A, B, E, F). Já no meio acrescido da combinação de ambas as citocininas, o padrão de calejamento foi diferente. Os calos apresentaram textura compacta e coloração verde claro na região em contato com o meio porém, acima desta, observou-se intenso calejamento de coloração esbranquiçada e textura esponjosa que se estendeu por quase todo o explante (Figuras 4C, D), havendo ainda a presença de algumas cavitações (fissuras) (Figura 4D)

Na presença  $\text{AgNO}_3$  os calos tiveram padrão de resposta semelhantes, em ambos os cultivares, ressaltando que para o meio acrescido com BAP + TDZ não se observou a formação de calo de aspecto esponjoso ao longo do explante (Figuras 5A-F).

### 3.1.3. Formação de brotações

A formação de brotações se restringiu apenas ao extremo proximal e aos explantes cultivados em meio de cultura suplementados com citocinina e  $\text{AgNO}_3$  (Figuras 5A-D e F).

Em ambos os cultivares testados o meio suplementado com a combinação de BAP e TDZ proporcionou a formação de um maior número médio de brotações (6,1 e 7,4 para os cultivares Anão e Fava Larga, respectivamente). Para o cultivar Anão não se observou a formação das mesmas em meio acrescido de  $2,27 \mu\text{M}$  de TDZ, sendo que para o Fava Larga esse meio proporcionou a formação de apenas 1,3 brotações em média (Figura 6).

## 3.2. Histologia

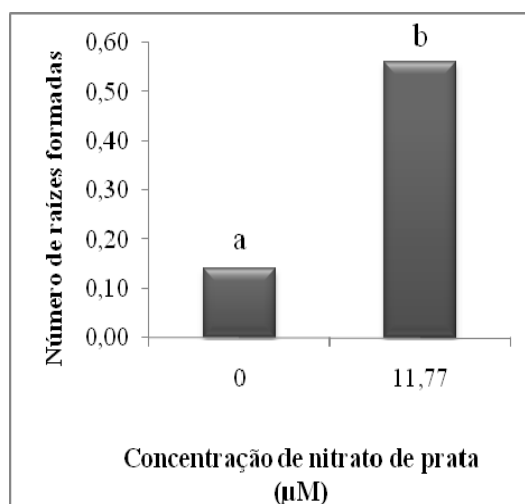
As análises histológicas revelaram a ocorrência de diferenciação de meristema apical de parte aérea e de primórdios foliares (Figuras 14B-D). As

brotações se formaram indiretamente a partir de um tecido calogênico caracterizado por uma massa de células frouxamente organizadas (Figura 14B). A diferenciação dessas gemas seguiu o padrão típico de organogênese apresentando a continuidade vascular com o tecido calogênico formado (Figura 14C).

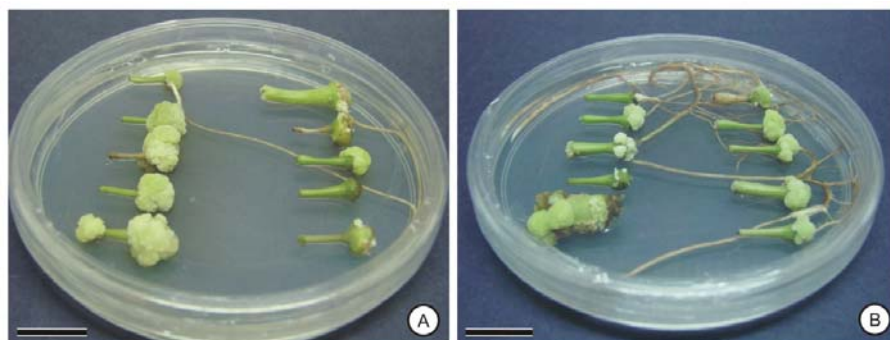
A Figura 14D mostra o meristema apical de parte aérea com intensa divisão celular, apresentando células de tamanho pequeno, isodiamétricas, paredes delgadas, citoplasma denso e núcleo proeminente.



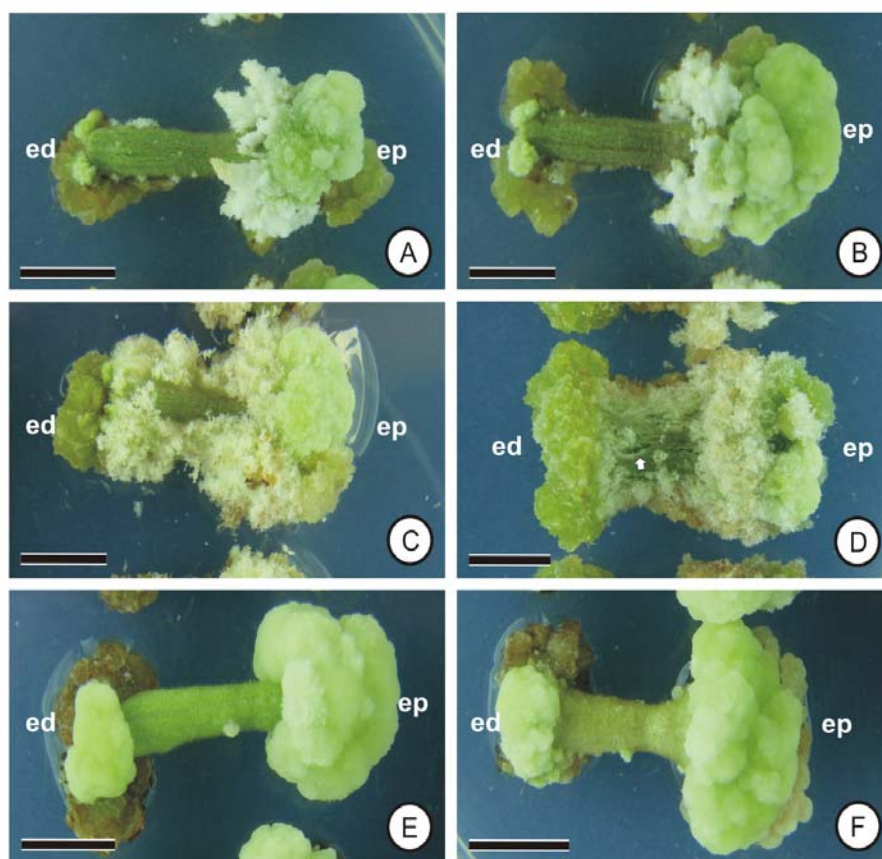
**Figura 1.** Resposta morfológica de explantes do epicótilo de plântulas de *Cajanus cajan* L. germinadas *in vitro*. **A** – Epicótilo seccionado em 5 segmentos; **B** – Explante intumescido na extremidade proximal após 8 dias de cultivo independente do meio de cultura testado; **C** – Oxidação fenólica em ambas as extremidades do explante em contato com o meio de cultura. Barras = 5 mm (**B** e **C**); 20 mm (**A**). ep: extremidade proximal; ed: extremidade distal;



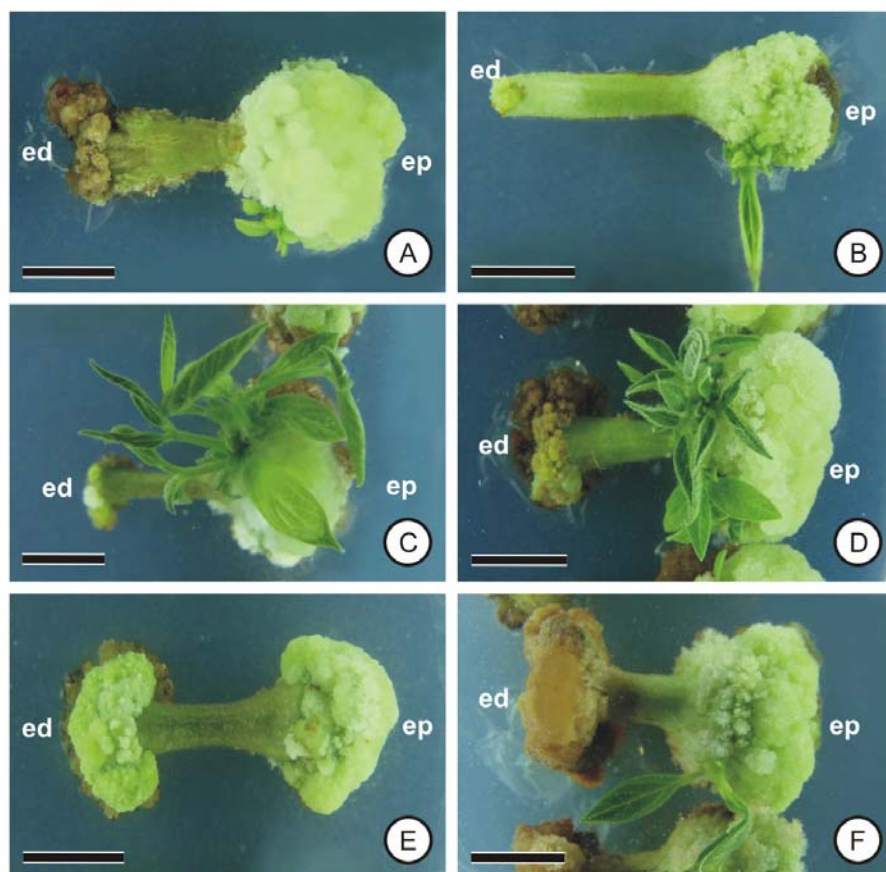
**Figura 2.** Rizogênese na extremidade proximal de segmentos de epicótilo de *C. cajan* aos 32 dias de cultivo em meio controle na ausência (0 µM) e em adição (11,77 µM) de AgNO<sub>3</sub>. As médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste F a 5% de significância.



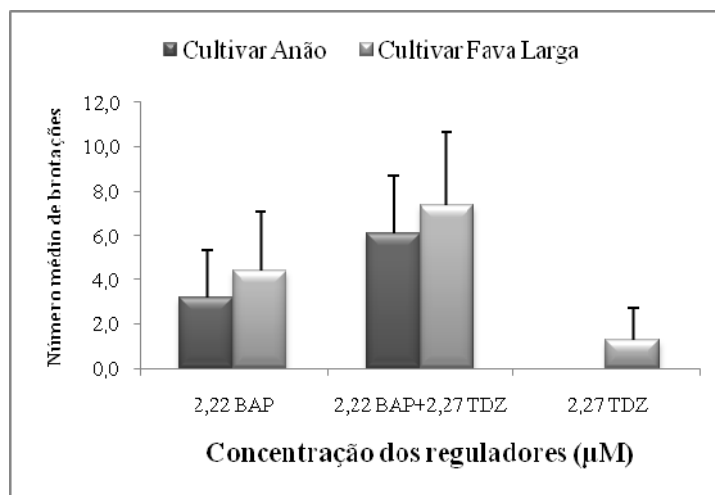
**Figura 3.** Rizogênese na extremidade proximal de segmentos de epicótilo de *C. cajan* L. cultivados em meio controle com adição de 11,77  $\mu\text{M}$  de  $\text{AgNO}_3$  após 32 dias de cultivo. **A** – Explantes do cv. Anão; **B** - Explantes do cv. Fava Larga. Barras = 15 mm.



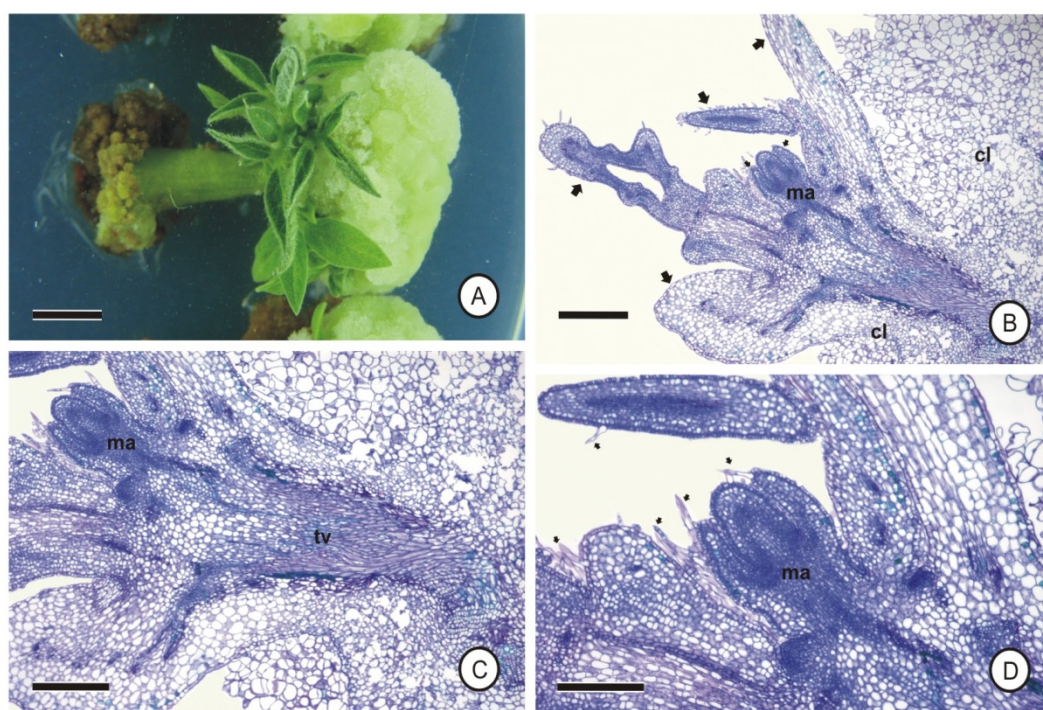
**Figura 4.** Calogênese nas extremidades proximal e distal de segmentos do epicótilo de *Cajanus cajan* L. cultivados em diferentes meios contendo citocinina e ausência de  $\text{AgNO}_3$  após 32 dias de cultivo. **A, C e E** – Explantes do cv. Anão inoculados em meio MS acrescido de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP, 22,22  $\mu\text{M}$  de BAP + 2,27  $\mu\text{M}$  de TDZ e 2,27  $\mu\text{M}$  de TDZ respectivamente; **B, D e F** – Explantes do cv. Fava Larga inoculados em meio MS acrescido de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP, 22,22  $\mu\text{M}$  de BAP + 2,27  $\mu\text{M}$  de TDZ e 2,27  $\mu\text{M}$  de TDZ respectivamente; A seta indica a formação de fissuras ao longo do explante (D). Barras = 5 mm. ep: extremidade proximal; ed: extremidade distal.



**Figura 5.** Calogênese em ambas as extremidades e organogênese na extremidade proximal de segmentos do epicótilo de *Cajanus cajan* L. cultivados em diferentes meios contendo citocinina e  $11,77 \mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  após 32 dias de cultivo. **A, C e E** – Explantes do cv. Anão inoculados em meio MS acrescido de  $2,22 \mu\text{M}$  de BAP,  $22,22 \mu\text{M}$  de BAP +  $2,27 \mu\text{M}$  de TDZ e  $2,27 \mu\text{M}$  de TDZ respectivamente; **B, D e F** – Explantes do cv. Fava Larga inoculados em meio MS acrescido de  $2,22 \mu\text{M}$  de BAP,  $22,22 \mu\text{M}$  de BAP +  $2,27 \mu\text{M}$  de TDZ e  $2,27 \mu\text{M}$  de TDZ respectivamente. Barras = 5 mm. ep: extremidade proximal; ed: extremidade distal.



**Figura 6.** Formação de brotações na extremidade proximal de segmentos do epicótilo de *C. cajan* L. (cultivares Anão e Fava Larga) cultivados em meio MS suplementado com citocinina e nitrato de prata. As barras verticais indicam os desvios padrões.



**Figura 7.** Organogênese na extremidade proximal de segmentos do epicótilo de *Cajanus cajan* L. cv. Fava Larga cultivados em meio MS acrescido de 22,22 µM de BAP + 2,27 µM de TDZ e 11,77 µM de AgNO<sub>3</sub> após 32 dias. **A** – Aspecto geral das brotações. **B** – Seção longitudinal. As setas indicam os primórdios foliares. **C** - Diferenciação das gemas seguindo um padrão típico de organogênese apresentando a continuidade vascular com o tecido calogênico formado. **D** - Detalhe do meristema apical de parte aérea com intensa divisão celular. As setas indicam a formação de tricomas. Barras = 3,0 mm (**A**); 200 µm (**D**); 300 µm (**C**); 400 µm (**B**). ma: meristema apical de parte aérea; cl: calo; tv: tecido vascular.

#### 4. Discussão

Após 32 dias de cultivo, observou-se formação de raízes apenas no tratamento controle (tanto na presença quanto na ausência de  $\text{AgNO}_3$ ), restrita ao extremo proximal dos explantes. Resultados semelhantes foram obtidos por Filismino (2005) ao cultivar segmentos de hipocótilo de maracujazeiro em meio desprovido de fitorreguladores, observando que somente o extremo proximal foi competente para o processo rizogênico em explantes cultivados nas orientações horizontal e vertical. Segundo o mesmo autor, a aplicação de citocininas parece desativar a polaridade fisiológica para a rizogênese, mas não para a calogênese nesse extremo, sugerindo que a adição de citocinina rompe a relação auxina:citocinina endógena favorável ao enraizamento adventício, estando de acordo com o postulado de Skoog e Miller (1957).

A adição de  $\text{AgNO}_3$  no tratamento controle, proporcionou a formação de maior número de raízes comparado à ausência deste. Resultados semelhantes foram obtidos por Khalafalla e Hattori (2000) ao testarem o efeito do precursor do etileno (ACC) e de três inibidores (nitrato de prata, ácido salicílico e cloreto de cobalto) no enraizamento adventício de brotações de *Vicia faba*. Os autores observaram que o ACC inibiu a formação de raiz, e que, os inibidores do etileno proporcionaram a formação das mesmas, sendo que em concentração apropriadas o  $\text{AgNO}_3$  promoveu aumento no número médio de raízes formadas por explante.

No processo organogênico de berinjela (*Solanum melongena* L.) a incorporação de ACC no meio diminuiu a frequência de primórdios radiculares, sendo o contrário observado com a suplementação dos inibidores AVG (aminoetóxi-vinil-glicina) e STS (tiosulfato de prata), onde um incremento na frequência de raízes foi induzido (Ribeiro 2006).

Resultados contrastantes foram obtidos por Pan et al. (2002). A adição de etefon ( $5 \times 10^{-5}$  M) proporcionou efeito estimulatório no enraizamento adventício de hipocótilos de *Vigna radiata*. O efeito foi dependente do período em que os explantes permaneceram expostos ao etefon, sendo os tratamentos de 0-6 h e 18-24 h mais efetivos.

Quanto ao processo de calogênese nos extremos proximal e distal dos explantes, todos os meios de cultura testados induziram a formação dos mesmos, mas diferenças quanto a intensidade de calejamento foram evidenciadas. O meio

contendo BAP (2,22  $\mu\text{M}$ ) associado com TDZ (2,27  $\mu\text{M}$ ) resultou na formação de calos visualmente maiores em ambas as extremidades quando comparado aos demais meios. Apesar da não suplementação com uma fonte de auxina, a formação de calo pode ser explicada possivelmente pela interação entre o balanço hormonal endógeno e exógeno.

De fato, este resultado está de acordo com aquele apresentado por Hong et al. (2007), que observaram efeito sinérgico na indução de calos a partir de segmentos do epicótilo e hipocótilo de soja (*Glycine max*) quando cultivados em meio acrescido de citocininas. A combinação de BAP e TDZ possibilitou um maior percentual de explantes com formação de calo visivelmente maiores (maior intensidade de calejamento). Quando os explantes foram cultivados em meio contendo apenas BAP ou TDZ, a formação de calo também foi observada, mas em menor intensidade.

Epicótilos de *Phaseolus angularis* também mostraram-se responsivos à formação de calos no extremo basal da maioria dos explantes quando cultivados em meio contendo BAP e TDZ. A formação de calo também foi observada em meio desprovido de reguladores de crescimento, mas em menor intensidade e frequência quando comparado aos meios acrescidos de ambas as citocininas (Mohamed et al., 2006), o que está de acordo com o presente trabalho onde se observou formação de calos visivelmente menores em meio MSØ.

Pôde-se observar que o extremo proximal se mostrou mais responsivo do que o distal em todos os meios testados, estando este resultado de acordo com os observados por García-Luis et al. (1999) em epicótilos de citrus, e por Filismino (2005) em hipocótilos de maracujazeiro. Estes autores afirmaram que a resposta morfogênica superior dada pelos explantes no extremo proximal pode estar relacionada com a interação entre a orientação do explante no meio de cultura e a polaridade fisiológica dos extremos nesses segmentos (balanço hormonal auxina:citocinina endógeno diferente em ambos os extremos).

Em ambos os extremos, com a adição de  $\text{AgNO}_3$  a intensidade de calejamento neste trabalho foi visualmente menor comparada à ausência de  $\text{AgNO}_3$ , independente do tratamento. A menor formação de calo está de acordo com os resultados obtidos por Kumar et al. (1998b) que ao cultivarem explantes foliares de *Albizia procera* em meio de indução acrescido de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{AgNO}_3$  observaram redução significativa na formação de calo; em alguns casos, a regeneração das brotações em meio com  $\text{AgNO}_3$  se deu de forma direta, sem a formação de tecido calogênico.

A diminuição da frequência e tamanho dos calos em explantes de outras espécies como mandioca (Zhang et al., 2001) e pepino (Mohiuddin et al., 2005) também foi observada ao se adicionar AgNO<sub>3</sub> no meio de cultivo, sendo a concentração ótima de AgNO<sub>3</sub> explante e cultivar dependentes. Estes resultados bem como os obtidos no presente trabalho, contrastam com aqueles obtidos por Adkins et al. (1993) no qual a adição de nitrato de prata no meio favoreceu o crescimento de calos de *Oryza sativa* L., enquanto o ACC promoveu decréscimo significativo.

A formação de brotações adventícias no presente trabalho foi observada apenas nos meios de cultura acrescidos de citocinina e AgNO<sub>3</sub>, se restringindo ainda ao extremo proximal dos explantes. Na presença de AgNO<sub>3</sub>, o meio suplementado com as duas citocinas (2,22 µM de BAP e 2,27 µM de TDZ) proporcionou a formação de um maior número de brotações e em maior frequência, quando comparado aos demais. Resultados semelhantes quanto à formação de múltiplas brotações a partir da combinação de ambas citocinias BAP e TDZ foram obtidos em trabalhos com outras espécies leguminosas, como em *Glycine max* (Franklin et al., 2004), *Vicia faba* (Khalafalla e Hattori, 1999) e *Vigna radiata* (Amutha et al., 2003). O efeito sinérgico na promoção de maior número de brotações pode ser explicado pelo modelo proposto por Nielsen et al. (1995). De acordo com esses autores as citocininas BAP e TDZ podem se ligar a uma proteína receptora (CBP, “*Cytokinin-binding protein*”) que possui dois sítios de ligação. Em um desses sítios se liga as citocininas derivadas de adenina (BAP) e no outro, aquelas derivadas de feniluréias (TDZ). Por esta razão, a combinação de ambas é capaz de proporcionar a formação de maior número de brotações, devido possivelmente à ativação dos dois sítios da proteína receptora.

Nos trabalhos citados anteriormente (Khalafalla e Hattori, 1999; Amutha et al., 2003; Franklin et al., 2004), não houve a necessidade de adição de AgNO<sub>3</sub> para a formação das brotações, contrastando com os resultados obtidos no presente estudo, onde a formação das mesmas se deu apenas na presença desse inibidor do etileno. Esse resultado confronta também com aqueles obtidos por Mohamed et al. (2006), onde segmentos de epicótilo de *Phaseolus angularis* foram capazes de formar brotações em meio acrescido de BAP ou TDZ em ambas as extremidades, sendo que no extremo apical esta se deu em uma maior frequência e de forma direta. Em ambos os trabalhos, também não houve a necessidade de adição de nitrato de prata para a formação das brotações.

A não formação de brotações nos explantes cultivados em meio com citocininas desprovido de  $\text{AgNO}_3$ , pode ser atribuída ao estresse causado nos explantes durante o preparo dos mesmos, levando à produção de etileno nas placas, o qual inibiu completamente a regeneração dos explantes, visto que na presença de  $\text{AgNO}_3$  a regeneração foi observada. O tipo de vedação utilizada no presente trabalho também pode ter influenciado de sobremaneira no processo de regeneração. A baixa troca de ar entre o ambiente externo e interno possibilitou possivelmente o acúmulo de compostos gasosos no ambiente *in vitro*. Aliado a isso, a adição de citocininas no meio de cultivo provavelmente cotribuiu para um aumento na produção de etileno, uma vez que a suplementação com citocininas sintéticas pode aumentar a produção deste hormônio (Ferrante e Francini, 2006) sendo o TDZ considerado o mais importante visto que sua habilidade em estimular a produção deste gás é usada para induzir a desfolha em algodão facilitando a colheita (Mok et al., 1982).

O efeito positivo da adição de  $\text{AgNO}_3$  na regeneração de brotações adventícias já foi relatado para várias espécies de Cruciferae (Chi et al., 1990 e 1991; Mukhopadhyay et al., 1992; Palmer, 1992; Eapen e George, 1997); em *Albizi procera* (Kumar et al., 1998b); *Cucumis sativus* L. (Mohiuddin et al., 1997 e 2005); *Helianthus annuus* (Khalid et al., 1991); *Hordeum vulgare* L. (Jha et al., 2007); *Manihot esculenta* Crantz (Zhang et al., 2001); e *Punica granatum* L. (Naik e Chand, 2003).

Nos processos de organogênese de algumas leguminosas, a adição de  $\text{AgNO}_3$  promoveu resultados semelhantes quanto à indução de brotações. Pestana et al. (1999), ao cultivarem explantes foliares de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) em meio de indução acrescido com diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  (1-10  $\mu\text{M}$ ), observaram maior proliferação de brotações quando comparado ao meio sem a adição deste inibidor. O efeito positivo do  $\text{AgNO}_3$  na indução de brotações adventícias também foi observado em *Glycine max* (Wang e Xu, 2008) e *Vigna unguiculata* L. (Brar et al., 1999).

Respostas divergentes foram observadas por Chandra et al. (1997), onde o etileno estimulou a diferenciação de brotações em cotilédones de *Cicer arietinum* L., mas inibiu o processo em epicótilo.

Os resultados mostrados em relação à indução de brotações em meio acrescido de fitorreguladores e  $\text{AgNO}_3$  diferem efetivamente daqueles apresentados por (Lin et al., 1997), onde a adição de nitrato de prata (30-120  $\mu\text{M}$ ) no meio de

indução não proporcionou aumento na regeneração de brotações em *Alstroemeria* L. Os autores relataram ainda que em concentrações elevadas de nitrato de prata (60 e 120  $\mu$ M) a frequência de regeneração foi significativamente diminuída.

Diante do exposto, pode-se concluir que os efeitos do etileno variam marcadamente entre as espécies, podendo ser explicado por diferenças nas condições experimentais, genótipo e diferentes tipos de explantes utilizados.

O fato das brotações terem sido formadas apenas no extremo basal e na presença de  $\text{AgNO}_3$  podem ser considerado mais um reflexo da inibição da ação do etileno por este composto. Sabe-se que o etileno pode degradar bem como reduzir a síntese e o transporte da auxina (Riov e Goren, 1979; Taiz e Zeiger, 2004; Pedersen et al., 2006), assim, com a adição de  $\text{AgNO}_3$  a ação dele provavelmente foi impedida o que de certo modo pode ter permitido o transporte polar da auxina endógena para a base do explante onde a regeneração ocorreu. Esta observação está de acordo com as encontradas por Palmer et al. (1992) onde a regeneração de brotações foi observada apenas na base do pecíolo de folhas cotiledonares de *Brassica campestris* quando cultivadas em meio acrescido com  $\text{AgNO}_3$ .

As análises histológicas realizadas revelaram a origem adventícia das gemas a partir de um tecido calogênico, o que caracteriza o processo de organogênese indireta. García-Luis et al. (1999) e Saini e Jaiwal (2002) obtiveram resultados semelhantes ao cultivarem segmento de epicótilo de citrus e *Vigna mungo* respectivamente, na posição horizontal. Esses autores relataram que a formação de brotações no extremo basal dos explantes ocorreu de forma indireta e que estas apresentaram conexão vascular com o tecido calogênico.

Embora a adição de precursores bem como a mensuração dos níveis de etileno não tenham sido realizados, as respostas obtidas no presente estudo podem estar relacionadas ao efeito deste hormônio.

Desse modo, sugere-se a utilização de outras concentrações de  $\text{AgNO}_3$  bem como a de outros inibidores da ação ou até mesmo da biossíntese do etileno, podendo assim contribuir de maneira efetiva para o processo de regeneração de epicótilos de guandu cvs. Anão e Fava Larga. Novos estudos com intuito de monitorar possível acúmulo de etileno bem como a busca de alternativas no sentido de se evitar os efeitos deste acúmulo fazem-se necessários.

## 5. Referências Bibliográficas

ADKINS, S. W.; KUNANUVATCHAIDACH, R.; GRAY, S. J.; ADKINS, A.L. Effect of ethylene and culture environment on rice callus proliferation. **Journal of Experimental Botany**, 44:1829-1835, 1993.

AMUTHA, S.; GANAPATHI, A.; MURUGANANTHAM, M. *In vitro* organogenesis and plant formation in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 72: 203-207, 2003.

BENSON, E. E. *In vitro* plant recalcitrance: an introduction. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 36: 141-148, 2000.

BIONDI, S.; SCARAMAGLI, S.; CAPITANI, F.; MARINO, G.; ALTAMURA, M. M.; TORRIGIANI, P. Ethylene involvement in the vegetative bund formation in tobacco thin layers. **Protoplasma**, 202: 134-144, 1998.

BLEEKER, A. B.; KENDE, H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. **Annual Review of Cell Development Biology**, 16:1-18, 2000.

BRAR, M. S.; MOORE, M. J.; AL-KHAYRI, J. M.; MORELOCK, T. E.; ANDERSON, E. J. Ethylene inhibitors promote *in vitro* regeneration of cowpea (*Vigna unguiculata* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 35: 222-225, 1999.

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

CHANDRA, R.; KHETARPAL, S.; POLISSETY, R. Effect of plant growth regulators on evolution of ethylene and methane by different explants of chickpea. **Biologia Plantarum**, 40: 337-343, 1997.

CHI, G. L.; BARFIELD, D. -G.; SIM, G. -E.; PUA, E. -C. Effect of AgNO<sub>3</sub> and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. **Plant Cell Reports**, 9: 195-198, 1990.

CHI, G. L.; PUA, E. C.; GOH, C. J. Role of ethylene on de novo shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson *in vitro*. **Plant Physiology**, 96:178-183, 1991.

CRUZ, C. D. **Programa Genes – Aplicativo computacional em genética e estatística**. 2006. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm>>.

DIMASI-THERIOU, K.; ECONOMOU, A. S. Ethylene enhances shoot formation in cultures of the peach rootstock GF-677 (*Prunus persica* X *P. amygdalus*). **Plant Cell Reports**, 15: 87-90, 1995.

EAPEN, S.; GEORGE, L. Plant regeneration from peduncle segments of oil seed *Brassica* species: Influence of silver nitrate and silver thiosulfate. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 51: 229-232, 1997.

EAPEN, S.; TIVAREKAR, S.; GEORGE, L. Thidiazuron-induced shoot organogenesis in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 53: 217-220, 1998.

FERRANTE, A.; FRANCINI, A. Ethylene and leaf senescence. In: KHAN, N. A. (Ed.). **Ethylene action in plants**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. v.1, p. 51-67.

FILISMINO, D. de C. **Avaliação morfológica e histológica da resposta morfogênica *in vitro* de segmentos hipocotiledonares de maracujazeiro influenciada pela posição, orientação e polaridade**. Viçosa, MG: UFV, 2005, 112 f.: il. (Dissertação) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

GAHAN, P.B., GEORGE, E. F. Adventitious regeneration. In: GEORGE, F. E.; HALL, M. A., de KLERK, J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture – The Background**. 3. ed. Springer, 2008. v.1, p. 355-402.

GARCÍA-LUIS, A.; BORDÓN, Y.; MOREIRA-DIAS, J. M.; MOLINA, R. V.; GUARDIOLA, J. L. Explant orientation and polarity determine morphogenic response of epicotyl segments of Troyer Citrange. **Annals of Botany**, 84: 715-723, 1999.

FRANKLIN, G.; CARPENTER, L.; DAVIS, E.; REDDY, C. S. AL-ABED, D.; ALAIWI, W. A.; PARANI, M.; SMITH, B.; GOLDMAN, S. L.; SAIRAM, R. V. Factors influencing regeneration of soybean from mature and immature cotyledons. **Plant Growth Regulation**, 43: 73-79, 2004

HONG, H. P.; ZHANG, H.; OLHOFT, P.; HILL, S.; WILEY, H.; TOREN, E.; HILLEBRAND, H.; JONES, T.; CHENG, M. Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 43:558-568, 2007.

JHA, A. K.; DAHLEEN, L. S.; SUTTLE, J. C. Ethylene influences green plant regeneration from barley callus. **Plant Cell Reports**, 26: 285-290, 2007.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, 27: 137-138, 1965.

KHALAFALLA, M. M.; HATTORI, K. A combination of thidiazuron and benzyladenine promotes multiple shoot production from cotyledonary node explants of faba bean (*Vicia faba* L.). **Plant Growth Regulation**, 27: 145-148, 1999.

KHALAFALLA, M. M.; HATTORI, K. Ethylene inhibitors enhance in vitro root formation on faba bean shoots regenerated on medium containing thidiazuron. **Plant Growth Regulation**, 32: 59-63, 2000.

KHALID, M.; CHARAIBI, B.; ALAIN, L.; ROUSTAN, J. -P.; FALLOT J. Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and cobalt. **Plant Cell Reports**, 10: 204-207, 1991.

KUMAR, P. P.; LAKSHMANAN, P.; THORPE, T. A. Review: Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 34: 94-103, 1998a.

KUMAR, S.; SARKAR, A. K.; KUNHIKANNAN, C. Regeneration of plants from leaflet explants of tissue culture raised safed siris (*Albizia procera*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 54: 137-143, 1998b.

LIN, H. S.; DE JEU, M. J.; JACOBSEN, E. Direct shoot regeneration from excised leaf explants on in vitro grown seedlings of *Alstromeria* L. **Plant Cell Reports**, 16: 770-774, 1997.

MOHAMED, S. V.; SUNG, J-M.; JENG, T-L.; WANG, C-S. Organogenesis of *Phaseolus angularis* L.: high efficiency of adventitious shoot regeneration from etiolated seedlings in the presence of N<sup>6</sup>-benzylaminopurine and thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 86: 187-199, 2006.

MOHIUDDIN, A. K. M.; CHOWDHURY, M. K. U.; ABDULLAH, Z. C.; NAPIS, S. Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber *in vitro* shoot regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 51:75-78, 1997.

MOHIUDDIN, A. K. M.; ABDULLAH, Z. C.; CHOWDHURY, M. K. U.; NAPIS, S. Enhancement of adventitious shoot regeneration in *Cucumis sativus* L. using AgNO<sub>3</sub>. **Plant Tissue Culture e Biotechnology**, 15: 15-23, 2005.

MOSHKOV, I. E.; NOVIKOVA, G. V. GEORGE, E. F. Plant growth regulators III: Gibberellins, ethylene, abscisic acid, their analogues and inhibitors; miscellaneous compounds. In: GEORGE, F. E.; HALL, M. A., de KLERK, J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture – The background**. 3. ed. Springer, 2008. v.1, p. 227-282.

MUKHOPADHYAY, A.; ARUMUGAM, N.; NAUDAKUMAR, P. B. A.; PRADHAN, A. K.; GUPTA, V.; PETAL, D. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: transformation frequency in strongly influenced by the mode of shoot regeneration. **Plant Cell Reports**, 11: 506-513, 1992.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.

NAIK, S.K.; CHAND, P. K. Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine promote in vitro adventitious shoot regeneration of pomegranate (*Punica granatum* L.). **Plant Physiology**, 160: 4234-430, 2003.

NIELSEN, J. M.; HANSEN, J.; BRAND, K. Sinergism of thidiazuron and benzyladenine in axillary shoot formation depends on sequence application in

*Miscanthus x ogiformis* "Giganteus". **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 41:165-170, 1995.

NOGUEIRA, S. R. **Resistência de plantas hospedeiras e identificação de genes diferencialmente expressos na interação Soja - *Phakopsora pachyrhizi***. Viçosa, MG: UFV, 2007, 110 f.: il. (Tese Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

O'BRIEN, T. P.; McCULLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne- Australia: Termarcarphy Pty Ltd., 45p., 1981.

OZUDOGRU, E. A.; OZDEN-TOKATLI, Y.; AKCIN, A. Effect of silver nitrate on multiple shoot formation of Virginia-type peanut through shoot tip culture. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 41: 151-156, 2005.

PALMER, C. E. Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate. **Plant Cell Reports**, 11: 541-545, 1992.

PAN, R. C.; WANG, J. X.; TIAN, X. S. Influence of ethylene interaction in adventitious root formation in mung bean cuttings. **Plant Growth Regulation**, 36: 135-139, 2002.

PEDERSEN, M. K.; BURTON, J. D.; COBLE, H. D. Effect of cyclanilide, ethephon, auxin transport inhibitors, and temperature on whole plant defoliation. **Crop Science**, 46: 1666-1672, 2006.

PESTANA, M. C.; LACORTE, C.; de FREITAS, V. G.; de OLIVEIRA, D. E.; MANSUR, E. In vitro regeneration of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through organogenesis: effect of culture temperature and silver nitrate. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 35:214-216, 1999.

PUA, E.-C.; CHI, G.-L. De novo shoot morphogenesis and plant growth of mustard (*Brassica juncea*) *in vitro* in relation to ethylene. **Physiologia Plantarum**, 88: 467-474, 1993.

RIBEIRO, A. P. O. **Influência de genótipo, agentes gelificantes, precursor (ACC) e inibidores (AVG e STS) do etileno e tipo de vedação na morfogênese *in vitro* de berinjela (*Solanum melongena* L.)**. Viçosa, MG: UFV, 2006, 113 f. : il. (Tese Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

RIOV, J. GOREN, R. Effect of ethylene on auxin transport and metabolism in midrib sections in relation to leaf abscission of woody plants. **Plant, Cell and Environment**, 2: 83-89, 1979.

SAINI, R.; JAIWAL, P. K. Age, position in mother seedling, orientation, and polarity of the epicotyls segments of blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) determines its morphogenic response. **Plant Science**, 163: 101-109, 2002.

SATYAVATHI, V. V.; PRASAD, V.; SHAILA, A. M. S.; SITA, G. L. Expression of hemagglutinin protein of Rinderpest virus in transgenic pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] plants. **Plant Cell Reports**, 21: 651-658, 2003.

SHARMA, K. K.; LAVANYA, M.; ANJALIAH, V. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) expressing the synthetic BT *cryIAb* gene. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 42: 165-173, 2006

SHIVA PRAKASH, N.; PENTAL, D.; BHALLA-SARIN, N. Regeneration of pigeon pea (*Cajanus cajan*) from cotyledonary node via multiple shoot formation. **Plant Cell Reports**, 13: 623-627, 1994.

SINGH, N. D.; SAHOO, L.; SARIN, N. B.; JAIWAL, P. K. The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millsp.). **Plant Science**, 164: 341-347, 2003.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of Society for Experimental Biology**, 11: 118-131, 1957.

SUREKHA, Ch.; BEENA, M. R.; ARUNDHATI, A.; SINGH, P. K.; TULI, R.; DUTTA-GUPTA, A.; KIRTI, P. B. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) using embryonal segments and development of transgenic plants for resistance against Spodoptera. **Plant Science**, 169: 1074-1080, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2004). **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Artmed. Porto Alegre/RS: pp. 541-459.

THU, T. T.; MAI, T. T. X.; DEWAELE, E.; FARSI, S.; TADESSE, Y.; ANGENON, G.; JACOBS, M. *In vitro* regeneration and transformation of pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **Molecular Breeding**, 11:159-168, 2003.

WANG, G.; XU, Y. Hypocotyl-based *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) and application for RNA interference. **Plant Cell Reports**, 27:1177-1184, 2008.

YADAV, P. B. S.; PADMAJA, V. Shoot organogenesis and plantlet regeneration from leaf segments of pigeonpea. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 73: 197-200, 2003.

ZHANG, P.; PHANSIRI, S.; PUONTI-KAERLAS, J. Improvement of cassava organogenesis by the use of silver nitrate *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 67: 47-54, 2001.

ZIV, M. Developmental and structural patterns of *in vitro* plants. In: SOH, W. Y.; BHOJWANI, S. S. (Eds.). **Morphogenesis in plant tissue cultures**. London: Kluwer Academic Publishers, 1999. p.235-253.

## CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições experimentais em que os trabalhos foram conduzidos, os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- Eixos embrionários podem ser considerados promissores como fonte de explantes ao processo de organogênese direta de guandu cvs. Anão e Fava Larga quando cultivados em meio MS acrescido das citocininas BAP e TDZ.
- A utilização combinada de BAP e TDZ possibilitou efeito sinérgico na indução de brotações adventícias a partir de eixos embrionários decapitados. Estas apresentaram tamanho muito reduzido devido possivelmente a um efeito tóxico.
- As brotações induzidas a partir de eixos embrionários cultivados em meio MS suplementado apenas com BAP ou TDZ apresentaram folhas mais expandidas e aspecto vigoroso.
- A adição combinada de BAP, TDZ e  $\text{AgNO}_3$  em meio MS proporcionou a formação de múltiplas brotações adventícias via organogênese indireta a partir de segmentos de epicótilo de plântulas de guandu cvs. Anão e Fava Larga.
- A utilização de  $\text{AgNO}_3$  se faz necessário para a indução de brotações adventícias a partir de segmentos de epicótilo de plântulas de guandu cvs. Anão e Fava Larga.

O presente trabalho gerou informações relevantes para o desenvolvimento de um protocolo eficiente de regeneração de guandu cvs. comerciais Anão e Fava Larga via organogênese a partir de eixos embrionários decapitados e segmentos de epicótilo. Os dados aqui apresentados servirão de base para a realização de novos estudos com intuito de se aperfeiçoar a eficiência de regeneração *in vitro* de guandu, bem como as fases de alongamento e aclimatização *ex vitro*.

## ANEXO

**Tabela 1a.** Resumo da análise de variância do número de raízes formadas no extremo proximal dos explantes cultivados em meio controle.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
		Raiz		
Cultivares	1	0,0063	0,0063	0,2278 <sup>ns</sup>
Resíduo	8	0,2194	0,0274	
Média	0,7083			
CV (%)	23,3818			

<sup>ns</sup> Não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

**Tabela 1b.** Resumo da análise de variância do número de raízes formadas no extremo proximal dos explantes cultivados em meio controle com adição ou não de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>).

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
		N° de raiz		
Cultivar	1	0,160	0,160	0,9632 <sup>ns</sup>
AgNO <sub>3</sub>	1	1,7640	1,7640	106,1940*
Cultivar X AgNO <sub>3</sub>	1	0,0010	0,0010	0,0602 <sup>ns</sup>
Resíduo	36	0,5980	0,0170	
Média	0,345			
CV (%)	37,558			

\*Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância do número de brotações (atribuídas em notas de 0 a 3) formadas no extremo distal dos explantes cultivados em meio MS com suplemento de BAP e/ou TDZ.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
		Brotação	Brotação	
Cultivares	1	0,3284	0,3284	8,7874 <sup>ns</sup>
Meios de cultivo	5	9,1768	1,8354	49,1163*
Cultivares X Meios de cultivo	5	0,1780	0,0356	0,9524 <sup>ns</sup>
Resíduo	48	1,7936	0,0374	
Média	0,6988			
CV (%)	27,6627			

\*Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.