

ESTUDOS SOBRE A REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE  
*Vigna unguiculata* (L.) Walp. (= *V. sinensis* (L.) Savi ex Hassk)  
A PARTIR DE SUSPENSÕES CELULARES

Ana Emília Ramos de Matos Brito

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários  
à obtenção do grau de  
MESTRE EM BIOQUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - CEARÁ

1980



Ao meu pai JOÃO RAMOS  
PEREIRA DA COSTA,  
in memoriam.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. ADERSON DE MENEZES AQUINO, pela orientação criteriosa durante a realização desta pesquisa e pela oportunidade de participar de trabalho decisivo na minha formação científica.

Aos professores Dr. JOSÉ TARQUINIO PRISCO e Dr. LUIZ GONZAGA REBOUÇAS FERREIRA pelas valiosas sugestões apresentadas durante a elaboração do presente trabalho.

À professora MARGARIDA MARIA BARROS DE MIRANDA e à Sra. VERA AUGUSTA GUIMARÃES NEPOMUCENO pela colaboração em técnicas anatômicas e disponibilidade do equipamento fotomicrográfico existente no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

Ao professor Dr. WALTER HANDRO da Universidade de São Paulo e à professora ARTEMÍSIA ARRAES HERMANS da Universidade de Brasília pelas sugestões na fase experimental.

À direção do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo uso de suas instalações durante a realização deste trabalho, bem como aos professores, colegas e funcionários deste Departamento pelo ambiente de cooperação e estímulo.

Ao Departamento de Biologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, que me permitiu o afastamento das atividades didáticas durante a realização de meu curso de Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela ajuda financeira, através do Convênio Dessalinização (CNPq/FCPC/UFC).

Aos meus irmãos FRANCISCO e MANUEL pelos desenhos e sugestões fotográficas.

De modo especial sou grata ao meu marido e minha mãe que muito colaboraram para a execução deste trabalho.

# SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	vii
DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS .....	x
RESUMO .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Desenvolvimento da Cultura de Tecidos Vegetais.	1
1.2. Obtenção de "callus" .....	3
1.3. Cultura de células .....	4
1.4. Regeneração em Culturas <u>in vitro</u> .....	6
1.5. Objetivos do trabalho .....	9
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	11
2.1. Condições de germinação .....	19
2.2. Indução de "callus" .....	19
2.3. Regeneração em "callus" de secções cotiledo- nares .....	20
2.4. Obtenção de suspensões celulares a partir de "callus" .....	21
2.5. Indução de "callus" em suspensões celulares ..	22
2.5.1. Em meio líquido .....	22
2.5.2. Em meio semi-sólido .....	22
2.6. Regeneração em "callus" originado de suspen- sões celulares .....	22
3. RESULTADOS .....	25
3.1. Produção de "callus" .....	25
3.2. Obtenção de suspensões celulares multiplican- do-se ativamente .....	33
3.3. Regeneração .....	37
3.3.1. Em "callus" de secções cotiledonares...	37
3.3.2. Em "callus" de suspensões celulares ...	41
4. DISCUSSÃO .....	54
5. CONCLUSÕES .....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
1. Composição dos meios de crescimento de células em suspensão .....	14
2. Composição dos meios indutores de "callus" em suspensões celulares .....	15
3. Valores de peso inicial (Pi), peso final (Pf) e aumento de peso fresco (Pf - Pi) das três secções cotiledonares de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridõ .....	30
4. Valores de aumento de peso relativo das três secções cotiledonares das sementes de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridõ .....	31

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA		PÁGINA
1.	Sequência esquemática dos processos utilizados nos estudos de multiplicação e diferenciação celular e tentativas de obtenção do ciclo de transformações: tecidos somático → "callus" → suspensão celular → "callus" → "plantlets" .....	24
2.	Sementes de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô, após 4 dias de semeadura em P.D.A.....	26
3.	Explantes de plúmula (EMB), hipocótilo (HIP) e radícula (RAIZ) de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô, e seus respectivos "calli", após incubação por 12 dias em meio indutor de "callus" em explante.....	27
4.	Conjunto de placas mostrando, de cima para baixo, as seções cotiledonares proximal, mediana e distal, respectivamente, após 12 dias de incubação em meio indutor de "callus" em explante .....	28
5.	"Calli" com aproximadamente 1mm de diâmetro, induzidos a partir de células em suspensão de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô.....	32
6.	"Calli" de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô, provenientes de suspensões celulares, previamente filtradas (à esquerda) e não filtradas (à direita), obtidos após 8 semanas de incubação em meio semi-sólido indutor de "callus".....	34
7.	Colorímetro fotoelétrico Klett-Summerson com erlenmeyer dotado de braço lateral, utilizado para acompanhar o aumento de turbidez de suspensões celulares em crescimento .....	35
8.	Células de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô em suspensão .....	36
9.	Célula de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô em suspensão, apresentando divisão equatorial da parede .....	38

LISTA DE ILUSTRAÇÕES (continuação)

FIGURA		PÁGINA
10.	"Calli" induzidos em secções proximais de cotilédones de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô, apresentando diferenciação em raízes, após 2 incubações sucessivas nos meios 9 (à esquerda), 10 (ao centro) e 11 (à direita).....	39
11.	"Callus" induzido em secção proximal de cotilédone de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô, mostrando raízes evidentes após 2 incubações sucessivas em meio 11 .....	40
12.	"Calli" obtidos de células de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô em suspensão, após transferências para meio 1 (à direita) e em seguida para meio 4 (à esquerda) .....	42
13.	"Calli" de células de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô em suspensão, após incubação nos meios 1, 2, 3 e 4, da esquerda para a direita, respectivamente.....	43
14.	"Calli" de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô e de <u>Nicotiana tabacum</u> L. (TABACO), após incubação nos meios 1 (à esquerda) e 11 (à direita).....	44
15.	Elementos traqueais em "callus" obtido de células de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô em suspensão, após transferência para meio 1 e em seguida para meio 4.....	46
16.	"Callus" obtido de células de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô em suspensão, após transferências para meio 1 e em seguida para meio 4... ..	47
17.	"Calli" de suspensões celulares de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô, após incubação em meio 1 e em seguida em 6 das 30 combinações do meio 8 .....	48
18.	"Calli" de suspensões celulares de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô, incubados no meio 1 e em seguida nos meios 1, 9, 10 e 11, da esquerda para a direita, respectivamente.....	49

LISTA DE ILUSTRAÇÕES (continuação)

FIGURA		PÁGINA
19.	"Calli" obtidos de suspensões celulares de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô, incubados no meio 1 e em seguida nos meios 9, 11 e 10, da esquerda para a direita, respectivamente .....	50
20.	Elementos de vasos em "callus" obtido de células de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô em suspensão, após incubação no meio 1 e em seguida no meio 10 .....	51
21.	"Calli" obtidos de suspensões celulares de <u>Vigna unguiculata</u> (L.) Walp. (= <u>V. sinensis</u> (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô, incubados nos meios 1, 10 e 9, da esquerda para a direita, respectivamente.....	53

## DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

AIA	-	Ácido indol acético
ANA	-	Ácido naftaleno acético
"callus"	-	É uma massa de tecido consistindo principalmente de células parenquimatosas não diferenciadas.
2,4-D	-	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
EDTA	-	Ácido etilenodiaminotetracético
Explante	-	Porções de tecidos que irão dar origem a "callus".
m/v	-	massa/volume
PDA	-	"Potato dextrose agar"
Pf	-	Peso final
Pi	-	Peso inicial
ppm	-	Partes por milhão
Regene ração	-	É o termo aplicado ao início de meristemas de caule e raiz em massa de "callus" não organizada.
s	-	desvio padrão
v/v	-	volume/volume
$\bar{x}$	-	média

## RESUMO

"Calli" foram induzidos em secções de cotilédones, radículas, hipocótilos e plúmulas de Vigna unguiculata (L.) Walp (= Vigna sinensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô, quando incubados em um meio quimicamente definido contendo 19,59  $\mu\text{M}$  de ácido maftaleno acético e 0,46  $\mu\text{M}$  de cinetina.

Determinações qualitativas e quantitativas da produção de "calli" foram realizadas em secções transversais de cotilédones. A secção proximal em relação ao eixo embrionário foi a que apresentou maior produção de "callus". Esses "calli" foram submetidos à indução de morfogênese, iniciando raízes.

Suspensões celulares foram obtidas a partir de "calli" formados em secções cotiledonares e destas, novos "calli" foram induzidos, tanto em meio líquido quanto em meio semi-sólido. Diferenciação de raiz foi induzida em "callus" originado de suspensão celular, em meios contendo cinetina e ácido naftaleno acético ou ácido indol acético. Em nenhum caso verificou-se a indução de brotos (parte aérea) ou a indução simultânea de raiz e brotos em um mesmo "callus".

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Desenvolvimento da Cultura de Tecidos Vegetais

O estudo em plantas inteiras é de difícil interpretação, devido a não uniformidade das partes individuais, envolvendo considerações de diferentes tecidos e células. Por esse motivo tem-se reconhecido que esse estudo pode ser simplificado quando se trabalha com órgãos, tecidos ou células isoladamente em culturas assépticas, permitindo melhor controle das condições para estudos metabólicos, fisiológicos e genéticos. Por outro lado, o conceito de totipotência das células vegetais, segundo o qual pode-se produzir uma planta a partir de uma célula quando esta for cultivada em meio adequado, associado a manipulação destas técnicas, permite desenvolver culturas com características desejáveis através da obtenção de células experimentalmente selecionadas.

Os primeiros trabalhos em que foram utilizadas técnicas de cultura de tecidos vegetais datam do início do século (HABERLANDT, 1902). Outros estudos utilizando esta técnica, seguiram-se a este, como os de germinação de sementes de orquídeas (KNUDSON, 1922) e os de manutenção de culturas por tempo ilimitado (WHITE, 1934; GAUTHERET, 1939 e NORBECOURT, 1939). A essa fase inicial de estabelecimento dos princípios fundamentais das técnicas, seguiram-se os trabalhos não menos importantes de SKOOG & MILLER (1957) e de STEWARD (1958) nos estudos de regulação do crescimento e desenvolvimento organizado de tecidos. Estabelecidos os primeiros meios de cultura sintéticos, tornou-se possível o cultivo dos mais diversos tecidos. MURASHIGE & SKOOG (1962) introduziram variações nos meios relacionando-as com o tipo de crescimento observado, iniciando então uma nova fase da cultura de tecidos *in vitro*, que estende-

-se até hoje.

As técnicas de cultura de tecidos vegetais permitiram um grande avanço nas conquistas científicas. Os principais sucessos dessa técnica foram, entre outros: a) cultura de células isoladas com posterior regeneração de indivíduos íntegros; b) obtenção de protoplastos a partir de células isoladas, cultura destas e regeneração de plantas; c) obtenção de plantas haplóides a partir de cultura de antera; d) estudos da floração *in vitro*; e) estudos de modificações genéticas por agentes mutagênicos a nível de células ou tecidos.

Esses conhecimentos possibilitaram as mais diversas aplicações, tais como: a) melhoramentos genético de culturas; b) estudo da resistência à infecção por patógenos, ou resistência às condições ambientais adversas (através da seleção de linhagens resistentes); c) produção de substâncias de interesse farmacológico e outros produtos naturais; d) determinação de interações hormonais na regulação do crescimento, a fim de selecionar genótipos de padrões morfogenéticos desejáveis; e) multiplicação clonal rápida de variedades selecionadas, etc.

As plantas são capazes de sintetizar todas as substâncias orgânicas requeridas para sua própria vida a partir de dióxido de carbono, água, sais inorgânicos e energia radiante. No entanto, em culturas estéreis requer-se uma nutrição mais complexa. Há considerável diversidade nos requerimentos nutricionais de tecidos para espécies diferentes, ou até para tecidos distintos de uma mesma planta.

O meio de cultura pode ser líquido ou semi-sólido, e para a maioria dos tecidos vegetais requer quatro grupos de compostos: 1) uma fonte de carbono na forma de açúcar, geralmente sacarose; 2) nutrientes inorgânicos, compreendendo, macronutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre) e micronutrientes (boro, cloro, cobre, ferro, manganês, molibdênio e zinco); 3) vitaminas (principalmente a tia-

mina) e 4) reguladores de crescimento (principalmente auxinas e citocininas). Complexos naturais podem ser usados quando outras tentativas de usar meio quimicamente definido falharem para um determinado tipo de cultura. O uso de antioxidantes também tem sido empregado para retardar o escurecimento e deterioração do explante utilizado.

### 1.2. Obtenção de "callus"

Quando pequenas porções de diferentes tecidos são colocadas em meio apropriado, estes induzem crescimento de "callus". A obtenção desses "calli" é de fundamental importância para o início e manutenção de linhagem de células em cultura e também para estudos de organogênese (GAMBORG, 1975). Na escolha do tecido ou explante que dará origem ao "callus", deve-se considerar: 1) o órgão que serve de fonte de tecido; 2) a idade fisiológica e ontogenética do órgão; 3) o tamanho do explante; 4) o estado sanitário da planta de onde se obtém o explante; 5) a estação em que o explante foi obtido, principalmente em variedades adaptadas ao clima (MURASHIGE, 1974).

A obtenção de "callus" a partir de explantes de raízes de hipocótilos e de cotilédones, tem sido observada por vários autores.\* Em *Phaseolus coccineus*, os "calli" foram induzidos em meio sem hormônio a partir de explante de suspensor e a quantidade de "callus" formada foi função do estágio de desenvolvimento do embrião e da integridade do sistema suspensor-embrião (BENNICI *et alii*, 1976). Em soja (*Glycine max* (L.) Merr. cv. Bragg) e trevo perene (*Trifolium repens* L. cv. Rejal Ladino), OSWALD *et alii* (1977) observaram que os "calli" eram induzidos em tecido somático num meio com relação auxina/citocinina de 50:1 (massa/massa).

A produção de "callus" em *Vigna sinensis* usando-se explantes de raízes e de hipocótilos de sementes com cinco dias de germinação é função da presença de extrato de levedura,

além de 2,4-D e cinetina (MATSUBARA, 1975). REDDY & NARAYANA (1977), estudando requerimentos hormonais para obtenção de "callus" a partir de explantes de hipocótilos de *Vigna sinensis*, encontraram que: em meio com AIA e cinetina não houve formação de "callus", em meio com 2,4-D e cinetina só houve formação de "callus" após a 6ª cultura e em meio com ANA e cinetina houve pronta formação de "callus". Eles também observaram que para crescimento contínuo dos "calli" foram essenciais 1 ppm de 2,4-D e 1 ppm de cinetina. Já ALBUQUERQUE (1979) trabalhando com a mesma espécie e utilizando o mesmo tipo de explante obteve "callus" em meio de cultura contendo 9 mg/l de cinetina e 3 mg/l de ANA.

### 1.3. Cultura de células

As culturas em suspensão são geralmente iniciadas colocando-se pedaços de tecidos friáveis ("callus") em meio de cultura líquido sob agitação. Nestas condições as células são então dispersadas, formando uma suspensão, que contém fragmentos de explantes, células livres e agregadas. Utiliza-se, frequentemente, a transferência da suspensão com pipeta ou seringa a fim de desfazer os fragmentos e agregados celulares grandes. Usa-se também deixar a cultura sedimentar por alguns segundos e utilizar apenas o sobrenadante dessa cultura, ou ainda a filtração em malha de aço ou nylon. A cultura líquida deve permanecer em agitação para permitir trocas gasosas adequadas entre o meio e o ar e para manter as células e agregados celulares distribuídos uniformemente.

Durante a incubação o número de células aumenta por certo tempo até que a cultura atinge um máximo de velocidade de multiplicação celular. A relação entre o número de células numa cultura em suspensão e o tempo, mostra uma curva semelhante a de crescimento bacteriano, apresentando uma fase inicial estacionária ("lag-phase"), seguida de fase logarítmica de crescimento, segunda fase estacionária e fase de declínio (WILSON, KING & STREET, 1971, citados por STREET, 1973). Para

a obtenção dessa curva, as suspensões celulares devem ser constituídas de células viáveis e apresentar uma densidade celular inicial mínima, pois abaixo de uma densidade crítica não haverá uma adequada multiplicação celular (STUART & STREET, 1969, citados por STREET, 1973).

Um dos aspectos mais aleatórios do trabalho de cultura de tecidos e células é a escolha do meio, porque diante de uma multiplicidade de meios torna-se difícil selecionar o mais apropriado para determinada investigação, especialmente, quando não se tem um trabalho anterior em que se basear (STREET, 1973). O mesmo autor refere-se à necessidade de se usar uma concentração inicial de células alta para manutenção de culturas em crescimento.

STEWART (1963) encontrou que a adição de água de côco e de hidrolisado de caseína ao meio básico estimulava o crescimento de culturas celulares de explantes de batata doce, cenoura, nabo branco e alcachofra. LIAU & BOLL (1970) cultivaram suspensões celulares derivadas de "callus" de *Phaseolus vulgaris* e desenvolveram um meio líquido contendo água de côco, que estimulava a multiplicação celular.

Suspensões celulares foram obtidas por OSWALD *et. alii* (1977), a partir de "callus" de soja e trevo, quando usaram uma relação auxina/citocinina de 5:1, tanto para início das suspensões como para a subsequente indução de "callus". Os autores também encontraram que meio com vitamina E e alta concentração de ferro favorece a dispersão de células em suspensão, enquanto que, meio sem vitamina E e com baixa concentração de ferro induz a formação de "callus" e regeneração de brotos ou de "plantlets".

Uma outra técnica de cultura de suspensões celulares é a de plaqueamento, que foi introduzida por BERGMANN, em 1960, (citado por EARLE & TORREY, 1965). Esta técnica consiste na utilização de meio semi-sólido para cultivo de colônias celulares, a partir de células dispersas em meio contendo agar.

O estágio em que as células das suspensões plaqueadas começam a se dividir e formar colônias, ocorre quando a concentração intracelular dos metabólitos, em equilíbrio com o meio externo, atingir níveis compatíveis com o referido processo (NARAYANASWAMY, 1977). Esse autor também relata que a eficiência teórica do crescimento de suspensões plaqueadas nunca atinge 100%, e que as divisões iniciam-se nos pequenos agregados celulares e seguem-se em células isoladas; quanto à densidade mínima inicial, refere-se a  $1 - 1,25 \times 10^3$  células/ml.

#### 1.4. Regeneração em culturas *in vitro*

A capacidade de regeneração de organismos inteiros a partir de porções isoladas de caule, raiz, folha, cotilédone e até de tecido relativamente desorganizado como "callus" é uma característica vegetal. Esse fenômeno evidencia que as células capazes de diferenciação não perderam suas potencialidades genéticas. A totipotência tem sido demonstrada experimentalmente em várias espécies vegetais. Deve-se considerar a importância da constituição genética na determinação da resposta morfogênica apresentada por uma espécie vegetal diante dos fatores de crescimento exógenos. A natureza dos fatores que influem na regeneração, quando uma massa de tecido desorganizada dá origem a um alto grau de organização não está completamente esclarecida. Sabe-se que o processo é iniciado por hormônios, e que em cultura de "callus" as divisões celulares ocorrem ao acaso em todas as direções, não havendo eixos de polaridade definidos, mas quando esses "calli" são colocados em certas condições de cultura, os padrões de divisão começam a se definir, dando origem a tecidos organizados. As condições específicas para a regeneração vegetal devem ser desenvolvidas para cada espécie de planta (KARTHA, 1975).

WETMORE (1954) já se referia ao desenvolvimento de uma planta inteira a partir de uma única célula. SKOOG & MILLER (1957) observaram que auxinas e citocininas interagem para iniciar não só a divisão celular, mas também para formar meriste-

mas organizados, regulando o tipo de meristema formado, se de caule ou de raiz. Eles observaram que relações de concentração cinetina/AIA baixas, intermediárias e altas favorecem, respectivamente, formação de raiz, crescimento de "callus" não-diferenciado e formação de broto (parte aérea).

O desenvolvimento de plantas de cenoura a partir de células foi obtido por STEWARD (1963) e a diferenciação de elementos traqueais, células com amido e tecido clorofilado a partir de colônias celulares de *Convolvulus arvensis* L. foi observada por EARLE & TORREY (1965).

Considerando que todo organismo é o produto de interação entre suas potencialidades genéticas e o meio, o desenvolvimento, em última análise teria que ser descrito em termos de expressão genética. Segundo WAREING & PHILLIPS (1970), se os hormônios afetam a expressão genética, então podem agir: 1) controlando diretamente a repressão do gen; 2) afetando a síntese de RNA mensageiro (transcrição); 3) afetando alguns passos na síntese de proteínas (tradução) e 4) afetando a atividade enzimática. Embora regulem a atividade do gen, os hormônios parecem não determinar quais os gens que serão ativados, isto é, o tecido já estaria predeterminado a responder ou não a essa influência. Consideram também que certos aspectos do desenvolvimento podem envolver outros fatores além daqueles controlados pelos gens, tais como, propriedades físicas de células e tecidos, além dos fatores ambientais como temperatura e luz.

O desenvolvimento de plantas albinas (*Bromus inermis*) a partir de células em meio de cultura sem hormônios exógenos, por embriogênese e não por formação de meristemas foi relatado por GAMBORG *et. alii* (1970).

A obtenção de órgãos diferenciados ou de plantas a partir de "callus" foi relatada para diversas espécies vegetais por diferentes autores (MASTELLER & HOLDEN, 1970; SAUNDERS & BINGHAN, 1972; ENGVILD, 1972; GAMBORG *et. alii*, 1974; KARTHA, GAMBORG &

CONSTABEL, 1974; SCOWCROFT & ADAMSON, 1976; CUMMINGS *et alii*, 1976; CROCOMO *et. alii*, 1976; GAMBORG *et. alii*, 1977; OSWALD *et. alii*, 1977; PHILLIPS & COLLINS, 1979).

As características regenerativas dos explantes podem ser atribuídas à idade fisiológica e à extensão da diferenciação entre seus constituintes celulares (MURASHIGE, 1974).

Regeneração de "plantlets" a partir de células ou de "callus", na família Leguminosa, não tem sido observada com frequência (NARAYANASWAMY, 1977). Todavia, isto foi possível em *Stylosanthes hamata* (SCOWCROFT & ADAMSON, 1976), *Phaseolus vulgaris* (CROCOMO *et. alii*, 1976) e trevo (OSWALD *et. alii*, 1977). Em geral quando se consegue regeneração, isto ocorre em culturas de meristema apical (KARTHA & GAMBORG, 1978). Organogênese (formação de caule) a partir de "callus" provenientes de células apicais de *Pisum sativum* foi relatada por GAMBORT *et. alii* (1974). Esses autores afirmam que não há nenhum método adequado para obtenção de plantas a partir de células de Leguminosas, embora as células de algumas espécies tenham sido cultivadas *in vitro*.

No caso de *Vigna sinensis*, o cotilédone tem sido a parte mais regenerativa (MURASHIGE, 1974). Diferenciação em traqueídeos nos "calli" de hipocótilos em desenvolvimento foi observada por REDDY & NARAYANA (1977) usando meio com 1 ppm de 2,4-D e 1 ppm de cinetina. MATSUBARA (1975), trabalhando com a mesma espécie, não observou diferenciação de células em meio com concentrações de 2,4-D de 0,5 a 5 mg/l, mas em concentrações mais baixas de 2,4-D encontrou ocasionalmente células diferenciadas em elementos traqueais lignificados. Essas mesmas células foram observadas usando 2mg/l de cinetina. ALBUQUERQUE (1979) induziu diferenciação de raiz em "callus" de segmento de hipocótilo de *Vigna sinensis* usando concentração de 3,0mg/l de cinetina, isolada ou combinada com 4,5mg/l de ANA; não observou diferenciação em caule e folhas, atribuindo o fato ao reduzido período de tempo utilizado. Considera ainda que a presença dos reguladores de crescimento poderia também causar

inibição nos explantes, e que a remoção de tais reguladores poderia quebrar essa inibição (cita sugestão de NISHI *et. alii*, 1973).

Para orientação efetiva do balanço de reguladores de crescimento no início de um órgão, deveria haver dados sobre as concentrações ou mudanças nesses reguladores endógenos durante a morfogênese, o que até hoje não existe a não ser estudos indiretos (THORPE, 1978). Os produtos da citodiferenciação não são equivalentes aos das células especializadas da planta inteira (STREET, 1978, citado por EVERETT *et. alii*, 1978). Sobre a ação molecular dos reguladores de crescimento, EVERETT *et. alii*, (1978) dizem haver pouca dúvida que as auxinas podem estimular a síntese de DNA, RNA e de proteína, supondo que estas agem a nível de replicação, transcrição e tradução. Quanto ao papel das citocininas, consideram que a maioria das evidências sugerem que estas agem no processo de tradução. Sobre as interações auxina-citocinina, reportam-se ao fato de que as plantas conseguem metabolizar os reguladores de crescimento, e que portanto deve-se considerar não só o suplemento exógeno ou a biossíntese de um hormônio, mas também sua degradação e conjugação para ter-se noção da atividade hormonal. Referem-se ainda a que a hidrólise de conjugados (de auxina e citocinina) tem feito supor que os ácidos livres ou bases seriam responsáveis pelas atividades biológicas observadas; e que então, a conjugação poderia ser uma maneira de preservar a atividade biológica dos reguladores de crescimento vegetal.

#### 1.5. Objetivos do trabalho

O feijão de corda é uma Leguminosa anual largamente cultivada no Nordeste brasileiro e constitui um dos alimentos básicos para a população dessa Região. No entanto, a irregularidade pluviométrica que se observa no Nordeste, associada ao aumento de áreas irrigadas com problemas de salinidade, têm sido responsáveis por grandes perdas na produção agrícola desta

cultura. Este fato tem levado os melhoristas a procurar selecionar cultivares resistentes a sêca e/ou salinidade. Todavia, utilizando-se as técnicas clássicas de melhoramento vegetal, os progressos têm sido muito lentos.

Nos últimos anos, alguns pesquisadores têm conseguido resultados promissores usando técnicas de cultura de células e tecidos *in vitro*, como meio de selecionar plantas resistentes a condições adversas (CARLSON, 1973; NABORS *et. alii*, 1975; DIX & STREET, 1975).

O objetivo do presente trabalho é o de induzir reprodutível e controladamente o ciclo de transformações: tecido somático → "callus" → suspensão celular → "callus" → "plantlets", com a finalidade de fornecer subsídios para futuras pesquisas visando a seleção de plantas resistentes a fatores ambientais adversos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram utilizadas sementes de feijão de corda seridô, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (= *Vigna sinensis* (L.) Savi ex Hassk, segundo VERDCOURT, 1970), das safras de 1977 e 1979, provenientes da Fazenda Experimental do Vale do Curú, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

Os "calli" de *Nicotiana tabacum* L. utilizados, foram fornecidos pelo laboratório do Dr. Walter Handro do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo.

Foram utilizados os reagentes abaixo relacionados com as respectivas procedências:

- Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.: "potato dextrose agar" (PDA), "Bacto agar", "Bacto Penassay broth" e extrato de levedura.

- Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio, EE.UU.: ácido naftaleno acético (ANA) e ácido indol acético (AIA).

- Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, EE.UU.: ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), 6 - furfurilaminopurina (cinetina), vitamina E cristalina Tipo IV ("D -  $\alpha$  tocopherol acid succinate") e mio-inositol..

- E. Merck, Darmstadt: hidrolisado de caseína (acetidrolisado), D (+) pantotenato de cálcio, vitamina H (D (+) biotina), vitamina B<sub>1</sub> (dicloreto de tiamina), cloridrato de piridoxina e glicina.

- Carlo ERba, São Paulo, Brasil: ácido nicotínico.

Os demais reagentes foram todos de grau analítico, com exceção do hipoclorito de sódio, que foi obtido sob o nome comercial de Q-Boa (Indústrias Químicas Anhembi S.A., Av. Periférica II, 566 - Simões Filho, BA).

Os meios de cultura utilizados foram constituídos de um meio básico (modificado por PHILLIPS, 1974b, de acordo com citação de OSWALD *et. alii*, 1977), acrescido dos elementos variáveis. Este meio apresentou a seguinte composição:

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	12,49mM
KNO <sub>3</sub>	9,89mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2,12mM
MgSO <sub>4</sub>	0,14mM
KCl	0,87mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,20mM
MnSO <sub>4</sub>	26,03µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	25,87µM
ZnSO <sub>4</sub>	5,22µM
KI	4,52µM
CoCl <sub>2</sub>	0,15µM
Glicina	26,64µM
mio-inositol	0,56mM
Cloridrato de piridoxina	0,49µM
Ácido nicotínico	4,06µM
Dicloreto de tiamina	0,30µM
Biotina	0,82µM
Pantotenato de cálcio	12,58µM

Para o meio indutor de "callus" em explantes foram adi

cionados ao meio básico os seguintes constituintes abaixo relacionados:

FeSO <sub>4</sub>	0,36mM
EDTA	0,46mM
ANA	19,59µM
Cinetina	0,46µM
Vitamina E	2,12µM
Sacarose	3% m/v
Agar	0,6% m/v

Os meios de crescimento de células em suspensão encontram-se descritos na TABELA 1.

Os meios líquido e semi-sólido indutores de "callus" em suspensões celulares encontram-se descritos na TABELA 2.

TABELA 1 - Composição dos meios de crescimento de células em suspensão.

Meio básico acrescido de:

CONSTITUENTES	MEIOS				
	A	B	C	D	E
FeSO <sub>4</sub> 0,18mM	+	+	+	+	+
EDTA 0,23mM	+	+	+	+	+
2,4-D 2,26µM	+	+	+	+	+
Cinetina 0,46µM	+	+	+	+	+
Vitamina E 2,12µM	+	+	+	+	+
Sacarose 2% m/v	+	+	+	+	+
Água de côco desproteini- zada* 20% v/v	-	+	-	-	-
Hidrolisado de caseína 0,1% m/v	-	-	+	-	-
Hidrolisado de caseína 0,05% m/v	-	-	-	-	+
Extrato de levedura 0,1% m/v	-	-	-	+	-
Extrato de levedura 0,05% m/v	-	-	-	-	+

\*. A desproteínização foi feita por autoclavagem a 120°C por 15 minutos, seguida de filtração em papel de filtro analítico.

TABELA 2 - Composição dos meios indutores de "callus" em sus-  
pensões celulares.

Meio básico acrescido de:

CONSTITUINTES	MEIOS	
	LÍQUIDO	SEMI-SÓLIDO
FeSO <sub>4</sub> 0,07mM	+	+
EDTA 0,09mM	+	+
2,4-D 2,26µM	+	+
Cinetina 0,46µM	+	+
Sacarose 2% m/v	+	+
Agar 0,6% m/v	-	+

Foram utilizados 11 meios indutores de morfogênese em "callus". Todos eles consistiam do meio básico acrescido dos componentes abaixo relacionados.

Meio 1:

FeSO <sub>4</sub>	0,07mM
EDTA	0,09mM
CuSO <sub>4</sub>	0,10µM
2,4-D	2,26µM
Cinetina	4,46µM
Sacarose	3% m/v
Agar	0,6% m/v

Meio 2:

FeSO <sub>4</sub>	0,07mM
EDTA	0,09mM
CuSO <sub>4</sub>	0,10µM
Cinetina	4,64µM
Sacarose	3% m/v
Agar	0,6% m/v

Meio 3

FeSO <sub>4</sub>	0,07mM
EDTA	0,09mM
CuSO <sub>4</sub>	0,10µM
2,4-D	2,26µM
Sacarose	3% m/v
Agar	0,6% m/v

Meio 4:

FeSO <sub>4</sub>	0,07mM
EDTA	0,09mM
CuSO <sub>4</sub>	0,10µM
Sacarose	3% m/v
Agar	0,6% m/v

O meio 5 foi obtido pela extração de vinte sementes germinadas por 4 dias, em 125ml de meio líquido 4 (sem agar). Após homogeneização em gral, a mistura foi aquecida a aproximadamente 90°C por 5 minutos e filtrada em papel de filtro analítico. Ao filtrado (pH 5,8 - 6,0) foi adicionado agar (0,6% m/v) e a mistura autoclavada por 20 minutos a 120°C.

O meio 6 foi obtido pela extração de vinte sementes germinadas por 4 dias em 125 ml de meio líquido 1 (sem agar). Após homogeneização em gral, a mistura foi aquecida a aproximadamente 90°C por 5 minutos e filtrada em papel de filtro analítico. Ao filtrado (pH 5,8 - 6,0) foi adicionado agar (0,6% m/v) e a mistura autoclavada por 20 minutos a 120°C.

O meio 7 representou um conjunto de 25 meios diferentes, resultante de todas as combinações possíveis das seguintes concentrações de 2,4-D (0,22 µM, 0,45 µM, 2,26 µM, 4,52 µM e 22,60 µM) e de cinetina (0,46 µM, 2,32 µM, 4,64 µM, 23,20 µM e 46,40 µM), acrescidos de:

FeSO <sub>4</sub>	0,07mM
EDTA	0,09mM
CuSO <sub>4</sub>	0,10µM
Sacarose	3% m/v
Agar	0,6% m/v

A composição deste meio foi anteriormente descrita por

MATOS BRITO & AQUINO (1979), como apresentando concentrações de 2,4-D de 0,28, 0,57, 2,85, 5,71 e 28,54 $\mu$ M, mas na realidade seus reais valores são os apresentados acima.

O meio 8 representou um conjunto de 30 meios diferentes, resultante de todas as combinações possíveis das seguintes concentrações de 2,4-D (0,9  $\mu$ M, 1,9  $\mu$ M, 2,7  $\mu$ M, 3,6  $\mu$ M, 7,2  $\mu$ M, e 14,4  $\mu$ M) e de cinetina (9,3  $\mu$ M, 18,6  $\mu$ M, 27,9  $\mu$ M, 37,2  $\mu$ M e 46,5  $\mu$ M), acrescidas de:

FeSO <sub>4</sub>	0,07mM
EDTA	0,09mM
CuSO <sub>4</sub>	0,10 $\mu$ M
Sacarose	3% m/v
Agar	0,6% m/v

Meio 9:

FeSO <sub>4</sub>	0,07mM
EDTA	0,09mM
CuSO <sub>4</sub>	0,10 $\mu$ M
ANA	1,07 $\mu$ M
Cinetina	4,64 $\mu$ M
Sacarose	3% m/v
Agar	0,6% m/v

Os meios 10 e 11 tinham essencialmente a mesma composição do meio 9, sendo que no primeiro (meio 10), ANA foi substituído por AIA (1,14 $\mu$ M), enquanto que no segundo (meio 11) a concentração de AIA foi de 0,57 $\mu$ M.

Os estoques de FeSO<sub>4</sub> foram sempre utilizados imediatamente após preparados.

Após dissolução de todos os componentes, cada meio de

cultura teve seu pH ajustado para 6,0 com NaOH 0,1M, sendo em seguida autoclavado por 15 minutos a 120°C.

O meio de germinação, "potado dextrose agar" (PDA) foi preparado na concentração de 3,9% m/v.

O meio "Penassay-agar" foi preparado nas concentrações de 1,75% m/v de "Bacto-Penassay broth" e 1,5% m/v de "Bacto agar".

Os meios PDA e "Penassay-agar" foram autoclavados por 20 minutos a 120°C.

A água utilizada para preparo dos meios de cultura foi destilada e deionizada.

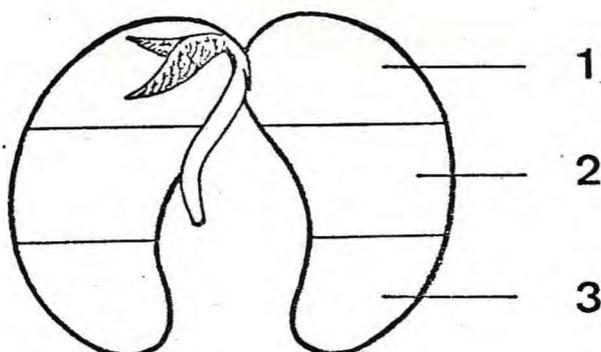
### 2.1. Condições de germinação

As sementes foram selecionadas para germinação de acordo com o tamanho e a conformação, sendo excluídas sementes pequenas e mal conformadas. Depois de selecionadas elas foram esterilizadas por 5 minutos em Q-Boa diluída 1:2 com água deionizada e lavadas 3 vezes em água deionizada estéril. Após esterilização, foram semeadas em número de 4 por placa de Petri contendo PDA e incubadas no escuro a temperatura de 25 - 30°C, durante 4 dias.

### 2.2. Indução de "callus"

Após retirado o tegumento das sementes germinadas, cotilédones, radículas, hipocótilos e plúmulas esterilizadas ou não por 3 minutos em Q-Boa diluída 1:5 e lavados em água deionizada estéril, foram incubados em meio indutor de "callus" em explantes, no escuro, a temperatura de 25 - 30°C, por 12 dias.

Os cotilédones de sementes germinadas em PDA, após retirados os tegumentos, foram cortados transversalmente, com auxílio de pinça e bisturi estéreis, em 3 secções de aproximadamente as mesmas dimensões, conforme diagrama abaixo:



secção 1 = proximal em relação ao eixo embrionário  
 secção 2 = mediana em relação ao eixo embrionário  
 secção 3 = distal em relação ao eixo embrionário.

As três secções foram esterilizadas por 3 minutos em Q-Boa diluída 1:5 em água, lavadas 3 vezes em água deionizada estéril e incubadas em meio indutor de "callus" em explantes, por 12 dias no escuro, à temperatura de 25 - 30°C.

Para determinação quantitativa da formação de "callus" nas 3 regiões do cotilédone, as secções de cada semente foram pesadas individualmente em balança analítica, antes e depois do período de incubação.

### 2.3. Regeneração em "callus" de secções cotiledonares

"Calli" de secções proximais de cotilédones, contendo ou não tecido somático, obtidos após incubação por 12 dias no escuro, em meio indutor de "callus", foram semeados em meios indutores de morfogênese (meios 1, 9, 10 e 11), incubados em fotoperíodo de 12 horas de luz (aproximadamente 4.000 lux) e 12 horas de escuro, a temperatura de 25 - 30°C. Após diversos

períodos de incubação os resultados macroscópicos e microscópicos foram registrados.

#### 2.4. Obtenção de suspensões celulares a partir de "callus"

"Calli" formados em secções proximais de cotilédones incubadas por 10 dias em meio indutor de "callus" em explantes, foram colocados em erlenmeyers de 250ml na proporção de 4 a 8 "calli" por 20ml de meio A, B, C, D ou E. Em seguida, incubados sob agitação recíproca (170 incursões/minuto) ou rotativa (120 rotações/minuto), a temperatura de 25 - 30°C e fotoperíodo de 12 horas de luz (3.000 lux) e 12 horas de escuro, ou iluminação contínua. Após um período de incubação que variou de 24 a 48 horas, as suspensões foram pipetadas repetidas vezes e/ou filtradas em malhas de aço (100 $\mu$  de diâmetro) ou nylon (250-300 $\mu$  de diâmetro), a fim de reduzir o tamanho dos agregados celulares. As suspensões foram então, diluídas adequadamente nos mesmos meios de cultura utilizados para produzi-las (meios A, B, C, D, E, além de meio líquido indutor de "callus" em suspensões celulares). Posteriormente, foram incubadas sob as mesmas condições de agitação, temperatura e fotoperíodo por 1 a 3 semanas, em erlenmeyers de 250ml dotados lateralmente de tubos de colorímetro Klett-Summerson.

Com a finalidade de acompanhar a multiplicação celular em suspensão, foram realizadas periodicamente contagens de células e leitura de turbidez em colorímetro Klett-Summerson, usando-se filtro azul (400-450 $\mu$ ), segundo SUNG (1976). Para a contagem de células, foram retiradas alíquotas de 0,5ml da suspensão celular, adicionado 0,1 ml de ácido tricloroacético 90% (m/v), agitadas e deixadas em repouso por 30 minutos, (HUBER *et. alii*, 1978), após os quais realizada a contagem em câmara de Neubauer de 0,1mm de profundidade.

Contaminação por microorganismos foi controlada plaqueando-se alíquotas das suspensões em "Penassay-agar" e incubando-se a 37°C por 18 horas.

## 2.5. Indução de "callus" em suspensões celulares

### 2.5.1. Em meio líquido

As suspensões celulares produzidas em meio A ou em meio líquido indutor de "callus" em suspensões celulares, foram diluídas de 1:1, 1:3 e 1:5 nesse último meio. Em seguida, foram incubadas por 3 semanas, com agitação recíproca (170 incursões/minuto) ou sem agitação, fotoperíodo de 12 horas de iluminação (aproximadamente 2.400 lux) e 12 horas de escuro, a temperatura de 25 - 30°C, após o que os resultados foram registrados.

### 2.5.2. Em meio semi-sólido

Amostras de 2,5ml das suspensões produzidas em meio A ou meio líquido indutor de "callus" em suspensões celulares, foram misturadas com igual volume desses mesmos meios adicionados de 1,2% de agar mantidos líquidos a 37°C, e em seguida transferidas para placas de Petri contendo o mesmo meio. Após incubação das placas no escuro, a temperatura de 25 - 30°C por 3 - 8 semanas, os resultados foram registrados.

## 2.6. Regeneração em "callus" originado de suspensões celulares

Os "calli" clorofilados, formados em suspensões líquidas como foi descrito no item anterior, foram transferidos para erlenmeyers de 125ml, contendo aproximadamente 50ml de meio semi-sólido, ou para tubos de 150 x 25mm, contendo 20ml de meio semi-sólido indutor de morfogênese, incubados por 2 meses a temperatura de 25 - 30°C e fotoperíodo de 12 horas de luz (aproximadamente 4.000 lux) e 12 horas de escuro.

A indução de morfogênese foi tentada de duas maneiras. Na primeira, os "calli" foram semeados inicialmente em meio 1, repicados 2 a 6 vezes nesse mesmo meio, e em seguida nos meios 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11. Foram utilizados como controle "calli" de fumo semeados nos meios 1 e 11. Na segunda, os pequenos "calli" clorofilados, originados de suspensões celulares, foram semeados diretamente nos meios 2, 4, 9, 10 e 11.

Com a finalidade de identificar estruturas diferenciadas nos "calli" submetidos ao tratamento acima descrito, além de inspeções regulares diretas, foram realizadas também observações microscópicas.

O preparo de lâminas foi feito de duas maneiras. Na primeira, os "calli" foram suspensos em tampão fosfato 0,1M, pH 6,7, desagregados com bastão de vidro, desidratados com glicérol 70% v/v, seguido de glicérol 100% e montados entre lâminas e lamínula com parafina ou gelatina glicerinada. Na segunda, os "calli" foram fixados em mistura 3:1 de álcool 75% (v/v): ácido acético 45% (v/v), e submetidos a desagregação com bastão de vidro por 5 - 15 minutos. Em seguida, foram lavados em álcool 75%, por 2 minutos, tratados com solução de ácido clorídrico 1 N a 60°C por 6 - 8 minutos e lavados com água por 1 minuto. Em alguns casos, após decantada a água de lavagem, foram corados com solução aquosa de safranina a 1% m/v ou "fast-green" 0,2% m/v por 15 - 30 minutos e novamente lavados em água. A montagem em parafina ou gelatina glicerinada foi feita após desidratação com glicérol 70% (v/v) e glicérol 100%.

A seqüência das etapas utilizadas ao longo do trabalho experimental encontra-se descrita na FIGURA 1.



### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Produção de "callus"

Como mostra a FIGURA 2, a maioria das sementes de feijão de corda seridô, após 4 dias de semeadura em "potato dextrose agar", no escuro, apresentou-se com a radícula já emitida. As sementes que após este período de incubação não emitiram radícula ou apresentaram contaminação por microorganismos não foram utilizadas em experimentos subsequentes. Os cotilédones, radículas, hipocótilos e plúmulas, após transferência asséptica (sem esterilização prévia) e incubação por 12 dias em meio indutor de "callus" em explantes, apresentavam "calli" formados de aproximadamente 2 a 16mm de dimensões, como mostram as FIGURAS 3 e 4. Dos cotilédones, radículas, hipocótilos e plúmulas esterilizados com hipoclorito de sódio antes de serem transferidos para o meio indutor de "callus" em explantes, somente cotilédones e hipocótilos apresentavam "calli" formados, após os 12 dias de incubação. Em ambas as situações (com ou sem esterilização prévia) o aparecimento de "callus" já pode ser detectado após 3 - 5 dias de incubação. Dos quatro tipos de explantes, os cotilédones foram os que produziram maior rendimento de "callus" em menor tempo de incubação. Alguns "calli" produzidos em cotilédones apresentaram também formação de raízes.

A frequência de formação de "callus" nas três diferentes secções cotiledonares (FIGURA 4) de 30 sementes foi a seguinte: secção proximal, 93%; secção mediana, 20% e secção distal, 16%. Foram considerados resultados positivos, a formação de "calli" claros, friáveis e bem desenvolvidos associados aos explantes. E negativos o escurecimento dos explantes, e a não formação de "callus", após 12 dias de incubação.



FIGURA 2 - Sementes de Vigna unguiculata (L.) Walp. (= V. sinensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô, após 4 dias de semeadura em P.D.A.

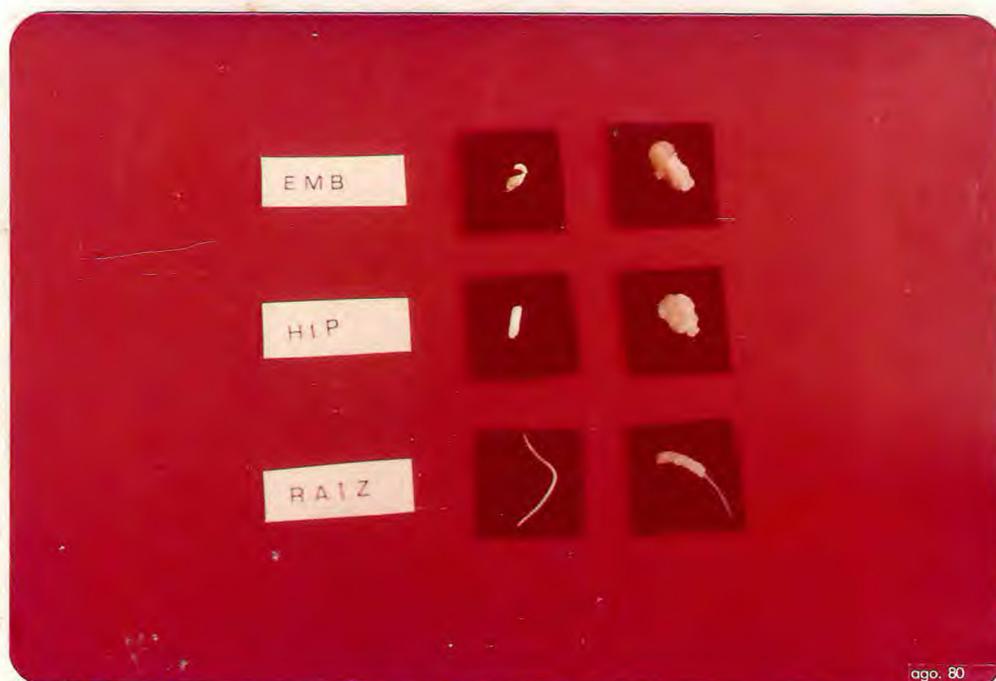


FIGURA 3 - Explantes de plúmula (EMB), hipocótilo (HIP) e radí-  
cula (RAIZ) de Vigna unguiculata (L.) Walp. ( = V.  
sinensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô, e seus res-  
pectivos "calli", após incubação por 12 dias em  
meio indutor de "callus" em explante.

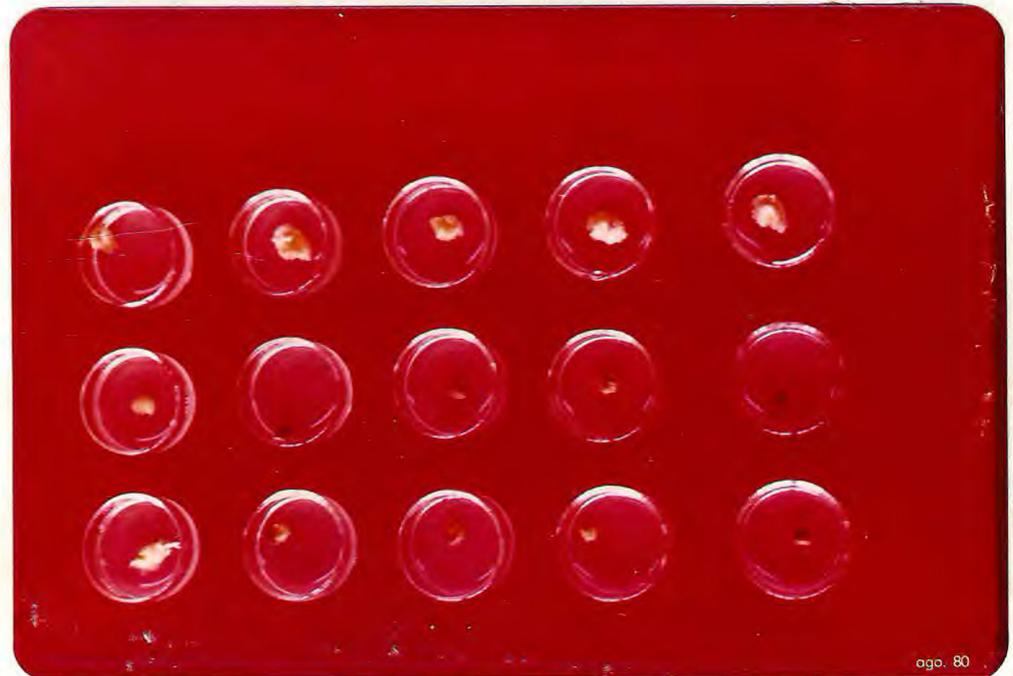


FIGURA 4 - Conjunto de placas mostrando, de cima para baixo, as secções cotiledonares proximal, mediana e distal, respectivamente, após 12 dias de incubação em meio indutor de "callus" em explante.

Com a finalidade de quantificar a produção e o crescimento de "callus" nas tres secções cotiledonares, foi acompanhado o aumento do peso fresco dos explantes ao longo de todo o período de incubação, bem como a formação de "callus" nas respectivas secções. A TABELA 3 mostra os valores de peso inicial, peso final e diferença entre peso final e inicial das tres secções cotiledonares das 25 sementes testadas, bem como seus valores médios e respectivos desvios padrões. A TABELA 4 mostra os valores de aumento de peso relativo, isto é, aumento de peso por unidade de peso inicial  $\frac{(Pf - Pi)}{Pi}$ , das três secções cotiledonares das 25 sementes testadas, bem como seus valores médios e respectivos desvios padrões. Diante destes resultados podemos afirmar que a secção proximal, após o período de incubação de 12 dias, apresentou em média, um aumento de peso fresco de aproximadamente 10 vezes o seu peso inicial, enquanto que a secção mediana manteve o seu peso inicial inalterado e a secção distal duplicou o referido valor.

Quanto à indução de "callus" em suspensões celulares, observou-se que em meio líquido indutor de "callus" em suspensões celulares, após 3 semanas de incubação nas condições de fotoperíodo de 12 horas de luz (aproximadamente 2.400 lux) e 12 horas de escuro a temperatura de 21 - 28°C, foram produzidos "calli" clorofilados de 0,5 a 1,0 mm de diâmetro (FIGURA 5). Algumas vezes já era bem grande o número de "calli" produzidos na segunda semana de incubação, fato observado com ou sem agitação da suspensão celular. O número de células da suspensão inicial variou de  $2,3 \times 10^4$  a  $9,7 \times 10^4$  células/ml, aproximadamente. Houve formação de "callus" nessa faixa de densidade celular, embora algumas vezes não tenham sido produzidos "calli", principalmente quando a suspensão havia sido previamente filtrada.

O meio semi-sólido indutor de "callus", quando plaqueado com suspensões celulares, e após incubação por 3 semanas no escuro a temperatura de 25 - 30°C, induziu a formação localizada de "calli" não clorofilados, iniciados por pequenas co

TABELA 3 - Valores de peso inicial (Pi), peso final (Pf) e aumento de peso fresco (Pf - Pi) das três secções cotiladonares de Vigna unguiculata (L.) Walp. (= V. sinensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô.

AMOSTRAS	SECÇÃO PROXIMAL			SECÇÃO MEDIANA			SECÇÃO DISTAL		
	Pi	Pf	Pf - Pi	Pi	Pf	Pi - Pf	Pi	Pf	Pf - Pi
1	0,063	0,110	0,047	0,104	0,221	0,117	0,073	0,079	0,006
2	0,081	0,324	0,243	0,074	0,186	0,112	0,053	0,260	0,207
3	0,088	0,329	0,241	0,088	0,100	0,012	0,079	0,241	0,162
4	0,013	0,363	0,350	0,035	0,095	0,060	0,022	0,083	0,061
5	0,043	0,427	0,384	0,074	0,167	0,093	0,016	0,134	0,118
6	0,072	0,803	0,731	0,097	0,128	0,031	0,065	0,108	0,043
7	0,071	0,812	0,741	0,066	0,114	0,048	0,088	0,131	0,043
8	0,065	0,693	0,628	0,077	0,095	0,018	0,084	0,138	0,054
9	0,038	0,630	0,592	0,066	0,111	0,045	0,070	0,223	0,153
10	0,057	0,688	0,631	0,056	0,102	0,046	0,060	0,102	0,042
11	0,042	0,122	0,080	0,094	0,097	0,003	0,080	0,129	0,049
12	0,057	0,886	0,829	0,135	0,417	0,282	0,084	0,120	0,036
13	0,040	0,368	0,328	0,080	0,113	0,033	0,071	0,103	0,032
14	0,031	0,223	0,192	0,064	0,112	0,048	0,074	0,135	0,061
15	0,044	0,537	0,493	0,088	0,102	0,014	0,073	0,131	0,058
16	0,034	0,582	0,548	0,095	0,295	0,200	0,061	0,129	0,068
17	0,094	0,958	0,864	0,083	0,142	0,059	0,038	0,272	0,234
18	0,047	0,810	0,763	0,100	0,152	0,052	0,058	0,245	0,187
19	0,056	0,589	0,533	0,059	0,113	0,054	0,044	0,114	0,070
20	0,061	0,815	0,754	0,059	0,142	0,083	0,075	0,170	0,095
21	0,099	0,799	0,700	0,133	0,176	0,043	0,072	0,141	0,069
22	0,055	0,586	0,531	0,149	0,332	0,183	0,089	0,123	0,034
23	0,058	0,480	0,422	0,086	0,136	0,050	0,079	0,166	0,087
24	0,100	0,658	0,558	0,068	0,303	0,235	0,071	0,035	0,164
25	0,064	0,551	0,487	0,118	0,119	0,001	0,088	0,288	0,200
Σ	1,473	14,143	12,671	2,148	4,070	1,922	1,667	4,000	2,333
$\bar{x}$	0,0589	0,5657	0,5068	0,0859	0,1628	0,0769	0,0667	0,1600	0,0933
s*	0,0219	0,2362	0,2263	0,0269	0,0858	0,0738	0,0194	0,0629	0,0650

\* Calculado pela seguinte equação: 
$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - n\bar{x}^2}{n - 1}}$$

TABELA 4 - Valores de aumento de peso relativo das três secções cotiledonares das sementes de Vigna unguiculata (L.) Walp. (= V. sinensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô.

AMOSTRAS	SECÇÃO PROXIMAL	SECÇÃO MEDIANA	SECÇÃO DISTAL
	$\frac{P_f - P_i}{P_i}$	$\frac{P_f - P_i}{P_i}$	$\frac{P_f - P_i}{P_i}$
1	0,746	1,125	0,082
2	3,000	1,513	3,905
3	2,738	0,136	2,050
4	26,923	1,714	2,772
5	8,930	1,256	7,375
6	10,152	0,319	0,661
7	10,436	0,727	0,488
8	9,661	0,233	0,642
9	15,578	0,681	2,185
10	11,070	0,821	0,700
11	1,904	0,031	0,612
12	14,543	2,088	0,428
13	8,200	0,412	0,450
14	6,193	0,750	0,824
15	11,204	0,159	0,794
16	16,117	2,105	1,114
17	9,191	0,710	6,157
18	16,234	0,520	3,224
19	9,517	0,915	1,590
20	12,360	1,406	1,266
21	7,070	0,323	0,958
22	9,654	1,228	0,382
23	7,275	0,581	1,101
24	5,580	3,455	2,309
25	7,609	0,008	2,272
$\Sigma$	241,885	23,216	44,341
$\bar{x}$	9,6754	0,9286	1,7736
$s^*$	5,5315	0,8004	1,7999

\* Calculado pela seguinte equação:  $s_x =$

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - n\bar{x}^2}{n-1}}$$

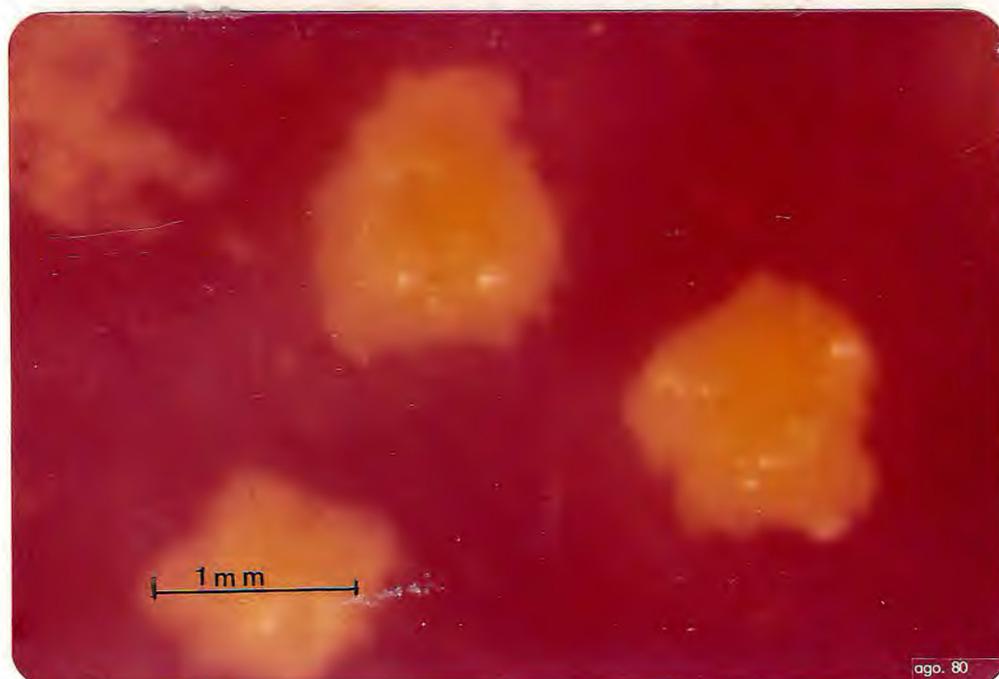


FIGURA 5 - "Calli" com aproximadamente 1 mm de diâmetro, induzidos a partir de células em suspensão de Vigna unguiculata (L.) Walp. (= V. sinensis (L.) Savi cv. seridô).

lônias de células que se desenvolveram. A densidade inicial de células variou de  $9,3 \times 10^4$  a  $2,0 \times 10^5$  células/ml. O número de "calli" formados por placa variou consideravelmente, sendo que naquelas com suspensões não filtradas a frequência foi maior. Nas suspensões submetidas a filtração em malha de 100 ou de 250-300  $\mu\text{m}$  de diâmetro, raramente houve formação de "callus", como é mostrado comparativamente na FIGURA 6. O meio A (meio de crescimento de células em suspensão) acrescido de 0,6% de agar também foi usado com a finalidade de induzir "callus" em placas e apresentou resultados semelhantes aos obtidos com meio semi-sólido indutor de "callus" em suspensões celulares.

### 3.2. Obtenção de suspensões celulares multiplicando-se ativamente

Suspensões celulares com as densidades iniciais de  $3,1 \times 10^4$  a  $2,3 \times 10^5$  células/ml foram utilizadas para incubação, sob agitação recíproca (170 incursões/minuto) ou rotativa (120 rotações/minuto), temperatura de 25 - 30°C e fotoperíodo de 12 horas de luz (3.000 lux) e 12 horas de escuro ou iluminação contínua (3.000 lux).

Multiplicação celular foi acompanhada por leitura de turbidez em colorímetro Klett-Summerson (FIGURA 7), filtro azul (400-450m $\mu$ ), e contagem de células em câmara de Neubauer. Em todos os 12 experimentos realizados, após 2 a 3 semanas de incubação nas condições citadas, utilizando os meios de crescimento de células em suspensão (meios A, B, C, D e E), o número de células/ml aumentou muito lentamente e apenas em raros casos esse número duplicou. Após alguns dias de incubação nas condições acima referidas, observou-se a formação de "callus".

Observações microscópicas (FIGURA 8) mostraram células pequenas e grandes, vacuoladas, com faixas citoplasmáticas, às vezes com granulações no citoplasma e núcleo visível. Nas sus



FIGURA 6 - "Calli" de Vigna unguiculata (L.) Walp. (= V. si-  
nensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridõ, provenientes  
de suspensões celulares, previamente filtradas (ã  
esquerda) e não filtradas (ã direita), obtidos após  
8 semanas de incubação em meio semi-sólido indutor  
de "callus".



FIGURA 7 - Colorímetro fotoelétrico Klett-Summerson com erlenmeyer dotado de braço lateral, utilizado para acompanhar o aumento de turbidez de suspensões celulares em crescimento.



FIGURA 8 - Células de Vigna unguiculata (L.) Walp. (= V. sinensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridõ em suspensão.

pensões celulares, geralmente, as células pequenas se apresentavam agrupadas, enquanto que as grandes, normalmente, encontravam-se isoladas. Tanto as suspensões pipetadas como as filtradas eram bastante heterogêneas, consistindo de células de tamanho e forma variadas, e agregados de pequenas células. Nas suspensões celulares pipetadas ou filtradas em malha de 250 - 300µm, observou-se crescimento um pouco mais intenso. A FIGURA 9 ilustra uma célula em divisão, mostrando a parede celular dividindo as duas novas células.

### 3.3. Regeneração

#### 3.3.1. Em "callus" de secções cotiledonares

Os "calli" de secções proximais de cotilédones (contendo ou não tecido somático), incubados a temperatura de 25 - 30°C, sob condições de fotoperíodo de 12 horas de luz (aproximadamente 4.000 lux) e 12 horas de escuro, em meios indutores de morfogênese apresentaram, na segunda cultura, os resultados abaixo descritos.

No meio 1, os "calli" cresceram bastante, apresentaram-se amarelos e friáveis e com células arredondadas ou alongadas de paredes pouco espessadas.

No meio 9, eles eram marrons e/ou verdes, apresentavam nódulos e em alguns houve formação de pequenas raízes (FIGURA 10). Exame microscópico do material evidenciou a presença de células com paredes bastante espessadas.

No meio 10, eram verdes e/ou marrons, com nódulos, raízes finas e escassas (FIGURA 10). Observações microscópicas mostraram que as células dos "calli" apresentavam as mesmas características das que foram incubadas em meio 9.

No meio 11, eram verdes e/ou marrons, apresentaram raízes pequenas e pouco frequentes (FIGURAS 10 e 11). Do mesmo modo que nos meios 9 e 10, as células quando observadas ao



FIGURA 9 - Célula de Vigna unguiculata (L.) Walp. (= V. si-  
nensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridõ em suspensão,  
apresentando divisão equatorial da parede.

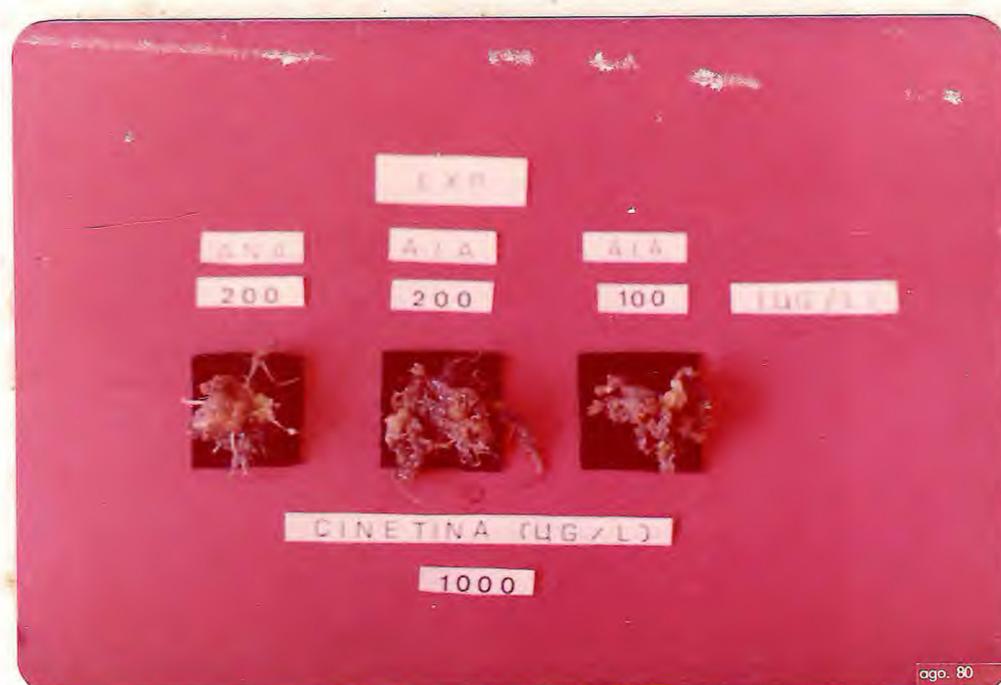


FIGURA 10 - "Calli" induzidos em secções proximais de cotilédones de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (= *V. sinensis* (L.) Savi ex Hassk) cv. seridõ, apresentando diferenciação em raízes, após 2 incubações sucessivas nos meios 9 (à esquerda), 10 (ao centro) e 11 (à direita).



FIGURA 11 - "Callus" induzido em secção proximal de cotilédone de Vigna unguiculata (L.) Walp. (= V. sinensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô, mostrando raízes evidentes após 2 incubações sucessivas em meio 11.

microscópio apresentaram-se com paredes bastante espessadas.

### 3.3.2. Em "callus" de suspensões celulares

Os "calli" clorofilados, originados de suspensões celulares, foram observados após incubação por 1 - 2 meses, a temperatura de 25 - 30°C, fotoperíodo de 12 horas de luz (aproximadamente 1.600 lux) e 12 horas de escuro nos meios indutores de morfogênese em "callus" (meios 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11). O aspecto desses "calli" variou entre os diferentes meios, e num mesmo meio, durante o decorrer da incubação. No início da incubação, os "calli" eram às vezes amarelos ou verdes e passavam a marron com o envelhecimento da cultura.

No meio 1, eles cresceram bastante, apresentaram coloração amarela, às vezes esverdeada, eram tenros, úmidos e de fácil desagregação (FIGURAS 12 e 13). Ao microscópio, as células apresentaram-se com paredes finas, não diferenciadas, semelhantes às células de "callus" de explantes. Esse meio não conseguiu regenerar plantas nem mesmo de "callus" de *Nicotiana tabacum* L. como se observa na FIGURA 14.

Após 2 a 6 transferências no meio acima, o tratamento com os meios indutores de morfogênese apresentou os resultados abaixo discriminados.

No meio 2, os "calli" eram grandes, secos, resistentes à desagregação, marrons com tonalidades verdes (FIGURA 13). Sob observação microscópica as células apresentaram-se com paredes bastante espessadas.

No meio 3, mostraram-se amarelos, tenros, úmidos, grandes e friáveis (FIGURA 13). Observações microscópicas revelaram células com paredes finas, frágeis e não diferenciadas.

No meio 4, eles a princípio não cresceram, tornaram-se marrons (FIGURA 13), depois desenvolveram localizadamente re-



FIGURA 12 - "Calli" obtidos de células de Vigna unguiculata (L.) Walp. (= V. sinensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô em suspensão, após transferências para meio 1 (à direita) e em seguida para meio 4 (à esquerda).



FIGURA 13 - "Calli" de células de Vigna unguiculata (L.) Walp. (= V. sinensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô em suspensão, após incubação nos meios 1, 2, 3 e 4, da esquerda para a direita, respectivamente.



FIGURA 14 - "Calli" de Vigna unguiculata (L.) Walp. (= V. sinensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô e de Nicotiana tabacum L. (TABACO), após incubação nos meios 1 (à esquerda) e 11 (à direita).

giões clorofiladas semelhante a nódulos. A FIGURA 12 mostra esses "calli" em comparação com os incubados em meio 1. Investigações citológicas mostraram nítidos e frequentes elementos traqueais (FIGURA 15). Em um único caso, após 2 transferências nesse meio, um dos "calli" desenvolveu raízes (FIGURA 16).

Nos meios 5 e 6, eles apresentaram coloração verde-marron, mas não se diferenciaram.

No meio 7, constituído de 25 combinações de concentrações de 2,4-D e cinetina, os resultados foram: crescimento mais intenso em meios com 0,22 $\mu$ M, 0,45 $\mu$ M, 2,26 $\mu$ M, de 2,4-D e 2,32 $\mu$ M de cinetina; em 22,60 $\mu$ M de 2,4-D e 4,6 $\mu$ M, 23,20 $\mu$ M, 46,40 $\mu$ M de cinetina, os "calli" não cresceram; em 0,22 $\mu$ M, 0,45 $\mu$ M de 2,4-D e 23,20 $\mu$ M, 46,40 $\mu$ M de cinetina, os "calli" tornaram-se marrons, e em 2,26 $\mu$ M, 4,52 $\mu$ M de 2,4-D e 23,20 $\mu$ M, 46,40 $\mu$ M de cinetina tornaram-se clorofiladas.

No meio 8, constituído de 30 combinações de 2,4-D e cinetina, eles também apresentaram a coloração variando entre amarelo, verde e marron, sendo que em 9,3 $\mu$ M de cinetina eram quase totalmente não clorofilados; em 0,9, 1,8, 2,7, 3,6 e 7,2 $\mu$ M de 2,4-D e 9,3 $\mu$ M de cinetina encontravam-se os de maior crescimento (FIGURA 17).

Como é mostrado comparativamente com meios 1 e 11, na FIGURA 18, e com meio 11 na FIGURA 19, em meios 9 e 10, os "calli" apresentaram-se bem crescidos, com tonalidades amarelo-verde-marrons e nódulos. Observações microscópicas demonstraram a presença de células com paredes espessadas, traqueídeos, e elementos de vasos (FIGURA 20).

No meio 11, os "calli" também mostraram-se com coloração variando do amarelo ao verde e marron, mas o crescimento não foi muito intenso (FIGURA 18). Quando "calli" repicados 3 vezes em meio 1, foram transferidos para meio 11, houve formação de raízes (FIGURA 19). A simples incubação de "calli" de *Nicotiana tabacum* L. em meio 11 foi suficiente para que se observasse a regeneração de "plantlets".

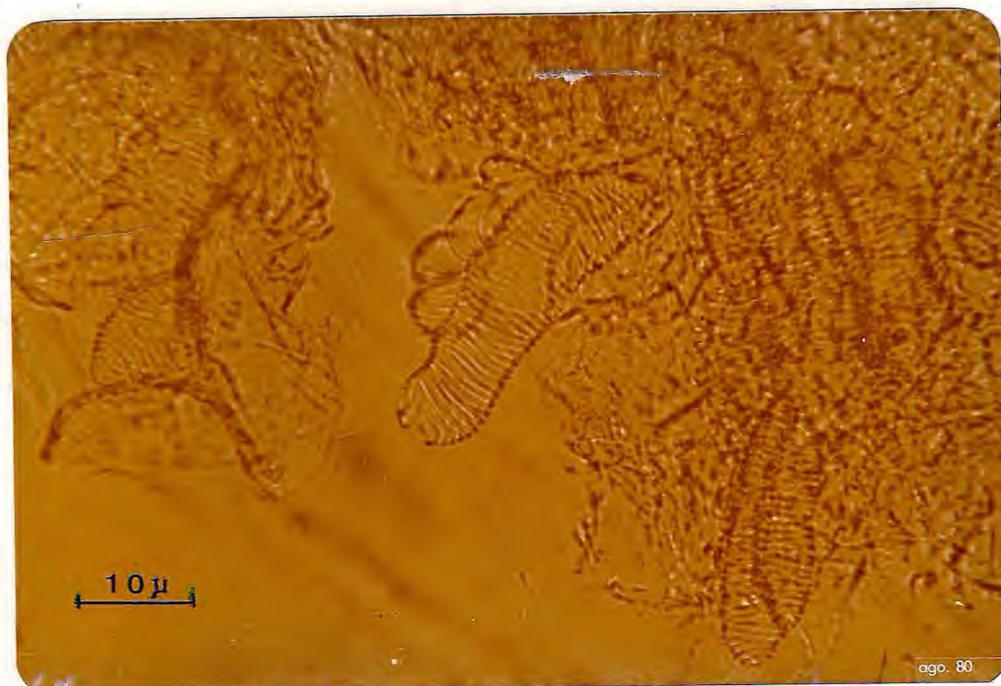


FIGURA 15 - Elementos traqueais em "callus" obtido de células de Vigna unguiculata (L.) Walp. (= V. sinensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô em suspensão, após transferência para meio 1 e em seguida para meio 4.

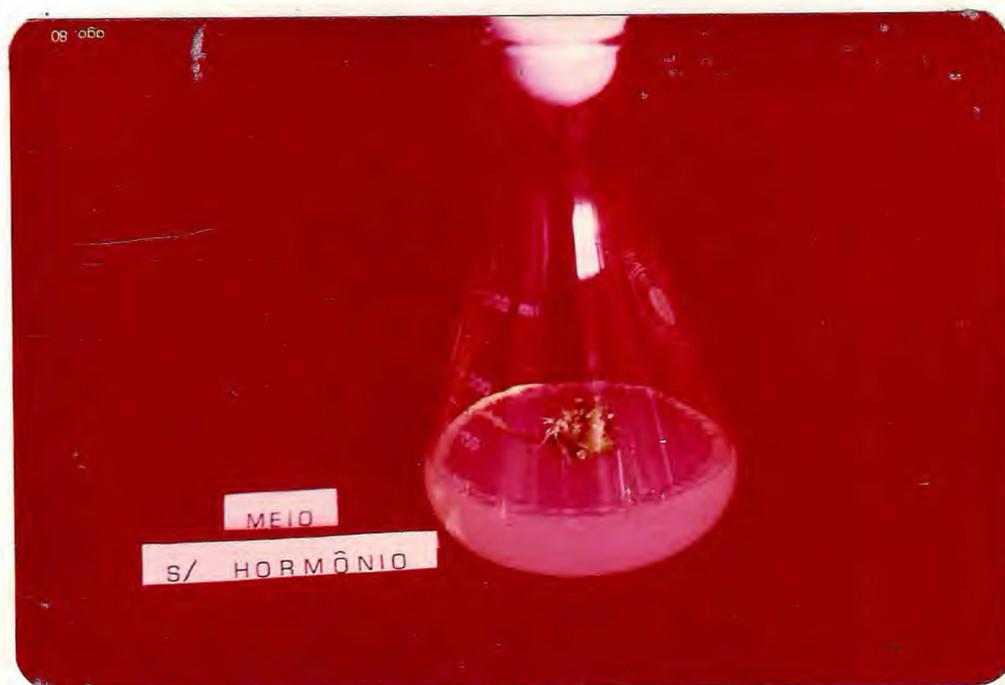


FIGURA 16 - "Callus" obtido de células de Vigna unguiculata (L.) Walp. (= V. sinensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô em suspensão, após transferências para meio 1 e em seguida para meio 4.



FIGURA 17 - "Calli" de suspensões celulares de Vigna unguiculata (L.) Walp. ( = V. sinensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô, após incubação em meio 1, e em seguida em 6 das 30 combinações do meio 8.

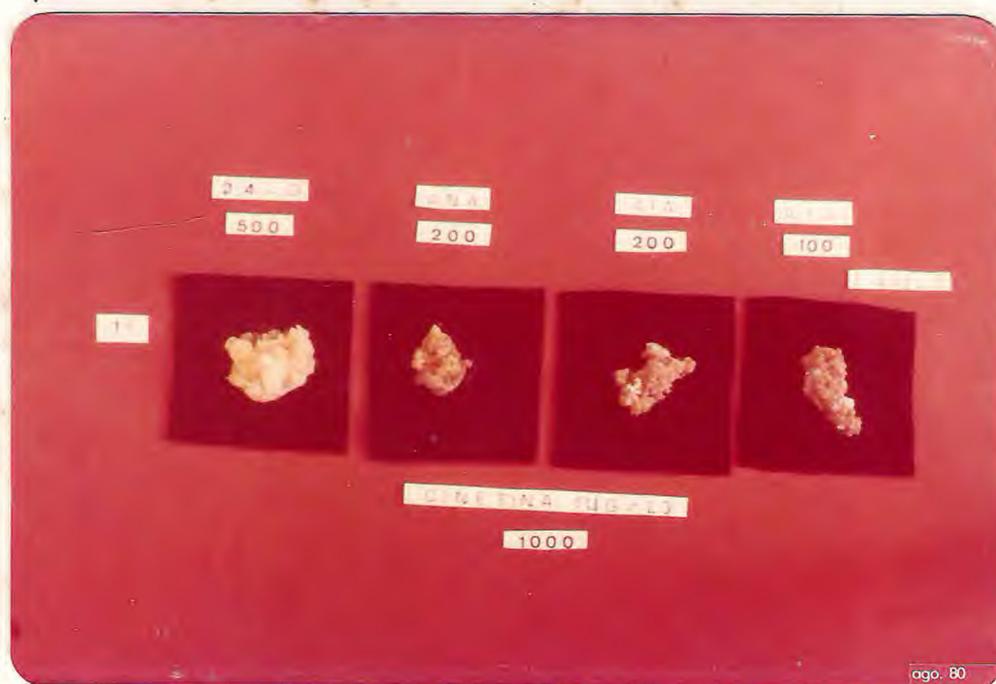


FIGURA 18 - "Calli" de suspensões celulares de Vigna unguiculata (L.) Walp. (= V. sinensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô, incubados no meio 1 e em seguida nos meios 1, 9, 10 e 11, da esquerda para a direita, respectivamente.

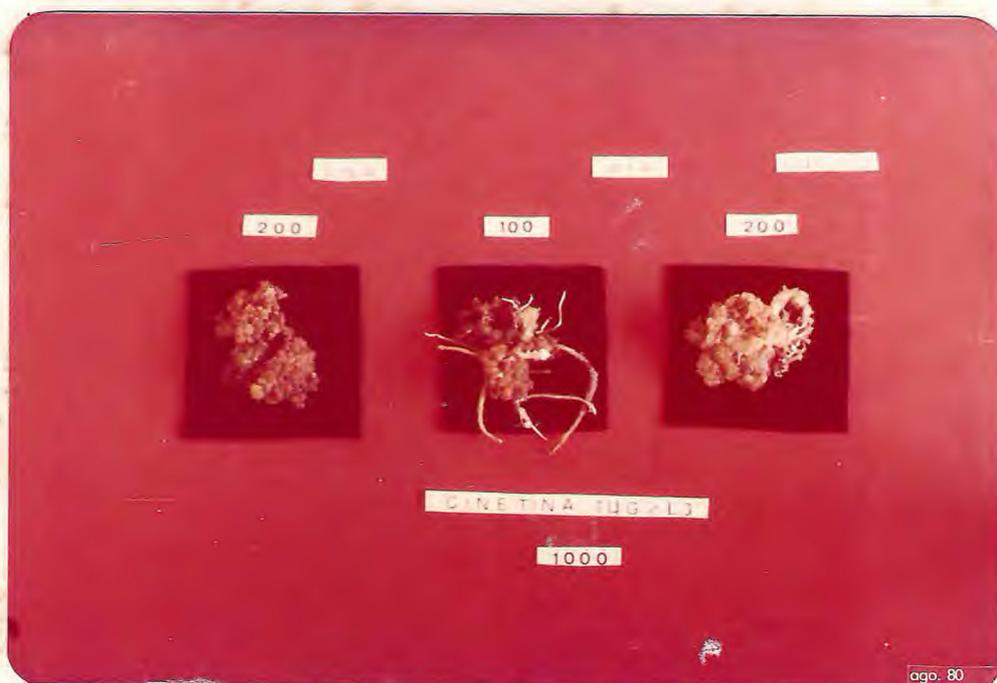


FIGURA 19 - "Calli" obtidos de suspensões celulares de Vigna unguiculata (L.) Walp. (= V. sinensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô, incubados no meio 1 e em seguida nos meios 9, 11 e 10, da esquerda para a direita, respectivamente.



FIGURA 20 - Elementos de vasos em "callus" obtido de células de Vigna unguiculata (L.) Walp. (= V. sinensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô em suspensão, após incubação no meio 1 e em seguida no meio 10.

Quando pequenos "calli" clorofilados foram semeados diretamente do meio líquido indutor de "callus" em suspensões celulares para alguns meios indutores de morfogênese (meios 2, 4, 9, 10 e 11), os resultados foram os abaixo descritos.

Nos meios 2 e 4, os "calli" não cresceram.

Nos meios 9 e 10, cresceram bem, com coloração verde e marron e desenvolveram uma estrutura verde, semelhante a nódulos. Após 2 a 4 repicagens nesses meios, observou-se a formação de raízes bem evidentes, mais longas e de maior calibre em meio com ANA, como é mostrado comparativamente na FIGURA 21.

No meio 11, os "calli" não apresentaram crescimento apreciável e mantiveram-se clorofilados.

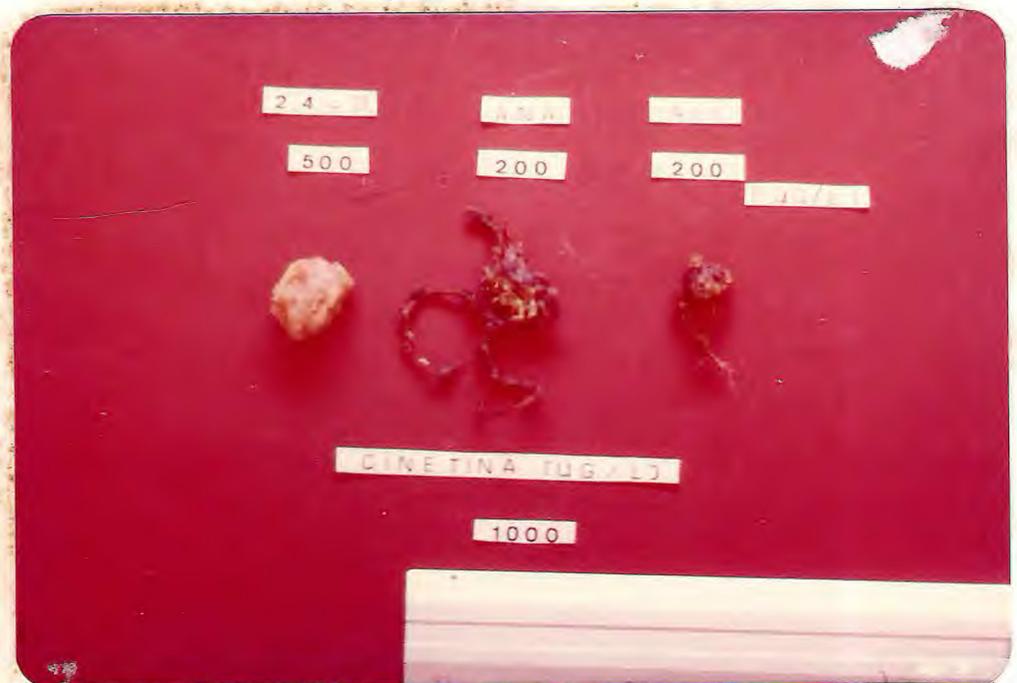


FIGURA 21 - "Calli" obtidos de suspensões celulares de Vigna unguiculata (L.) Walp. (= V. sinensis (L.) Savi ex Hassk) cv. seridô, incubados nos meios 1, 10 e 9, da esquerda para a direita, respectivamente.

#### 4. DISCUSSÃO

Indução de "callus" já foi obtida em várias espécies de Leguminosas, tais como: *Phaseolus vulgaris* (LIAU & BOLL, 1970), *Vigna sinensis* Endl. (MATSUBARA, 1975; REDDY & NARAYANA, 1977 e ALBUQUERQUE, 1979), *Stylosanthes hamata* (SCOWCROFT & ADAMSON, 1976), *Glycine max* (L.) Merr. cv. Bragg e *Trifolium repens* L. cv. Rejal Ladino (OSWALD *et. alii*, 1977), *Trifolium pratense* L., *Canavalia ensiformis* L. e *Medicago* sp. (PHILLIPS & COLLINS, 1979) e outras.

O meio indutor de "callus" em explantes (com 19,59µM de ANA e 0,46µM de cinetina), assim como as condições de cultura empregadas por OSWALD *et. alii* (1977), com a finalidade de induzir a formação de "callus" em soja e trevo, mostraram-se adequados à indução de "callus" nos diferentes explantes testados de *Vigna unguiculata* (FIGURAS 3 e 4). LIAU & BOLL (1970) observaram o mesmo comportamento no que tange a produção de "callus" em explantes de raízes, hipocótilos e cotilédones de sementes germinantes de *Phaseolus vulgaris*, e ALBUQUERQUE (1979) usando a mesma auxina (ANA) e explantes de hipocótilos de *Vigna sinensis*, também conseguiu indução de "callus".

Embora não tenha sido demonstrado experimentalmente, acreditamos que a maior produtividade de "callus" em explantes cotiledonares seja decorrente destes apresentarem a maior área superficial susceptível à indução dos mesmos.

A maior produtividade de "callus" da secção proximal cotiledonar em relação às duas outras secções (FIGURA 4, TABELAS 3 e 4) pode estar relacionada com a maior atividade metabólica dessa região próxima ao eixo embrionário. Embora o tamanho do explante determine a duração de sobrevivência *in vitro* (MURASHIGE, 1974), acreditamos que a ausência de formação de

"callus" em algumas secções cotiledonares não se deva ao tamanho do explante, já que secções de raízes, hipocótilos e plúmulas, ainda menores, produziram "callus" normalmente.

O fato de não se ter observado grande frequência de "callus" no segmento mediano do cotilédone está em desacordo com as observações de YEOMAN *et. alii* (1968), YEOMAN & MITCHELL (1970), citados por YEOMAN (1973). Segundo esses autores, substâncias que emanam da superfície cortada do explante são ativas na indução de divisões celulares, que são responsáveis pela formação de "callus". Portanto, a secção mediana deveria ter apresentado uma maior frequência de "callus" do que as demais, já que sofreu seccionamento em duas extremidades e as outras somente em uma.

O aumento de peso fresco dos explantes utilizados na indução de "callus" representa não só a formação de "callus" como também o aumento de peso dos tecidos somáticos do próprio explante por absorção de água. Ao contrário, durante a incubação, a ocorrência de perda de peso representa evaporação no tecido.

O fato de que as suspensões plaqueadas não filtradas produziram mais colônias ou "callus" do que as filtradas (FIGURA 6), pode significar que agregados celulares dão origem a "callus" mais facilmente do que células isoladas. Resultados semelhantes foram obtidos por ENGVILD (1972), e por outros autores citados por STREET (1973). A maior eficiência das culturas com número mais elevado de agregados do que de células isoladas, justifica a importância da densidade inicial de células na determinação das divisões celulares, pois favorece um nível ótimo de metabólitos que limita o efluxo líquido, permitindo às células a manutenção de sua concentração intracelular e sua capacidade de divisão (NARAYANASWAMY, 1977).

Suspensões celulares foram obtidas nos meios A, B, C, D e E, contendo 2,26 $\mu$ M, de 2,4-D e 0,46 $\mu$ M de cinetina. Todavia, os valores de aumento de turbidez das mesmas não se mostraram proporcionais ao aumento do número de células, ao contrário do observado por SUNG

(1976). Provavelmente, isto se deve à extensiva agregação. Por outro lado, em nenhum dos meios utilizados verificou-se mais do que a duplicação do número de células em suspensão. Apesar das inúmeras tentativas objetivando a multiplicação celular em suspensão, isto não foi conseguido e os motivos para tal não puderam ser esclarecidos.

As células de suspensões celulares de feijão de corda seridô apresentaram as mesmas características descritas por WAREING & PHILLIPS (1970) para suspensões de diferentes espécies, como vacúolos grandes, faixas citoplasmáticas e núcleo evidente (FIGURA 8). A estrutura básica destas células é a de células parenquimatosas como as da cultura de "callus" que lhes deram origem. O aspecto das células depende da fase de crescimento das mesmas (YEOMAN & STREET, 1973). Sabe-se que numa cultura líquida em multiplicação ativa ocorrem mudanças no tamanho médio celular da população, como também na estrutura e condição metabólica (YEOMAN & AITCHISON, 1973). Portanto, observando-se as modificações citológicas, pode-se deduzir sobre a situação metabólica das células e identificar as transformações de células inativas em ativas. No presente estudo as culturas apresentaram certa agregação de pequenas células que co-existiam com células grandes alongadas, não tendo sido possível identificar o estágio de crescimento dessas culturas.

STREET (1973), citando dados não publicados de MANSFIELD, diz que o grau de agregação celular é máximo no final da fase exponencial e a proporção de células livres é mais alta na fase estacionária. Ele afirma que células isoladas podem se dividir tanto quanto células agregadas. No entanto, não podemos confirmar tais resultados. As suspensões celulares líquidas de feijão de corda seridô apresentaram maior intensidade de divisão nas células agregadas que nas células isoladas. Esses resultados coincidem com os de STREET & HENSHAW (1963) em culturas de *Rubus fruticosus*, segundo citação de METHA *et. alii* (1967) e com os de METHA, HENSHAW & STREET (1967) em *Phaseolus vulgaris* L. Esses autores sugerem que em

agregados, as células produziriam certos fatores, que estariam ausentes ou em pequena concentração no meio e que por isso, provavelmente, a indução de divisão celular em células livres, devia requerer fatores adicionais em relação aos exigidos para crescimento de agregados celulares. Então, os agregados celulares seriam mais eficientes do que as células isoladas em produzir níveis endógenos de tais fatores, já que fatores internos e externos podem ser responsáveis pela diminuição na atividade mitótica.

Uma outra dificuldade em se obter células isoladas em divisão na cultura é devido a estas tenderem a perder substâncias para o meio, dada a grande superfície exposta, ao contrário de células em "callus", que estão rodeadas por células semelhantes (WAREING & PHILLIPS, 1970). Acreditamos que em decorrência deste processo, as células em suspensão passam a apresentar granulações ou gotículas, internas e externas. OSWALD *et. alii* (1977), usando os mesmos meios, relatam que células de soja e trevo liberavam lipídios e organelas para o meio de cultura, quando havia vitamina E presente, embora essa vitamina inibisse a senescência celular e favorecesse a dispersão das células.

Assim como MEHTA *et. alii* (1967) utilizaram água de côco acrescida ao meio de cultura de suspensões de *Phaseolus vulgaris* L. e *Linum usitatissimum* L., LIAU & BOLL (1970) adicionaram água de côco para o cultivo de "callus" e de células em suspensão de *Phaseolus vulgaris* visando estimular a multiplicação celular. STEWARD (1963) já referia-se à água de côco com essa finalidade. Foi testada a adição de água de côco, hidrolisado de caseína e extrato de levedura, mas os resultados obtidos não foram satisfatórios. Isto pode ter sido devido à densidade inicial de células inadequada para crescimento ativo da suspensão, já que essa densidade varia para cada espécie vegetal (STREET, 1973). HUBER, *et. alii* (1978) encontraram para erva doce a concentração de  $1 \times 10^5$  células/ml e OSWALD *et. alii* (1977) relataram densidade maior

do que  $1 \times 10^6$  células/ml para trevo e soja. Culturas também podem ser iniciadas em densidades menores, como  $1,5 \times 10^4$  células/ml ou até mais baixas, como em sicômoro de  $2 \times 10^3$  células/ml (STREET, 1977). Abaixo de uma densidade crítica inicial a cultura não cresce (STUART & STREET, 1969, citados por STREET, 1973). No entanto, se a concentração inicial de células estiver demasiado alta a suspensão atinge prontamente a fase estacionária. Provavelmente, a filtração das culturas líquidas, para evitar agregados, deve ter reduzido a concentração de células na suspensão, que sob essas condições iria demorar a se multiplicar. Por outro lado, a fase de crescimento exponencial pode não ter sido obtida, talvez em virtude da densidade das células viáveis não estar adequada.

Para alguns tipos de células em suspensão tem sido possível determinar precisamente os requerimentos nutricionais necessários ao crescimento das mesmas. Segundo STREET (1973), às vezes é muito difícil encontrar exatamente o meio adequado a um determinado tipo de célula quando não se tem uma referência anterior.

As culturas líquidas de feijão de corda seridô revertiram a "callus" em poucos dias. Esses resultados também foram encontrados por OSWALD *et. alii* (1977), em suspensões de *Trifolium repens* (L.) cv. Rejal Ladino.

Em relação às tentativas visando induzir diferenciação, não se pode garantir que, as raízes formadas foram originadas de células do "callus" ou se elas foram derivadas de primórdios já presentes nas secções de tecido cotiledonar. Este fato também foi observado por LINSMAIER & SKOOG (1965) em reneeração de fumo.

Tanto em "calli" obtidos de explantes (FIGURAS 3 e 4), como de suspensões celulares (FIGURA 5), o meio indutor de morfogenese em "callus" (meio 1), contendo  $2,26 \mu\text{M}$  de 2,4-D e  $4,64 \mu\text{M}$  de cinetina, induziu crescimento intenso, mas nenhuma diferenciação. Mesmo em "callus" de fumo não se conseguiu re-

geração nesse meio (FIGURA 14). No entanto, OSWALD *et. alii* (1977) conseguiram regenerar plantas de trevo a partir de "callus" obtido de suspensões celulares, usando o mesmo meio. Parece, que os "calli" que mostram maior crescimento são os que apresentam menor tendência à regeneração. Resultados semelhantes foram observados por HEBLE *et. alii* (1971) e CHATURVEDI *et. alii* (1974 a, e 1974 b) em "callus" de caule de *Holarrahaena* e *Citrus*, segundo citação de NARAYANASWAMY (1977).

Pelos resultados de SKOOG (1957), ficou demonstrado que os níveis e as proporções de auxina e citocinina, além de outros fatores, regulam o início de centros meristemáticos em "callus" e também o tipo de meristema formado. A ausência de desenvolvimento organizado em culturas de "callus" de muitas espécies pode ser atribuída a inabilidade das células sofrerem transformações para meristemóides (MURASHIGE, 1974).

Como a natureza dos fatores que influem na regeneração não está completamente esclarecida e como a totipotência não foi ainda demonstrada em todas as espécies vegetais, principalmente em leguminosas não-forrageiras como feijão de corda seridô, ainda há muito a ser esclarecido. Deve-se considerar a importância da constituição genética na determinação da resposta morfogênica apresentada por uma espécie vegetal diante dos fatores de crescimento exógenos. Assim, duas espécies diferentes apresentam respostas diversas, em termos de regeneração, diante de um único meio de cultura com idêntica composição de reguladores de crescimento, conforme foi observado dos resultados em meio com  $0,57\mu\text{M}$  de AIA e  $4,64\mu\text{M}$  de cinetina, que induziu regeneração de planta em fumo mas não em feijão de corda seridô (FIGURA 14).

A presença de auxina e ausência de citocinina não induz formação de tecido organizado, como foi observado em meio 3 (FIGURA 13), com  $2,26\mu\text{M}$  de 2,4-D, em que não houve diferenciação visível. MATSUBARA (1975) também não encontrou nenhuma diferenciação de células em meio com 0,5 a 5 mg/l de 2,4-D, mas em concentrações mais baixas observou algumas células diferenciadas em elementos traqueais. Já na presença de  $4,64\mu\text{M}$  de cine-

tina (meio 2), houve redução da dispersão das células e elementos traqueais foram observados. Resultados semelhantes foram obtidos com a mesma espécie por MATSUBARA (1975).

É possível que a diluição interna de hormônios ou de produtos destes tenha permitido regeneração de raízes (FIGURA 16) após transferências sequenciais de meio com 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 4,64  $\mu\text{M}$  de cinetina para meios sem reguladores de crescimento. SCOWCROFT & ADAMSON (1976) obtiveram regeneração de "plantlets" inteiras de *Stylosanthes hamata* (leguminosa forrageira perene) após transferências sequenciais de meio sem reguladores de crescimento para meio com cinetina. Por outro lado, as células não conseguem controlar a quantidade de auxina porque esta não é rapidamente catabolizada nas células vegetais, e este tipo de hormônio parece inibir a formação de caule por reprimir o início de broto (GAMBORG *et. alii*, 1974). No entanto, KARTHA *et. alii* (1974) obtiveram regeneração em ervilha a partir de meristemas apicais de caule, usando apenas ANA como regulador de crescimento, e sugeriram que os requerimentos nutricionais das células meristemáticas dependem do estágio de desenvolvimento da planta.

As diferentes combinações de 2,4-D e cinetina dos meios 7 e 8 (FIGURA 17) não produziram resultados significativos. A resposta morfogênica foi geralmente limitada à formação de elementos traqueais quando 2,4-D foi a auxina usada. O uso de outras auxinas como AIA e ANA (meios 9, 10 e 11) aumentou a efetividade no aparecimento de tecido organizado (FIGURAS 19 e 21). Esses resultados foram ainda mais efetivos quando os "calli" recém-formados em suspensão foram transferidos diretamente para meios contendo AIA ou ANA, sem terem passado previamente por um meio indutor de diferenciação contendo 2,4-D (FIGURA 21).

Apesar de alguns autores terem conseguido efeito estimulante no crescimento ou na indução de morfogênese com a adição de extratos de sementes, como CROCOMO *et. alii* (1976), com a adição de extrato de sementes de *Phaseolus vulgaris* ao meio

de cultura, não se obteve nenhuma diferenciação utilizando-se extratos germinantes de feijão de corda seridô.

Demonstração da totipotência em leguminosas foi obtida por OSWALD *et. alii* (1977) com "plantlets" de trevo regeneradas de "calli" obtidos de suspensões celulares. Regenerações a partir de "calli" de leguminosas foram também reportadas em alfafa (SAUNDERS & BINGHAM, 1972), trevo vermelho e "jack bean" (PHILLIPS & COLLINS, 1979). KARTHA & GAMBORG (1978) obtiveram regeneração de 30 a 50% com cultura de meristema de *Vigna sinensis* e relataram que leguminosas não forrageiras, como ervilha, "chick pea", soja e feijão de corda ("cowpea"): têm sido propagadas mais facilmente por culturas de meristemas. ALBUQUERQUE (1979) induziu a formação de raízes, utilizando "callus" de hipocótilos de *Vigna sinensis*.

Embora a totipotência tenha sido provada em leguminosas, cultura de tecido de feijão de corda mostrou ser especialmente difícil de regeneração, principalmente a partir de "calli" originados de suspensões celulares.

Os estudos sobre a ação dos reguladores de crescimento na indução do desenvolvimento organizado sugerem a ativação ou supressão de vias metabólicas especializadas numa complexa sequência de fatores interagentes, no controle da diferenciação de órgãos vegetais em desenvolvimento. Segundo WAREING & PHILLIPS (1970) o controle do desenvolvimento deve ser considerado sob vários aspectos, tendo-se dois tipos de mecanismos de controle: interno e externo. Interno, porque o padrão de desenvolvimento de um organismo está determinado primariamente pelo seu patrimônio genético. Os estágios de desenvolvimento parecem envolver uma sequência de ativação e repressão ordenada de gens, em vários pontos críticos no tempo e no espaço. Externo, porque certos estágios do ciclo de vida vegetal podem ser controlados por fatores ambientais como nutrientes, hormônios do meio, pH, temperatura, luminosidade (fotoperíodo). A diferenciação envolve manifestações estruturais e metabólicas, que ocasionam diferenças na produção de enzimas, que por outro

lado influem na regulação dos gens. Os hormônios parecem ter importante papel na atividade dos gens, mas não na determinação de quais gens serão ativados (WAREING & PHILLIPS, 1970). Portanto, a dificuldade de diferenciação em feijão de corda se ridô pode ser devida a causas endôgenas e/ou exôgenas.

## 5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, concluimos que:

a) cotilédones, radículas, plúmulas e hipocótilos de sementes germinantes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (= *Vigna sinensis* (L.) Savi ex Hassk), demonstraram-se viáveis como explantes, permitindo a formação de "callus";

b) dentre os tipos de secções cotiledonares utilizadas (proximal, mediana e distal ao eixo embrionário), a secção proximal foi a que apresentou maior produção de "callus" nas condições descritas;

c) a indução de "callus" a partir de suspensões de células foi conseguida em meio líquido indutor de "callus" em suspensões celulares;

d) as suspensões celulares cultivadas em meio líquido A (meio de crescimento de células em suspensão) reverteram a "callus" em poucos dias;

e) a análise microscópica de suspensões celulares mostrou que as células apresentavam diversidade acentuada em tamanho, forma e grau de agregação;

f) formação de colônias celulares e "calli" em placas foram obtidas em meio semi-sólido indutor de "callus" em suspensões celulares e em meio semi-sólido A;

g) os meios indutores de morfogênese que proporcionaram crescimento de "callus" mais intenso foram os que menos induziram diferenciação;

h) diferenciação em "calli" obtidos de suspensões celulares e cultivados em meios com diferentes concentrações de 2,4-D e cinetina, foi escassa, observando-se apenas presença de elementos traqueais;

i) a formação de raízes em "calli" originados de suspensões celulares, crescidos em meio 1 (com 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 4,64  $\mu\text{M}$  de cinetina) e transferidos para meio 4 (sem reguladores de crescimento) foi observada em um único caso;

j) "calli" produzidos em meio líquido indutor de "callus" em suspensões celulares e transferidos para meios 9 (com 1,07  $\mu\text{M}$  de ANA e 4,64  $\mu\text{M}$  de cinetina) e 10 (com 1,14  $\mu\text{M}$  de AIA e 4,64  $\mu\text{M}$  de cinetina) desenvolveram com maior reprodutibilidade a formação de raízes.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, M.C.F. 1979. Crescimento e diferenciação de tecidos de feijão-de-corda, *Vigna sinensis* (L.) Savi, in vitro. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil, 72 p.
- BENNICI, A., P.G. CIONINI & F. D'AMATO. 1976. Callus formation from the suspensor of *Phaseolus coccineus* in hormone-free medium: a cytological and DNA cytophotometric study. Protoplasma, 89: 251-261.
- CARLSON, P. S. 1973. Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco. Science, 180: 1366-1368.
- CROCOMO, O.J., W.R. SHARP & J.E. PETERS. 1976. Plantlet morphogenesis and the control of callus growth and root induction of *Phaseolus vulgaris* with the addition of a bean extract. Z. Pflanzenphysiol., 78: 456-460.
- CUMMINGS, D.P., C.E. GREEN & D. D. STUTHMAN. 1976. Callus induction and plant regeneration in oats. Crop Science, 16: 465-470.
- DIX, P.J. & H.E. STREET. 1975. Sodium chloride-resistant cultured cell lines from *Nicotiana sylvestris* and *Capsicum annuum*. Plant Sci. Let., 5: 231-237.
- EARLE, E.D. & J.G. TORREY, 1965. Morphogenesis in cell colonies growth from *Convolvulus* cell suspensions plated on synthetic media. Amer. Jour. Bot., 52: 891-899.
- ENGVILD, K.C. 1972. Callus and cell suspension cultures of carnation. Physiol. Plant., 26: 62-66.

- EVERETT, N.P., T.L. WANG & H.E. STREET. 1978. Hormone regulation of cell growth and development in vitro. In: Frontiers of plant tissue culture 1978, T.A. Thorpe ed., pp. 307-316. Intern. Assoc. Plant. Tissue Cult., Calgary, Canada.
- GAMBORG, O.L. 1975. Callus and cell culture. In: Plant tissue culture methods, O.L. Gamborg & L.R. Wetter, ed., pp. 1-10. Nat. Res. Counc. Canada, Saskatoon, Canada.
- GAMBORG, O.L., F. CONSTABEL & R.A. MILLER. 1970. Embryogenesis and production of albino plants from cell cultures of Bromus inermis. Planta, 95: 355-358.
- GAMBORG, O.L., F. CONSTABEL & J. P. SHYLUK, 1974. Organogenesis in callus from shoot apices of Pisum sativum. Physiol. Plant., 30: 125-128.
- GAMBORG, O.L., J.P. SHYLUK, D.S. BRAR & F. CONSTABEL. 1977. Morphogenesis and plant regeneration from callus of immature embryos of sorghum. Plant.Sci.Let., 10: 67-74.
- GAUTHERET, R.J. 1939. Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissue de tubercules de carrote. C. R. Acad. Sci., 208: 118-120.
- HABERLANDT, G. 1902. Kulturversuche mit Isolierten Pflanzellen. Sitzungsber. Akad. der Wiss. Wien. Math. Naturwiss, 111: 69-92.
- HUBER, J., F. CONSTABEL & O.L. GAMBORG. 1978. A cell counting procedure applied to embryogenesis in cell suspension cultures of anise (Pimpinella anisum L.). Plant Sci. Let., 12: 209-215.
- KARTHA, K.K. 1975. Organogenesis and embryogenesis. In: Plant tissue culture methods, O. L. Gamborg & L. R. Wetter, ed., pp. 44-49. Nat. Res. Counc. Canada, Saskatoon, Canada.

- KARTHA, K.K., C.L. GAMBORG & F. CONSTABEL. 1974. Regeneration of pea (Pisum sativum L.) plants from shoot apical meristems. Z. Pflanzenphysiol., 72: 172-176.
- KARTHA, K.K. & O.L. GAMBORG. 1978. Meristem culture techniques in the production of disease-free plants and freeze-preservation of germ plasm of tropical tuber crops and grain legumes. In: Diseases of tropical food crops, H. Maraité & J.A. Meyer, ed., pp. 267-283. Proc. Intern. Symp., Louvain-la Neuve, Belgium.
- KNUDSON, L. 1922. Symbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz., 73: 1-25.
- LIAU, D.F. & W.G. BOLL. 1970. Callus and cell suspension culture of bush bean (Phaseolus vulgaris). Can. J. Bot. 48: 1119-1130.
- LINSMAIER, E.M. & F. SKOOG. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 18: 100-127.
- MASTELER, V. J. & D.J. HOLDEN. 1970. The growth of and organ formation from callus tissue of sorghum. Plant Physiol., 45: 362-364.
- MATOS BRITO, A.E.R. & A.M. AQUINO. 1979. Indução de formação de "callus" a partir de suspensão de células isoladas de Vigna sinensis (L.) Savi cv. seridô multiplicando-se ativamente e tentativas de diferenciação dos mesmos. Resumos da 31.<sup>a</sup> Reunião Anual da SBPC. 08 - 06.01.10. p. 674.
- MATSUBARA, S. 1975. Nutritional and hormonal requirements for the growth of Vigna sinensis callus in vitro. Physiol. Plant., 34: 83-89.
- MEHTA, A.R., G.G. HENSHAW & H.E. STREET. 1967. Aspects of growth in suspension cultures of Phaseolus vulgaris L. and Linum usitatissimum L. Indian J. Plant Physiol., 10: 44-53.

- MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant. Physiol., 25: 135-166.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- NABORS, M.W., A. DANIELS, L. NADOLNY & C. BROWN. 1975. Sodium chloride tolerant lines of tobacco cells. Plant. Sci. Let., 4: 155-159.
- NARAYANASWAMY, S. 1977. Regeneration of plants from tissue cultures. In: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. J. Reinert & Y. P. S. Bajaj, ed., pp. 179-248. Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- NOBECOURT, P. 1939. Sur la p̄ernnite et l'augmentation de volume des cultures de tissue v̄gétaux. C.R. Soc. Biol., 130: 1270.
- OSWALD, T.H., A.E. SMITH & D.V. PHILLIPS. 1977. Callus and plantlet regeneration from cell cultures of ladino clover and soybean. Physiol. Plant., 39: 129-134.
- PHILLIPS, G.C. & G.B. COLLINS. 1979. In vitro tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. Crop Science, 19: 59-64.
- REDDY, K.B.S.M. & R. NARAYANA. 1977. Histogenesis of callus from hypocotyl of Vigna sinensis Endl. & establishment of a continuous culture. Indian J. Exp. Biol., 15: 88-90.
- SAUNDERS, J.M. & E.T. BINGHAM. 1972. Production of alfalfa plants from callus tissue. Crop. Science., 12: 804-808.
- SCOWCROFT, W.R. & J.A. ADAMSON. 1976. Organogenesis from callus cultures of the legume, Stylosanthes hamata. Plant Sci. Let., 7: 39-42.

- SKOOG, F. & C.O. MILLER. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol., 11: 118-131.
- STEWART, F.C. 1963. The control of growth in plant cells. Scientific American (oct.): 1-11.
- STEWART, F.C., M.O. MAPES & K. MEARS. 1958. Growth and organized development of cultures growth from freely suspended callus. Amer. J. Bot., 45: 705-708.
- STREET, H.E. 1973. Cell (suspension) cultures - techniques. In: Plant tissue and cell culture. Botanical Monographs, vol.11.H.E.Street ed., pp. 59-99. Blackwell Scient.Public. Oxford, London, Edinburg, Melbourne.
- STREET, H.E. 1973. Plant cell cultures: their potential for metabolic studies. In: Biosynthesis and its control in plants, B.V. Milborrow, ed., pp. 93-125. Academic Press, London & New York.
- SUNG, Z.R. 1976. Turbidimetric measurement of plant cell culture growth. Plant Physiol., 57: 460-462.
- THORPE, T.A. 1978. Physiological and biochemical aspects of organogenesis in vitro. In: Frontiers of Plant tissue culture, T.A. Thorpe, ed., pp. 48-59. Intern. Assoc. Plant Tissue Cult. Calgary, Canada.
- VERDCOURT, B. 1970. Studies in the Leguminosae - Papilionoideae for the 'Flora of Tropical East Africa': IV. Kew Bull., 24: 507-569.
- WAREING, P.F. & I.D.J. PHILLIPS. 1970. The control of development. In: The control of growth and differentiation in plants. pp. 271-293. Pergamon Press, New York.
- WAREING, P.F. & I.D.J. PHILLIPS. 1970. Sterile culture methods in studies of differentiation. In: The control of growth and differentiation in plants, pp. 147-163. Pergamon Press, New York.

- WETMORE, R.H. 1954. The use of in vitro cultures in the investigation of growth and differentiation in vascular plants. Brookhaven Symp. Biol., 6: 22-40.
- WHITE, P.R. 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant. Physiol., 9: 585-600.
- YEOMAN, M.M. 1973. Tissue (callus) cultures - techniques In: Plant tissue and cell culture. Botanical Monographs, vol. 11. H.E. Street, ed., pp. 31-58. Blackwell Scient. Public., Oxford, London, Edinburg, Melbourne.
- YEOMAN, M.M. & H.E. STREET. 1973. General cytology of cultured cells. In: Plant tissue and cell culture. Botanical Monographs, vol. 11. H.E. Street, ed., pp. 121-160. Blackwell Scient. Public., Oxford, London, Edinburg, Melbourne.
- YEOMAN, M.M. & P.A. AITCHISON. 1973. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: Plant tissue and cell culture. Botanical Monographs, vol. 11. H.E. Street, ed., pp. 240-268. Blackwell Scient. Public., Oxford, London, Edinburg, Melbourne.