



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

IGOR MACEDO DE OLIVEIRA

**Obtenção de calos embriogênicos de uma cultivar de feijão-caupi
adaptada ao semiárido brasileiro**

MOSSORÓ

2020

IGOR MACEDO DE OLIVEIRA

**Obtenção de calos embriogênicos de uma cultivar de feijão-caupi
adaptada ao semiárido brasileiro**

Monografia apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel de
Sousa Jereissati.

MOSSORÓ

2020

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas
da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

0048o Oliveira, Igor Macedo de.
Obtenção de calos embriogênicos de uma cultivar
de feijão-caupi adaptada ao semiárido brasileiro
/ Igor Macedo de Oliveira. - 2020.
46 f. : il.

Orientador: Emmanuel de Sousa Jereissati.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
2020.

1. Cultura de Tecidos Vegetal. 2. Embriogênese
somática. 3. Feijão-caupi. I. Jereissati,
Emmanuel de Sousa, orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

IGOR MACEDO DE OLIVEIRA

Obtenção de calos embriogênicos de uma cultivar de feijão-caupi adaptada ao semiárido brasileiro

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Defendida em: 07 / 02 / 2020

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Emmanuel de Sousa Jereissati (UFERSA)
Presidente


Dr^a Camila Barbosa Pinheiro Jereissati (DOCENTE EXTERNO)
Membro Examinador


Prof. Dr^a Ioná Santos Araújo Holanda (UFERSA)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, a causa primeira, as forças e condições que permitem a existência.

À toda minha família, por terem me auxiliado nas melhores decisões dessa caminhada, em especial aos meus pais, Francisco Genésio de Oliveira e Maria José Macedo de Oliveira, cujo os cuidados e estímulos me fazem continuar a caminhar. O meu mais profundo agradecimento, muito obrigado.

Agradeço a Universidade Federal Rural do Semiárido, pela oportunidade de ingressar no curso de Biotecnologia, por prover um ambiente agradável, de desenvolvimento humano e científico, pautados na ética, moral e profissionalismo que regem a construção de uma forte instituição. O meu muito obrigado.

Agradeço a todos os docentes pelos seus excelentes serviços no cumprimento da majestosa missão de ensinar, muito obrigado pelas diversas contribuições em minha formação profissional e humana.

Agradeço ao meu orientador Doutor Emmanuel de Sousa Jereissati, por toda orientação e paciência, o meu muito obrigado.

Agradeço a disponibilidade em participar da banca examinadora, Dr. Emmanuel de Sousa Jereissati, Dr^a Camila Barbosa Pinheiro e a Dr^a Ioná Santos Araújo Holanda, por todas as avaliações, correções e orientações sugeridas, muito obrigado.

A minha turma e demais amigos e amigas pela companhia durante esta graduação, meu profundo obrigado à cada um de vocês.

Agradeço aos técnicos, docentes, terceirizados e a todos os demais que puderam contribuir direta e indiretamente para conclusão do presente trabalho, muito obrigado a cada um de vocês.

RESUMO

O feijão caupi é (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) um grão de notável importância na área econômica, social e cultural. Como pode ser visto na literatura, encontrar um protocolo de regeneração efetivo e generalista para feijão-caupi que retorne uma alta taxa regeneração por embriogênese somática têm sido difíceis. O presente trabalho segue desde a plantação para a aquisição de sementes, a assepsia e germinação para a aquisição do explante, até uma série de etapas como, indução de calos, repique, estabelecimento de culturas em suspensão, maturação de embriões, onde diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-D (ácido diclorofenociacético) em meio basal fortificado (FBM) foram utilizados para examinar a variedade BRS Juruá da espécie *Vigna unguiculata*, quanto à competência na indução de calos embriogênicos e a aquisição de embriões somáticos em meio semissólido e suspensão celular. A BRS Juruá foi competente em responder por meio de embriogênese somática indireta, gerando calos embriogênicos em meio semissólido e estruturas similares a embriões globulares, cordiformes e torpedo em suspensão, e por organogênese na produção de raízes diretamente do explante foliar e dos calos. Dentre as concentrações testadas e características observadas na etapa de indução, o tratamento FBM1 (1 mg/L 2,4-D) apresentou a melhor qualidade em calos friáveis, seguido do controle FBM0 (0 mg/L 2,4-D), do FBM2 (2 mg/L 2,4-D) e por último o FBM0,5 (0,5 mg/L 2,4-D), que também diferiu significativamente e apresentou as menores taxas de indução de calos embriogênicos. Em suspensão, as concentrações entre as faixas, 0.125, 0.25 e 0.37 mg/L 2,4-D foram suficientes para induzir a proliferação de estruturas embriogênicas e de raiz, com o tratamento FBM0 estando limitado apenas a proliferação de raízes. Dentre as concentrações em suspensão, não houveram diferenças significativas em relação a quantidade de estruturas embriogênicas geradas. Outras concentrações de 2,4-D podem ser exploradas e comparadas tanto para indução de calos como nas demais etapas da suspensão celular. O presente trabalho contribui para o estabelecimento de protocolos de regeneração. Com base nos resultados, a BRS Juruá é uma leguminosa competente a indução de calos embriogênicos, e com possíveis modificações na metodologia, a mesma poderá alcançar um aumento da qualidade e quantidade de calos friáveis e embriões somáticos aptos a regeneração por ES.

Palavras chave: Cultura de tecidos vegetal. Embriogênese somática. *Vigna unguiculata*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
2.1 FEIJÃO-CAUPI	11
2.2 CULTURA DE TECIDOS	13
2.3 PROPAGAÇÃO IN VITRO	14
2.3.1 <i>Embriogênese somática e organogênese</i>	15
3. HIPÓTESE	18
4. JUSTIFICATIVA	19
5. OBJETIVOS	21
5.1 OBJETIVO GERAL	21
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
6. MATERIAIS E MÉTODOS	22
6.1 MATERIAIS	22
6.1.1 <i>Local do experimento</i>	22
6.1.2 <i>Material vegetal</i>	22
6.2 MÉTODOS	22
6.2.3 <i>Preparo dos meios de cultura</i>	22
6.2.4 <i>Assepsia do material vegetal e germinação</i>	22
6.2.5 <i>Indução de calos embriogênicos e repique</i>	23
6.2.6 <i>Estabelecimento e avaliação das suspensões celulares</i>	23
6.2.7 <i>Maturação e desenvolvimento dos embriões</i>	24
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
8.1 <i>INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS E REPIQUE</i>	27
8.2 <i>AVALIAÇÃO DAS SUSPENSÕES CELULARES</i>	36
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
10. REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

Entre dez e doze mil anos atrás, durante a designada era pré-histórica, mais especificamente o entre período da pedra polida, alguns indivíduos de povos caçadores-perceberam que grãos coletados para alimentação poderiam ser enterrados, isto é, semeados, dessa maneira, em algumas regiões consideravelmente pouco numerosas e relativamente pouco extensas do planeta, as primeiras formas e sistemas de cultivo surgiram ([MAZOYER e ROUSART, 2010](#)).

O termo “feijão” normalmente é utilizado para designar uma variedade de sementes de alguns dos gêneros da família *Fabaceae*, os feijoeiros. O grão do feijoeiro é uma leguminosa amilácea, que vem sendo utilizada desde práticas as agrícolas mais antigas, e possui destacável importância cultural, medicinal e nutricional ([PHILLIPS; MCWATTERS, 1991](#)).

No Brasil a destacável importância do feijão é em parte refletida pelo cultivo de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), com parte da produção sendo realizada ainda de modo tradicional. No Brasil a produção do grão está presente nas regiões Nordeste e Norte, estendendo se em direção a região Sudeste e Centro-Oeste, demonstrando uma contínua expansão em diferentes lugares do país ([FREIRE FILHO, 2011](#)).

É evidente a importância econômica que o cultivo de caupi possui em diversas regiões do Brasil, principalmente na região Nordeste, que possui o feijão como um ingrediente básico da alimentação ([JÚNIOR et al., 2002](#)) de notável importância cultural e nutricional.

As estimativas em 2015 demonstraram que o feijão-caupi foi responsável pela geração de 961.993 empregos, com o valor de produção estimado em R\$ 643.553.333,00, tendo sido produzido como suprimento para 26.505.491 pessoas. As estimativas de produção foram, no Mato Grosso (127.000 toneladas), Ceará (107.291 toneladas), Piauí (55.278 toneladas), Pernambuco (52.406 toneladas), Maranhão (50.314 toneladas) e Bahia (20.890 toneladas) ([ROCHA et al., 2017](#)).

No entanto, o rendimento médio do feijão-caupi pode variar bastante, isso se deve a inúmeros fatores, como estresses bióticos e abióticos, susceptibilidade a pragas e doenças provenientes dessa relação, podendo ocasionar perdas substanciais na produção, mesmo após os grãos maduros já terem sido colhidos ([SAHOO et al., 2001](#)).

Os programas de melhoramento do feijão-caupi podem ter a parcela de contribuição da cultura de tecidos vegetal. A cultura de tecidos pode ser definida como um conjunto de técnicas

que proporciona o cultivo asséptico de qualquer parte viva da planta, como frações de tecidos, órgãos ou mesmo células em suspensão em meio de cultura sintético (nutrientes, reguladores de crescimento, etc), sob as vantagens de estarem em condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade (LAMEIRA *et al.*, 2000).

A cultura *in vitro* pode render diversas áreas de exploração com aplicações associadas. Na micropropagação ou propagação clonal, se é capaz de direcionar pesquisas em buscas de melhoramentos para resistência a patógenos, na conservação de germoplasma, produção de sementes sintéticas, cultura de anteras ou micrósporos, cultura de embriões zigóticos, cultura de protoplastos e entre outras (CALDAS, L. S.; BUSO, J. A., *et al.*, 1998). Dentre as técnicas de micropropagação, têm-se a embriogênese somática (ES) como uma via com alta significância para a multiplicação, transformação genética, variação somaclonal e hibridização somática (CARVALHO; VIDAL, 2003);

Com o sucesso em estabelecimento de protocolos de regeneração, a cultura de tecidos pode ser utilizada com uma ferramenta associada a produção de embriões somáticos, assim como contribuir para a gerar organismos geneticamente modificados, como plantas resistente a patógenos (na literatura se relata cerca de 31 insetos que podem agir como pragas do caupi, além das doenças causadas por fungos e bactérias) (LATUNDE, 1990; KORMAWA *et al.*, 2000) e livres de vírus.

Com base na literatura, diversas abordagens experimentais já foram aplicadas para regeneração do *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Na ES, há trabalhos com a utilização das folhas primárias como explante e cultura em suspensão (RAMAKRISHNAN *et al.*, 2005a; ANAND *et al.*, 2000) com diferentes taxas de sucesso. Sabe-se que, os processos envolvidos nas etapas de regeneração por ES são multifatoriais, tanto em relação às condições e estímulos adequados, quanto em relação à resposta do genótipo ao próprio protocolo testado, tornando evidente a complexidade dos acontecimentos que regem a embriogênese (CALDAS, L. S.; BUSO, J. A., *et al.*, 1998).

Diversas etapas e fases como desdiferenciação, calogênese, transição de fases da embriogênese e a regeneração podem vir a ser realizadas com maior competência por algumas variedades do que por outras (CALDAS, L. S.; BUSO, J. A., *et al.*, 1998). A partir do sucesso das metodologias via organogênese ou ES já descritas na literatura, o estabelecimento inicial de parâmetros investigativos, com base na adaptação de metodologias já descritas, torna-se o ponto de partida para exploração de cultivares frente à competência embriogênica.

Desta maneira, o presente trabalho propõe-se a contribuir para estabelecer um protocolo para indução de calos embriogênicos para a variedade BRS Juruá *Vigna unguiculata*,

indentificando a relação entre as concentrações de fitorhônios e os resultados, e a observação da qualidade dos calos quanto a friabilidade e geração de embriões somáticos em suspensão.

Pelo fato da regeneração por embriogênese somática ser genótipo-dependente e ser comprometida pela recalcitrância, outras cultivares devem ser sucessivamente testadas quanto à competência à embriogênese *in vitro*. Os esforços em estabelecer bons protocolos de indução e suspensão celular, refletem diretamente os passos iniciais que se possa dar em direção ao progresso do estabelecimento de protocolos de transformações genéticas padronizados, na exploração de novas áreas de investigação, de desenvolvimento e de emprego do feijão-caupi.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FEIJÃO-CAUPI

Para o feijão-caupi, a Índia, Etiópia, Paquistão, Irã e América do Sul foram sugeridos como centro de origem do *Vigna unguiculata* (L.) Walp, no entanto, com base na assertividade da literatura disponível, é na África que se encontra a origem primária do grão (STEELE & MEHRA, 1980). Um dado que tem contribuído para esta evidência é o local de origem de tipos selvagens, pois como apontam autores Steele & Mehra (1980), normalmente não são encontradas fora da África grãos selvagens da espécie *Vigna unguiculata*.

Seria no Oeste da África, mais precisamente na Nigéria, o centro primário de diversidade do *Vigna unguiculata* (NG & MARECHAL, 1985). Portanto, originário do continente Africano, foi introduzido no Brasil na segunda metade do século XVI pelos colonizadores portugueses no Estado da Bahia (FREIRE FILHO, 1988).

Atualmente a produção mundial de feijão-comum e feijão-caupi em 2017, segundo registro da FAOSTAT (2019), foi de aproximadamente 7,4 milhões de toneladas de grãos secos, produzidas em 12,3 milhões de hectares. Com os três maiores produtores sendo, a Nigéria (2,5 milhões de toneladas), Níger (906 mil de toneladas) e Burkina Faso (398 mil toneladas). Nos dados disponibilizados pela FAOSTAT não se apresenta uma distinção clara entre feijão-caupi e feijão comum, e os números em relação ao Brasil e Índia não estão contabilizados.

O feijão-caupi têm parte da sua produção sendo realizando ainda de modo tradicional. No Brasil, considerando as estimativas obtidas em 2015, é evidente a importância econômica que o cultivo de caupi possui em diversas regiões do Brasil, a cultura do feijão-caupi foi responsável pela geração de 961.993 empregos, com o valor de produção estimado em R\$ 643.553.333,00, tendo sido produzido como suprimento para 26.505.491 pessoas. As estimativas de produção foram, no Mato Grosso (127.000 toneladas), Ceará (107.291 toneladas), Piauí (55.278 toneladas), Pernambuco (52.406 toneladas), Maranhão (50.314 toneladas) e Bahia (20.890 toneladas) (ROCHA *et al.*, 2017).

O feijão-caupi é uma leguminosa de excelente fonte de proteínas e apresenta aminoácidos essenciais, carboidratos, vitaminas e minerais, além de possuir grande quantidade de fibras dietéticas, baixa quantidade de gordura e não conter colesterol. Essa leguminosa representa uma parte básica da alimentação das populações do Nordeste brasileiro (JÚNIOR *et al.*, 2002).

O rendimento médio do feijão-caupi pode variar bastante, isso se deve a inúmeros fatores, como estresses bióticos e abióticos, susceptibilidade a pragas e doenças provenientes dessa relação, ocasionando perdas substanciais na produção mesmo após a colheita ([SAHOO et al., 2001](#)). Em decorrência da demanda de cultivares adaptadas as condições ambientais nos biomas brasileiros e, com o passar dos anos, com o desenvolvimento e o emprego de novas tecnologias para colheita, a dinâmica de mercado e demanda por desenvolvimento fez com que programas de melhoramentos surgissem e pudessem ser realizados, levando ao mercado cultivares que foram adaptadas e melhoradas, e ao longo dos anos foram sendo lançadas comercialmente ([FREIRE FILHO, 2011](#)).

Precisamente na região do Rio Grande do Norte, em 1985 foi lançado o BR6-Serrano (subclasse mulato) ([EMBRAPA, 1986](#)); assim como em 1989 o BR13-Caicó (subclasse mulato) ([SOUZA e FERNANDES, 1989](#)); em 1990 o BR15-Asa-branca (subclasse mulato) ([SOUZA e FERNANDES, 1990](#)); em 1990 o BR16-Chapéu-de-couro (subclasse mulato), em 1998 o Riso-do-ano (subclasse branco) ([FERNANDES et al., 1990](#)); em 2005 o BRS Potiguar (subclasse mulato) ([Brasil, 2008](#)); em 2007 o BRS Novaera (subclasse branco) ([FREIRE FILHO et al., 2008](#)); e em 2009 o BRS Tumucumaque e BRS Potengi (ambos subclasse branca) ([FREIRE FILHO et al., 2009a](#)) ([BRASIL, 2010](#)).

O trabalho adaptativo com o feijão-caupi rendeu uma serie de cultivares com notáveis aspectos eco fisiológicos, tornando-os aptos para desenvolver-se bem em diversas e diferentes regiões ([FREIRE FILHO, 2011](#)), onde normalmente outras culturas leguminosas anuais, em razão da irregularidade das chuvas e das altas temperaturas, não possuem um desenvolvimento satisfatório ([JÚNIOR et al., 2002](#)).

Se busca o aperfeiçoamento da produção e a melhora da produtividade. A cultivar selecionada, a BRS Juruá possui um alto teor de proteínas assim como é rica em ferro e zinco, as sementes possuem traços marcantes como cor verde dos grãos, além de cálice com coloração roxa e vagem roxas e curvadas. Em algumas regiões do planeta, os consumidores optam pela escolha de um grão a outro, pela cor, rugosidade e outras características como tamanho e peso do grão([FREIRE FILHO, 2011](#)). Dessa forma, pela BRS Juruá possuir cor verde persistente, torna-se um grão de potencial para o mercado internacional de consumidores ao levar em conta o apelo visual da coloração do grão ([FREIRE FILHO, 2009b](#)).

A produtividade da BRS Juruá já foi testada nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste nos anos agrícolas 2007/2008 e 2008/2009. A BRS Juruá verde tem sido recomendada para cultivo em regime irrigado e sequeiro ([FREIRE FILHO et al., 2009b](#)).

2.2 CULTURA DE TECIDOS

Da Literatura pode ser resgatada uma série de definições similares a respeito da cultura de tecidos, de acordo com George E. F (1993), a cultura de tecidos é refere-se a todos os tipos de culturas de plantas, calos, células, protoplastos, anteras, meristemas, embrião e órgãos. De acordo com LAMEIRA *et al.*, (2000), a cultura de tecidos é um conjunto de ferramentas que explora o cultivo asséptico de qualquer parte viva da planta (explantos), frações de tecidos, órgãos ou mesmo células em suspensão em meio de cultura sintético (nutrientes, reguladores de crescimento, etc.) sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade, para gerar uma nova planta.

A base teórica para a cultura de tecidos vegetais obteve ponto de partida nos experimentos de Gottlieb Haberlandt em 1902, mostrando de forma prática a teoria da totipotencialidade das células formulada por Schleiden e Schawann em 1838/1939 (THORPE, 2012). Por serem totipotentes, se expostas a estímulos e condições adequadas, as células vegetais competentes (mesmo as diferenciadas) podem passar a expressar genes que eram expressos apenas no início do processo de morfogênese, dessa forma, a reprogramação pode conduzir as células ao início do desenvolvimento de um novo organismo multicelular (LOYOLA-VARGAS, V. M. VÁZQUEZ-FLOTA, F., 2006).

Propagação em larga escala, geração de indivíduos férteis modificados geneticamente, aquisição de plantas livres de vírus ou contaminantes, ou até como um sistema modelo para a investigação de aspectos fundamentais da fisiologia celular de plantas, onde podem ser investigados estímulos, sinalizações, mecanismos de defesa, caracterização celular, na engenharia metabólica de químicos finos, preservação de espécies e a aquisição de novas fontes de variação genética por meio da variação somaclonal. Associado ao sucesso em qualquer uma dessas áreas citadas, está a necessidade do desenvolvimento de protocolos de regeneração e/ou do cultivo *in vitro* (LOYOLA-VARGAS, V. M. VÁZQUEZ-FLOTA, F., 2006).

Todo um segmento metodológico deve ser desenvolvido na propagação *in vitro*. Disponibilidade de laboratório adequado, equipamentos e vidrarias esterilizadas, assim como meios de cultura assépticos em faixa adequada de pH, condições de incubação (qualidade da luz, intensidade luminosa, fotoperíodo, temperatura, umidade relativa) e acompanhamento frequente. As culturas podem ser cultivadas em meio sólido (ágar ou outro agente gelificante) ou líquido (CARVALHO, 1996).

Ao longo de muitos experimentos vários meios de cultura foram elaborados e aperfeiçoados, um meio nutritivo amplamente utilizado pelos pesquisadores na cultura de tecidos vegetais que foi formulado por Murashige e Skoog (1962), é o meio MS, o mesmo é usado como base para a formulação de muitos outros meios. Um outro meio utilizado é o meio FBM (meio basal fortificado) que foi produzido levando em conta as concentrações de sais de embriões de feijão-caupi ([PELLEGRINESCHI, 1997](#)).

Os principais componentes em qualquer meio nutritivo são; água (destilada, bidestilada, deionizada), nutrição mineral (N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, Mo, Cu, Cl, Zn, Mn e Co) e nutrição orgânica (sacarose, glicose, frutose). Há ainda as vitaminas (riboflavina, tiamina) que desempenham funções reguladoras catalíticas no metabolismo celular. O meio nutritivo é composto por componentes adicionais, incluídos os aminoácidos, amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas ([PAIVA, 2001](#)).

Possuindo a função de sinalizadores químicos, desempenhando funções específicas e regulando processos envolvidos no crescimento e morfogênese, os hormônios vegetais (citocinas, auxinas, giberelinas e ácido abscísico) ([L. TAIZ e E. ZEIGER, 2003](#)), são em plantas, os mais importantes mediadores na transdução de sinais ([GUERRA e NODARI, 2006](#)). No cultivo *in vitro*, são por repercutir diretamente no desenvolvimento e em modificações morfofisiológicas nas células, que os reguladores de crescimento devem ter a concentração no meio nutritivo bem conhecida, sendo, portanto, a categoria das principais substâncias a terem seus efeitos investigados.

2.3 PROPAGAÇÃO *IN VITRO*

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação por conta do tamanho dos propágulos, é uma das práticas de culturas de tecidos de maior aplicação prática e impacto, normalmente associada com objetivos de acelerar a propagação vegetativa, e geração de mudas livres de doenças e contaminantes. Ela é utilizada em âmbito comercial na propagação de diversas espécies ([CALDAS, L. S.; BUSO, J. A., et al., 1998](#)). Uma das primeiras aplicações comerciais desta técnica foi realizada por Morel (1960), por meio da multiplicação de orquídeas realizando cultura de ápices caulinares.

A literatura geral sobre micropropagação é extensa e com inúmeras variações de um protocolo para outro, isso se deve ao fato da variabilidade das respostas morfogênicas *in vitro*. A variabilidade não é evidente somente entre diferentes espécies, mas também entre os próprios

genótipos de uma mesma espécie (cultivares ou clones) (CALDAS, L. S.; BUSO, J. A., *et al.*, 1998). Dessa forma, podendo apresentar características únicas, determinado por fatores genéticos, há a refletida necessidade de definir protocolos a cada cultivar, realizando experimentos para alcançar os parâmetros específicos para os melhores resultados em cada etapa do tratamento.

Existem duas vias principais de micropropagação, sendo a organogênese embriogênese somática, ambas possuindo via direta e indireta (SANTOS, 2003). O desenvolvimento embriões somáticos *in vitro* é um processo semelhante a do embrião zigótico. Ambos se caracterizam pela diferenciação de uma estrutura bipolar constituída de ápice caulinar e radicular, ambos passam pelos estágios de desenvolvimento pré-embrionário e embrionário, sendo, o globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (GUERRA *et al.*, 1999). A diferença significativa entre os embriões somáticos e zigóticos, relacionado ao ponto em que, os embriões somáticos se desenvolvem sem as elaboradas conexões físicas com as células do tecido maternal, diferentemente do embrião zigótico (ZIMMERMAN, 1993).

A capacidade de regeneração pode estar associada não somente ao genótipo como também a atividade fisiológica da planta matriz e seus fatores endógenos, portanto, o desafio consiste em manipular adequadamente o material vegetal entre diversas etapas, tomando considerações a respeito do tipo de explante, o procedimento de subcultura, as condições ambientais e micro ambientais, dentre outras possíveis variáveis. Por meio de tais exigências, existem inúmeras variações metodológica entre os protocolos, tornando se também um desafio fundamental a determinação de um protocolo efetivo e generalista (CALDAS, L. S.; BUSO, J. A., *et al.*, 1998).

2.3.1 Embriogênese somática e organogênese

Embriogênese somática (ES) é o processo pelo qual células somáticas, inseridas sob condições específicas de indução, geram células embriogênicas que, através de uma diversidade de modificações estruturais e bioquímicas, culmina na formação do embrião somático (TAUTORUS *et al.*, 1991; QUIROZ-FIGUEROA, 2006). Este processo morfogênético é útil para investigar o processo de diferenciação em células vegetais, bem como a expressão dos mecanismos de totipotência, abordando a competência de reprogramação celular em resposta a determinados sinais específicos (TAUTORUS *et al.*, 1991; QUIROZ-FIGUEROA, 2006).

A ES (embriogênese somática) vêm sendo testada nas mais variadas espécies como coníferas e outras espécies lenhosas (STASOLLA, 2003; KLIMASZEWSKA, 2007; PIJUT, 2011). A Abordagem de micropropagação por ES apresenta algumas vantagens; a obtenção de uma grande quantidade de propágulos (embriões somáticos), alto grau de automatização, reduzindo os custos por unidade produzida, pela utilização de biorreatores, os embriões somáticos podem ser produzidos de forma sincronizada, com alto grau de uniformização e pureza genética. A embriogênese somática pode ser utilizada como uma ferramenta integrada a programas de melhoramento genético florestal, em especial quando associada à técnica de criopreservação, na produção de sementes sintéticas e produção de metabólitos secundários (MERKLE e DEAN, 2000; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A., 1998).

Existe de maneira geral um procedimento metodológico para a embriogênese somática, que pode ser dividida como: 1) indução em meios de culturas contendo reguladores de crescimento como citocininas e auxinas; 2) multiplicação em meios contendo auxinas em baixas concentrações; 3) maturação em presença de ácido abscísico (ABA) e agentes osmóticos; e 4) germinação em meios de cultura isentos de reguladores de crescimento (DURZAN, 1988; FLOH *et al.*, 2007).

Durante e ao final do cultivo celular com os fatores de regulação *in vitro* adequados e combinados se é possível obter uma gama de resultados, o desenvolvimento dos meristemas já existentes no explante, a organogênese, isto é, formação de multibrotação e/ou raízes adventícias, embriogênese assexual, ou seja, formação de embriões somáticos (embrióides) a partir de células que não são produto de fusão gamética e, desdiferenciação (conversão de células diferenciadas em células não diferenciadas) de tecidos, assim como a proliferação de massa de calos (CARVALHO, VIDAL, 2003).

Durante a embriogênese ou organogênese pelo modelo indireto, as células podem passar pelo estágio de calos para gerar embriões ou desenvolver órgãos. Calos podem ser descritos como uma estrutura de tecidos que se desenvolvem em resposta a injúrias físicas ou químicas, a massa aglomerada pode possuir células em diferentes graus de diferenciação e com aspectos morfológicos distintos, pois se desenvolvem normalmente de forma desorganizadas, mas podem vir a apresentar algumas áreas com tecido organizado. Pela organogênese e por embriogênese direta as células não passam pela etapa de calos, pulam diretamente para a etapa de gemas ou embriões somáticos (FEHÉR, 2019; PAIVA, 2001).

Uma serie de esforços experimentais já foi aplicada para regeneração do *Vigna unguiculata* (L.) Walp, obtendo se diferentes taxas de sucesso, com diferentes tipos de explantes. Via organogênese já se utilizou do cotilédone (VAN LE *et al.*, 2002);

CHAUDHURY *et al.*, 2007), do cotilédone maduro (MUTHUKUMAR *et al.*, 1996; BRAR *et al.*, 1999, POPELKA *et al.*, 2006) das folhas primárias (MUTHUKUMAR *et al.*, 1995), o embrião maduro (ODUTAYO *et al.*, 2005; POPELKA *et al.*, 2006), o hipocótilo (PELLEGRINESCHI, 1997) e o meristema / ápice / ponta da parte aérea (KARTHA *et al.*, 1981; BRAR *et al.*, 1997; MAO *et al.*, 2006, AASIM *et al.*, 2008, AASIM *et al.*, 2009). Na embriogênese somática, se encontram esforços com resultados positivos na regeneração pela via indireta com a utilização do explante de folhas primárias e cultura em suspensão (ANAND *et al.*, 2000; RAMAKRISHNA *et al.*, 2005A, KULOTHUNGAN, 1995).

É necessário notar que, para que o sucesso de diferentes etapas da embriogênese somática via indireta seja alcançada, é necessário que ocorra o crescimento da massa pró-embriogênica e a desdiferenciação das células. Como cita Somers *et al* (2003), os protocolos de transformação genética de rotina são normalmente limitados nas leguminosas de grão tropicais, isso se deve a sua recalcitrância, dificultando a regeneração em condições de cultura de tecidos. O estabelecimento de um protocolo eficiente e uma cultivar que responda bem ao tratamento de regeneração, pode tornar ideal a busca por um organismo modelo para estudos *in vitro* em feijão-caupi, o que reflete positivamente em áreas que estejam trabalhando associadas ao feijão-caupi.

A massa pró-embriogênica pode demonstrar características distintas, sendo um fator importante para os calos embriogênicos de *Coffea arabica*, que são discerníveis com base na coloração, pois os mesmos são castanhos e duros (QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006). *Arabidopsis thaliana* também têm como justificativa para fator para seleção dos calos embriogênicos a coloração (IKEDA-IWAI *et al.*, 2003) assim como com *Sum sativum* (OINAN and KOTHARI, 1995).

Referente a indução de calos no feijão-caupi, no trabalho de Jereissati (2008), quatro linhagens de calos foram isoladas e cultivadas por até 2 anos sem perder suas características. Calos com coloração verde, amarelo, marrom e branco foram analisados. Sendo os calos branco amarelados os que demonstraram maior taxa friabilidade, de crescimento, assim como foram os que chegaram a produzir estruturas embriogênicas em suspensão (JEREISSATI, 2008).

Todas as cultivares anteriores podem ter a competência à regeneração *in vitro* testada experimentalmente, e isso constitui de fato, uma estratégia para possibilitar a construção do conhecimento acerca do estabelecimento protocolos de regeneração a espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. A partir deste trabalho pode surgir oportunidades para a exploração de novas áreas, proporcionando inovações, reduzindo de custos e gerando contribuições positivas para os trabalhos com feijão-caupi na região do semiárido.

3. HIPÓTESE

Por meio de explantes dos primórdios foliares, é possível gerar calos embriogênicos e embriões somáticos aptos à regeneração do feijão *Vigna unguiculada* (L.) Walp, com cultivar BRS Juruá.

4. JUSTIFICATIVA

O feijão caupi é uma leguminosa empregada em muitas áreas. O feijão apresenta competência para o controle da erosão, em alguns casos favorecendo a presença benéfica de populações de insetos, pode ser trabalhado para pastagem rotativa quando misturado com culturas como milho ou sorgo. O cultivo pode ser realizado para a reposição de nitrogênio atmosférico ou de fósforo, já que, as associações as raízes do feijão-caupi contribuem significativamente na melhora do conteúdo desses elementos no solo ([VALENZUELA e SMITH, 2002](#)).

Apesar da relativa importância econômica, desde a segunda metade do século XVI, até 2010, foram lançadas apenas 71 cultivares melhoradas ([FREIRE FILHO, 2011](#)). O rendimento médio do feijão-caupi pode variar bastante, o emprego tecnológico limitado a algumas regiões, os inúmeros fatores, como estresses bióticos e abióticos, susceptibilidade a pragas e doenças provenientes dessa relação, termina por ocasionar perdas substanciais na produção mesmo após os grãos maduros já terem sido colhidos ([SAHOO *et al.*, 2001](#)).

Uma gama de métodos de melhoramento pode ser abordada para a aquisição de determinados atributos do feijão-caupi. A BRS Juruá (cultivar selecionada para o experimento) possui 25% de descendência de germoplasma Brasileiro, 25% Africano e 50% Americano, a cultivar é homozigota para o gene que lhe condiciona o fenótipo de tegumento verde, e para o gene que condiciona o fenótipo aos cotilédones verdes. Essa característica pode ser apreciada no mercado internacional, já que a coloração conta como um fator atrativo no consumo de grãos ([FREIRE FILHO, 2009b](#), [FREIRE FILHO, 2011](#)).

A escolha via ES é realizada com base em possíveis vantagens como a obtenção de grandes quantidades de propágulos (embriões somáticos), um alto grau de automatização, redução os custos por unidade produzida com alto grau de uniformização e pureza genética ([CALDAS, L. S.; BUSO, J. A., *et al.*, 1998](#)). Além do que, a utilização da via de regeneração por embriogênese somática vêm sendo testada nas mais variadas espécies ([STASOLLA, 2003](#); [KLIMASZEWSKA, 2007](#); [PIJUT, 2011](#)).

Portanto, a cultura de tecidos proporciona condições para a execução de diversos tipos de técnicas, onde pode ser utilizada como uma ferramenta integrada a geração de indivíduos férteis modificados geneticamente, aquisição de plantas livres de vírus ou contaminantes, na engenharia metabólica de químicos finos, preservação de espécies, na produção de sementes sintéticas e na aquisição de novas fontes de variação genética por meio da variação somaclonal ([MERKLE e DEAN, 2000](#)).

No entanto, na própria cultura de tecidos se encontram desafios, o feijão-caupi é recalcitrante, sendo assim, tem uma dificuldade inata em alcançar boas taxas de regeneração *in vitro* (SOMERS *et al.*, 2003), isso torna, portanto, ainda mais necessária a contínua avaliação de diversas cultivares em relação a competência na produção de calos embriogênicos e embriões somáticos, pois a soma desses resultados pode culminar no desenvolvimento de um protocolo cada vez mais efetivo.

Amparado pela literatura e explorando possíveis variações de protocolos, se encontram alguns esforços com resultados positivos na regeneração pela ES via indireta com a utilização do explante de folhas primárias, e de cultura em suspensão (ANAND *et al.*, 2000; RAMAKRISHNA *et al.*, 2005A, KULOTHUNGAN, 1995).

Testar experimentalmente a BRS Juruá quanto à competência frente à regeneração é um ponto oportuno e necessário para ampliar a cobertura científica a respeito dessa espécie, agregando conhecimentos para melhor entender, manusear, modificar ou melhorar essa planta na região do semiárido, assim como contribuir para futuras pesquisas e aplicações futuras.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um protocolo de regeneração para o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) com a variedade BRS Juruá a partir de explante foliar.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um protocolo eficiente de desinfecção das sementes;
- Estabelecer um protocolo para indução de calos para a variedade BRS Juruá;
- Analisar o efeito das diferentes concentrações dos reguladores de crescimento em cada etapa de desenvolvimento;
- Analisar e identificar os calos e suas características, assim como embriões e seus respectivos estágios de desenvolvimento;
- Identificar a relação entre as concentrações com melhores resultados em cada etapa de desenvolvimento;
- Analisar estatisticamente os resultados obtidos e esquematizar um protocolo de regeneração.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 MATERIAIS

6.1.1 Local do experimento

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal Rural do Semiárido.

6.1.2 Material vegetal

No presente trabalho foram utilizadas sementes de feijão-caupi da variedade BRS Juruá (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). As sementes foram obtidas a partir de plantas cultivadas em um campo experimental situado no Departamento de Biociências da Universidade Federal Rural do Semiárido. As sementes maduras foram coletadas e armazenadas em frascos de vidro e mantidas sob refrigeração.

6.2 MÉTODOS

6.2.3 Preparo dos meios de cultura

Duas principais formulações de meio nutritivo foram preparadas a partir das soluções-mãe (5X), o FBM (meio basal fortificado) (Pellegrineschi *et al.* 1997), e MS (Murashige & Skoog, 1962) ¼ da força. Todos os meios nutritivos utilizados no experimento foram autoclavados por 15 minutos à 121 °C, e armazenados sob refrigeração até o uso.

6.2.4 Assepsia do material vegetal e germinação

Sementes de BRS Juruá, previamente selecionadas, foram imersas em etanol (C₂H₆O) 70% pelo tempo de um minuto, ajudando a quebrar a tensão superficial para facilitar a penetração do hipoclorito de sódio, em seguida foram enxaguadas com água destilada autoclavada por cinco vezes e tratadas com hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,5% por dez minutos para livrá-las de contaminantes superficiais, e posteriormente lavadas novamente por mais cinco vezes com água destilada autoclavada.

Após a assepsia, com o auxílio de uma pinça, quatro sementes previamente selecionadas foram inseridas em frascos de vidro e submetidas à germinação sob 25 ± 2 °C,

60% de umidade e fotoperíodo de 16/8 ($36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em frascos de vidro contendo 50 mL de meio MS $\frac{1}{4}$, 0.7% de ágar-ágar, pH 5.7 – 5.8 pelo período de aproximado de 12 dias. Após germinadas e crescidas, as plântulas foram selecionadas por tamanho e coletadas para a aquisição dos explantes provenientes das folhas primárias.

6.2.5 *Indução de calos embriogênicos e repique*

Foi utilizado para indução de calos o meio nutritivo FBM (Pellegrineschi *et al.* 1997) suplementado com sacarose a 3%, pH 5.8, 0,7% de ágar-ágar, 0,05% mg/L de CH (caseína hidrolisada), 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) em concentrações de 0,0 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L e 2,0 mg/L, autoclavado por 15 minutos a 121°C . Os folíolos das plantas germinadas em frascos de vidro foram excisados longitudinalmente através do segmento da nervura central com a ajuda de um bisturi. Cinco explantes de $1,5 \text{ cm}^2$ foram excisados e colocados por placa de Petri de 15 X 100 mm, com o lado abaxial do explante em contato com o meio, as placas foram colocadas em uma estante sob $25 \pm 2^\circ \text{C}$, 60% de umidade e fotoperíodo de 16/8 ($36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Após 35 dias foi realizado o repique da massa de calos friáveis, a massa de calos foi mantido em meio semissólido, no mesmo meio nutritivo (FBM), nas mesmas condições e concentração de 2,4-D. Mais um tratamento foi adicionado nesta fase, a concentração de 1,5 mg/L de 2,4-D, a mesma foi proveniente do repique de calos da concentração de 2,0 mg/L de 2,4-D. Todos os outros calos foram subcultivados respectivamente em 0,0 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 2,0 mg/L de 2,4-D. A etapa de indução de calos foi realizada em triplicata, assim como a etapa de suspensão celular.

A porcentagem de indução de calos foi realizada para cada explante pelo cálculo da área do explante em cm^2 dividido pela área acometida por calos, posteriormente os valores foram transformados submetidos a testes estatísticos e transformados em porcentagem.

6.2.6 *Estabelecimento e avaliação das suspensões celulares*

Após 35 dias os calos friáveis provenientes do repique foram selecionados para constituir as suspensões celulares. Calos com peso fresco de 0,5g foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio líquido FBM (Pellegrineschi *et al.* 1997), pH 5.8, suplementado com sacarose 3%, CH (caseína hidrolisada) 0,05%, no entanto sem ágar-ágar, com 0,0 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 1,5 mg/L e 2,0 mg/L de 2,4-D e mantidas sob $25 \pm 2^\circ \text{C}$, 60% de umidade, fotoperíodo de 16/8 ($36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e sob agitação rotatória à 90 rpm. A cada 5 a 6 dias, 25 ml do sobrenatante foi removido com auxílio de uma pipeta e o Erlenmeyer

foi reabastecido com igual volume do meio líquido FBM. Todas as amostras de cada uma das suspensões foram analisadas com o auxílio de uma lupa, em intervalos regulares a cada 2 dias, observando o comportamento da cultivar em relação indução de embriões somáticos e a identificação de estruturas embriogênicas em desenvolvimento.

Após 18 dias as culturas foram transferidas ao meio FBM com uma concentração reduzida de 2,4-D, pH 5.8, suplementado com sacarose 3%, 0,05% CH, com 0,0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 0,75 mg/L, 1,0 mg/L de 2,4-D e mantidas sob $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% de umidade, fotoperíodo de 16/8 ($36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e sob agitação rotatória à 90 rpm. Posteriormente, após mais 18 dias, as suspensões foram novamente transferidas para um meio com menor concentração de 2,4-D, respectivamente, 0,0 mg/L, 0,125 mg/L, 0,25 mg/L, 0,37 mg/L e 0,5 mg/L 2,4-D.

6.2.7 *Maturação e desenvolvimento dos embriões*

As estruturas em estágio cordiforme e torpedo foram selecionadas manualmente e transferidas para Erlenmeyers com meio FBM líquido, pH 5.8, suplementado com Pro (L-prolina) 20 mg/L, ABA 5 μM , mannitol a 2%, CH 150 mg/L, Gln (ácido L-glutâmico-5-amida) 100 mg/L, sem ágar- ágar, suplementado agora com 0,1 mg/L de 2,4-D e mantidas sob $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% de umidade e fotoperíodo de 16/8 ($36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em um agitador rotatório (90 rpm). Após 5 dias, os embriões foram avaliados quanto a maturidade. Após a autoclavação do meio utilizado ABA foi filtrado em filtros de 0,22 μm e adicionado à solução.

FIGURA 1 – Resumo geral das etapas seguidas na metodologia. 1 - Aquisição do explante. 2 - Indução em meio semissólido. 3 – Repique.

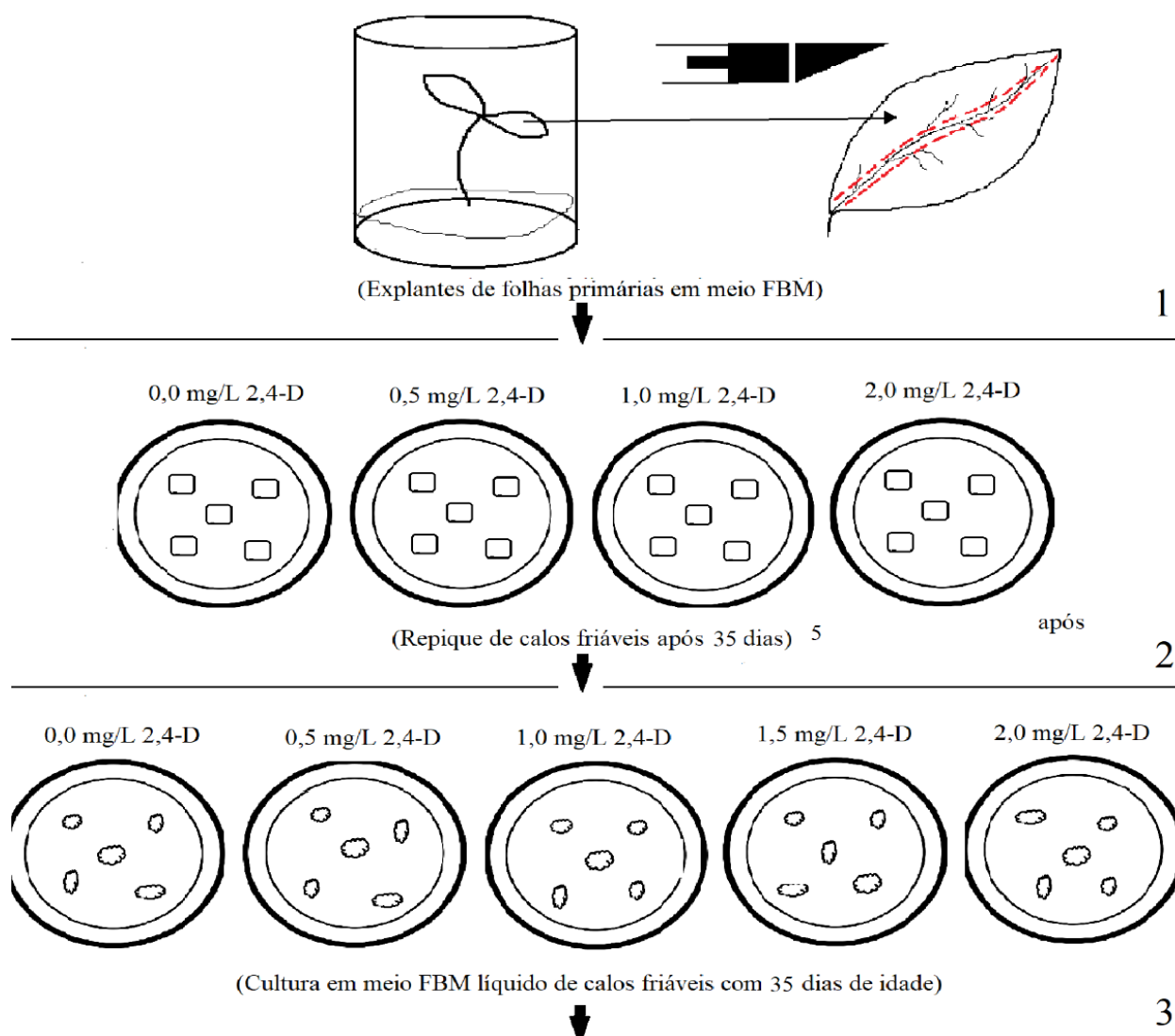
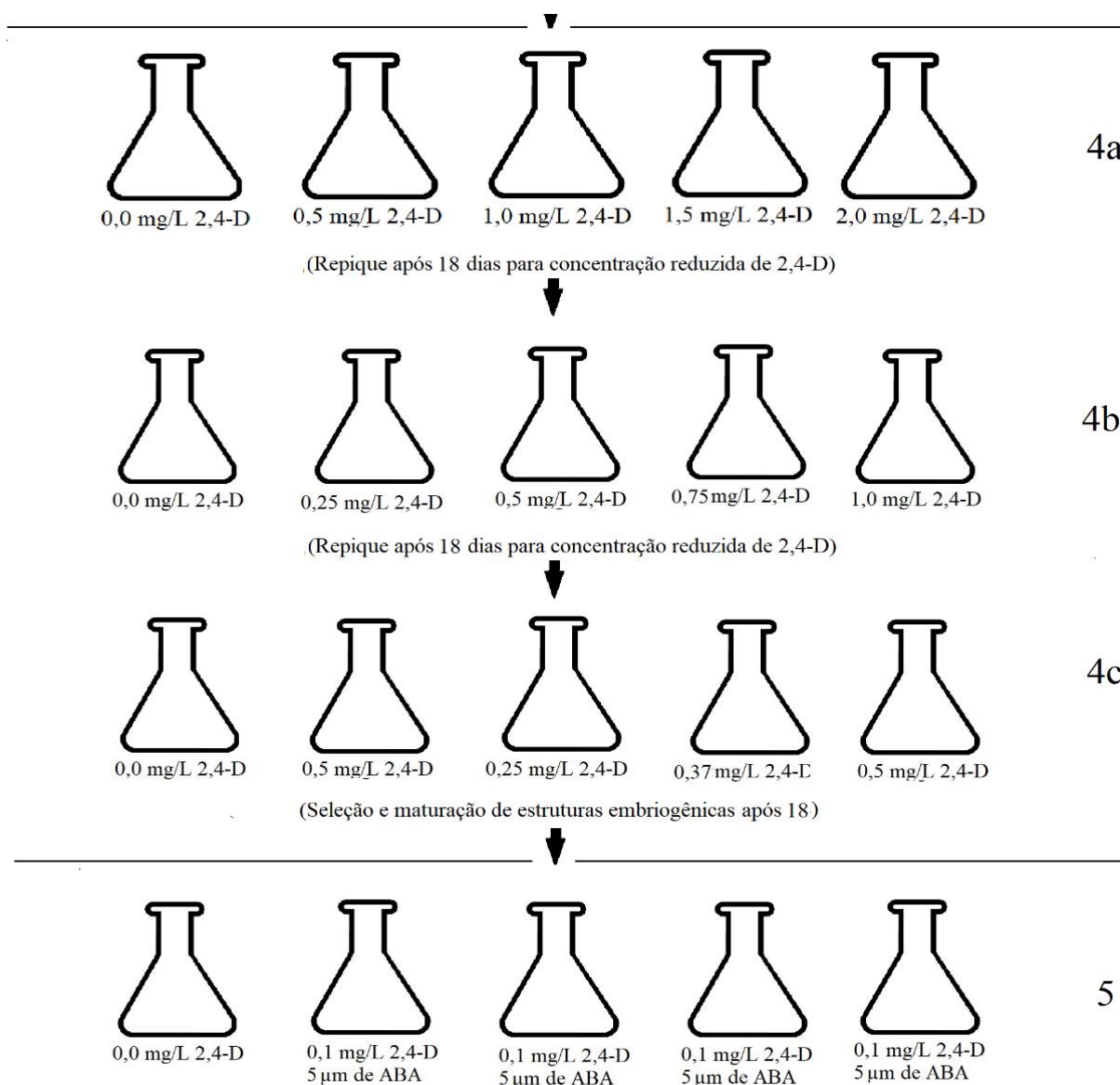


FIGURA 2 – Resumo geral das etapas seguidas na metodologia. **4** – Cultura em suspensão celular. **5** – Maturação de estruturas embriogênicas.



7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A Análise estatística foi realizado foram utilizados teste de normalidade, análise de variância e pós teste de Tuckey.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

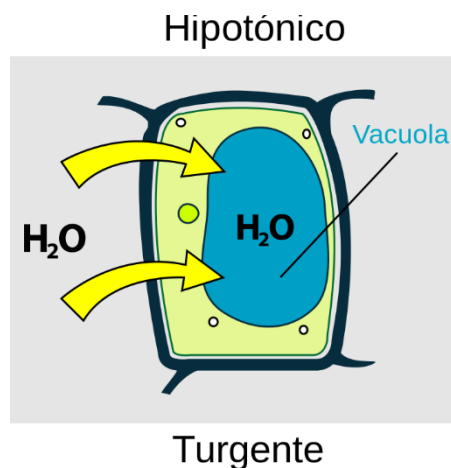
8.1 INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS E REPIQUE

Um dia após a inoculação, em todas as concentrações testadas, foi possível perceber o aumento de tamanho na área dos explantes. Isto ocorre devido a dois possíveis fatores, a absorção de água e o efeito da auxína.

A água e outros sólutos são absorvidos através da membrana plasmática. Se a quantidade de água dentro da célula é menor que no meio externo, então o gradiente de potencial hídrico irá acelerar a taxa de absorção, seguindo a tendência em igualar a concentração de sais entre o interior e o exterior da célula. Como no presente caso, as condições não propiciam a saída de sais, há a entrada de água. O resultado dessa absorção gera ainda o potencial de turgescência que atua sobre a membrana e a parede celular, resultando no aumento da pressão interna e inchaço da célula (L. TAIZ e E. ZEIGER, 2003; ALBERTS, BRUCE *et al.*, 2017).

Há ainda um possível aumento no potencial de extensibilidade por conta do efeito da presença de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). A hipótese do crescimento ácido estabelece que, um aumento no efluxo de H^+ e consequente queda do pH no apoplasto faz com que várias enzimas possam vir à entrar em atividade (expansinas, hidrolases, pectinases, celulasas, hemicelulasas) clivando uma série de ligações químicas (pontes de hidrogênio, ligações cruzadas entre as microfibrilas de celulose e as hemicelulosas) contribuindo para o afrouxamento da parede celular, resultando no aumento da taxa de extensibilidade da célula (L. TAIZ e E. ZEIGER, 2003; ALBERTS, BRUCE *et al.*, 2017).

FIGURA 3 - Reação da célula vegetal em meio hipotônico.



Fonte: Resgatado da internet. Domínio Público.

Os dados coletados na primeira etapa de indução apresentaram homocedastidade ($p > 0,05$). A análise de varância (ANOVA) com pós teste de Tuckey, demonstrou que um dos tratamentos diferiu significativamente dos demais testados ($p < 0,05$). O tratamento utilizando 0,5 mg/L de 2,4-D (FBM0,5) foi o que menos produziu calos por área de explante (TABELA 1). Uma repetição inteira de explantes do tratamento FBM0,5 senesceu sem dar início a calogênese, tornando evidente a constatação estatística. As pequenas quantidades de calos gerados nas duas repetições remanescentes do tratamento FBM0,5 possuíam tonalidades levemente esbranquiçadas, amareladas e eram levemente friáveis.

Isso demonstra que a concentração utilizada, além de não induzir uma boa proliferação de calos também retardou o desenvolvimento normal dos mesmos, pois isso contrasta os resultados observados no grupo controle, já que todos os explantes do grupo FBM0 produziram calos com massa friável presente e em bem maiores quantidades do que o tratamento FBM0,5.

Outros trabalhos (RAMAKRISHNA, K., et al, 2005a; JEREISSATI, 2008) com *Vigna unguiculata* na qual se envolve o uso de 0,5 mg/L de 2,4-D para indução de calos, não resultaram em senescência de uma replicata inteira, e não se obteve valores tão baixos como os resultados adquiridos no presente trabalho. O comportamento à essa concentração pode ser um resultado influenciado pelo genótipo, influenciando de forma singular o comportamento da variedade BRS Juruá em resposta a concentração testada.

Os resultados estatísticos mostraram que não houve diferenças significativas na porcentagem de indução de calos dentre os demais tratamentos. A maior porcentagem de indução esteve associado ao explante número 2 do tratamento FBM1 que alcançou a marca de 70% da área do explante acometida por calos (TABELA 1).

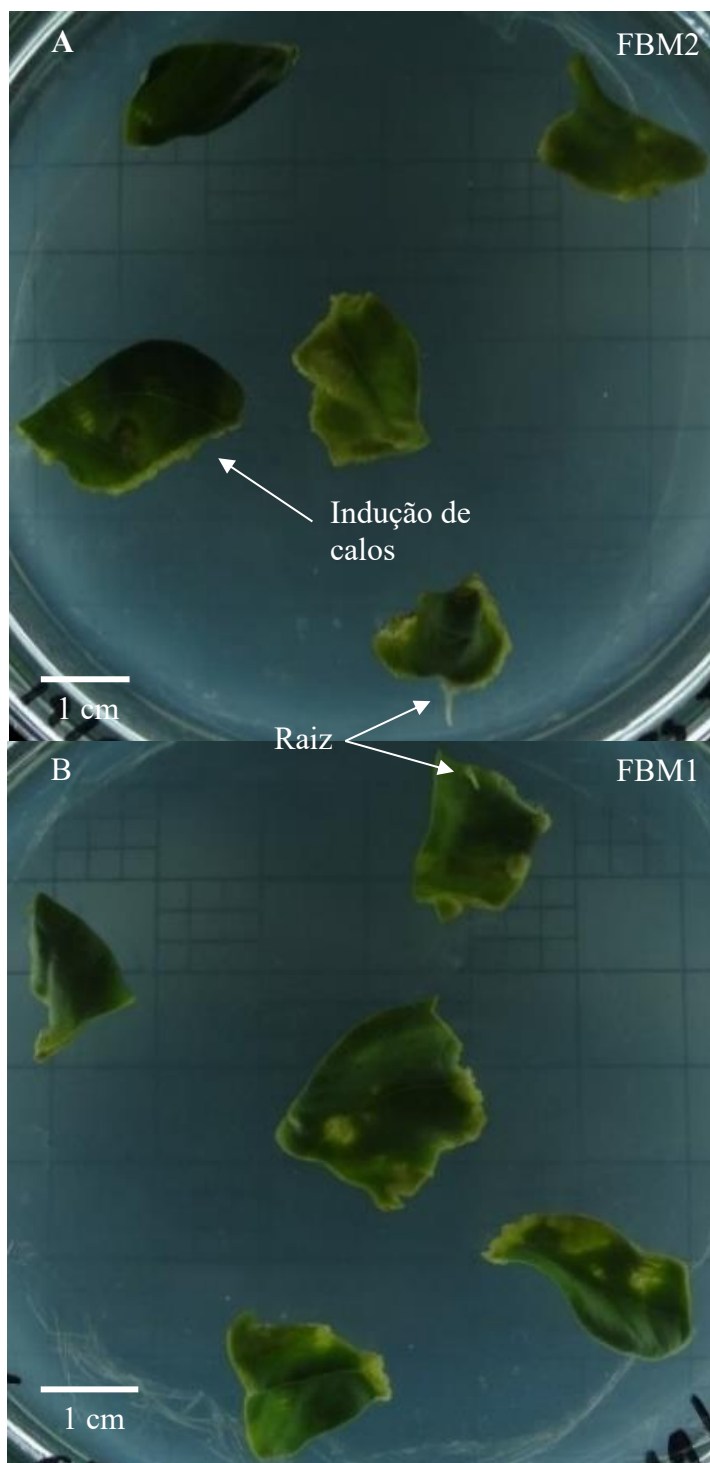
TABELA 1 – Porcentagem de proliferação de calos por explante (1,5 cm²) após 35 dias.

Porcentagem de indução de calos por área (1,5 cm²) de explante					
		FBM0	FMB0,5	FBM1	FBM2
Repetição 1	Explante 1	49,80%	0,70%	30,60%	16,40%
	Explante 2	16,90%	2,50%	70,60%	34,50%
	Explante 3	7,10%	4,40%	27,70%	44,30%
	Explante 4	19,10%	8,70%	11,00%	26,50%
	Explante 5	43,50%	15,00%	34,90%	26,20%
Repetição 2	Explante 1	29,50%	14,00%	50,40%	25,10%
	Explante 2	31,90%	7,60%	12,30%	53,50%
	Explante 3	12,10%	0,60%	33,30%	61,60%
	Explante 4	25,00%	0,10%	12,90%	38,70%
	Explante 5	20,40%	17,30%	41,80%	21,80%
Repetição 3	Explante 1	15,80%	0,00%	7,80%	24,80%
	Explante 2	19,50%	0,00%	20,50%	9,10%
	Explante 3	37,10%	0,00%	55,00%	34,10%
	Explante 4	14,60%	0,00%	20,20%	39,50%
	Explante 5	21,00%	0,00%	29,70%	56,40%

Com apenas um dia após a inoculação em meio FBM semissólido, um explante de cada tratamento FBM2 (FIGURA 4A) e FBM1 (FIGURA 4B) apresentou o surgimento de raízes próximas à borda do explante, com tamanho aproximado de 2 a 3 mm de comprimento.

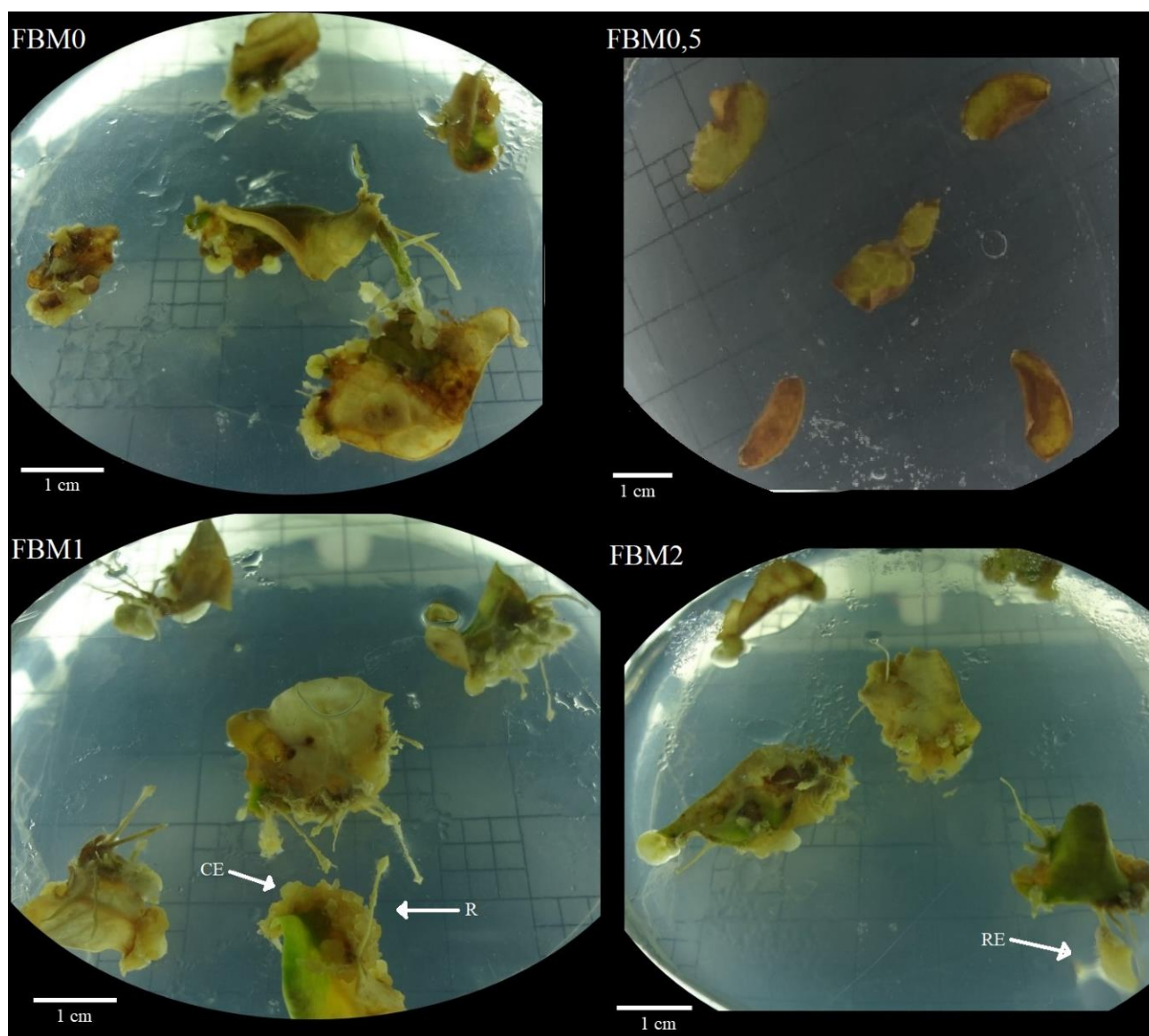
A maior parte dos calos produzidos após 35 dias de cultivo durante a etapa de indução estavam mais próximos das extremidades do explantes do que distribuídos pela extensão do mesmo. De fato, a proliferação de calos iniciou-se próxima das regiões da folha que sofreram injúria pelo corte do bisturi durante a excisão (FIGURA 4A e B), como se sabe, as células de calos se desenvolvem como resposta a injúrias físicas ou químicas (PAIVA, 2001).

FIGURA 4 - Formação de raiz, início da formação de calos nas bordas dos explantes na etapa de indução de calos em presença de 2,0 mg/L e de 2,4-D



Após 35 dias de cultivo foi possível notar uma alta frequência de raízes (organogênese), as mesmas emergiram de diferentes locais da amostra vegetal, com inclinações angulares variadas, tendo a maior parte surgido e mantendo-se em desenvolvimento geralmente mais próximas das regiões que permaneceram verdes, ou possuíam calos em crescimento (FIGURA 5). Ao inclinarem-se, a ponta das raízes que tocaram a superfície do meio iniciaram a produção de calos com aspecto amarelado e friável. Algumas raízes geradas persistiram e cresceram por mais tempo durante toda a etapa de indução, já outras senesceram algum tempo depois, principalmente quando a região do explante próxima da área a qual as mesmas emergiram se tornou amarelada.

FIGURA 5 - Cultivo de calos em meio FBM semissólido após 35 dias de propagação. **(CE)** - Calos friáveis (embriogênicos); **(R)** - Raiz; **(RE)** - Raiz propagando calos ao entrar em contato direto com o meio.



Na triplicata de cada concentração, os explantes foram analisados um a um em relação a algumas características (TABELA 2). Na coloração, foram observados predominantemente em todos os tratamentos calos de coloração amarelada, que variava entre tonalidades claras a escuras. A qualidade da friabilidade foi bastante variável de explante para explante bem como a porcentagem de indução por área do explante. Dentre as concentrações testadas, o tratamento FBM1 apresentou a melhor qualidade em calos friáveis, seguido pelo grupo controle (FBM0), pelo tratamento FBM2, e por último o FBM0,5.

TABELA 2 – *Constatação após 35 dias da presença de alguns aspectos em calos induzidos pelo efeito de 2,4-D em meio FBM sob diferentes concentrações.*

Aspectos observados	0 mg/L			0,5 mg/L			1 mg/L			2 mg/L		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a
Calo friável	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Calo mucilaginoso	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Calo amarelado	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Calo esverdeado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Calo escuro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Calo branco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

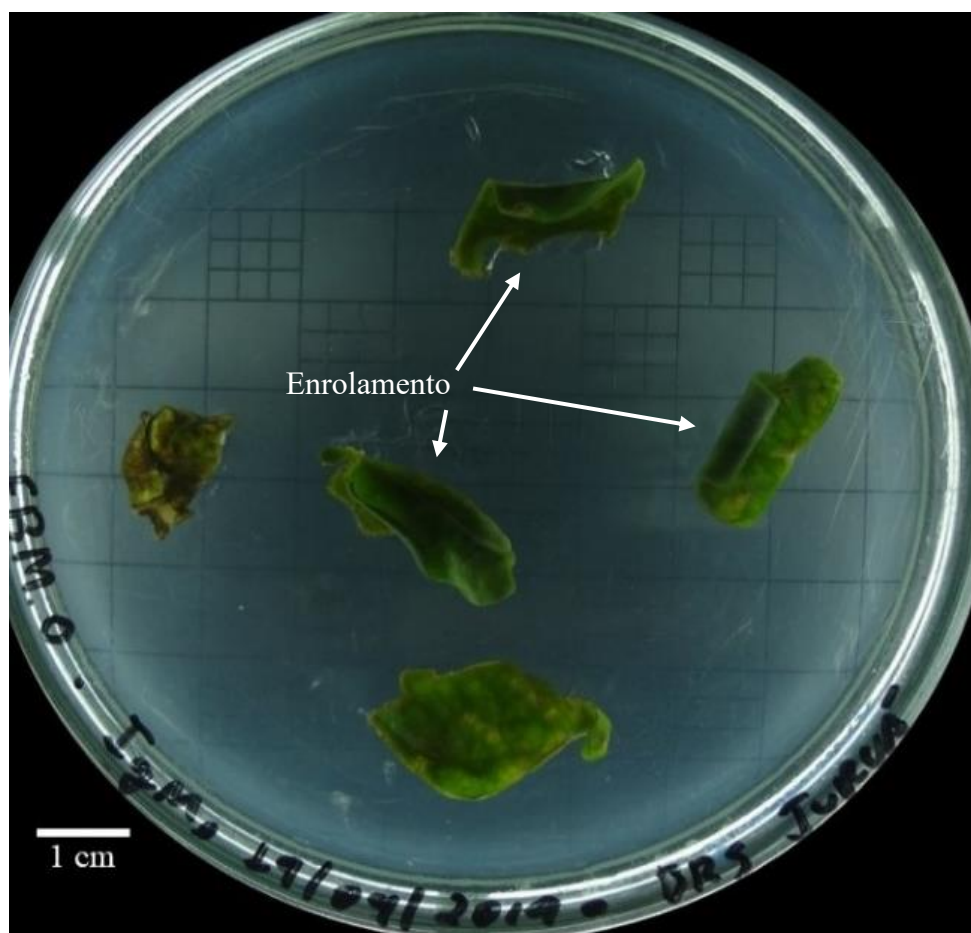
TABELA 3 – *Porcentagem de coloração remanescente na área dos explantes induzidos a calogênese, e formação de raiz em presença de 2,4-D em meio FBM sob diferentes concentrações após 35 dias de cultivo.*

Coloração e presença de raiz	0 mg/L			0,5 mg/L			1 mg/L			2 mg/L		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a
Folha esverdeada	±60 %	±40 %	±25 %	±0%	±0%	±0%	±30 %	±80 %	±30 %	±40 %	±20 %	±20 %
Folha amarelada	±40 %	±60 %	±75 %	±99 %	±99 %	±99 %	±70 %	±20 %	±70 %	±60 %	±80 %	±80 %
Formação de raiz	11	6	2	0	0	0	14	12	29	12	2	10

Alguns explantes sofreram um processo de enrolamento (FIGURA 6), com isso, perderam parte do contato com a superfície do meio nutritivo. Associação de dois fatores podem ser a causa desses padrões de enrolamento, o tamanho do explante ($1,5 \text{ cm}^2$), permitindo a folha a dobrar-se sobre si mesma mais facilmente do que se fosse um tamanho menor, e pelo possível movimento nástico diferencial.

Em plantas, o movimento nástico mais comum é a epinastia, na qual ocorre a curvatura para baixo de órgãos como pecíolos e folhas, esse movimento pode ser induzido por altas concentrações de auxína distribuída de forma diferencial entre o lado superior e inferior da folha, na decorrência disso, um lado alonga-se (no explante, o lado o abaxial) mais rapidamente que o outro, resultando em diversos padrões de enrolamento no explante.

FIGURA 6 - *Início do enrolamento dos explantes em meio basal fortificado a 0,0 mg/L de 2,4-D, após 1 dia.*



Em alguns experimentos realizados paralelamente durante a realização do presente trabalho, notou-se que os amostras excisadas com tamanho de 0,5 cm² produziu calos em toda a extensão da folha, transformando o explante em uma grande massa de calos desorganizado. Como consequencia da rápida proliferação, o explante não persistiu sendo capaz de sustentar sua coloração verde por muito tempo, e não foi observado o surgimento de raízes, nem o enrolamento dos explantes.

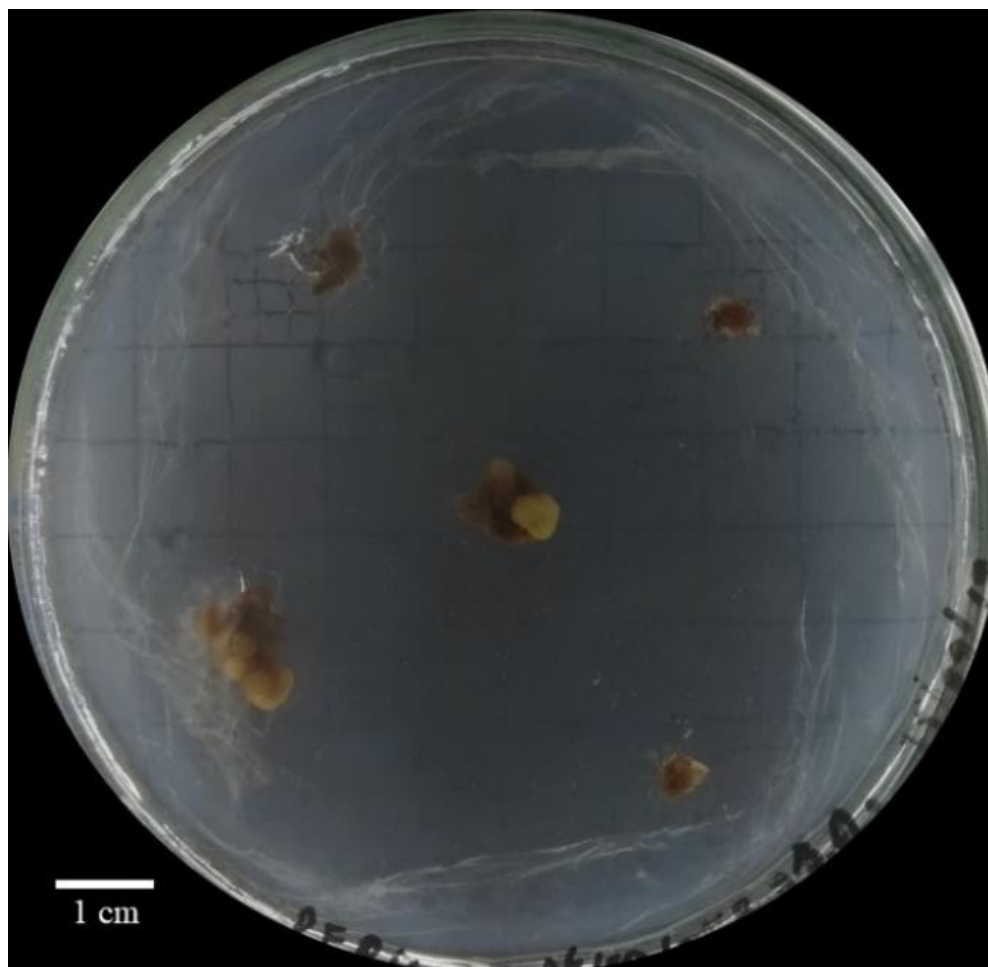
A partir dessas observações é possível inferir que, um tamanho maior do explante permite que a coloração da folha persista verde por mais tempo durante o cultivo, inclusive levando mais tempo também para que toda a extensão da folha seja acometida por calos, se comparado a explantes de tamanhos menores.

O amarelamento da folha ocorreu mais rapidamente nas regiões que não estavam em contato direto com o meio (por conta do enrolamento). Como o sistema vascular do explante não é mais eficientemente o mesmo que quando havia as elaboradas conexões com o tecido da plântula, a auxína levará mais tempo para se distribuir do que levaria se fosse transportada em folhas normais, além do mais, a distribuição também tende a ser desigual entre as células, dessa forma, as regiões do explante que perdem contato com a superfície do meio morrerem antes de receber o estímulo adequado de auxína, não apresentando qualquer modificação visível.

Além de calos friáveis também foi observada uma proliferação de massa de calos com aspecto mucilaginoso e coloração amarelada, mas uma baixa qualidade em desagregar-se do aglomerado de células. De fato, como relata Jereissati (2008) no trabalho com feijão-de-corda, a linhagem de calo mucilaginoso apresenta uma baixa friabilidade e uma baixa taxa de crescimento frente a outras linhagens de calos isoladas. A melhor massa pró-embriogênica esteve presente em calos de tonalidade amarelada (FIGURA 6; FBM1), que demonstrou possuir ótima friabilidade quando manipuladas manualmente.

Ao final de 35 dias foi realizado o repique em meio semissólido. Ao final de 35 dias, o tratamento FBM1 do repique destacou a coloração marrom na massa de calos (Figura 7), os calos dessa origem eram aglomerados extremamente rígidos e com algumas poucas regiões de calos friáveis e amarelados. A possível causa associada à presença desse tipo de calo vêm a ser a oxidação. A oxidação se tornou um problema mais intenso durante as etapas de repique em meio semissólido e suspensão, tendo influenciado tanto na quantidade como na qualidade dos calos embriogênicos de feijão-caupi. A oxidação fenólica é altamente dependente da espécie e do genótipo (CARVALHO, 2003). Ao que consta no presente trabalho, a oxidação é um dos fatores que contribuem para recalcitrância desta leguminosa.

FIGURA 7 - *Etapa de indução calos, fase de repique. Calos referentes ao tratamento FBM1 sofreram escurecimento.*

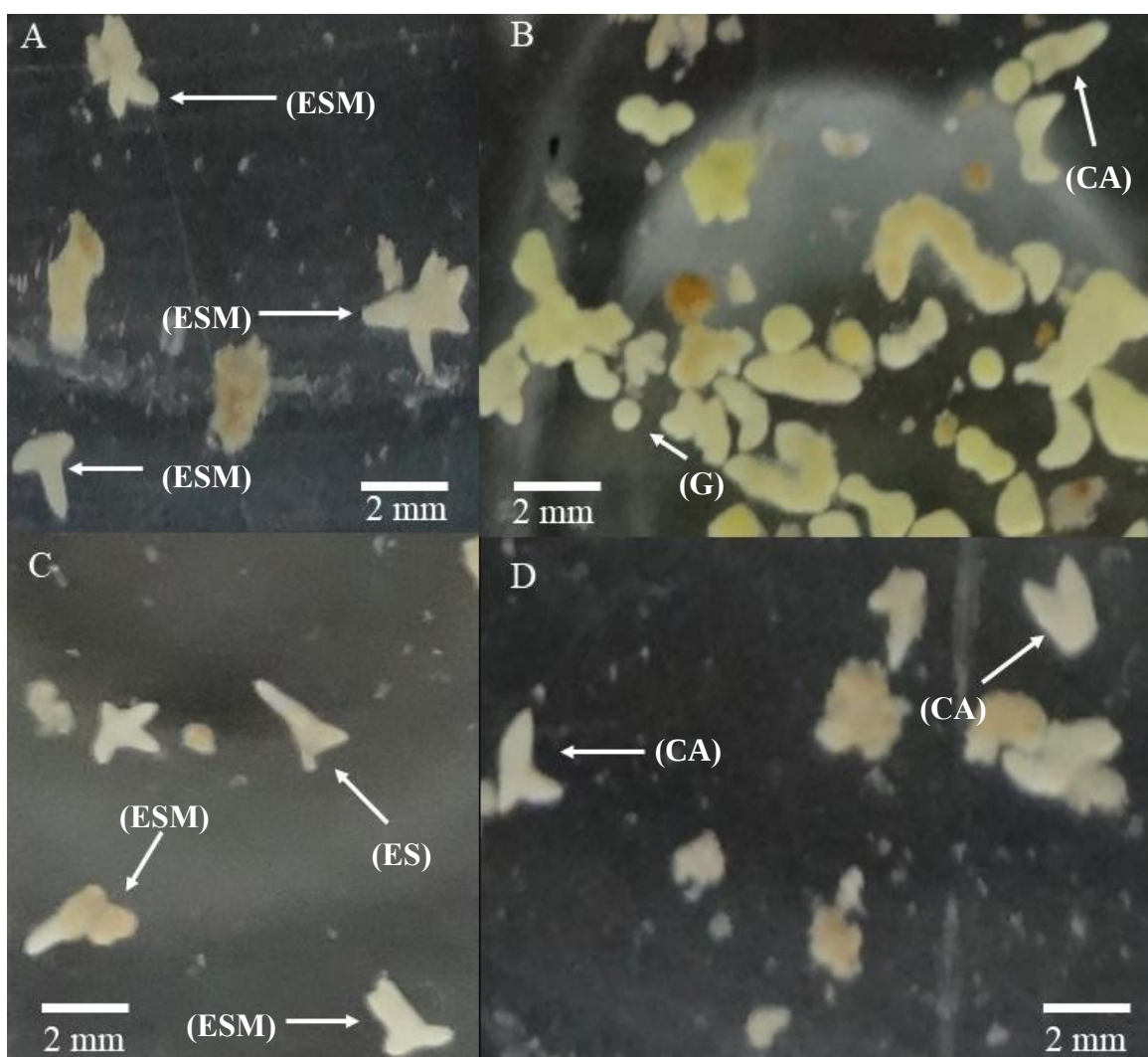


8.2 AVALIAÇÃO DAS SUSPENSÕES CELULARES

Após 35 dias de cultivo do repique em meio semissólido, 0,5 grama de calos friáveis foram utilizado para iniciar as suspensões celulares (Figura 2; fases 4a, 4b, 4c) em meio líquido FBM (Pellegrineschi *et al.* 1997), pH 5.8, sacarose 3%, CH 0,05%, sem ágar-ágar, sob $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% de umidade, fotoperíodo de 16/8 ($36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e sob agitação rotatória à 90 rpm, nas respectivas concentrações 0,0 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 1,5 mg/L e 2,0 mg/L de 2,4-D.

Ao fim de 54 dias, a última fase da cultura em suspensão foi finalizada, e durante estes procedimentos uma série de estruturas morfolologicamente distintas apresentaram-se (FIGURA 8), estruturas globulares foram encontradas nas concentrações 0.125; 0.25 e 0.37 mg/L de 2,4-D, com destaque na concentração 0.125 mg/L de 2,4-D, que apesar de possuir uma alta quantidade de estruturas globulares, sofreu grandes percas por conta da oxidação.

FIGURA 8 - Estruturas embriogênicas observadas na suspensão. **(ES)** – estruturas similares à torpedos, a morfologia evidentemente aponta um desenvolvimento anormal por parte de alguns embriões **(ESM)**. **(G)** - Globular. **(CA)** – cordiforme em alongamento.



Ao final, estruturas similares a embriões em transição entre as fases globulares, cordiforme e torpedo foram observadas (TABELA 4). Não se constatou nenhum embrião em fase cotiledonar. Normalmente a formação de estruturas que culminam em um embrião apto a regeneração pode sofrer ainda diversos processos, o que inclui a possibilidade de anomalias durante as etapas de transição do embrião até a aclimatação, a falta de simetria e regularidade na histodiferenciação é um dos principais pontos na geração de embriões somáticos secundários, fazendo com que os mesmos não sobrevivam as demais etapas da regeneração (RAMAKRISHNAN, K. *et al.*, 2005b).

TABELA 4 - Quantidade de estruturas observadas ao fim da suspensão celular. As concentrações apresentadas são referentes última etapa da suspensão antes da maturação.

Estruturas observadas na suspensão												
2,4-D	Globular			Cordiforme			Torpedo			Raiz		
mg/L	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3
0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	89	67	194
0.125	33	46	15	0	2	1	4	0	0	2	42	38
0.25	36	23	3	0	1	2	0	0	0	1	3	4
0.37	7	12	9	3	0	1	0	0	0	0	0	7
0.5	2	4	5	1	0	0	1	0	0	0	0	0

A triplicata grupo controle (0,0 mg/L de 2,4-d) da suspensão celular foi altamente afetada pela proliferação de raízes (FIGURA 9; A e C), que ocorreu durante todas as etapas do experimento, na etapa 2 durante a indução de calos, onde estiveram emergindo diretamente do explante (organogênese), e durante a fase de repique a partir dos calos no tratamento FBM1 (FIGURA 9; B). Na suspensão, pequenas células esfericas e isoladas começaram a se alongar repentinamente e formar raízes, por vezes a produção de raízes adquiriu características notáveis, no aglomerado de células globulares era possível observar o desenvolvimento de 3 a 4 raízes por vez (FIGURA 9; A).

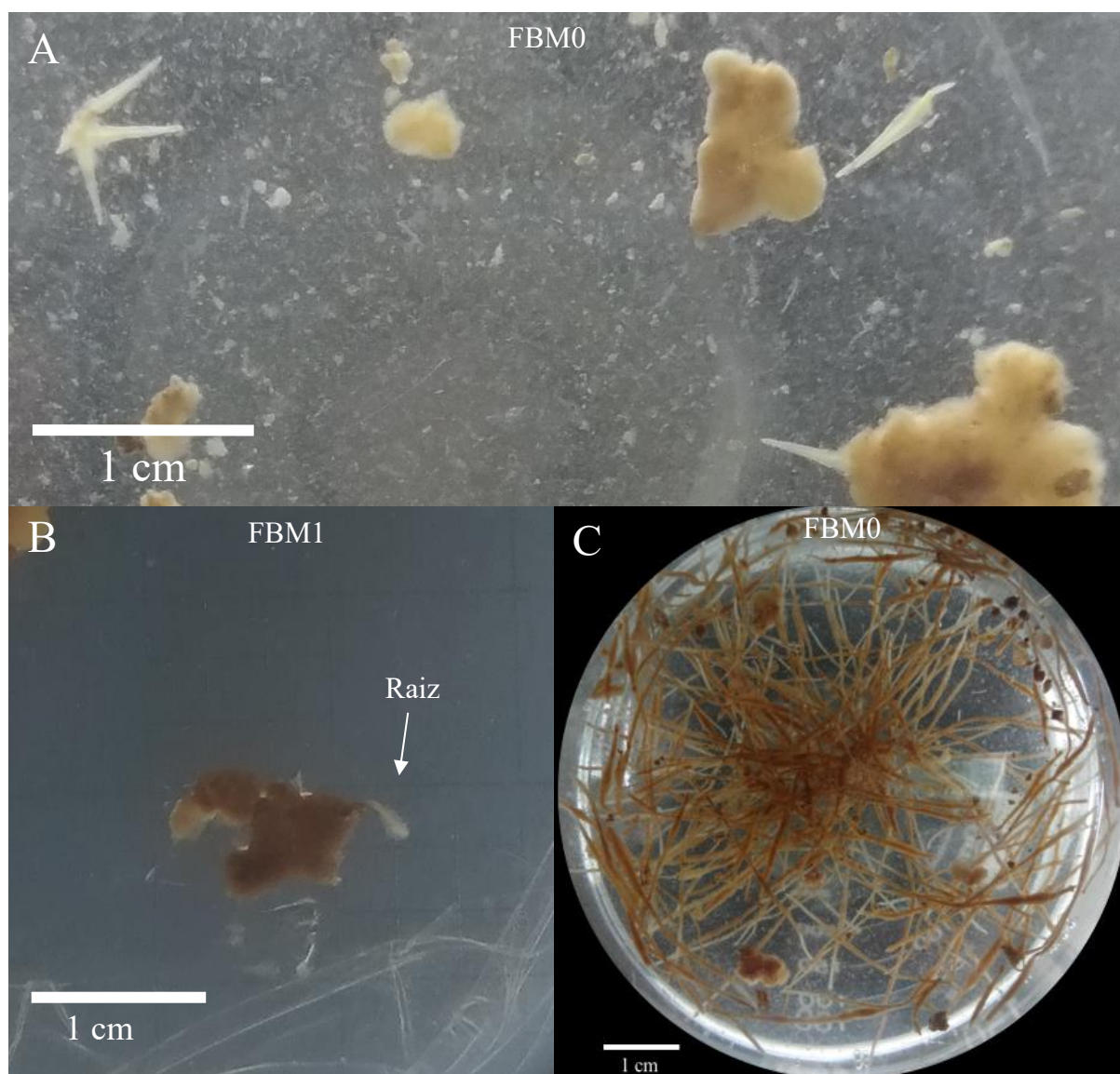
Em investigações realizadas com o organismo modelo *Arabidopsis thaliana*, a formação de raízes por meio de organogênese foi alcançada em meio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) insento de reguladores de crescimentos, os resultados apresentados sugerem que a formação de raízes adventícias pode possuir mecanismos de regulação semelhantes aos desempenhados na formação de calos, uma das evidências relatadas sugerem a expressão de uma série de genes

homeobox WOX11 (WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN11) e WOX15 que são expressos durante a formação de raízes, mas também estão envolvidos durante a formação de calos (HU, XIAOMEI. XU, LIN *et al.*, 2016).

Em *Arabidopsis thaliana*, a produção de raízes foi inibida em explantes com um inibidor de auxína, evidenciando que os genes para indução de raízes são dependentes da presença de auxínas (HU, XIAOMEI. XU, LIN *et al.*, 2016). Pode se inferir que, possivelmente, assim como em *Arabidopsis thaliana*, no tratamento sem a presença da auxína exógena, a endógena, em sua forma ativa no explante, foi suficiente para induzir a formação de raízes no grupo controle FBM0. Com base nas demais observações, as concentrações passíveis de induzir a formação de raízes observadas em suspensão na variedade BRS Juruá estão entre a faixa de 0.0, 0.125, 0.25 e 0.37 mg/L 2,4-D, com a faixa acima 0,5 mg/L de 2,4-D para trabalhos em suspensão sem o requerimento raízes.

Utilizar um modelo de regeneração insento de reguladores de crescimento pode significar que todo o processo dependa apenas do funcionamento de reguladores endógenos, podendo não ser o caso mais adequado quando se trabalha com organismos recalcitrantes à regeneração, tal como o feijão caupi.

FIGURA 9 - **A** - Formação de 4 raízes por vez em suspensão após 8d. **B** - Indução de raízes após repique no tratamento FBM1. **C** - Resultado do Tratamento FBM0 após 54 dias em suspensão.



A ANOVA confirmou que dentre as concentrações testadas na suspensão não houve diferença significativa nos resultados encontrados ($p > 0,05$). Desde a transição entre a fase 4b e 4c (FIGURA 2) que os processos de oxidação começaram a ser notados na suspensão. A oxidação tornou-se ainda mais intensa com o passar dos dias, chegando a escurecer duas repetições da concentração 0,125 mg/L de 2,4-D causando a morte de células e estruturas potencialmente embriogênicas. As raízes também sofreram intensos processos de oxidação, é possível perceber as raízes no início do seu desenvolvimento (FIGURA 9, A) e ao final do cultivo (FIGURA 9, C). No entanto, apesar de afetadas pela oxidação, as mesmas continuaram a se desenvolver normalmente até o final do cultivo.

As amostras em estágio de cordiforme e torpedo foram selecionadas manualmente e inoculadas em FBM líquido, pH 5.8, suplementado com Pro (L-prolina) 20 mg/L, ABA 5 μ M, manitol a 2%, CH (caseína hidrolisada) 150 mg/L, Gln (ácido L-glutâmico-5-amida) 100 mg/L, sem ágar- ágar, suplementado com 0,1 mg/L de 2,4-D e mantidas sob $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% de umidade e fotoperíodo de 16/8 ($36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em um agitador rotatório (90 rpm). As estruturas não demonstraram desenvolvimento regular e satisfatório após 5 dias, não atingindo a estágios posteriores e nem a maturidade para serem submetidos as demais etapas de regeneração.

Os tratamentos iniciais com explante, como a escolha do tamanho, idade da folha, tipo de injúria e estresse induzido e até a possível disposição dele na placa pode ser uma relevante fonte de investigações que contribuem para o sucesso das posteriores etapas. Com a relação a expressão gênica entre raízes e calos, a quantidade ou até a qualidade da massa embriogênica gerada pode possivelmente ser melhorada, se forem aplicados parâmetros que melhor mimetizem as condições para produção de raízes. A luz pode retardar o crescimento de raízes (HOPKINS, William G. *et al.*, 2009), portando, o cultivo na escuridão que é propício ao crescimento de raízes pode se tornar propício a indução de calos e embriões, ao menos inicialmente.

Como uma leguminosa recalcitrante, todo esforço em aumentar a produção e qualidade da massa de calos friáveis, reflete como um esforço positivo em aumentar a possibilidade de regeneração, inclusive, de entender os possíveis mecanismos que estão envolvidos nas vias direta e indireta da ES e organogênese. Assim, toda condição de incubação, pré-tratamento ou tipo de explante que venha melhorar a probabilidade de produção de calos de maior potencial embriogênico, e possa contribuir para a exploração das vias de micropopagação com o feijão caupi, deve ser testada, pois com base nos resultados adquiridos, se pode contribuir para o sucesso no estabelecimento de protocolos de regeneração cada vez mais eficientes

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento utilizando 0,5 mg/L de 2,4-D (FBM0,5) foi o que menos produziu calos por área de explante na etapa de indução, bem como não produziu raízes. As demais concentrações produziram sem diferença significativa entre si, calos de coloração amarelada e aspecto friável, e raízes. A produção de BRS Juruá em meio semissólido segue testes com concentrações de auxina acima de 2,0 mg/L 2,4-D, pois no que consta, as concentrações testadas foram suficientes para indução de calos, mas não inibiu a formação de raízes.

No nosso experimento, se pôde evidenciar a competência da BRS Juruá em responder prontamente em gerar raízes adventícias a partir de células de um órgão (folha) já desenvolvido e a partir de calos de explantes foliares (organogênese direta e indireta), e alcançando a partir de calos friáveis, embriões somáticos em suspensão em diferentes estágios de desenvolvimento (embriogênese indireta). Com a identificação desse tipo de resposta, metodologias relacionadas a organogênese devem ser futuramente testadas na BRS Juruá.

Com sucesso, na suspensão, em concentrações de 0.125, 0.25 e 0.37 mg/L 2,4-D, com estruturas globulares, cordiforme e torpedo encontradas, torna-se evidente a capacidade da BRS Juruá em produzir calos e embriões somáticos, apesar de secundários. Por falta de diferenças significativas em relação às concentrações testadas, outras concentrações de 2,4-D podem ser exploradas suspensão celular, com possíveis concentração que inibam o desenvolvimento de raízes iniciando na faixa de 0,5 mg/L de 2,4-D.

Os valores entre 0.0 e 0.37 mg/L de 2,4-D foram suficientes para induzir a formação de raiz em suspensão. A partir dos dados é possível perceber que na medida em que essa concentração diminui a proliferação de raízes se intensifica, e na medida em que aumenta a presença de raízes diminui.

A seleção de um tamanho menor do explante, que possa refletir na melhora da quantidade e qualidade da produção de calos embriogênicos deve ser um ponto de investigação na realização de trabalhos futuros, assim como a indução de calos no escuro, a adição de antioxidantes ao meio e a diminuição do tempo total em todas as etapas do experimento são pontos a trabalhar modificações.

Com base nos objetivos alcançados e nos resultados levantados, torna-se, o próximo objetivo nos trabalhos com a BRS Juruá via ES, realizar correções na metodologia que propiciem condições para a aquisição de estruturas potencialmente competentes à atravessar todas as etapas em suspensão com sucesso, principalmente para garantir a possibilidade de exploração de todas as fases de desenvolvimento embriogênico e adquirir embriões em bom estado de desenvolvimento, competentes a regeneração completa.

10. REFERÊNCIAS

- AASIM, Muhammad; KHAWAR, Khalid Mahmood; ÖZCAN, Sebahattin. In vitro micropropagation from shoot meristems of Turkish cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cv. Akkiz. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 37, n. 2, p. 149-154, 2008.
- AASIM, Muhammad; KHAWAR, Khalid Mahmood; ÖZCAN, Sebahattin. In vitro micropropagation from plumular apices of Turkish cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cultivar Akkiz. **Scientia horticultrae**, v. 122, n. 3, p. 468-471, 2009.
- ALBERTS, BRUCE., *et al.*, Biologia molecular da célula., 6. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2017.
- ANAND, R. Prem *et al.* High frequency plant regeneration via somatic embryogenesis in cell suspension cultures of cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 36, n. 6, p. 475-480, 2000.
- BRAR, M. S. *et al.* 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.
- BRAR, M. S. *et al.* In vitro shoot tip multiplication of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 33, n. 2, p. 114-118, 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 12 de 28 mar. 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília**, DF, 31 mar. 2008. Seção 1, p. 11-14.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. Ato nº 4, de 19 de agosto de 2010. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília**, DF, 20 ago. 2010. Seção 1, p. 6-7.
- CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. **Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPB**, v. 1, p. 183-260, 1998.
- CARVALHO, J.M.F.C. Aplicación de las técnicas de cultivo in vitro en la multiplicación y mejora del algodón. 1996. 174p. **Tese doutorado**. E.T.S.I.U.P.M., 1996.
- CARVALHO, Julita Maria Frota Chagas; VIDAL, Márcia Soares. **Noções de cultivo de tecidos vegetais**. 1 ed. Campina Grande, PB: EMBRAPA, 2003. 42 p.
- CHAUDHURY, Darshna *et al.* Agrobacterium tumefaciens-mediated high frequency genetic transformation of an Indian cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivar and transmission of transgenes into progeny. **Plant Science**, v. 172, n. 4, p. 692-700, 2007.
- DURZAN, Don J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 6, n. 1, p. 341-378, 1988.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (Goiânia, GO). **Cultivares de arroz, feijão e caupi lançadas em cooperação com o Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão**. Brasília, DF: EMBRAPA-DDT, 1986.

FAOSTAT. Production, Crops: Cow peas, dry. Roma: FAO, 2016. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 07 jul. 2018.

FEHÉR, Attila. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 536, 2019.

FERNANDES, João Batista *et al.* Comportamento ambiental e estabilidade produtiva de cultivares de caupi no Rio Grande do Norte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, n. 11, p. 1555-1560, 1990.

FLOH, Eny Iochevet Segal; SANTA-CATARINA, Claudete; SILVEIRA, Vanildo. Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese in vitro. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 1992-2001, 2007.

FREIRE FILHO *et al.*, BRS Juruá: cultivar de feijão-caupi com grãos de cor verde persistente rica em ferro e zinco. **CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI. Da agricultura de subsistência ao agronegócio: anais**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2009b. p. 349-353.

FREIRE FILHO, F. R. *et al.* BRS Novaera: cultivar de feijão-caupi de porte semi-ereto. **Embrapa Amazônia Oriental-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)** 2008.

FREIRE FILHO, F. R. **Origem, evolução e domesticação do caupi**. 1988.

FREIRE FILHO, F. R.; CRAVO, M. da S.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. de M.; CASTELO, E. de O.; BRANDÃO, E. dos S.; BELMINO, C. S.; MELO, M. I. S. de. BRS Milênio e BRS Urubuquara: cultivares de feijão-caupi para a região Bragantina do Pará. **Revista Ceres**, v. 56, n. 6, p. 749-752, 2009a.

FREIRE FILHO, Francisco Rodrigues, *et al.* **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Embrapa Meio-Norte-Livro científico (ALICE), 2011. 84 p.

FREIRE FILHO, Francisco Rodrigues; CARDOSO, Milton José; DE ARAÚJO, Antônio Gomes. **Caupi: nomenclatura científica e nomes vulgares**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 18, n. 12, p. 1369-1372, 1983.

GEORGE, Edwin F. *et al.* **Plant propagation by tissue culture. Part 1: The technology. Exegetics limited**, 1993.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Apostila de biotecnologia. **Florianópolis**: CCA/UFSC, 2006.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. **Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Culturas de tecidos e transformação genética em plantas**. Brasília: Embrapa-CBAB, 1999. v. 2, p. 533-568.

HOPKINS, William G. *et al.* **Introduction to Plant Physiology**. 4th-edition. 2009.

HU, Xiaomei; XU, Lin. Transcription factors WOX11/12 directly activate WOX5/7 to promote root primordia initiation and organogenesis. **Plant physiology**, v. 172, n. 4, p. 2363-2373, 2016.

- IKEDA-IWAI, Miho *et al.* Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 34, n. 1, p. 107-114, 2003.
- JAIWAL, P.K., 2001. **Current status and future strategies in genetic improvement of cowpea**. *Vegetal Res.* 28, 9–16.
- JEREISSATI, EMMANUEL DE SOUSA. **Indução, isolamento e caracterização de linhagens de calos de feijão de corda (*Vigna unguiculata*)**, 2008.
- JÚNIOR, Aderson Soares De Andrade, *et al.* **Sistemas de produções: cultivo do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**. Teresina: Embrapa Meio-Norte: [s.n.], 2002. 108 p.
- KARTHA, K. K. *et al.* **Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea, and bean**. *Canadian Journal of Botany*, v. 59, n. 9, p. 1671-1679, 1981.
- KLIMASZEWSKA, Krystyna *et al.* Recent progress in somatic embryogenesis of four *Pinus* spp. **Tree For Sci Biotechnol**, v. 1, n. 1, p. 11-25, 2007.
- KORMAWA, P. M.; CHIANU, J. N.; MANYONG, V. M. **Cowpea demand and supply patterns in West Africa: the case of Nigeria**. In: *Proceedings of World Cowpea Conference*. 2000. p. 4-7.
- KULOTHUNGAN, S. *et al.* Somatic embryogenesis in cell suspension culture of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 43, n. 4, p. 385-390, 1995.
- KULOTHUNGAN, S.; GANAPATHI, A.; SHAJAHAN, A.; KATHIRAVAN, K. **Somatic embryogenesis in cell suspension culture of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**. *Israel Journal of Plant Sciences*, v. 43, n. 4, p. 385-390, 1995.
- LAMEIRA, O.A.; LEMOS, O.F.; MENEZES, I.C. de; PINTO, J.E.B.P. **Cultura de tecidos: (manual)**. Belém: **Embrapa Amazônia Oriental**, 2000. 41p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 66).
- LATUNDE-DADA, A. O. **Genetic manipulation of the cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) for enhanced resistance to fungal pathogens and insect pests**. In: *Advances in agronomy*. Academic Press, 1990. p. 133-154.
- LOYOLA-VARGAS, Victor M.; VÁZQUEZ-FLOTA, Felipe (Ed.). **Plant cell culture protocols**. USA: Humana Press, 2006.
- MAO, JING QIN *et al.* **In vitro regeneration of *Vigna unguiculata* (L.) Walp.** cv. Blackeye cowpea via shoot organogenesis. *Plant cell, tissue and organ culture*, v. 87, n. 2, p. 121-125, 2006.
- MARÉCHAL, R.; MASCHERPA, J. M.; STAINIER, F. **Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique**. Boissiera, Geneve, v. 28, p. 1-273, 1978.
- MAZOYER, Marcel e ROUDART, Laurence. **História das Agriculturas do Mundo: do neolítico à crise contemporânea**. São Paulo: Editora UNESP; Brasília, DF: NEAD, 2010.
- MERKLE, Scott A.; DEAN, Jeffrey FD. **Forest tree biotechnology**. *Current opinion in biotechnology*, v. 11, n. 3, p. 298-302, 2000.

- MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. **A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures**. *Physiologia plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- MUTHUKUMAR, B. *et al.* **Genetic transformation of cotyledon explants of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) using *Agrobacterium tumefaciens***. *Plant cell reports*, v. 15, n. 12, p. 980-985, 1996.
- MUTHUKUMAR, B.; MARIAMMA, M.; GNANAM, A. **Regeneration of plants from primary leaves of cowpea**. *Plant cell, tissue and organ culture*, v. 42, n. 2, p. 153-155, 1995.
- NG, N.Q. & MARECHAL, R. Cowpea taxonomy, origin and germ plasm. In: SINGH, S.R. & RACHIE, K.O., eds. **Cowpea research, production and utilization**. Chichester, John Wiley, 1985. p.11-21.
- OBEMBE, O. O.; KADIRI, M.; MACHUKA, J. **Induction of multiple shoots and regeneration from cotyledonary nodes and epicotyls**. In: Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea Production. Proceedings of the World Cowpea Conference III. Ibadan, Nigeria: International Institute of Tropical Agriculture. 2000. p. 32.
- ODUTAYO, O. I. *et al.* **Multiple shoot induction from embryo derived callus cultures of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Walp**. *African Journal of Biotechnology*, v. 4, n. 11, 2005.
- OINAM, G. S.; KOTHARI, S. L. Totipotency of coleoptile tissue in indica rice (*Oryza sativa* L. cv. CH 1039). *Plant Cell Reports*, v. 14, n. 4, p. 245-248, 1995.
- PAIVA, Renato.; PAIVA, Patrícia Duarte De Oliveira. **Cultura de tecidos**. UFLA/Lavras - MG: UFLA/FAEPE, 2001. 95 p.
- 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.
- PHILLIPS, R. D.; MCWATTERS, K. H. **Contribution of cowpeas to nutrition and health**. Food technology (USA), 1991.
- PIJUT, Paula M. *et al.* In vitro propagation of tropical hardwood tree species—A review (2001-2011). **Propagation of Ornamental Plants**. 12 (1): 25-51., v. 12, n. 1, p. 25-51, 2012.
- POPELKA, J. Carlos *et al.* **Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny**. *Plant cell reports*, v. 25, n. 4, p. 304-312, 2006.
- QUIROZ-FIGUEROA, Francisco R. *et al.* **Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 86, n. 3, p. 285, 2006.
- RAMAKRISHNAN, K. *et al.* **Developmental pattern formation of somatic embryos induced in cell suspension cultures of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]**. *Plant cell reports*, v. 24, n. 9, p. 501-506, 2005b.
- RAMAKRISHNAN, K. *et al.* **In vitro somatic embryogenesis from cell suspension cultures of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]**. *Plant cell reports*, v. 24, n. 8, p. 449-461, 2005a.
- ROCHA, Maurisrael de Moura., SILVA, Kaesel Jackson Damasceno., JUNIOR, Jose Angelo Nogueira de Menezes. SISTEMAS DE PRODUÇÃO EMBRAPA. **Cultivo de feijão-caupi**, 2ª Ed. mar/2017. Disponível em:

<https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducao6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_column_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=9109&p_r_p_-996514994_topicoId=10506>. Acesso em: 07 jul. 2018.

SAHOO, L.; SUGLA, T.; SINGHS, N.D.; SONIA, Nijasure, P.; GULATI, A., SINGH, R.P.,

SANTOS, EK dos. **Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais**. FREITAS, LB; BERED, F. Genética e evolução vegetal. Porto Alegre: 1ª Ed. UFRGS, p. 415-444, 2003.

SOMERS, David A.; SAMAC, Deborah A.; OLHOFT, Paula M. **Recent advances in legume transformation**. Plant Physiology, v. 131, n. 3, p. 892-899, 2003.

SOUZA, N. A de; FERNANDES, J. B. **BR 13-Caicó: nova cultivar de feijão macassar para o Rio Grande do Norte**. Natal: ENPARN, 1989.

SOUZA, N. A. de; FERNANDES, J. B. **BR 15-Asa Branca: nova cultivar de feijão macassar para o Rio Grande do Norte**. Natal: EMPARN, 1990.

STASOLLA, Claudio; YEUNG, Edward C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, n. 1, p. 15-35, 2003.

STEELE, W.M. & MEHRA, K.L. **Structure, evolution, and adaptation to farming systems and environments in *Vigna***, p. 393-404, 1980.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3rd ed Sinauer Associates Inc Publishers. Sunderland, MA. 690 p, 2002.

TAUTORUS, T. E.; FOWKE, L. C.; DUNSTAN, D. I. **Somatic embryogenesis in conifers**. Canadian Journal of Botany, v. 69, n. 9, p. 1873-1899, 1991.

THORPE, Trevor. **History of plant tissue culture**. In: **Plant Cell Culture Protocols**. Humana Press, Totowa, NJ, 2012. p. 9-27.

VALENZUELA, Hector, SMITH, Jody. 2002. **Cowpea**. Honolulu (HI): University of Hawaii. 3 p. (Sustainable Agriculture; SA-GM-6).

VAN LE, B. U. I. et al. **Direct whole plant regeneration of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] from cotyledonary node thin cell layer explants**. Journal of plant physiology, v. 159, n. 11, p. 1255-1258, 2002.

VIEITEZ, Ana M. et al. Application of biotechnological tools to Quercus improvement. **European Journal of Forest Research**, v. 131, n. 3, p. 519-539, 2012.

ZIMMERMAN, J. Lynn. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 5, n. 10, p. 1411, 1993.