

EFEITO DE HORMÔNIOS VEGETAIS NA RESPOSTA MORFOGÊNICA *IN VITRO* EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.).

MARÍLIA A. R. **FATOBENE**¹ ; ILENE R. S. **PASSOS**²; SÉRGIO A. M. **CARBONELL**³;
NEIVA I. **PIEROZZI**⁴; ALISSON F. **CHIORATO**³

N° 0900039

Resumo

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) foi considerado durante muito tempo como recalcitrante à regeneração *in vitro*. Somente a partir da década de noventa é que trabalhos com resultados mais consistentes começaram a surgir. O objetivo deste trabalho foi estudar a regeneração *in vitro* de feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. Alvorada, utilizando-se diferentes tipos de explantes (hipocótilos e cotilédones) e testando-se diferentes concentrações dos hormônios vegetais, 6-BA em combinação dialética com NAA. Foram efetuados dois experimentos com explantes distintos: hipocótilos e cotilédones em meios que contiveram os sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), e as vitaminas do meio B5 (Gamborg et al., 1968). Verificou-se nos experimentos com hipocótilos que, independentemente do tempo de permanência dos explantes em meio com NAA na concentração de 4,0 µM, sempre ocorreu a formação de raízes. Em meio com 40 µM de NAA a melhor resposta foi dada com a permanência do explante por 24h. Nesse período houve uma resposta homogênea da desdiferenciação do explante, com a formação de calos. Após a passagem dos explantes para meio com 6-BA foi mantida a produção de calos sem, porém, haver regeneração de plantas, em nenhum dos casos. Já, quando os hipocótilos foram inoculados diretamente em meio com 6-BA ocorreu uma nítida polarização dos explantes, no que diz respeito à formação de calos, mas nenhum momento houve a regeneração de plantas. No experimento em que se utilizaram cotilédones como explante houve apenas uma ocorrência de regeneração de planta em meio MS contendo 5,32 µM de 6-BA.

1.Bolsista Fundag: Aluna do IX Nível do curso de Ciências Biológicas, UNIPINHAL, Espírito Santo do Pinhal-SP, ✉ fatobene@ymail.com

2.Orientadora: Pesquisadora, Centro de P&D de Recursos Genéticos Vegetais/IAC, Campinas-SP,

3.Colaborador: Pesquisador, Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Grão e Fibras/IAC, Campinas-SP

4.Colaboradora: Pesquisadora, Centro de P&D de Recursos Genéticos Vegetais/IAC, Campinas-SP.

Abstract

The bean (*Phaseolus vulgaris* L.) was long regarded as recalcitrant to *in vitro* regeneration. Only from the nineties works with more consistent results began to emerge. The objective was to study the *in vitro* regeneration of bean *Phaseolus vulgaris* L. 'Alvorada', using different types of explants (hypocotyls and cotyledons) and testing different concentrations of plant hormones 6-BA in combination with NAA. Two experiments were performed with different explants: cotyledons and hypocotyls in media that contained the salts of MS medium (Murashige & Skoog, 1962) and vitamins of B5 medium (Gamborg et al., 1968). It was found in experiments with hypocotyls that, regardless of the time of explants in medium with NAA at a concentration of 4.0 μ M, have always been the formation of roots. In medium with 40 μ M NAA for the best answer was given to the permanence of the explants for 24 hours. In this period there was a homogeneous response of the explants dedifferentiation, with the formation of callus. When the hypocotyls were inoculated directly into medium with 6-BA was a clear polarization of the explants as regards the formation of callus, but no time was the regeneration of plants. In the experiment in which cotyledons were used as explants was only one occurrence of plant regeneration on MS medium containing 5.32 μ M of 6-BA.

Introdução

O Brasil destaca-se na produção mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e é considerado o maior consumidor por encontrar nesta leguminosa uma alta fonte de proteína vegetal. O programa de melhoramento genético do feijão, no Instituto Agrônomo de Campinas, busca atender demandas específicas dos produtores, e tem contribuído de forma clara para o progresso da produtividade da cultura. Métodos e sistemas biotecnológicos, por outro lado, podem ser ferramentas úteis aos programas de melhoramento genético, a fim de superar barreiras de cruzamentos interespecíficos e permitir a introdução de genes por meio da transgenia. Para tanto, pressupõe-se a disponibilidade de protocolos eficientes. O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) foi considerado durante muito tempo como recalcitrante à regeneração *in vitro*. Somente a partir da década de noventa é que trabalhos com resultados mais consistentes começaram a surgir. O objetivo deste trabalho foi estudar a regeneração *in vitro* de feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. Alvorada, utilizando-se diferentes tipos de explantes (hipocótilos e cotilédones) e testando-se diferentes concentrações dos hormônios vegetais, 6-BA em combinação dialética com NAA.

Material e Métodos

Em todos os experimentos foram utilizadas sementes da cultivar Alvorada de *Phaseolus vulgaris* L, lançada recentemente pela equipe de melhoristas de feijão do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) (CARBONELL et al., 2008). O meio de cultura para os diferentes experimentos conteve os sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), as vitaminas do meio B5 (Gamborg et al., 1968) e *myo*-inositol (100 mg L^{-1}). A concentração de sacarose no meio foi de 30 g L^{-1} . O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição do agente geleificante (Agar $6,2 \text{ g L}^{-1}$) e da autoclavagem. Foram distribuídos 30 ml de meio de cultura em frascos de vidro (13 cm de altura e 6 cm de largura). Quando se utilizaram placas de petri, foram colocados 15 ml de meio de cultura.

Germinação de feijão *in vitro*: A descontaminação das sementes procedeu-se em câmara de fluxo laminar asséptico. Estas foram submersas em solução de hipoclorito de cálcio (2%) por 20 minutos sob agitação, sendo a seguir lavadas em solução de ácido clorídrico (0,001N). Na seqüência enxaguaram-se as sementes com várias passagens por água destilada autoclavada durante 20 minutos. O meio de germinação constou de $\frac{1}{4}$ da concentração salina em meio líquido de MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo ou não 6-BA. O meio conteve também 0,05% de carvão ativado. Distribuiu-se 10 ml de meio de cultura em frascos de vidro (13 cm de altura e 6 cm de largura). Em cada frasco foram colocadas 2 sementes para germinar. Os frascos foram selados com papel alumínio e incubados no escuro em sala de crescimento ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Após 2 ou 3 dias em germinação os explantes (hipocótilos ou cotilédones) foram coletados para os distintos experimentos:

a) Utilizando-se hipocótilos como explante: No meio de germinação das sementes acrescentou-se $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado. O hipocótilo foi coletado antes de a radícula emitir raízes secundárias. Foi utilizada a extremidade que fica em ligada ao cotilédone. Os tratamentos constaram das concentrações de 4 (T1) ou $40 \mu\text{M}$ (T2) de NAA (ácido naftaleno acético) ou $10 \mu\text{M}$ de 6-BA (6 - benzilaminopurina) (T3) em meio MS. Foram colocados 4 explantes por frasco. Os explantes permaneceram no meio com NAA por 1, 2 ou 3 dias e, após esse tempo de permanência foram transferidos para meio com $10 \mu\text{M}$ 6-BA.

B) Utilizando-se cotilédones como explante: Os cotilédones foram separados da plúmula e de qualquer resquício de eixo embrionário, sendo inoculados em meio de cultura com combinações dialéticas dos hormônios NAA (0,0; 2,1; 4,2; $6,4 \mu\text{M}$) e 6-BA (0,0; 2,6; 5,3; $10,6 \mu\text{M}$), constituindo-se em 16 tratamentos. Este experimento foi montado em placas de petri e permaneceram em sala de crescimento ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), inicialmente no escuro. Os blocos foram estabelecidos no tempo. As avaliações foram efetuadas a cada 7 dias,

anotando-se o número de explantes contaminados, oxidados, com calos, com raízes e com regeneração de parte aérea.

Resultados e Discussão

1. Utilizando-se hipocótilos como explante.

Verificou-se que, independentemente do tempo de permanência dos explantes em meio com NAA, na concentração de 4,0 μM , sempre ocorreu a formação de raízes. Isto significa que essa dose não foi suficiente para induzir a dediferenciação do explante. Mesmo após a transferência para meio com 6-BA, os explantes continuaram a produzir raízes. Em meio com 40 μM de NAA a melhor resposta foi dada com a permanência do explante por 24h. Nesse período houve uma resposta homogênea da dediferenciação do explante, com a formação de calos. Após a passagem dos explantes para meio com 6-BA foi mantida a produção de calos sem, porém, haver regeneração de plantas. Já, quando os cotilédones foram inoculados diretamente em meio com 6-BA ocorreu uma nítida polarização dos explantes, no que diz respeito à formação de calos. Em nenhum momento houve a regeneração de plantas.

2. Utilizando-se cotilédones como explante.

Esse experimento teve um caráter exploratório, como se pode deduzir pelo número de variáveis utilizadas. Para o feijão esse tipo de experimento se justifica uma vez que não existe na literatura um protocolo eficiente de regeneração, sendo que as respostas regenerativas são, via de regra, esporádicas (Azevedo et al., 2008). A Tabela 1 apresenta um resumo das respostas dentro de cada bloco sem levar em conta os tratamentos.

TABELA 1. Média e desvio padrão do n° de explantes (cotilédones) inoculados por bloco, contaminados, oxidados e com calos.

Bloco	Explantes	Contaminados	Oxidados	Calo
A	64	53	11	3
B	128	104	24	7
C	128	119	9	3
D	128	66	56	15
E	126	92	34	2
Média \pm Desvio Padrão	114,8 \pm 28,4	86,8 \pm 27,0	26,8 \pm 19,2	6 \pm 5,4

A Tabela 2 apresenta a média e o desvio padrão do número de explantes com calos, dentro de cada tratamento. A regeneração de plantas foi observada apenas no tratamento 3, em meio primário, na região inferior do explante, ou seja, em contato com o meio de cultura (Figura 1).

TABELA 2. Média e desvio padrão do n° de explantes que apresentaram divisão celular (calo) de acordo com o tratamento. Média de 5 repetições.

Tratamento	6-BA (μ M)	NAA (μ M)	EXPLANTES C/CALOS Média \pm Desvio Padrão
1	0	0	*
2	2,6	0	*
3	5,3	0	0,2 \pm 0,5
4	10,6	0	0,2 \pm 0,5
5	0	2,1	*
6	2,6	2,1	*
7	5,3	2,1	0,2 \pm 0,5
8	10,6	2,1	0,6 \pm 0,9
9	0	4,2	*
10	2,6	4,2	0,4 \pm 0,5
11	5,3	4,2	2,0 \pm 2,6
12	10,6	4,2	0,8 \pm 1,3
13	0	6,4	0,2 \pm 0,5
14	2,6	6,4	0,2 \pm 0,5
15	5,3	6,4	*
16	10,6	6,4	1,4 \pm 3,1

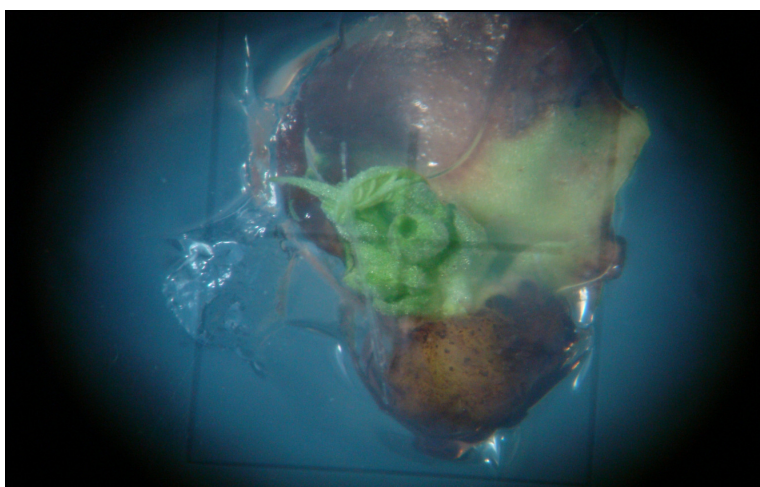


FIGURA 1. Regeneração de brotações por meio de calos em cotilédones de feijão 'Alvorada'.

Conclusão

A regeneração *in vitro* na cultivar de feijão Alvorada deu-se de maneira esporádica quando se utilizou cotilédones com cortes em meio MS contendo 5,32 µM de 6-BA.

Agradecimentos

À FUNDAG pela concessão de bolsa para a estudante de biologia Marília Antonia dos Reis Fatobene.

Referências bibliográficas:

AZEVEDO, H.; HOULLOU-KIDO, L.; BENKO-ISEPPON, A. Análise do potencial regenerativo *in vitro* de diferentes cultivares de feijão-caupi. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, nº2, p.528-530, 2007.

CARBONELL, S. A. M; CHIORATO, A. F.; ITO, M. F.; PERINA, E. F.; GONÇALVES, J. G. R.; SOUZA, P. S.; GALLO, P. B.; TICELLI, M.; COLOMBO, C. A.; AZEVEDO Fº, J. A. IAC - Alvorada and IAC – Diplomata: new common bean cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v.8, p.163-166, 2008.

FARIAS, F. L. Cultura de Tecidos em *Phaseolus vulgaris* L. visando a regeneração e a androgênese *in vitro*. Dissertação. Mestrado. 2009 82 fls.