

Avaliação da regeneração *in vitro* de explantes de caupi e soja¹

Evaluation of *in vitro* regeneration of cowpea and soybean

Viviane Pinho de Oliveira², Abdellatrf Kemaleddine Benbadis³ e Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho⁴

Resumo - A capacidade de regeneração *in vitro* é uma das exigências para a produção de plantas utilizáveis em programas de melhoramento genético. Como cada genótipo apresenta um potencial específico, diversos protocolos têm sido elaborados com o intuito de desenvolver tecnologias que possam acelerar o processo de regeneração. O trabalho teve por objetivo avaliar o potencial morfogenético *in vitro* de diferentes explantes de uma cultivar de soja, “Doko”, e de quatro cultivares de caupi, “João Paulo II”, “Epace 10”, “Pitiúba” e “Setentão”. A avaliação baseou-se nas respostas de explantes excisados diretamente de sementes (embriões zigóticos e cotilédones) ou a partir de hipocótilos de plântulas germinadas *in vitro*, cultivados em meios suplementados com diferentes reguladores de crescimento (2,4-D, TDZ e BA). O meio MS suplementado com BA e 2,4-D (5 µM) induz maior formação de calos em explantes de cotilédones e embriões zigóticos da cultivar “Doko”. Os explantes de embriões zigóticos dessa cultivar, apresentam a melhor média para formação de brotos, em relação às cultivares de caupi estudadas, quando cultivados em meio MS suplementado com 6,6 µM de BA e 3% de sacarose. Essas respostas não são adequadas para a utilização desses cultivares em estudos de melhoramento genético.

Termos para indexação: *Vigna unguiculata*, *Glycine max*, regeneração *in vitro*.

Abstract - A good potential for *in vitro* regeneration is needed to produce useful plants in genetic improvement programs. Various protocols have been used to improve specifically soybean and cowpea cultivars regeneration. In this study, one cultivar of soybean, “Doko”, and four cowpea cultivars (Epace 10, João Paulo II, Setentão and Pitiuba) served to provide explants for *in vitro* culture. Zygotic embryos and cotyledons extracted from seeds and segments of hypocotyls taken from germinated seedlings have been cultivated in supplemented environment with different growth regulators (2,4-D, TDZ and BA). MS environment containing BA and 2, 4-D (5 µM) results on a better callus and bud formation on zygotic embryos and cotyledons explants of the cultivar “Doko”. Bud formation from zygotic explants of this cultivar was higher in average in relation to the four cultivars of cowpea cultured in a supplemented environment with BA (6. 6 µM) and sucrose (3%). These *in vitro* morphogenetic responses don't allow a further utilization of these materials for genetic improvement.

Index terms: *Vigna unguiculata*, *Glycine max*, *in vitro* regeneration.

¹ Recebido para publicação em 14/09/2004; aprovado em 31/01/2006.

Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor apresentada ao Dep. de Fitotecnia, CCA/UFC, CE

² Bióloga, M. Sc., Profa. da Universidade Regional do Cariri, viviane78oliveira@hotmail.com

³ Biólogo, Ph. D., pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, benbadis@ufc.br

⁴ Bióloga, D. Sc., pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, cristina@cnpat.embrapa.br

Introdução

A aplicação de técnicas de biotecnologia, em auxílio dos métodos convencionais de melhoramento, pode contribuir para a sustentabilidade da agricultura pela produção de cultivos melhorados e mais compatíveis com o ambiente, especialmente em países não desenvolvidos, onde há necessidade de tecnologias para problemas específicos em cultivos tropicais. As técnicas de cultura de tecidos têm sido adotadas como um dos procedimentos relacionados com a biotecnologia, no melhoramento de diversas espécies de interesse econômico (Barros, 1999).

O princípio básico da cultura de tecidos, a totipotencialidade celular, formulado por Matthias Schleiden e Theodor Schwann, em 1938, afirma que a célula é autônoma e, portanto, contém a informação genética necessária para regeneração de uma planta completa (Cid, 2001).

A maioria dos sistemas de cultura de tecidos apresenta como fatores determinantes do crescimento e do padrão de desenvolvimento vegetal, a composição e a concentração de reguladores de crescimento. Além disso, os meios nutritivos usados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas *in vitro* (Caldas et al., 1998).

O caupi (*Vigna unguiculata*) é uma leguminosa bastante cultivada na região Nordeste do Brasil, representando uma fonte alimentar extremamente importante, principalmente para as camadas sociais economicamente menos favorecidas dessa região (Araújo & Watt, 1988). Nas últimas décadas, a produção e a área ocupada com a cultura do feijoeiro aumentaram. A produtividade, entretanto, vem decrescendo em detrimento de fatores sócio-econômicos, fitossanitários e agroecológicos. Diante dos problemas que esta cultura apresenta e da sua grande importância para as regiões onde está estabelecida, o desenvolvimento de tecnologias que possam acelerar o processo de melhoramento continua a ser um desafio para a agricultura (Aragão et al., 1998).

A aplicação da engenharia genética para o melhoramento de caupi tem sido limitada por causa da sua natureza recalcitrante em manipulações *in vitro* e da conseqüente escassez de sistemas de regeneração aplicáveis aos genótipos comerciais de caupi (Christou, 1995). Alguns protocolos de regeneração de caupi vêm sendo desenvolvidos (Pellegrineschi, 1997; Brar et al., 1999; Carvalho et al., 2000), no entanto, tais protocolos não podem, necessariamente, ser aplicados a outras cultivares de mesma espécie, pois o potencial regenerativo depende não apenas do tipo de

explante ou da composição do meio, mas também do genótipo da cultivar (Nabors et al., 1983).

O grão da soja dá origem a produtos e subprodutos utilizados atualmente pela agroindústria de alimentos e indústria química. Até 1975, toda a produção brasileira de soja era realizada com cultivares e técnicas importadas dos Estados Unidos, onde as condições climáticas e os solos são diferentes do Brasil. Em 1980, a Embrapa desenvolveu a primeira variedade genuinamente brasileira de soja, a Doko, que foi o ponto de partida para a exploração do cerrado do Centro-oeste e Norte do Brasil. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de soja e, na safra 2003, produziu cerca de 50 milhões de toneladas (A soja, 2005). Observa-se uma expansão da mesma na região Nordeste do Brasil, principalmente nos estados do Maranhão, Piauí, Alagoas e timidamente no estado do Ceará (Curso, 2004).

Um dos mais eficientes métodos para regeneração de soja foi primeiro descrito em 1983 (Christianson et al., 1983). Depois disso, muitos outros artigos foram publicados (Bailey et al., 1993; Dan & Reichert, 1998; Droste et al., 2001). O objetivo desse trabalho foi estudar respostas morfogênicas *in vitro* em explantes de caupi e de soja.

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no período de março a dezembro de 2003, no Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal da EMBRAPA – Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE, Brasil.

Condições de desinfestação das sementes

Sementes de caupi, cultivares “Setentão”, “João Paulo II”, “Epacé 10” e “Pitiúba”, e de soja, cultivar “Doko”, foram desinfestadas, em câmara de fluxo laminar, por meio de imersão em álcool etílico a 70% (v/v) por dois minutos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio a 2% (v/v) por 15 minutos, sob agitação manual. Posteriormente, foram lavadas por três vezes em água destilada e esterilizada. Após a desinfestação das sementes, foram realizados três experimentos com metodologias distintas, descritas a seguir.

Potencial morfogênico *in vitro* de soja, genótipo Doko, a partir de explantes submetidos a tratamentos de embebição e de combinações de diferentes reguladores de crescimento

Neste experimento, após o processo de assepsia, as sementes de soja foram embebidas, por um período de 1 e 7 dias, em água destilada, não esterilizada, em frascos de vidro transparentes, com capacidade de 220 mL. O pH de

todos os meios foi ajustado para 5,8 antes da esterilização dos mesmos em autoclave. A autoclavagem dos meios de cultura realizou-se em temperatura de 121°C, pressão de 1 Kgf.cm⁻¹, por 15 minutos. Durante os períodos de embebição, as sementes foram mantidas em sala de crescimento, sob condições controladas de temperatura de 24 ± 1°C, luminosidade de 3,682 µEm².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

A partir de sementes desinfestadas e embebidas, os explantes foram obtidos de cortes longitudinais dos cotilédones e de embriões isolados das sementes. Esses, foram inoculados, em frascos de vidro contendo 30 mL do meio de crescimento. O meio de crescimento consistiu do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), solidificado com 0,45% (p/v) de agar e suplementado com reguladores de crescimento: 6-benziladenina (BA) em concentrações de 1; 3 e 5 µM; ou BA (1; 3 e 5 µM) combinado com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), em concentrações de 1; 3 e 5 µM; ou BA (1; 3 e 5 µM) combinado com ácido naftalenoacético (ANA), em concentrações de 1; 3 e 5 µM ou BA (1; 3 e 5 mM) combinado com isopenteniladenina (2iP), em concentrações de 1; 3 e 5 µM.

Explantes provenientes de cotilédones foram inseridos com a face adaxial em contato com o meio, juntamente com o embrião zigótico isolado. Santarem & Finer (1999) observaram que esta orientação do cotilédone foi a mais favorável para induzir embriões somáticos em soja.

Durante 30 dias foram feitas avaliações periódicas (a cada 10 dias) do número de calos em cada repetição. A unidade experimental foi constituída por um frasco contendo dois cotilédones (cada um excisado em duas partes) e um embrião zigótico, sendo seis repetições para cada tratamento. A análise estatística foi efetuada utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, tendo como fatores, tempo de embebição (1 e 7 dias), tipo de explante (cotilédones e embriões zigóticos) e de meio de cultura (MS suplementado com os reguladores de crescimento nas concentrações e combinações citadas anteriormente). Os dados coletados foram submetidos à análise de variância, utilizando o sistema estatístico SANEST, com transformação de dados segundo raiz ($x + 0,5$), e a comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Potencial morfogenético *in vitro* de diferentes explantes de caupi

Após a desinfestação, as sementes de caupi foram colocadas para germinar em tubos de ensaio (25x150 mm), contendo 10 mL do meio de cultura MS, com as concentrações salinas reduzidas pela metade, solidificado com 0,45% (p/v) de agar. As sementes permaneceram em sala de cres-

cimento sob condições controladas de temperatura, luminosidade e fotoperíodo descritas anteriormente, por um período de duas semanas, necessário para o desenvolvimento completo das plântulas. A partir das plântulas desenvolvidas *in vitro*, explantes foram obtidos de cortes transversais de hipocótilos e inoculados individualmente em tubo de ensaio (25x150 mm), contendo 10 mL do meio MS suplementado com 9 µM de 2,4-D ou TDZ, (thidiazuron) [1-fenil 3-(1,2,3-tiadiazol-5il) uréia], na concentração de 20 µM. Os explantes foram inoculados com uma face excisada em contato com o meio de crescimento, e em seguida, foram mantidos, por 10 dias, em sala de crescimento.

A formação de calos foi avaliada pela contagem de calos em cada repetição. A unidade experimental foi constituída por um tubo contendo um explante de hipocótilo, com três repetições para cada tratamento. O experimento seguiu o esquema fatorial 4 x 2, com 4 cultivares (“Setentão”, “João Paulo II”, “Epace 10” e “Pitiúba”) e 2 meios de cultura (MS suplementado com 2,4-D 9 µM ou com TDZ 20 µM). A análise estatística utilizou o delineamento inteiramente casualizado. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância, utilizando o sistema estatístico SANEST, e a comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Potencial morfogenético de soja, cultivar Doko, e de quatro cultivares de caupi, a partir de cotilédones e embriões zigóticos

A partir de semente desinfestadas, os explantes foram obtidos de cortes longitudinais dos cotilédones e de embriões isolados das sementes. Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram inoculados em frascos de vidro contendo 30 mL do meio MS suplementado com 6,6 µM de BA ou 181 µM de 2,4-D. Cada concentração foi testada com a adição de 3 ou 12% de sacarose ao meio de cultura. Explantes provenientes de cotilédones foram excisados em duas partes e, em seguida, inseridos com a face adaxial em contato com o meio de crescimento, juntamente com o embrião zigótico isolado.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento durante 30 dias, recebendo avaliações regulares a cada semana. A formação de calos foi avaliada através da contagem de calos formados em cada repetição. A unidade experimental foi constituída por um frasco contendo quatro explantes de cotilédone e o embrião zigótico, com três repetições para cada tratamento. A análise estatística foi realizada utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, e os fatores considerados foram: cultivares (“Setentão”, “João Paulo II”, “Epace 10”, “Pitiúba” e

“Doko”) e meios de cultura (MS suplementado com 181 μM de 2,4-D e 3 ou 12% de sacarose e MS suplementado com 6,6 μM de BA e 3 ou 12% de sacarose). Os dados coletados foram submetidos à análise de variância, utilizando o sistema estatístico SANEST, com transformação de dados segundo raiz ($x + 0,5$) e a comparação de médias pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

Potencial morfogenético *in vitro* de soja, genótipo Doko, a partir de explantes submetidos a tratamentos de embebição e de combinações de diferentes reguladores de crescimento.

Detectou-se efeitos significativos para embebição e combinação dos reguladores. No período de embebição de um dia, o tratamento que apresentou melhor média para formação de calos foi a combinação de BA e 2,4-D em concentrações de 5 μM (T_6), cuja média foi 0,72 (Tabela 1).

Tabela 1 - Formação de calos em explantes de cotilédones e embriões zigóticos de soja, cultivar Doko, inoculados em 12 tratamentos, sob dois períodos de embebição, 1 e 7 dias, 30 dias após inoculação dos explantes. Fortaleza, CE, Brasil, 2004.

Tratamentos	Período de embebição	
	1 dia	7 dias
T_1 (MS + BA 1 μM)	0,00 A d	0,00 A a
T_2 (MS + BA 3 μM)	0,00 A d	0,00 A a
T_3 (MS + BA 5 μM)	0,00 A d	0,00 A a
T_4 (MS + BA+2,4-D 1 μM)	0,41 A bc	0,00 B a
T_5 (MS + BA+2,4-D 3 μM)	0,32 A c	0,00 B a
T_6 (MS + BA+2,4-D 5 μM)	0,72 A a	0,00 B a
T_7 (MS + BA+ANA 1 μM)	0,05 A d	0,00 B a
T_8 (MS + BA+ANA 3 μM)	0,45 A b	0,00 B a
T_9 (MS + BA+ANA 5 μM)	0,45 A b	0,00 B a
T_{10} (MS + BA+2iP 1 μM)	0,00 A d	-
T_{11} (MS + BA+2iP 3 μM)	0,00 A d	-
T_{12} (MS + BA+ 2iP 5 μM)	0,00 A d	-

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey. D.M.S. 5% = 0,039 (linhas) e D.M.S. 5% = 0,066 (colunas).

No período de embebição de sete dias não houve formação de calos em nenhum tratamento. A embebição prolongada pode influenciar na perda de constituintes celulares importantes através da lixiviação e assim, causar perdas no vigor da semente.

Segundo Chaturvedi & Bhatnagar (2001), os melhores resultados para formação de calos, a partir de

cotilédones de melancia, foram obtidos quando se combinou uma citocinina e uma auxina, nas concentrações de 3 e 5 μM . Na Figura 1 pode ser observada a formação de calos, a partir de explantes de embrião zigótico e de cotilédones da cultivar “Doko”, em meio MS suplementado com BA e 2,4-D em concentrações de 1, 3 e 5 μM .

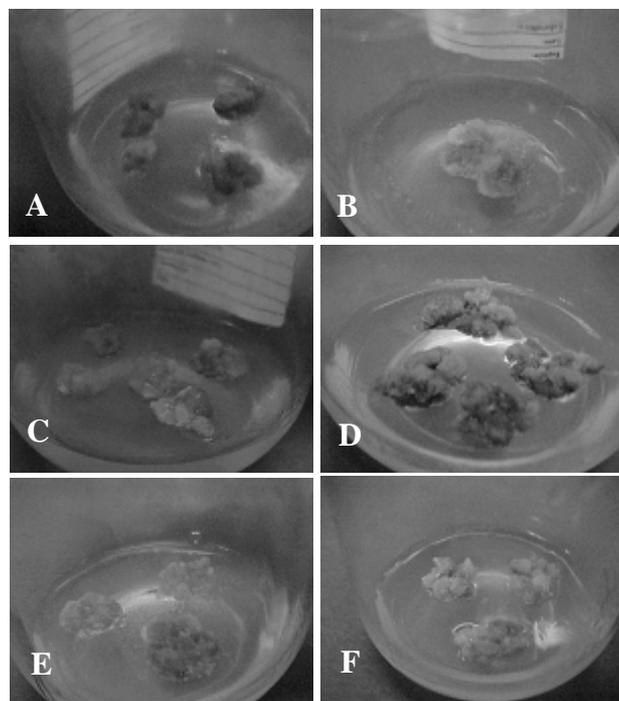


Figura 1 - (A–C) Calos formados a partir de embriões de soja inoculados em meio contendo BA combinado com 2,4-D. (A) – 1 μM ; (B) – 3 μM ; (C) – 5 μM . (D – F) – Calos formados a partir de cotilédones de soja inoculados em meio suplementado com BA combinado com 2,4-D. (D) – 1 μM ; (E) – 3 μM ; (F) – 5 μM .

As auxinas apresentam respostas diferentes *in vitro*. O 2,4-D é conhecido por sua estabilidade e ação na indução de calos e em sistemas de embriogênese somática, enquanto o ácido indolbutírico (AIB) é freqüentemente melhor para indução de raízes. Existem também as diferenças entre as citocininas, sendo o BA responsável pela indução da formação de um grande número de brotos e alta taxa de multiplicação em sistemas de micropropagação, enquanto a cinetina (CIN) e o 2iP permitem apenas o crescimento normal sem brotações múltiplas (Torres et al., 1998).

O uso de citocininas em combinação com auxinas, na indução de calos e formação de brotos, foi aplicado com sucesso no protocolo desenvolvido por Geetha et al. (1997), para regeneração de plantas de *Vigna mungo*, a partir de explantes de hipocótilo, epicótilo, gema axilar, nós cotiledonares e folhas imaturas.

Tabela 2 - Formação de calos em explantes de hipocótilo de quatro cultivares de caupi submetidos a dois tratamentos. Fortaleza, CE, Brasil, 2004.

Tratamentos	Cultivar			
	João Paulo II	Setentão	Epace 10	Pitiúba
T ₁ (MS+2,4-D 9,0 mM)	100,00 A a	66,66 AB a	83,66 AB a	50,00 B a
T ₂ (MS+TDZ 20 mM)	100,00 A a	83,33 AB a	55,66 B b	20,00 C b

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. D.M.S. 5% = 35,42 (linhas) e D.M.S. 5% = 26,24 (colunas).

Potencial morfo genético *in vitro* de diferentes explantes de caupi.

Observou-se a presença de efeitos significativos para cultivar e tratamento. No tratamento com 9 μ M de 2,4-D, a cultivar “João Paulo II” não diferiu significativamente das cultivares “Setentão” e “Epace 10”, diferindo apenas de “Pitiúba”. “Setentão” e “Epace 10” não diferiram significativamente da cultivar “Pitiúba” (Tabela 2).

No tratamento com 20 μ M de TDZ, “João Paulo II” e “Setentão” não diferiram entre si para médias de formação de calos, porém, o João Paulo II diferiu de “Epace 10” e “Pitiúba”. “Setentão” e “Epace 10” não diferiram entre si para formação de calos. “Pitiúba” diferenciou-se da culti-

var João Paulo II nesse tratamento (Tabela 2). Para as cultivares “João Paulo II” e “Setentão”, o efeito dos tratamentos com 2,4-D e TDZ não diferiu significativamente, porém, para as cultivares “Pitiúba” e “Epace 10”, o tratamento com 2,4-D diferiu significativamente do tratamento com TDZ (Tabela 2).

Esses resultados sugerem uma relação entre esses genótipos e o tipo de resposta morfo genética, entretanto, a possibilidade de se testar sementes mais saudáveis permitiria a obtenção de melhores resultados, uma vez que foram constatadas contaminações endógenas na germinação de todas as cultivares, principalmente na cultivar “Pitiúba” (dados não apresentados).

A Figura 2 ilustra calos formados a partir de explantes de hipocótilo, das quatro cultivares estudadas, inoculados nos meios com 2,4-D e TDZ. Os calos cultivados em meio com 2,4-D apresentaram uma coloração verde clara e textura compacta, aspecto característico de calos embriogênicos. Os calos cultivados em meio com TDZ apresentaram calos com coloração verde escura e textura

friável, característica essa que identifica calos não-embriogênicos (Oropeza et al, 2001).

Após um período de, aproximadamente, dois meses, os calos cultivados em meio contendo 20 μ M de TDZ se apresentavam oxidados. Carvalho et al. (2000) demonstraram que a exposição à concentração de 10 μ M de TDZ foi suficiente para obter uma indução ótima de brotos em *P. vulgaris*, a partir de explantes de epicótilo, entretanto, foi observado que uma exposição prolongada a esta concentração de TDZ teve um efeito inibitório no desenvolvimento de brotos e raízes.

Potencial morfo genético de soja, cultivar “Doko”; caupi, cultivares “Setentão”, “João Paulo II”, “Epace 10” e “Pitiúba”, a partir de cotilédones e embriões zigóticos.

Observou-se efeitos significativos para cultivar e tratamento. Esses resultados permitem relacionar a importância de fatores como os reguladores

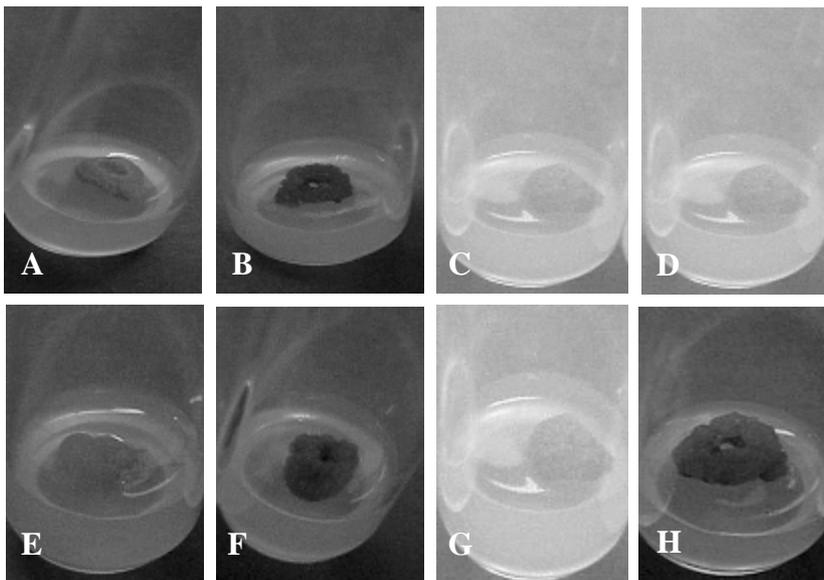


Figura 2 - Calos obtidos a partir de explantes de hipocótilo, de quatro cultivares de caupi, inoculados em meio MS contendo 2,4-D a 9,0 μ M ou TDZ 20 μ M, um mês após a inoculação em meio de crescimento. (A) – Cultivar “Epace 10” em meio MS suplementado com 2,4-D a 9,0 μ M; (B) – Cultivar “Epace 10” em meio MS suplementado com TDZ 20 μ M; (C) – Cultivar “Setentão” em meio MS suplementado com 2,4-D 9,0 μ M; (D) – Cultivar “Setentão” em meio MS suplementado com TDZ 20 μ M; (E) – Cultivar “Pitiúba” em meio MS suplementado com 2,4-D 9,0 μ M; (F) – Cultivar “Pitiúba” em meio MS suplementado com TDZ 20 μ M; (G) – Cultivar “João Paulo II” em MS + 2,4-D 9,0 μ M; (H) – João Paulo II em meio MS suplementado com TDZ 20 μ M.

de crescimento e as características genéticas de cada genótipo nas respostas morfogênicas.

Conforme apresentado na Tabela 3, a cultivar “Doko” obteve resultados mais significativos que as cultivares de caupi apenas para o tratamento 1. No tratamento 2, as cultivares “Doko” e as cultivares de caupi, “João Paulo II”, “Pitiúba” e “Epace 10” não diferiram significativamente entre si para formação de brotos. Dentro da cultivar “Doko”, os tratamentos 1 e 2 diferiram significativamente entre si.

Segundo Charrière et al. (1999), a indução de embriões somáticos e brotos a partir de células de embriões zigóticos imaturos de *Helianthus annuus*, é dependente da concentração de açúcar no meio de indução. Com a mesma concentração de BA, brotos são induzidos em concentrações de sacarose de 3%, enquanto embriões somáticos se desenvolvem em concentrações de sacarose de 12%.

Vários são os protocolos desenvolvidos para estabelecer um sistema alternativo de regeneração de plan-

tas para cultivares de soja. Em parte, a limitação desses protocolos de transformação de soja é devida à incapacidade de uma grande produção de embriões, os quais são adquiridos pela aplicação de altas concentrações de 2,4-D durante a indução e proliferação dos embriões somáticos (Droste et al., 2001).

Para um conhecimento mais aperfeiçoado sobre a capacidade de regeneração *in vitro* é imprescindível a utilização de sementes vigorosas e livres de contaminações endógenas para, desta forma, permitir a manipulação de um maior número de explantes e, conseqüentemente, contribuir para o desenvolvimento de protocolos eficientes de regeneração de plantas. Além disso, como cada genótipo apresenta um potencial de regeneração específico, o estudo da cultura de tecidos, *in vitro*, deve ser aprimorado utilizando um amplo espectro de fatores externos como o meio de cultura, a concentração de reguladores, luz e temperatura, favorecendo o desenvolvimento de potenciais morfogênicos de cada cultivar.

Tabela 3 - Formação de brotos a partir de explantes de embrião, em cultivares de caupi (“Setentão”, “João Paulo II”, “Epace 10” e “Pitiúba”) e uma cultivar de soja (“Doko”), submetidos a quatro tratamentos. Fortaleza, CE, Brasil, 2004.

Tratamento	Cultivares				
	Doko	João Paulo II	Pitiúba	Epace 10	Setentão
T ₁ (MS + sacarose 3% + BA 6,6 µM)	0,69 A a	0,30 B a	0,21 BC a	0,00 C a	0,00 C a
T ₂ (MS + sacarose 12% + BA 6,6 µM)	0,38 A b	0,18 AB ab	0,14 AB a	0,14 AB a	0,00 B a
T ₃ (MS + sacarose 3% + 2,4-D 181 µM)	0,00 A c	0,00 A b	0,00 A a	0,00 A a	0,00 A a
T ₄ (MS + sacarose 12% + 2,4-D 181 µM)	0,00 A c	0,00 A b	0,00 A a	0,00 A a	0,00 A a

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. D.M.S. 5% = 35,42 (linhas) e D.M.S. 5% = 26,24 (colunas).

Conclusões

1. O meio de cultura MS suplementado com BA e 2,4-D, ambos na concentração de 5 µM, utilizando o período de embebição de 1 dia, é favorável para a indução de calos em soja, cultivar “Doko”, a partir de explantes de cotilédones e embriões zigóticos.
2. Os explantes de hipocótilo das cultivares “João Paulo II” e “Setentão” apresentam maiores médias para formação de calos que as cultivares “Epace 10” e “Pitiúba”, quando é utilizado o meio com 20 µM de TDZ.
3. O meio MS suplementado com 9 mM de 2,4-D induz maior formação de calos em explantes de hipocótilos nas cultivares “Epace 10” e “Pitiúba”, em relação ao meio com 20 µM de TDZ.
4. Os explantes de embriões zigóticos da cultivar “Doko” apresentam a melhor média para formação de brotos

quando cultivados em meio MS suplementado com 6,6 µM de BA e 3% de sacarose, em relação às cultivares de caupi.

5. Os meios suplementados com alta concentração de 2,4-D, em ambas concentrações de sacarose (3 ou 12%) não induzem respostas morfogênicas nas cultivares deste estudo.

Referências Bibliográficas

- ARAGÃO, F. J. L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. **Biotecnologia Ciência & desenvolvimento**. Brasília, n.5, p.46-49, 1998.
- ARAÚJO, L. P.; WATT, E. E. **O Caupi no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA. 1988.722p.
- BAILEY, M. A.; BOERMA, H. R.; PARROT, W. A. Genotypic-specific optimization of plant regeneration from somatic embryos of soybean. **Plant Science**. v.93, p.117-120, 1993.

- BARROS, L. M. Embriogênese somática. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.7, p.36-39, 1999.
- BRAR, M. S.; AL-KHAYARI, J. M.; ANDERSON, E. J. Genotypic response of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) to *in vitro* regeneration from cotyledon explants. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.35, n.1, p.8-12, 1999.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. L. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa- SPI: CNPq, 1998. v.1, p.87-132.
- CARVALHO, M. H. C.; LE, B. V.; ZUILY-FODIL, Y.; THI, A. T. P.; VAN, K. T. V. Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. **Plan Science**. v.159, p.223-232, 2000.
- CHARRIÉRE, F.; SOTTA, B.; MIGINIAC, E.; HAHNE, G. Induction of adventitious shoots or somatic embryos on *in vitro* cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: Variation of endogenous hormone levels. **Plant Physiology Biochemistry**, v.37, n.10, p.751-757, 1999.
- CHATURVEDI, R.; BHATNAGAR, S. P. High frequency shoot regeneration from cotyledons explants of watermelon cv. Sugar Baby. **In vitro Cell Development Biology Plant**. v.37, p.255-258, 2001.
- CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A.; CARLSON, P. S. A morphogenetically competent soybean suspension culture. **Science**. v.222, p.632-634, 1983.
- CHRISTOU, P. Strategies for variety independent genetic transformation import cereals, legumes and wood species utilizing particle bombardment. **Euphytica**. v.85, p.13-27, 1995.
- CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.19, p.16-21, 2001.
- CORSO, T. H. B. **Viabilidade do plantio da soja no Ceará**. Disponível em: <www.diariodonordeste.globo.com> Acesso em: 01 jun. 2004.
- DAN, Y. H.; REICHERT, N. A. Organogenic regeneration of soybean from hypocotyls explants. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. v.34, n.1, p.14-21, 1998.
- DROSTE, A.; LEITE P. C. P.; PASQUALI, G.; MUNDSTOCK, E. C.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Regeneration of soybean via embryogenic suspension culture. **Scientia Agricola**, v.58, n.4, p.753-758, 2001.
- GEETHA, N.; VENKATACHALAM, P.; RAO, G. R. In vitro plant regeneration from different seedling explants of blackgram [*Vigna mungo* (L.) Hepper] via organogenesis. **Breeding Science**, v.47, n.4, p.311-315, 1997.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NABORS, M. W., HEYSER, J. W., DYKES, T. A.; MOTT, K. J. Long duration, high frequency plant regeneration from cereal tissue culture. *Planta*. v.157, p.385-391, 1983.
- OROPEZA, M.; MARCANO, A. K.; GARCÍA, E. Proteins related with embryogenic potential in callus and cell suspensions of sugarcane (*Saccharum* sp.). **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.37, p.211-216, 2001.
- PELLEGRINESCHI, A. *In vitro* plant regeneration via organogenesis of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Plant Cell Reports**. v.17, n.2. p.89-95, 1997.
- SANTAREM, E. R.; FINER, J. J. Transformation of soybean [*Glycine Max* (L.)Merrill] using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium. **In vitro Cellular & developmental Biology-Plant**. v.35, n.6, p.451-455, 1999.
- A SOJA. Disponível em:< www.cnpso.embrapa.br> Acesso em: 25 fev. 2005.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPH. 1998. v.1., 509p.