

## CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO DE TECIDOS DE FEIJÃO-DE-CORDA, *VIGNA SINENSIS* (L.) SAVI, IN VITRO \*

MARIA CRISTINA DE F. E ALBUQUERQUE \*\*  
RAIMUNDO GLADSTONE MONTE ARAGÃO \*\*\*  
JOSÉ FERREIRA ALVES \*\*\*  
JOSÉ BRAGA PAIVA \*\*\*

O feijão-de-corda, *Vigna sinensis* (L.) Savi, leguminosa herbácea e anual, originária da parte Oeste ou Central da África, constitui uma importante fonte de proteínas e carboidratos na alimentação dos rurícolas. É a principal espécie de feijoeiro cultivado no Estado do Ceará, contribuindo com 95% do total produzido. A sua produtividade situa-se abaixo da média nacional (500 kg/ha). Esta baixa produtividade é causada, essencialmente, pela utilização de cultivares de qualidade inferior, ataque de pragas (manhoso, *Chalcodermus bimaculatus* e pulgão, *Aphis craccivora*) e a ocorrência de doença (mosaico e o fusário).

Pesquisas relacionadas com o melhoramento genético do feijão-de-corda vêm sendo realizadas objetivando a obtenção de sementes de qualidade superior, resistentes às pragas e doenças.

Além dos métodos tradicionais de melhoramento das plantas superiores, os pesquisadores vêm utilizando também técnica de cultura de tecidos, órgãos, células e protoplastos, *in Vitro*, com a finalidade de eliminar a variabilidade genética entre plantas obtidas a partir de sementes; produzir clones livres de patógenos; acelerar a taxa de reprodução e manter bancos de germoplasma.

A regeneração de plantas através deste método foi obtida por WALKEY (1972), CHATURVERDE & MITRA (1974), HERMAN e HAAS (1975), a partir de tecidos de maçã, Citrus e café, respectivamente, NAVARRO *et alii* (1975) obtiveram plantas de Citrus livres de vírus e LITZ & CONOVER (1978) conseguiram propagar plantas de mamão tolerantes ao PRV, ambos através de cultura de meristemas, *in Vitro*.

A formação de plantas, a partir de um simples tecido que normalmente não se diferencia, quando isolado, constitui, então, um importante progresso na propagação vegetal. O desenvolvimento dessa tecnologia torna-se indispensável aos estudos básicos com vegetais e tem aplicação prática na agricultura.

Os objetivos deste trabalho foram testar o meio de cultura modificado de Murashige e Skoog no crescimento e di-

\* Parte da dissertação do primeiro autor, apresentada ao Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, para obtenção do Grau de Mestrado em Fitotecnia. Fortaleza, Ceará, Brasil.

\*\* Aluna do Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, vinculada ao Centro de Ciências Agrárias da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

\*\*\* Professores do Departamento de Fitotecnia de Ciências Agrárias da UFC. Fortaleza, Ceará, Brasil.

ferenciação de tecidos de feijão-de-corda e estudar os efeitos isolados e/ ou combinados de concentrações de 6-furfurilaminopurina (cinetina) e ácido L-naftalenoacético no crescimento e diferenciação dos "explantes".

## MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia de Plantas Cultivadas e na Casa de Vegetação do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, no período de julho a dezembro de 1978.

Para obtenção dos hipocótilos, foram plantadas, em julho de 1978, sementes de feijão-de-corda, cultivar Pitiúba, cujo ciclo cultural é de cerca de 75 dias. Cita-das sementes pertenciam à coleção do Departamento de Fitotecnia do já referido Centro de Ciências Agrárias. As sementes foram postas para germinar em caixas de madeira (40 x 24 x 7 cm) tendo como substrato a vermiculita.

A germinação ocorreu em 3 dias e, a partir do 4.<sup>o</sup>, extraíram-se com o emprego de lâmina esterilizada, secção do hipocótilo, com peso fresco médio de 3,17 mg por tecido. Referidas secções foram

imediatamente postas em placas de Petri contendo água destilada esterilizada. Os "explantes" foram esterilizados em solução de Hipoclorito de Sódio (Clorox 10%) e polietileno Sorbitan a 0,2%, durante 15 minutos e lavados três vezes em água destilada e esterilizada.

Os "explantes" foram transferidos para frascos Erlenmeyer, com capacidade de 125 ml, contendo alíquotas de 50 ml do meio modificado de Murashige e Skoog (Tabela I) e concentrações isolada e/ou combinadas de cinetina (6-furfurilaminopurina) e ácido L-naftalenoacético (ANA) nos níveis 0,0, 3,0, 6,0, 9,0 mg/l e 0,0, 1,5, 3,0, 4,5 mg/l, respectivamente.

### Constituintes Orgânicos

Sacarose	50,0 g/l
Tiamina	0,2 mg/l
Ácido nicotínico	0,5 mg/l
Piridoxina	0,5 mg/l
Mio-inositol	100,0 mg/l
Agar	14,0 mg/l
Caseína Hidrolizada	1,0 g/l
Glicina	2,0 g/l
L-Asparagina	500,0 mg/l

TABELA I

Composição Química do Meio Nutritivo Modificado de Murashige e Skoog, Utilizado na Cultura de Tecidos de Feijão-de-Corda, *Vigna Sinensis* (L.) Savi, *in Vitro*.

Macroelementos	mg/l	Microelementos	mg/l
KNO <sub>2</sub>	1900	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	ZnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	9
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	KI	0,90
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,30
Na <sub>2</sub> · EDTA	37	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,03
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	28	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,03

O pH do meio foi ajustado para 5,6 a 5,8 com adição de ácido (HCl) ou base (NaOH), antes da adição de agar. A desinfecção foi realizada a uma pressão de 1 kg/cm<sup>2</sup> e temperatura de 120°C, durante 30 minutos.

Os frascos com tampa de esponja foram inoculados em câmara asséptica e flambados. Durante 55 dias os frascos foram conservados em câmara de crescimento que apresentava as seguintes condições: temperaturas controladas de 27°C durante o dia e 24°C à noite; 8/16 horas de luz/escuro; intensidade luminosa de 280 f. c. e umidade de 70% durante o dia e 75% à noite.

Após a formação dos calos, os melhores foram subdivididos em secções com peso médio de 327 mg. A seguir, procedeu-se à inoculação destes em frascos Erlenmeyer de 125 ml, contendo o meio e as concentrações dos reguladores do crescimento já referidos anteriormente. Após esta operação, os frascos foram conduzidos para a câmara de crescimento, onde permaneceram cerca de 65 dias. A câmara de crescimento foi mantida com temperatura controlada de 27°C durante o dia e 24°C durante a noite, intensidade luminosa de 200 f.c. e 8/16 horas de luz/escuro. Foram efetuadas observações quinzenais relativas a variações na cor e textura dos tecidos, formação de calo, diferenciação de calo e de raiz, e peso fresco. Os frascos contaminados foram imediatamente substituídos por outros dentro de no máximo uma semana.

O modelo experimental adotado foi um fatorial 4 x 4, num delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições.

Os dados relativos ao peso dos "explantes" vivos foram transformados para a escala logarítmica e analisados estatisticamente, de acordo com WINER (1971).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Número de "explantes" vivos*

Após 65 dias em meio de cultura, 88,75% dos "explantes" totais sobreviveram. Na ausência de ambos os reguladores, 60% dos "explantes" resistiram e, quando foi adicionada cinetina ou ANA, em diferentes concentrações, houve aumento da porcentagem de "explantes" vivos (Tabela II). Este fato evidencia que a adição de reguladores do crescimento afeta a sobrevivência dos "explantes" de feijão-de-corda, *in Vitro*. Os melhores resultados foram obtidos com a adição de cinetina ao meio de Murashige e Skoog do que em presença de ANA. O nível de 3,0 mg/1 de cinetina apresentou o mais alto índice de sobrevivência e, quando se elevou este nível, ocorreu um decréscimo no número de "explantes" vivos. Estes resultados concordam parcialmente com os obtidos por MURASHIGE *et alii* (1972).

O ácido  $\mathcal{L}$ -naftalenoacético, quando adicionado isolado ao meio nutritivo, nos níveis de 3,0 e 4,5 mg/1, aumentou a taxa de sobrevivência dos "explantes". Quando aplicado em combinação com cinetina, também foi observado um aumento do número de "explantes" vivos, exceto na combinação de 1,5 mg/1 de ANA e 9,0 mg/1 de cinetina. Todos os níveis de ANA em combinação com 3,0 mg/1 de cinetina e todos os níveis de cinetina combinados com 4,5 mg/1 de ANA apresentaram 100% de sobrevivência. Estes resultados evidenciam novamente a influência dos reguladores de crescimento, ANA e cinetina, quer isolados ou combinados na sobrevivência dos "explantes" de feijão-de-corda, *in Vitro*. TABACHNIR & KESTER (1977) também evidenciaram essa influência na sobrevivência de tecidos de *Prunus amygdalus* Batsch e *Prunus persica* (L.) Batsch.

A sobrevivência dos "explantes" pode estar relacionada com o retardamento da senescência dos tecidos por ação dos fitoreguladores. A diminuição na senescência por ação de cinetina parece estar associada com a manutenção dos conteúdos de clorofila e proteína

(RICHMOND & LANG, 1957). Auxinas também foram referidas como um dos retardantes da senescência (GALSTON & DAVIES, 1970).

após este nível. Quando os reguladores ANA e cinetina foram adicionados, em combinação/houve aumento significativo no peso fresco médio. Os níveis de 3,0 e

## TABELA II

ESTADO DO CEARÁ  
FORTALEZA  
1979

Número de "Explantes" Vivos de Feijão-de-Corda, *Vigna Sinensis* (L.) Savi, Após 65 Dias Cultivados em um Meio de Cultura Modificado de Murashige e Skoog com Diferentes Níveis de Cinetina e Ácido *L*-Naftalenoacético (160 Tubos, 16 Tratamentos, 10 Tubos por Tratamento e 1 "Explante" por Tubo)

Ácido <i>L</i> -naftalenoacético (mg/1)	CINETINA (mg/1)				TOTAL
	0,0	3,0	6,0	9,0	
0,0	6	10	9	8	33
1,5	6	10	8	6	30
3,0	9	10	10	10	39
4,5	10	10	10	10	40
TOTAL	31	40	37	34	142

### Peso Fresco dos "Explantes"

Houve um considerável aumento no peso fresco médio dos "explantes" quando se adicionou cinetina e/ ou ANA ao meio nutritivo de Murashige e Skoog (Tabela III). Na ausência de ambos os reguladores ocorreu um pequeno aumento do peso fresco médio inicial. Quando se adicionou cinetina, em todos os níveis, foi observado um aumento considerável no peso fresco médio, tendo o nível de 9,0 mg/1 apresentado melhor resultado. A adição de ANA isolada, também promoveu um aumento no peso fresco sobre o peso inicial, sendo este acréscimo menor do que o obtido com adição de apenas cinetina. O nível de 3,0 mg/1 de ANA apresentou o melhor resultado, ocorrendo um decréscimo no peso fresco

6,0 mg/1 de cinetina combinados com todos os níveis de ANA apresentaram aumento considerável de peso fresco, tendo atingido um máximo nos níveis de 3,0 mg/1 de ANA e 6,0 mg/1 de cinetina.

O aumento do peso dos "explantes", ocasionado pela adição de cinetina e ANA ao meio nutritivo, provavelmente, ocorreu porque a cinetina age como fator de indução da divisão celular e ANA atua como um fator de alongação celular. Deste modo, atuando em combinação, eles têm maior capacidade de aumentar a massa dos tecidos do que isoladamente (ARAGÃO, 1976). MATSUBARA (1975) e MEYER *et alii* (1975), também evidenciaram a promoção do crescimento, *in Vitro*, de tecidos de *Vigna sinensis* Endl e *Tris* sp., respecti-

vamente quando adicionaram ANA e cimetina ao meio nutritivo.

### Diferenciação em calo

Logo após 15 dias em meio de cultura, 32,5% do total dos "explantes" ini-

ciaram a diferenciação em calo. Com 65 dias, 63,75% de todos os tecidos estavam diferenciados, dependendo esta diferenciação dos níveis dos reguladores ANA e cimetina, isolados ou em combinação (Tabela IV).

Na ausência de tratamento com am-

TABELA III

ESTADO DO CEARÁ  
FORTALEZA  
1979

Peso Médio (mg) dos "Explantes" Vivos de Feijão-de-Corda, *Vigna Sinensis* (L.) Savi, Após 65 Dias Cultivados em um Meio de Cultura Modificado de Murashige e Skoog com Diferentes Níveis de Cinetina e Ácido *L*-Naftalenoacético (Peso Médio Inicial dos "Explantes" 327 mg) ocasionado pela adição de cimetina e

Ácido <i>L</i> -naftalenoacético (mg/1)	CINETINA (mg/1)				Peso Médio
	0,0	3,0	6,0	9,0	
0,0	420	3535	2241	3536	2433
1,5	995	15090	13442	11423	10237,50
3,0	4334	14006	17711	10398	11612,25
4,5	1141	14742	14299	6100	9070,50
Peso Médio	1722,50	11843,25	11923,25	7864,25	8338,30

TABELA IV

ESTADO DO CEARÁ  
FORTALEZA  
1979

Número de "Explantes" de Feijão-de-Corda, *Vigna sinensis* (L.) Savi, com Diferenciação em Calo Após 65 Dias Cultivados em um Meio de Cultura Modificado de Murashige e Skoog com Diferentes Níveis de Cinetina e Ácido *L*-Naftalenoacético (160 Tubos, 16 Tratamentos, 10 Tubos por Tratamento e 1 "Explante" por Tubo)

Ácido <i>L</i> -naftalenoacético (mg/1)	CINETINA (mg/1)				TOTAL
	0,0	0,3	6,0	9,0	
0,0	1	5	6	8	20
1,5	5	9	7	5	26
3,0	6	9	9	10	34
4,5	2	6	6	8	22
TOTAL	14	29	28	31	102

bos os reguladores, apenas 10% dos "explantes" diferenciaram-se e, quando adicionou-se ANA e/ou cinetina ocorreu um aumento significativo na porcentagem de "explantes" diferenciados. A cinetina quando aplicada isoladamente apresentou um maior número de "explantes" diferenciados do que ANA, tendo o nível de 9,0 mg/1 apresentado a mais elevada taxa de diferenciação em calo. O nível de 3,0 mg/1 de ANA, quando aplicado isolado, foi o que apresentou melhores resultados, ocorrendo, no entanto, inibição com a elevação do nível do regulador. Este resultado concorda parcialmente com o obtido por ARAGÃO (1976) trabalhando com *Simmondsia chinensis*, *in Vitro*.

Quando ANA e cinetina foram adicionados em combinação, ao meio nutritivo, houve aumento significativo na porcentagem de "explantes" diferenciados em calo. O tratamento com 9,0 mg/1 de cinetina e 3,0 mg/1 de ANA apresentou a melhor resposta. Os resultados encontrados (Tabela IV) mostram que ANA e cinetina, quando em combinação, induzem a diferenciação de calo em tecidos de *Vigna sinensis in Vitro*, melhor do que isolados. Esta diferenciação em calo pode ser devido à relação citocinina: auxina, como reportado por SKOOG & MILLER (1957).

O tecido de calo, formado na ausência de cinetina e ANA, apresentou-se bastante pequeno, mole e necrosado. Em concentrações baixas de cinetina e ausência de ANA ocorreu um início de necrose. Na presença de cinetina e ANA, os tecidos de calo apresentaram-se friáveis, macios e com áreas clorofiladas. A concentração de 4,5 mg/1 de ANA, combinada com 3,0 e 6,0 mg/1 de cinetina apresentou calos com tendências a endurecer e formar nódulos, concordando parcialmente com CHEN & GALSTON (1967), trabalhando com tecidos de *Perlagonium* em meio contendo auxinas e citocininas.

Após 65 dias em meio de cultura, apenas 11, 87% do total dos "explantes" diferenciaram-se em calo e raiz. Esta diferenciação foi observada depois de 50 dias, não sendo notada alguma diferenciação no início da cultura. Na ausência de ambos os reguladores houve 20% de diferenciação do calo e raiz (Tabela V). Quando foi adicionado somente cinetina na concentração de 3,0 mg/1 aumentou o número de "explantes" diferenciado em calo e raiz. Quando o nível de cinetina foi elevado, a porcentagem de "explantes" diferenciados em calo e raiz foi reduzida, ocorrendo uma inibição total quando se acrescentou 9,0 mg/1 de cinetina ao meio. Esta formação de raízes na ausência de auxinas exógenas pode ser devido ao fato de já existirem resquícios de auxina no tecido de calo que deu origem a estes "explantes". Entretanto, MATSUBARA (1975) e MITCHELL & GILDOW (1975) também obtiveram formação de raízes em presença de cinetina trabalhando com *Vigna sinensis* e *Vicia faba*, respectivamente.

Quando foi adicionado ANA na ausência de cinetina, ocorreu total inibição nos "explantes" para se diferenciarem em raízes. Estes resultados contrariam os obtidos por HARAMAKI & MURASHIGE (1972) e ARAGÃO (1976), trabalhando, respectivamente, com tecidos de gloxínia e jojoba, *in Vitro*. Esta inibição pode ser devido à ação da luz (GALSTON (1948); VASIL e HILDEBRANDT (1965) ou ao esgotamento das substâncias envolvidas na formação de raízes causado pela presença da luz (GALSTON, 1948), ou pela grande produção de calo (GRINBLAT, 1972).

A adição de cinetina e ANA nas concentrações de 3,0 ou 6,0 mg/1 4,5 mg/1, respectivamente, determinou a diferenciação de calo e raiz. O número de raízes por "explantes" foi de 1 a 5, contendo pêlos radiculares e apresentando geotropismo negativo. VASIL &

HILDEBRANDT (1976) também encontraram "explante" com formação de raízes dotadas de geotropismo negativo, em experimentos com *Petroselinum hortense* e *Simmondsia chinensis*, respectivamente.

## CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que a produção de calo e de raiz pode ser induzido quimicamente, em segmentos de hipocótilo, de feijão-de-corda. Na ausência de fitoreguladores não houve tendência de diferenciação desses tecidos. O tipo de diferenciação dependeu das concentrações dos fitoreguladores utilizados, tendo 9,0 mg/1 de ANA apresentado a melhor resposta na diferenciação de calo, e a concentração de 3,0 mg/1 de cinetina, isolada ou combinada com 4,5 mg/1 de ANA a mais efetiva na diferenciação de calo e raiz.

## SUMMARY

The shoot tips of bean plants were excised and cultured aseptically for 55 and 65 days on modified Murashige and Shoog medium with different concentrations of kinetin and naphthaleneacetic acid. The best combination to get just callus was 9 mg/1 of kinetin and 3 mg/1 of NAA. The concentration of 3 mg/1 of kinetin and 4 mg/1 of NAA gave the best results to differentiate the roots and callus.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, R.G.M. *Growth and morphogenesis of jojoba simmondsia chinensis* (Link.) Schneider Shoot Tips in Vitro. Arizona, U.S.A., University of Arizona, 1976. 117 p. (Tese PhD)
- CHATURVEDE, H. C. & MITRA, G.C. Clonal propagation citrus from somatic callus cultures. *Hortscience*, 9 (2): 118-120, 1974.

## TABELA V

ESTADO DO CEARÁ  
FORTALEZA  
1979

Número de "Explantes" de Feijão-de-Corda, *Vigna Sinensis* (L.) Savi, Diferenciados em Calo e Raízes Após 65 Dias Cultivados em Meio de Cultura Modificado de Murashige e Skoog com Diferentes Níveis de Cinetina e Ácido *L*-Naftalenoacético (160 Tubos, 16 Tratamentos, 10 Tubos por Tratamento e 1 "Explante" por Tubo)

Ácido <i>L</i> -naftalenoacético (mg/1)	CINETINA (mg/1)				TOTAL
	0,0	3,0	6,0	9,0	
0,0	2	5	1	0	8
1,5	0	1	1	1	3
3,0	0	0	1	0	1
4,5	0	4	3	0	7
TOTAL	2	10	6	1	19

- CHEN, H.R. & GALSTON, A. W. Growth and development of pelargonium pith cellus *In Vitro* II. Initiation of organized development. *Physiol. Plant.* 20: 533-539, 1967.
- GALSTON, A. W. On the Physiol Root initiation in excised asparagus stem tips. *Amer J. Bot.*, 35: 281-286, 1948.
- GALSTON, A. W. & DAVIES, P. J. *Control Mechanism in Plant Growth Hormones*. Prentic Hall, Inc., New Jersey, 1970, 184 p.
- GRINBLAT, Uri. Differentiation of Citrus Stem *in Vitro*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 97 (5): 599-603, 1972.
- HARAMAKI, C. & MURASHIGE T. *In Vitro* Culture of gloxinia. *Hortscience*, 7 (3): 35, 1972.
- HERMAN, E, B, & HASS, G. J. Clonal propagation of *Coffea arabic L.* from Callus Culture. *Hortscience*, 10 (6): 588-589, 1975.
- LIFZ, R. E. & CONOVER, R.A. *In Vitro* Propagation of papaya. *Hortscience*, 13 (3): 241-242, 1978.
- MATSUBARA, S. Nutricional and hormonal requirements for the growth of *Vigna sisenensis* Callus *in Vitro*. *Physiol. Plant*, 34: 83-99, 1975.
- MEYER, M. M., F.E. The Initiation and Maintenance, of *Vicia faba* Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, Regeneration from Hypocotyl and Amther Derived Callus of Berse Clover, *Cro. Science*. 18: 567-572. 1978.
- MURASHIGE T. & SKOOG F.A. A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-487, 1962.
- MURASHIGE, T.; SHABDE, M.N.; HASEGWA, P.M.; TAKATORI, F.H. & JONES, J. B. Propagation of Asparagus Shoog Apex Culture I. Nutrient, Medium for Formation of Plantlets. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 97 (2): 158-161, 1972.
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C. N. & MURASHIGE, I. Improvement of Shoot Tip Grafting *in Vitro* for Virus-Fres Citrus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 100 (5): 471-479, 1975.
- SKOOG, F. & MILLER, C.O. Chemical Regulation of Growth Oragan Formation in Plant Tissue Cultured *in Vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 11: 118-131, 1975.
- TABACHNIK, L. & KESTER, D. E. Shoot Culture for Almond and Almond Peach Hybrid Clones *in Vitro*. *Hort Science*, 12 (6): 545-547, 1977.
- VASIL, I.K. & HILDEBRANDT, A, C. Variations of Morphogenetic Behavior in Plant Tissue Cultures II. Petroselinum hortense. *Amer. J. Bot.*, 53 (9): 869-874, 1966.
- WALKEY, D.G. Production of Apple From Axillary - Bud Meristems. *Can. J. Plant. Sci.*, 52: 1085-1087, 1972.
- WINER, B.J. *Statistical Principles in Experimental Design*. 2 ed. New York, McGraw-Hill Book, 1971. 907 p.