

IONE SALGADO MARTINS

Cultura de tecidos de *Phaseolus vulgaris* L.

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da UNICAMP para a
obtenção do título de Mestre
em Biologia.

Orientador: Prof. MARO RAN-IR SÖNDAHL

Campinas/1982

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

DNA BASE 1981

Ao meu Esposo e à minha Filha

Dedico este Trabalho

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais e sogros pelo apoio e incentivo durante a realização deste trabalho
- Ao Dr. MARO RAN-IR SÖNDAHL pela valiosa colaboração como orientador deste trabalho científico.
- Aos Professores ANTONIO CELSO NOVAES DE MAGALHAES, ROLF DIETER ILLG e WILLIAM JOSÉ DA SILVA pelas sugestões feitas a este trabalho.
- Ao Instituto Agronômico de Campinas pela concessão do estágio de treinamento junto ao laboratório de cultura de tecidos da Seção de Genética, possibilitando a realização deste trabalho experimental.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo auxílio financeiro.
- À SIRLEI APARECIDA FRANCISCO, SÔNIA APARECIDA FERRAZ DE CAMPOS, MARLENE MACARELLI DE GODOY e ADEMIR BENATI pelos serviços de laboratório.
- À ELIANE DE FÁTIMA ORTOLAN LEAL pelos serviços de secretaria.
- À Seção de Genética pelo fornecimento do material vegetal , especialmente ao Dr. ANTONIO SIDNEY POMPEU.
- Aos colegas do Departamento de Bioquímica da UNICAMP, especialmente ao Dr. AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA, que muito tem contribuído para minha formação profissional.
- Ao amigo JOÃO MANETTI FILHO pelo apoio e incentivo.
- Ao acadêmico KAZUMITSU MATSUMOTO pela colaboração prestada nos serviços de laboratório.

- Ao meu irmão ARMANDO SALGADO JÚNIOR pelo fornecimento das fo
tocópias.
- A todos que direta ou indiretamente colaboraram com este traba
balho e com minha formação profissional.

ÍNDICE

PÁGINA

I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	7
1. <u>Regeneração em Leguminosas</u>	8
2. <u>Cultura de Tecidos de <i>Phaseolus</i> spp.</u>	30
2.1. Crescimento de calos e citodiferenciação	30
2.2. Estudos citológicos e bioquímicos ...	35
2.3. Efeitos de radiação no crescimento de calos	41
2.4. Estudos fisiológicos	42
2.5. Aplicações em fitopatologia	43
2.6. Isolamento e cultura de protoplastos.	45
2.7. Organogênese	45
2.8. Cultura de embrião e meristema	46
III. MATERIAL E MÉTODOS	49
1. <u>Material Vegetal</u>	49
2. <u>Preparo dos Explantes</u>	49
3. <u>Meios e Condições de Cultura</u>	53
4. <u>Esterilização do Material Vegetal</u>	53
4.1. Testes de esterilização de sementes ..	53
4.2. Testes de esterilização de folhas trifolioladas ..	54
5. <u>Estabelecimento de Cultura Sólida</u>	54
5.1. Cultura de diferentes explantes	64
5.2. Cultura em diferentes interações de reguladores de crescimento	64
5.3. Cultura de diferentes cultivares	65
6. <u>Estabelecimento de Cultura Líquida</u>	66
7. <u>Estabelecimento da Cultura de Ápice Meristemático</u>	67

8.	<u>Cultura de Ápices Meristemáticos de 36 Cultivares de <i>Phaseolus vulgaris</i></u>	67
8.1.	Indução de calos	67
8.2.	Cultura líquida	67
8.3.	Indução de morfogênese	63
8.4.	Cultura de ápices meristemáticos de 'Palmital Precoce'	69
9.	<u>Testes de Meios de Cultura Regenerativos em Leguminosas</u>	69
10.	<u>Cultura de Segmentos Nodais</u>	71
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO ..	74
1.	<u>Esterilização do Material Vegetal</u>	74
1.1.	Testes de esterilização de sementes .	75
1.2.	Testes de esterilização de folhas trifolioladas	80
2.	<u>Estabelecimento de Cultura Sólida</u>	84
2.1.	Cultura de diferentes explantes	84
2.2.	Cultura em diferentes interações de reguladores de crescimento	100
2.3.	Cultura de diferentes cultivares	118
3.	<u>Estabelecimento de Cultura Líquida</u>	128
4.	<u>Estabelecimento da Cultura de Ápice Meristemático</u>	131
5.	<u>Cultura de Ápices Meristemáticos de 36 Cultivares da <i>Phaseolus vulgaris</i></u>	133
5.1.	Indução de calos	133
5.2.	Cultura líquida	134
5.3.	Indução de morfogênese	141
5.4.	Cultura de ápices meristemáticos de 'Palmital Precoce'	150
6.	<u>Testes de Meios de Cultura Regenerativos em Leguminosas</u>	153
7.	<u>Cultura de Segmentos Nodais</u>	162

V. CONCLUSÕES	175
VI. RESUMO	180
VII. ABSTRACT	184
VIII. APÊNDICE	188
1. <u>Morfogênese in vitro</u>	188
1.1. Desenvolvimento de meristemas	188
1.2. Organogênese	189
1.3. Embriogênese Somática	190
2. <u>Cultura de Tecidos de Leguminosas</u>	191
2.1. <i>Acacia koa</i>	191
2.2. <i>Acachis</i> spp.	192
2.3. <i>Cajanus cajan</i>	193
2.4. <i>Cicer arietinum</i>	194
2.5. <i>Crotalaria</i> spp.	195
2.6. <i>Glycine</i> spp.	197
2.7. <i>Indigofera enneaphylla</i>	203
2.8. <i>Lathyrus sativus</i>	204
2.9. <i>Lotus</i> spp.	206
2.10. <i>Medicago sativa</i>	210
2.11. <i>Pisum sativum</i>	217
2.12. <i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	220
2.13. <i>Stylosanthes hamata</i>	222
2.14. <i>Trifolium alexandrinum</i>	223
2.15. <i>Trifolium incarnatum</i>	224
2.16. <i>Trifolium pratense</i>	224
2.17. <i>Trifolium repens</i>	227
2.18. <i>Trigonella</i> spp.	230
2.19. <i>Vicia faba</i> ...	232
2.20. Outras leguminosas	234
IX. BIBLIOGRAFIA	236

ABREVIATÖES UTILIZADAS

Reguladores de Crescimento (RCs)

Auxinas

IAA	: ácido indol-acético
NAA	: ácido naftaleno-acético
IBA	: ácido indol-butiúico
2,4-D	: ácido 2,4--dicloro-fenoxi-acético
picloram	: ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico

Citocininas

KIN	: 6-furfuril-aminopurina
6-BA	: 6-benzil-adenina
2ip	: 2-isopentenil-adenina
Z	: zeatina

Outros

Ad	: Adenina
3-AP	: 3-amino-piridina
GA ₃	: ácido giberélico
2,4,5-T	: ácido 2,4,5-triclorofenoxi-acético

Meios de Cultura

A	: KAO & MICHAYLUK (1980)	MS-M	: CHENG (1977)
B5	: GAMBORG <i>et al.</i> (1968)	NT	: NAGATA & TAKEBE (1971)
B5-M1	: SWANSON & TOMES (1980)	PC-12	: PHILLIPS & COLLINS (1979a)
B5-M2	: CHENG <i>et al.</i> (1980)	Phillips	: PHILLIPS (1974b)
Blaydes	: BLAYDES (1966)	Phillips-M	: OSWALD <i>et al.</i> (1977)
Bonner	: BONNER & DEVIRIAN (1939)	RM	: LINSMAIER & SKOOG (1965)
CS-5	: SCOWCROFT & ADAMSON (1976)	SH	: SCHENK & HILDEBRANDT (1972)
Heller	: HELLER (1953)	SL	: PHILLIPS & COLLINS (1980)
Kao	: KAO & MICHAYLUK (1975)	UM	: UCHIMIYA & MURASHIGE (1974)
Miller	: MILLER (1965)	67-V	: VELIKY & MARTIN (1970)
MS	: MURASHIGE & SKOOG (1962)	White	: WHITE (1943)

Aditivos Complexos

AC	: água de coco	EM	: extrato de malte
CH	: caseína hidrolizada	EL	: extrato de levedura

ÍNDICE DE TABELAS

	PÁGINA
TABELA 1 - Espécies de Leguminosas regeneradas <i>in vitro</i> a partir de culturas sólidas	10
TABELA 2 - Espécies de Leguminosas obtidas <i>in vitro</i> pelo desenvolvimento de meristemas (apical ou axilar)	15
TABELA 3 - Espécies de Leguminosas regeneradas <i>in vitro</i> a partir de cultura líquida	27
TABELA 4 - Cultivares de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. utilizados nas culturas <i>in vitro</i> de tecidos de feijão	50
TABELA 5 - Concentrações dos sais minerais de MS (MURASHIGE & SKOOG 1962), PC-L2 (PHILLIPS & COLLINS 1979), B5 (GAMBORG <i>et al.</i> 1968) e MM (MOREL & MILLER 1964)	52
TABELA 6 - Teste 1 para esterilização de sementes de <i>P. vulgaris</i> cv. Moruna	55
TABELA 7 - Teste 2 para esterilização de sementes de <i>P. vulgaris</i> cv. Moruna	56
TABELA 8 - Teste 1 para esterilização de folhas trifolioladas de <i>P. vulgaris</i> cv. Moruna	57
TABELA 9 - Teste 2 para esterilização de folhas trifolioladas de <i>P. vulgaris</i> cv. Moruna	57
TABELA 10 - Meios de cultura utilizados para o cultivo de tecidos de feijão	59

TABELA 11 - Combinações de citocininas utilizadas no meio de cultura sólida XI ...	60
TABELA 12 - Composição dos meios de cultura (primário e secundário) utilizados para testar a capacidade regenerativa em <i>Phaseolus vulgaris</i> . A espécie e respectiva fonte do explante nas quais metodologia semelhante levou à regeneração de plantas <i>in vitro</i> são também apresentadas, com as respectivas referências	70
TABELA 13 - Resultado do teste 1 para esterilização de sementes de <i>P. vulgaris</i> cv. Moruna. Leitura feita após 7 dias de germinação em frascos com algodão embebido em água, no escuro	76
TABELA 14 - Resultado do teste 2 para esterilização de sementes de <i>P. vulgaris</i> cv. Moruna. Leitura feita após 7 dias de germinação em frascos com algodão embebido em água, no escuro ..	77
TABELA 15 - Resultados do teste 1 para esterilização de folhas trifolioladas de <i>P. vulgaris</i> cv. Moruna. Leitura feita após 7 dias de permanência dos explantes foliares no escuro, em placas de Petri com meio de cultura de incubação	81
TABELA 16 - Resultado do teste 2 para esterilização de folhas trifolioladas de <i>P. vulgaris</i> cv. Moruna. Leitura feita após 7 dias de permanência dos explantes foliares no escuro, em placas de Petri com meio de cultura de incubação	82

TABELA 17 - Respostas de crescimento de calos em 36 cultivares de <i>Phaseolus vulgaris</i> . Calos obtidos a partir do ápice meristemático cultivado em meio básico de MS acrescido de IAA (10 µM), 2,4-D (5 µM) e KIN (10 µM): (1) crescimento insatisfatório, (2) crescimento médio e (3) crescimento ótimo. Média de 16 a 20 repetições.	135
TABELA 18 - Frequência de formação de gemas adventícias em 12 cultivares de <i>Phaseolus vulgaris</i> . Ápices meristemáticos cultivados em diferentes condições de desenvolvimento	146
TABELA 19 - Respostas de crescimento <i>in vitro</i> de tecidos de <i>Phaseolus vulgaris</i> , utilizando a metodologia descrita para <i>Crotalaria juncea</i>	154
TABELA 20 - Respostas de crescimento <i>in vitro</i> de tecidos de <i>Phaseolus vulgaris</i> , utilizando a metodologia descrita para <i>Indigofera enneaphylla</i>	155
TABELA 21 - Respostas de crescimento <i>in vitro</i> de tecidos do <i>Phaseolus vulgaris</i> , utilizando metodologia descrita para <i>Lathyrus sativus</i>	156
TABELA 22 - Respostas de crescimento <i>in vitro</i> de tecidos do <i>Phaseolus vulgaris</i> , utilizando metodologia descrita para <i>Lathyrus sativus</i>	157
TABELA 23 - Respostas de crescimento <i>in vitro</i> de tecidos de <i>Phaseolus vulgaris</i> utilizando metodologia descrita para <i>Medicago sativa</i>	158

TABELA 24 - Respostas de crescimento <i>in vitro</i> de tecidos de <i>Phaseolus vulgaris</i> , utilizando metodologia descrita para <i>Pisum sativum</i>	159
TABELA 25 - Respostas de crescimento <i>in vitro</i> de tecidos de <i>Phaseolus vulgaris</i> , utilizando metodologia descrita para <i>Stylosanthes hamata</i>	160
TABELA 26 - Respostas de crescimento <i>in vitro</i> de tecidos de <i>Phaseolus vulgaris</i> , utilizando metodologia descrita para <i>Trifolium alexandrinum</i>	161
TABELA 27 - Desenvolvimento de gemas axilares em nós cotiledonares (nó I) e nós de folhas primárias (nó II) de Plântulas de <i>Phaseolus vulgaris</i>	165
TABELA 28 - Desenvolvimento de gemas axilares em regiões nodais de plântulas de <i>Phaseolus vulgaris</i>	167
TABELA 29 - Altura e frequência de gemas axilares em segmentos nodais de plântulas de <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Moruna. Dados de 15-20 repetições	173

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

FIGURA 1 - Caracterização de crescimento de calos de tecidos de <i>Phaseolus vulgaris</i> . Avaliação visual por volume de calos com notas variando de 1 a 5: (A) calos de hipocótilos; (B) calos de folhas.....	62
FIGURA 2 - Caracterização da diferenciação de raízes em calos de <i>Phaseolus vulgaris</i> . Avaliação visual por intensidade de enraizamento com notas variando de 1 a 3	63
FIGURA 3 - Caracterização de crescimento de calos de <i>Phaseolus vulgaris</i> derivados da cultura de ápices meristemáticos. Avaliação visual por volume de calos, com notas variando de 1 a 3 ...	63
FIGURA 4 - Crescimento de calos e raízes a partir de hipocótilos de <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Moruna induzido por KIN e 2,4-D, após 25 dias de cultura no escuro. Dados de 7 a 10 repetições. Avaliação por índice de crescimento.	87
FIGURA 5 - Crescimento de calos e raízes a partir de cotilédones de <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Moruna induzido por KIN e 2,4-D, após 26 dias de cultura no escuro. Dados de 7 a 10 repetições. Avaliação por índice de crescimento.	88
FIGURA 6 - Crescimento de calos e raízes a partir de embriões de <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Moruna induzido por KIN e	

2,4-D, após 26 dias de cultura no escuro. Dados de 7 a 10 repetições. Avaliação por índice de crescimento . 89

FIGURA 7 - Crescimento de calos a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido por KIN e 2,4-D, após 25 dias de cultura no escuro. Dados de 7 a 10 repetições. Avaliação por índice de crescimento..... 90

FIGURA 8 - Crescimento de calos a partir de folhas trifolioladas de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido por KIN e 2,4-D após 25 dias de cultura no escuro. Dados de 7 a 10 repetições. Avaliação por índice de crescimento 91

FIGURA 9 - Desenvolvimento de gemas apicais de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna. (A) Cultura de embrião; (B) Cultura de ápices meristemáticos nos meios: (I) NOVAK (1977), (II) MOREL & MILLER (1964), (III) KARTHA & GAMBORG (1975) e (IV) KARTHA *et al.* (1979)..... 99

FIGURA 10 - Crescimento de calos a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido por 6-BA e 2,4-D após 29 dias de cultura no escuro. Dados de 8 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido 102

FIGURA 11 - Crescimento de calos a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido por 2ip e 2,4-D , após 29 dias de cultura no escuro. Dados de 9 a 10 repetições. Avaliação

pelo aumento de peso fresco do tecido 103

FIGURA 12 - Crescimento de calos a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido por KIN e 2,4-D, após 29 dias de cultura no escuro. Dados de 7 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido.... 104

FIGURA 13 - Crescimento de calos e raízes a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido por 6-BA e IAA, após 29 dias de cultura no escuro. Dados de 8 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido (calos) e pela presença ou ausência de raiz. 105

FIGURA 14 - Crescimento de calos e raízes a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido por 2ip e IAA, após 29 dias de cultura no escuro. Dados de 9 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido (calos) e pela presença ou ausência de raiz.. 106

FIGURA 15 - Crescimento de calos e raízes a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido por KIN e IAA, após 29 dias de cultura no escuro. Dados de 9 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido (calos) e pela presença ou ausência da raiz ... 107

- FIGURA 16 - Crescimento de calos a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Piratã-1 induzido por 6-BA e 2,4-D após 29 dias de cultura no escuro. Dados de 8 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido 120
- FIGURA 17 - Crescimento de calos a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Roxinho induzido por 6-BA e 2,4-D, após 29 dias de cultura no escuro. Dados de 8 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido..... 121
- FIGURA 18 - Crescimento de calos a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Carioca induzido por 6-BA e 2,4-D, após 29 dias de cultura no escuro. Dados de 8 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido..... 122
- FIGURA 19 - Crescimento de calos a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Puebla-153 induzido por 6-BA e 2,4-D, após 29 dias de cultura no escuro. Dados de 8 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido..... 123
- FIGURA 20 - Crescimento de calos a partir de folhas primárias de diferentes cultivares de *Phaseolus vulgaris* cultivados na presença de 6-BA (5 μ M) e 2,4-D (1 - 50 μ M) .
- FIGURA 21 - Crescimento de calos a partir de fo

lhas trifolioladas de *Phaseolus vulgaris* cv. Piratã-1 induzido por KIN e 2,4-D, após 25 dias de cultura no escuro. Dados de 8 a 10 repetições. Avaliação por índice de crescimento.. 126

FIGURA 22 - Cultura líquida de células de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna. (A) Células em suspensão derivadas de calos de hipocótilos, cultivadas em meio PC-L2 contendo 2,4-D (10 µM) na presença de 2 g/l de caseína hidrolizada (1) ou na ausência de caseína (2). (B) Estruturas globulares originadas em cultura líquida, estabelecida a partir de calos derivados de ápices meristemáticos 130

FIGURA 23 - Respostas de crescimento de ápices meristemáticos de *Phaseolus vulgaris* cultivados em meio B5 com 6-BA (0,5 µM). Leitura após 45 dias de cultura sob luz: (1) Moruna, (2) Piratã-1, (3) Roxinho, (4) Puebla-153, (5) Linea-29, (6) Carioca, (7) Chumbinho, (8) Catu, (9) Bico de Ouro, (10) Fartura, (11) Roxote e (12) Mulatinho .. 142

FIGURA 24 - Respostas de crescimento de ápices meristemáticos de *Phaseolus vulgaris* cultivados em meio B5 com 6-BA (0,5 µM). Leitura após 45 dias de cultura sob luz: (13) Rosinha, (14) Sujo, (15) Coco Blanchi, (16) Nep-2, (17) Palmital Precoco, (18) 60-Dias, (19) N-203, (20) Jules, (21) Cavalo Xaxim, (22) Red Kloud, (23) Brasil e (24) Copinha Manteiga. 143

FIGURA 25 - Respostas de crescimento de ápices meristemáticos de *Phaseolus vulgaris* cultivados em meio B5 com 6-BA (0,5 µM). Leitura após 45 dias de cultura sob luz : (25) Sacavem, (26) Linea-17, (27) Gold Korrel, (28) Tupi, (29) Actopan, (30) Rapé, (31) 73 Vul, (32) Bayo e (33) Mamoninha.

144

FIGURA 26 - Formação de gemas adventícias múltiplas e desenvolvimento de plântulas de *Phaseolus vulgaris* cv. Palmital Precoce, a partir de cultura de ápices meristemáticos. (A) Crescimento de calos, indução do desenvolvimento de gemas adventícias, desenvolvimento de gema apical e diferenciação de raízes durante cultura secundária (meio sem RC) de acordo com diferentes tratamentos de RCs durante cultura primária (ensaio dialélico). (B) Gemas em desenvolvimento após quatro semanas em cultura terciária (note o crescimento assincrônico das gemas derivadas da cultura de um único sub-meristema). (C) Desenvolvimento de uma planta de feijão de 12 semanas de idade, derivada de gema adventícia, crescendo em substrato de areia-vermiculite, em lugar sombreado na estufa...

151

FIGURA 27 - Gemas axilares desenvolvidas em nós cotiledonares de plântulas de *Phaseolus vulgaris* cv. Puebla-153, após 18 dias de cultura dos segmentos nodais.....

160

I. INTRODUÇÃO

As técnicas de cultura de tecidos envolvem o isolamento de células, tecidos ou órgãos vegetais e sua inoculação em condições assépticas, em meios nutritivos próprios, sob condições controladas, com o objetivo de obter rápida multiplicação de células e tecidos e completa recuperação de plantas. Estas culturas *in vitro* vem demonstrando que os processos envolvidos na diferenciação celular, desenvolvimento de meristemas, crescimento de órgãos e formação de plantas inteiras são semelhantes aos sistemas *in vitro*.

Recentes progressos no campo da cultura de células e tecidos vegetais tem tornado esta área de pesquisa uma das mais dinâmicas e promissoras em biologia experimental. Culturas *in vitro* estão sendo utilizadas como instrumento para o estudo de vários problemas básicos, não apenas em fisiologia vegetal, biologia celular e genética, mas também na agricultura, silvicultura, horticultura e indústria.

A obtenção de plantas *in vitro* pode ocorrer através da cultura de explantes meristemáticos ou não-meristemáticos. A diferença entre estas duas fontes de explantes é que explantes meristemáticos contêm centros organizados já definidos para seguir em um padrão de desenvolvimento até a formação final de plântulas. Explantes não meristemáticos contêm células possíveis de seguirem caminhos alter

ativos de desenvolvimento. Células não meristemáticas podem rediferenciar *in vitro* tornando-se comprometidas a um desenvolvimento típico de formação de plântulas, via organogênese ou embriogênese somática, quando submetidas a condições apropriadas de cultura.

O interesse pelo cultivo de leguminosas tem aumentado nestes últimos 20 anos, uma vez que estas espécies fornecem importantes fontes de proteínas vegetais, além de serem responsáveis pelo enriquecimento do nitrogênio do solo, através de simbiose com *Rhizobium* spp. Além disso, a cultura de tecidos de leguminosas teria um alto valor para a pesquisa agrônoma visto a possibilidade de hibridação somática entre espécies leguminosas e não leguminosas de grande valor agrônomo.

A regeneração de plantas tem sido bastante difícil entre as leguminosas. Os melhores exemplos de regeneração estão entre as leguminosas forrageiras, em comparação com as leguminosas de semente. Vinte e quatro espécies de leguminosas foram regeneradas *in vitro* até o presente: *Arachis hypogaea*, *A. villosa*, *Cajanus cajan*, *Cicer arietinum*, *Erotalaria burhia*, *C. juncea*, *C. medicaginia*, *Glycine canescens*, *G. tomentella*, *Indigofera enneaphylla*, *Lathyrus sativus*, *Lotus caucasicus*, *L. corniculatus*, *Medicago sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Psophocarpus tetragonolobus*, *Stylosanthes hamata*, *Trifolium alexandrinum*, *T. incarnatum*, *T. pratense*, *T. repens*, *Trigonella corniculata*, *T. foenum-graecum*. No entanto, na maioria dos casos, a regeneração o

correu em baixa frequência, ou foi limitada pela fonte de explante.

Diferentemente da maioria das famílias vegetais, pouca generalização pode ser feita, com relação ao papel dos RCs na regeneração das leguminosas. A maioria das leguminosas de semente tem uma maior propensão para a formação de raiz do que para a regeneração de gemas. A regeneração de plantas em leguminosas de semente tem sido obtida ou pela redução da concentração de auxina ou pelo aumento da concentração de citocinina. As exigências hormonais são menos específicas para leguminosas forrageiras.

As gemas podem ser enraizadas muito rapidamente em leguminosas de semente. Em leguminosas forrageiras a indução de raízes em gemas desenvolvidas tem sido mais difícil.

O estabelecimento de suspensões celulares a partir de calos já foi relatado para a maioria das espécies leguminosas estudadas *in vitro*. Entretanto, descrição da sequência reversa de células em suspensão para calos e plantas, metodologia imprescindível para os trabalhos de indução de mutantes e seleção, ~~tem~~ sido muito pouco frequentes. Apenas para cinco leguminosas forrageiras tal metodologia foi definida: *Lotus corniculatus*, *Medicago sativa*, *Trifo*lium alexandrinum, *T. pratense* e *T. repens*.

A recuperação de plantas a partir de protoplastos foi obtida apenas para duas leguminosas (*Medicago sativa* e *Trifolium repens*) apesar do frequente uso de proto

plastos de leguminosas em trabalhos de hibridação somática.

Plantas leguminosas tem sido obtidas a partir de calos derivados de ápice meristemático, hipocótilo, cotilédone, folha, caule, radícula, ovário, embrião, antera, células em suspensão e protoplastos. Tem sido observado que a frequência e a velocidade da resposta regenerativa são influenciadas pela fonte de explante e pelo genótipo. Além disso, o aumento da frequência regenerativa tem sido obtido pela seleção para regeneração. As distintas variações genotípicas para a regeneração e a relativa facilidade com que a seleção pode aumentar a frequência de regeneração sugere que, pelo menos entre as leguminosas, a habilidade de recuperar plantas teria um controle genético.

Em diferentes gêneros de leguminosas, como espécies de *Glycine* e *Arachis*, a frequência de regeneração de plantas é maior em espécies selvagens do que em plantas cultivadas. Se alta frequência de regeneração for controlada por um número limitado de genes em espécies selvagens, será possível usar o melhoramento convencional para transferir a habilidade de regeneração para espécies cultivadas.

Em muitos trabalhos de recuperação de plantas leguminosas *in vitro*, não existe uma descrição do processo regenerativo que está ocorrendo. Muitas vezes a recuperação de plantas a partir de tecidos meristemáticos é classificada com organogênese. Estes casos entretanto são exemplos típicos de desenvolvimento e/ou multiplicação de centros meristemáticos pré-existent no explante. Por orga

nogênese, entende-se o processo regenerativo a partir de células em cultura, que sob condições apropriadas formam indivíduos *de novo*, a partir de gemas adventícias. Entre as espécies em que plantas foram recuperadas através da cultura de tecidos meristemáticos encontram-se: *Acacia koa*, *Cicer arietinum*, *Glycine max*, *Lotus corniculatus*, *Phaseolus aureus*, *P. mungo*, *Pisum sativum*, *Trifolium pratense* e *Vicia faba*.

Até o presente, a regeneração em leguminosas ocorreu via organogênese. Em duas espécies embriogênese ocorre concomitantemente com organogênese. Em *T. pratense* embriogênese pode ocorrer dependendo das condições de cultura. Em *M. sativa* os dois processos regenerativos parecem ocorrer sob condições idênticas de cultura. A alta frequência de regeneração por organogênese em leguminosas sugere um controle genético para este processo de diferenciação.

Para que se possa avaliar o resultado de um trabalho em cultura de tecido, visando a regeneração de plantas, as frequências regenerativas devem ser dadas em termos de número de plântulas regenerados por calo ou explante, bem como a frequência das culturas que responderam aos tratamentos. Em leguminosas muitas vezes a frequência regenerativa é dada apenas sob a forma de "total de plantas recuperadas". Outras vezes, nem são fornecidos os números de plantas recuperadas das culturas, o que limita a avaliação do sucesso descrito pelos autores.

Este projeto de pesquisa foi elaborado visando o desenvolvimento de técnicas de cultura *in vitro* em

Phaseolus vulgaris L., com ênfase na descrição de uma metodologia que permita a diferenciação de tecidos de feijão, a fim de permitir futuras aplicações em Genética e Melhoramento desta espécie. A escolha deste material vegetal justifica-se pela importância alimentar, pelas dificuldades de exploração agrícola extensiva e pelo pequeno avanço metodológico das técnicas *in vitro* desta espécie. A importância alimentar do feijão no Brasil pode ser avaliada pelo alto consumo per-capita (25 kg/hab/ano), pela área colhida (3,5 milhões de hectares/ano) e pela produção total anual (2,2 milhões de toneladas) nestes últimos anos (VIEIRA 1978). Existem inúmeros problemas a serem solucionados para o cultivo extensivo desta espécie, a fim de garantir uma maior produção mundial e maior estabilidade das safras. Esta cultura sofre uma alta incidência de moléstias, não permite colheita mecanizada e tem muito pouca resistência a períodos de seca. Até o presente, as técnicas de cultura de tecidos vegetais não permitem a diferenciação de novas plantas de feijão, limitando assim a manipulação genética *in vitro* desta espécie. Mais ainda, sabe-se que os meios e condições de cultura *in vitro* são específicos a nível de cultivares, havendo portanto necessidade de desenvolvimento metodológico para a cultura de tecidos de cultivares comercialmente importantes para o Brasil.

II. REVISÃO DE LITERATURA

Há oitenta anos atrás, em um trabalho, hoje considerado profético e clássico, o botânico alemão GOTTLIEB HABERLANDT (1902) discutiu a possibilidade de demonstrar a totipotência de células somáticas através da cultura de tecidos. O próprio conceito de totipotência estava inerente na Teoria Celular de SCHLEIDEN (1838) e SCHWANN (1839) e foi popularizado logo em 1858 por VIRCHOW com seu famoso aforismo "omnis cellula e cellula" (cada célula de uma célula). Os primeiros sucessos em cultivar células vegetais foram obtidos com a cultura continua de raízes *in vitro* (KOTTE 1922, ROBBINS 1922, WHITE 1934, 1937, 1939). As primeiras descrições de cultura prolongada de tecidos não organizados de vegetais foram apresentadas independentemente por GAUTHRET (1939), NOBECOURT (1937, 1938, 1939) e WHITE (1939). Estas técnicas foram resumidas nos dois primeiros livros texto sobre o assunto, editados por WHITE (1954) e GAUTHRET (1959). Dois eventos fundamentais que ocorreram na botânica experimental e na fisiologia vegetal durante o período de 1955 a 1965, levaram à demonstração da totipotência em células de vegetais superiores. O primeiro foi a descoberta da regulação hormonal no crescimento e formação de órgãos em vegetais, por SKOOG & MILLER (1957) e o segundo foi o desenvolvimento de técnicas experimentais possibilitando a cultura de tecidos (REINERT 1958a, b, 1959), suspensões celulares (STEWART *et al.* 1958) e eventualmente células isoladas (VASIL & HILDE

BRANDT 1965a, b, 1967; VASIL & VASIL, 1972) levando à regeneração de plantas *in vitro*. Todos estes trabalhos foram feitos com a cultura de tecidos de cenoura (*Daucus carota* L.) e de fumo híbrido (*Nicotiana tabacum* L. x *N. glutinosa* L.). As múltiplas aplicações das técnicas de cultura de órgãos e cêlulas vegetais ficaram bem demonstradas após o Primeiro Congresso Internacional (WHITE 1963) realizado na Universidade Estadual da Pennsylvania - USA. Os Congressos Internacionalis subsequentes realizados em Strasbourg, Alemanha - 1970 ; Leicester, Inglaterra (STREET 1974) e Calgary, Canadá (THORPE 1978) vieram a consolidar e ampliar os trabalhos pioneiros.

Trabalhos experimentais nesta área vem sendo realizados com as mais diferentes espécies vegetais , sendo atualmente a regeneração de plantas a partir da cultura de tecidos, comumente encontrada entre as Angiospermas - (VASIL *et al.* 1979, EVANS *et al.* 1981). Entretanto, a maioria das espécies cultivadas de grande importância agronômica não são regeneradas com a facilidade dos sistemas modelo, ou seja, fumo e cenoura. Antes que as técnicas de cultura de cêlulas e tecidos vegetais possam ser aplicadas na propagação ou melhoramento de espécies de importância agrícola, protocolos eficientes para a regeneração de plantas devem ser estabelecidos.

1. Regeneração em Leguminosas

A regeneração de plantas *in vitro* tem sido bastante difícil entre as leguminosas. Os melhores exemplos de regeneração estão entre as leguminosas forrageiras em comparação com as leguminosas de semente. Vinte e quatro espécies de leguminosas foram regeneradas *in vitro* até o presente. No entanto, na maioria dos casos, a regeneração ocorreu em baixa frequência ou foi limitada pela fonte de explante utilizada (TABELA 1).

A recuperação de plantas a partir da cultura de tecidos contendo centros meristemáticos (gemas apicais ou axilares) já foi demonstrada para nove espécies leguminosas (TABELA 2). Em alguns casos, este tipo de cultura é impropriamente considerado pelos autores como exemplos de regeneração *de novo*. Nestes casos incluem-se os trabalhos com *Cicer arietinum* (BAJAJ & DHANJU 1979), *Glycine max* (KIMBALL & BINGHAM 1973, CHENG *et al.* 1980, SAKA *et al.* 1980), *Pisum sativum* (GAMBORG *et al.* 1974, KARTHA *et al.* 1974) e *Vicia faba* (GALZY & HAMOUI 1981). Tais trabalhos são exemplos de multiplicação e/ou desenvolvimento de gemas pré-existent no explante, distinção esta não discutida por estes autores. Esta técnica de propagação vegetativa pode ser usada para limpeza de vírus ou manutenção de genótipos como foi demonstrado em *Acacia koa* (SKOLMEN & MAPES 1976) *Lotus corniculatus* (TOMES 1979), *Trifolium pratense* (PHILLIPS & COLLINS 1979b) e *Vicia faba* (AUBRY *et al.* 1975, MARTIN *et al.* 1979).

Pelo menos 10 meios diferentes tem sido utilizados com sucesso para obter regeneração entre as legu

TABELA 1: Espécies de Leguminosas regeneradas *in vitro* a partir de culturas sólidas.

Espécie	Reguladores de crescimento e aditivos complexos			Meio para diferenciação	Explante	Subcultura de calos (meses)	Modo de regeneração	Frequência regenerativa	Referência
	Calo	Gema							
<i>Arachis hypogaea</i>	23 µM IAA	5,4 µM NAA		MS	antera	ca. 1	0	gemas ocasionais	BAJAJ <i>et al.</i> 1981
<i>A. villosa</i>	9,2 µM KIN	8,8 µM 6-BA						(<i>A. hypogaea</i>);	
	ou 23 µM IAA							gemas em 40-70% das culturas	
	8,8 µM 6-BA							(<i>A. villosa</i>)	
<i>Cajanus cajan</i>	-	0,06 µM IAA 4,7 µM KIN 0,4 g/l CH		White	hipocótilo	1	0	-	SHAWA RAO & NARAYANASWAMY 1975
<i>Gicer arsatikum</i>	2,9 µM IAA 4,4 µM 6-BA	2,9 µM IAA 4,4 µM 6-BA		B5	cotilédone	1	0	-	MUKHOPADHYAY & BHOSWANI 1978
<i>Crotalaria burnia</i>	1,1 µM 2,4-D 1,3 µM NAA 1,1 µM KIN	1,3 µM NAA 2,2 µM 6-BA 1 g/l EM		MS	caule, folha	6	0	-	RAJ BHANSALI <i>et al.</i> 1978b
<i>Crotalaria juncea</i>	27 µM NAA 2,3 µM KIN	46-230 µM KIN		MS	caule, folha	1,5	0	5-20 gemas/explante	RANJAN <i>et al.</i> 1977
<i>Crotalaria medicagenea</i>	2,3-14,3 µM 2,4-D	2,2-8,9 µM 6-BA		MS	caule, folha	-	0	-	RAJ BHANSALI <i>et al.</i> 1978a

TABELA 1 (continuação).

Espécie	Reguladores de crescimento e aditivos complexos			Meio para diferenciação	Explant	Subcultura de calos (meses)		Modo de regeneração	Frequência regenerativa	Referência
	Calo	Gema								
<i>Glycine canescens</i> <i>G. tomentella</i>	-	10,8 µM NAA 4,4 µM 6-BA ou 0,5 µM NAA 22 µM 6-BA		MS	hipocótilo	1	0		gemas em 60% (<i>G. canescens</i>) e 45% (<i>G. tomentella</i>) das culturas	KANEYA & WIDHOLM 1981
<i>Indigofera enneaphylla</i>	2,3 µM 2,4-D 4,4 µM 6-BA	2,9 µM IAA 4,4 µM 6-BA		B5	cotilédone, hipocótilo	1-2	0		50-150 gemas/cotilédone 40-100 gemas/hipocótilo	BHARAL & RASHID 1979b
<i>Lepturus sativus</i>	2,3 µM 2,4-D 4,4 µM 6-BA 10,8 µM NAA 2,2 µM 6-BA	2,9 µM IAA 4,4 µM 6-BA 10,8 µM NAA 2,2 µM 6-BA		B5	ápice meris- temático ápice meris- temático	12 1-2	0		45-82 gemas/explante gemas em 100% das culturas	MUKHOPADHYAY & BHOUJANI 1978 GHARYAL & MAHESHWARI 1980
<i>Lotus caucasicus</i> <i>L. corniculatus</i>	57 µM IAA 46 µM KIN	8,6-22,8 µM IAA 6,9-18,4 µM KIN ou 8,6-22,8 µM IAA 6,6-17,6 µM 6-BA		Miller	antera	3-10	0		44 plantas recuperadas	NITZKEI & GRANT 1971
<i>Lotus corniculatus</i>	4,5 µM 2,4-D	0,4 µM 6-BA		B5-M	inter-nó	18	0		16-17 gemas/grama de calo	SWANSON & TONES 1980

TABELA 1 (continuação).

Espécie	Reguladores de crescimento e aditivos complexos			Meio para diferenciação	Explantos	Subcultura de calos (meses)	Modo de regeneração	Frequência regenerativa	Referência
	Calo	Gema							
<i>Medicago sativa</i>	9,0 µM 2,4-D	2 g/l EL		Blaydes	antera, ovário hipocótilo, inter-nó	1	0, E	200 plantas recuperadas	SAUNDERS & BINGHAM 1972
	10,8 µM NAA								
	9,2 µM KIN								
	9,0 µM 2,4-D	2 g/l EL		Blaydes	hipocótilo	1	0	gemas em 67% das culturas após 3 ciclos de seleção	BINGHAM et al. 1975
<i>Phaseolus vulgaris</i>	50 µM 2,4-D	2 g/l EL		Blaydes	ovário	1-2	0	0-50 gemas/calos conforme o genótipo	WALKER et al. 1978
	5 µM KIN								
	25 µM NAA	50 µM 2,4-D		SH	ovário	-	0	100-260 gemas/cultura	WALKER et al. 1979
	10 µM KIN	5 µM KIN							
<i>Phaseolus vulgaris</i>	5,7 µM IAA	11,4 µM IAA;		67-V	folha	1,5	0	2 gemas recuperadas	CROCONO et al. 1976
	13,4 µM KIN	5,4 µM NAA							
	1/4 semente/ml	0,9 µM KIN							
		1/4 semente/ml							
<i>Pisum sativum</i>	10,8 µM NAA	1,1 µM IAA		MS	epicótilo	4-6	0	2-8 plantas/explante	MILBERG 1979
	4,4 µM 6-BA	22,2 µM 6-BA							

TABELA 1 (continuação).

Espécie	Reguladores de crescimento e aditivos complexos			Meio para diferenciação	Subcultura de calos (meses)	Modo de regeneração	Frequência regenerativa	Referência
	Calo	Gema	sem RCs					
<i>Passiflora caribaea</i> <i>tetragonolobus</i>	5,4-26,9 μ M NAA 0,5 μ M KIN	sem RCs	-	-	2-3	0	-	VENKATESWARAN & HUTNINEN 1978
	1,0 μ M NAA 8,8; 22 μ M 6-BA	1,0 μ M IAA 8,8; 44 μ M 6-BA ou 11 μ M IAA 4,4; 8,8; 22 μ M 6-BA	MS	MS	ca. 2	0	gemas em 54% dos calos	GREGORY <i>et al.</i> 1980
<i>Passiflora caribaea</i> <i>tetragonolobus</i>	1 μ M IAA 10 μ M 6-BA (7 dias)	sem RCs	MS	MS	-	0	15-20 gemas/explante 100% das culturas	HANH <i>et al.</i> 1981
<i>Stylosanthes</i> <i>hamata</i>	9,0 μ M 2,4-D 0,2 μ M KIN	14 μ M KIN	CS-5	CS-5	15	0	5-10 plântulas/explante	SCOWCROFT & ADAMSON 1976
<i>Trifolium</i> <i>alexandrinum</i>	5,4 μ M NAA 6,9 μ M KIN	2,7 μ M NAA 2,3 μ M KIN	MS	MS	4,5	0	4 gemas/calor em 100% das culturas	MOGHARZADEH & CONSTANTIN 1978

TABELA 1 (continuação).

Espécie	Reguladores de crescimento e aditivos complexos			Meio para diferenciação	Explante	Subcultura de calos (meses)	Modo de regeneração	Frequência regenerativa	Referência
	Calo	Gema							
<i>Trifolium incarnatum</i>	10 µM 2,4-D	10 µM NAA		B5,SH	hipocótilo	1	0	-	BEACH & SMITH 1979
	11 µM NAA	15 µM Ad							
	10 µM KIN								
<i>Trifolium pratense</i>	0,25 µM picloram	0,025 µM picloram		PC-L2	cotilédono, ápice meristemático	2-3	0	cerca de 100 plantas recuperadas	PHILLIPS & COLLINS 1979a
	0,4 µM 6-BA	0,4-44 µM 6-BA							
	11 µM NAA	11 µM NAA		B5	hipocótilo, ovário	1	0	intenso brotamento de gemas	BEACH & SMITH 1979
<i>Trifolium repens</i>	10 µM 2,4-D	15 µM Ad							
	10 µM KIN								
	0,9 µM 2,4-D	0,5 µM NAA		MS, Heller	cotilédono	3	0	cerca de 70 plantas recuperadas	PELLETIER & PELLETIER 1971
	0,5 µM KIN	0,5 µM KIN							
		10% AC							
	4,0 µM 2,4-D	0,5 µM IAA		MS	semente	1	0	13 plantas recuperadas	GRESSHOFF 1980
<i>Trigonella corniculata</i>	0,5 µM KIN	2,0 µM 2ip							
	0,1% CH								
	2,7 µM NAA	2,7 µM NAA		MS	folha	5	0	4-10 gemas/calco	SEN & GUPTA 1979
<i>T. foenum-graecum</i>	15% AC	15% AC							

Espécie	Reguladores de crescimento e aditivos complexos				Meio básico	Explante	Gema / explante (nº)	Frequência de desenvolvimento (%)	Referência
	Calo	Gema	Raiz						
<i>Acacia koa</i>	11,3 µM 2,4-D 1% AC	22 µM 6-BA	0,2 mg/l IBA	MS	ápice me- ristemático	5	-	-	SKOLMEN & MAPES 1976
<i>Cicer arietinum</i>	-	0,5 µM NAA 0,9 µM 6-BA	0,5 µM NAA 0,9 µM 6-BA	MS	meristema	1	-	-	BAJAJ & DHAN JU 1979
<i>Glycine max</i>	-	2,9 µM IAA 15% AC	0,6-11 µM IAA 15% AC	B5	nó de hipocótilo	2	1-10	-	KIMBALL & BINGHAM 1973
-	-	0,025 µM IBA 5-50 µM 6-BA	sem RCS	M-B5	nó de cotilédone	5-11	100	-	CHENG <i>et al.</i> 1980
-	-	0,025 µM IBA 25 µM 6-BA	-	M-B5	nó de hipocótilo	9-11	100	-	SAKA <i>et al.</i> 1980
<i>Lotus corniculatus</i>	-	0,2 µM 6-BA	sem RCS	D5	ápice meris- temático, nó	6,6 5,2	44 95	-	TOMES 1979
<i>Phaseolus au- reus P. mungo</i>	-	11,4 µM IAA 2,3 µM KIN	11,4 µM IAA 2,3 µM KIN	MS	meristema	1	20-90	-	BAJAJ & DHAN JU 1979

TABELA 2: (continuação)

Espécie	Reguladores de crescimento e aditivos complexos			Meio	Gema / explante (nº)	Frequência de desenvolvimento (%)	Referência
	Calo	Gema	Raiz				
<i>Pisum sativum</i>	1µM NAA	1 µM NAA	ao acaso	B5	ápice meris	1-4	GAMBORG et
	0,2-5 µM 6-BA	0,2-5 µM 6-BA			temático		al. 1974
	-	1 µM NAA	1 µM NAA	B5	meristema	1	KARTHA et
		0,5 µM 6-BA					al. 1974
<i>Trifolium pratense</i>	-	0,025-0,033 µM picloram	2,5 mg/l 3-AP	PC-L2	meristema	várias	PHILLIPS & COLLINS 1979b
		0,24 µM 6-BA	1,1 µM IAA				
<i>Vicia faba</i>	-	1 µM NAA	1 µM NAA	MS (ma- cro)	ápice meris	3-4	AUBRY et al.
					Hel temático, nó ler (mi- cro)		1975
	-	0,1 µM GA ₃	1 µM NAA	MS	meristema	várias	MARTIN et al.
		1 µM 6-BA	0,5 µM KIN				1979
	5,4 µM NAA	0,5 µM NAA	0,5 µM NAA	MS	ápice meris	1-10	GALZY & HAMOUI
	22 µM 6-BA	2,2 µM 6-BA			temático		1981

minosas (TABELA 1). PHILLIPS & COLLINS (1979a) estabeleceram um meio de cultura para as leguminosas (PC-L2) que quando testado com quatro diferentes gêneros (*Trifolium pratense*, *Medicago sativa*, *Glycine max* e *Canavalia ensiformis*) resultou no crescimento vigoroso de calos em todos os casos. O meio de MS é o mais frequentemente usado para regeneração em leguminosas. Baseado nestas variações de meio, é provável que o meio tradicionalmente usado para regeneração de plantas em outras famílias talvez não seja apropriado para as leguminosas.

Diferentemente da maioria das famílias vegetais, pouca generalização pode ser feita com relação ao papel dos RCs na cultura das leguminosas. As auxinas mais frequentemente usadas para a indução de calos foram 2,4-D, NAA e IAA (TABELAS 1 e 2). Algumas vezes a auxina capaz de promover vigoroso crescimento de calos é inibitória à diferenciação como é o caso de 2,4-D para *Crotalaria burhia* (RAJ BHANSALI *et al.* 1978b), *Lotus* ssp. (NIIZEKI & GRANT 1971), *Trifolium repens* (PELLETIER & PELLETIER 1971) e *Vicia faba* (GALZY & HAMOUI 1981) e de NAA para *Crotalaria juncea* (RAMAWAT *et al.* 1977). Uma citocinina, 6-BA ou KIN, tem sido usada para a formação de calos em todas as espécies, exceto em *Acacia koa* (SKOLMEN & MAPES 1976) e *Trigonella* ssp. (SEN & GUPTA 1979) nas quais AC foi usada e *C. medicagenia* onde apenas 2,4-D induziu o crescimento de calos (RAJ BHANSALI *et al.* 1978a). Para grande parte das espécies de leguminosas, a razão auxina/citocinina é alta para a indução de calos, mas existem várias excessões (TABELAS 1 e 2). Geralmente as espé

cies de leguminosas requerem maiores concentrações de citocinina do que espécies de outras famílias (EVANS *et al.* 1981).

A maioria das leguminosas de semente tem uma maior propensão para a formação de raiz do que para a regeneração de gemas. Nestes casos a frequência de iniciação de raízes é muito alta a despeito das concentrações de auxina e citocinina. Apenas iniciação de raiz foi observada em tentativas de obter regeneração de plantas de *Psophocarpus tetragonolobus* (BOTTINO *et al.* 1979), *Glycine max* (EVANS *et al.* 1976), *Phaseolus vulgaris* (HADDON & NORTHCOTE 1976, CROCOMO *et al.* 1976b) e *Vigna sinensis* (Davey *et al.* 1974). Em *Arachis hypogaea* calos derivados de anteras tiveram maior tendência para diferenciar raízes do que para regenerar gemas (BAJAJ *et al.* 1981). A formação de raiz ocorreu antes da regeneração de gemas em *Stylosanthes hamata* (SCOWCROFT & ADAMSON 1976). Leguminosas forrageiras formam raízes porém em frequências menores do que leguminosas de semente. Em alfafa a diferenciação de raízes foi controlada pela composição inorgânica do meio de cultura (WALKER *et al.* 1978).

A regeneração de plantas em leguminosas de sementes tem sido obtida ou pela redução da concentração de auxina ou pelo aumento da concentração de citocinina. As exigências hormonais são pouco específicas para leguminosas forrageiras. Por exemplo, nenhum hormônio é requerido para a regeneração de plantas em alfafa (WALKER *et al.* 1979), enquanto que uma grande faixa de concentrações de vários RCs resultaram na regeneração de plantas em trevo vermelho (ver.

Tab. 4 em PHILLIPS & COLLINS 1979a) e *Trifolium alexandrinum* (ver. Tab. 2 em MOKHTARZADEH & CONSTANTIN 1978). Embora a regeneração de gemas nestas espécies tenha ocorrido em diversas combinações de RCs, certas concentrações aumentaram a frequência de calos com capacidade regenerativa.

Extrato de semente de feijão foi requeriido para a regeneração em *P. vulgaris* (CROCOMO *et al.* 1976), enquanto que 5 kRad de irradiação gamma foi usado para obter regeneração em *Cajanus cajan* (SHAMA RAO & NARAYANASWAMY 1975). A utilização de IAA como fonte de auxina e 6-BA como fonte de citocinina foi determinante na diferenciação de gemas em *Indigofera enneaphylla* (BHARAL & RASHID 1979b). O 6-BA estimulou a indução de gemas em *C. burhia* (RAJ BHANSALI *et al.* 1978b), *Lotus spp.* (NIIZEKI & GRANT 1971) e *T. ale*xandrinum (MOKHTARZADEH & CONSTANTIN 1978). Em *Trigonella* spp. a frequência regenerativa foi aumentada pela adição de CH ao meio de cultura (SEN & GUPTA 1979). Um único meio de cultura foi suficiente para induzir o crescimento de calos e regeneração de gemas em *Indigofera enneaphylla* (BHARAL & RASHID 1979b). Em *Lathyrus sativus* a regeneração de gemas foi obtida pela subcultura no mesmo meio indutor de calos (MUKHOPADHYAY & BHOJWANI 1978, GHARYAL & MAHESHWARI 1980), o mesmo ocorrendo para *Trigonella* spp. (SEN & GUPTA 1979).

O 6-BA tem sido o RC mais frequente na indução de desenvolvimento de centros meristemáticos, sendo a combinação deste RC com NAA, a mais comum nos trabalhos de propagação vegetativa de leguminosas (TABELA 2). Entre as

espécies leguminosas propagadas vegetativamente, tem-se exemplos de obtenção de plantas com ou sem a formação intermediária de calos. As frequências de recuperação de plantas na propagação vegetativa de leguminosas (TABELA 2) sugerem que o estágio intermediário de calos é útil para multiplicar regiões meristemáticas pré-existentes nos explantes.

A organogênese de plantas sem a intermediária formação de calos foi demonstrada em *C. burhia* (RAJ BHANSALI *et al.* 1978b), *Glycine canescens* e *G. tomentella* (KAMEYA & WIDHOLM 1981) e *P. tetragonolobus* (GREGORY *et al.* 1980, HANH *et al.* 1981).

As condições de luminosidade das culturas influenciaram a regeneração em *C. burhia* (RAJ BHANSALI *et al.* 1978b) e *Trigonella* spp. (SEN & GUPTA 1979). O comprimento do dia não parece ser crítico na diferenciação em *Medicago sativa* (SAUNDERS & BINGHAM 1972).

Anteras foram utilizadas como fonte de explante para regeneração em *Lotus* spp. (NIIZEKI & GRANT 1971), alfafa (SAUNDERS & BINGHAM 1972) e trevo vermelho (PHILLIPS & COLLINS 1979a.). Entretanto, nestas três espécies os plântules obtidos apresentaram o mesmo número cromossômico das plantas doadoras de explantes. Para *T. alexandrinum* (MOKHTARZADEH & CONSTANTIN 1978) e *Arachis* spp. (BAJAJ *et al.* 1981) foi descrito a recuperação de plantas haplóides, a partir da cultura de anteras. No último caso, vários níveis de ploidia foram observados entre as plantas regeneradas, variando estas de haplóides a octaplóides.

Em *P. tetragonolobus* um sistema interessante foi descrito por HANH *et al.* (1981) para a regeneração de plantas. Finas camadas celulares, contendo a epiderme, parênquima paliçádico e células do parênquima lacunoso foram utilizadas como explante. Demonstrou-se a formação de gemas de *P. tetragonolobus* diretamente a partir de células epidérmicas.

Plantas tem sido regeneradas de calos derivados de ápice meristemático, hipocótilo, cotilédone, folha, caule, radícula, ovário, embrião e cultura de células em suspensão (TABELAS 1 e 3). A fonte de explante pode afetar grandemente a frequência de regeneração. Em trevo vermelho a frequência de regeneração foi de 1% a partir de cotilédones e 30 - 80% a partir de tecidos meristemáticos (PHILIPS & COLLINS 1979a). Em *Indigofera enneaphylla* o número de gemas regeneradas variou entre 10 - 50 (50 - 60% das culturas) por segmento foliar cultivado; 40 - 100 por hipocótilo e 50 - 150 (90% das culturas) por cotilédone (BHARAL & RASHID 1979b). Segmentos de hipocótilos de *Glycine canescens* regeneraram gemas (60% das repetições), enquanto que em cotilédones a regeneração de gemas ocorreu apenas em 5% das culturas (KAMEYA & WIDHOLM 1981). Em *C. juncea* a regeneração de gemas ocorreu a partir de caule e folha, mas não a partir de raiz (RAMAWAT *et al.* 1977). A fonte de explante pode também influenciar a velocidade da resposta regenerativa. Em *C. burhia* segmentos de caule apresentaram resposta a morfogênese relativamente mais rápida quando comparada a folha e calos

(RAJ BHANSALI *et al.* 1978b). A frequência regenerativa em alfafa variou entre indivíduos do mesmo cultivar (SAUNDERS & BINGHAM 1972, WALKER *et al.* 1978).

Frequência inicial de regeneração de 12% foi obtida com o uso de explantes de hipocótilo de alfafa (BINGHAM *et al.* 1975). Esta frequência foi aumentada pelo uso de plantas regeneradas *in vitro* para estabelecer novas culturas. Após dois ciclos de cultura, a frequência de regeneração foi aumentada de 12 para 67% em uma linha genética de alfafa. Aumento da frequência regenerativa também tem sido obtido através de subculturas mensais no mesmo meio de cultura. Em *L. sativus* houve a regeneração de 4-5 gemas/calos (10% das culturas), após 4-5 semanas e 45-82 gemas/calos (quase 100% das culturas), após quatro subculturas (MUKHOPADHYAY & BHOJWANI 1978). Aumento da frequência regenerativa com a idade da cultura também foi observado em *T. alexandrinum* (MOKHTARZADEH & CONSTANTIN 1978). Entretanto em ervilha, a capacidade regenerativa diminuiu com a idade da cultura (MALMBERG 1979), o mesmo ocorrendo em alfafa (McCOY & BINGHAM 1977). Porém para esta última espécie, STAVAREK *et al.* (1980) puderam obter regeneração de plantas através de modificações apropriadas no meio de cultura, em tecidos mantidos por 32 meses na forma de calos. Para outras espécies, tais como *S. hamata* (SCOWCROFT & ADAMSON 1976) e *L. sativus* (MUKHOPADHYAY & BHOJWANI 1978) a capacidade regenerativa parece não ter sido afetada com a idade das culturas.

Diferenças intervarietais tem sido observadas na regeneração de plantas. De 14 linhas genéticas de *P.sativum* testadas para regeneração, apenas seis puderam ser regeneradas após dois meses *in vitro*. Apenas duas destas seis linhas, puderam ser regeneradas após seis meses *in vitro* (MALMBERG 1979). Diferença intervarietal na regeneração de plantas também foi observada em cinco cultivares de trevo vermelho (PHILLIPS E COLLINS 1979a) e nove cultivares de alfafa (BINGHAM *et al.* 1975). A frequência e o tempo para regeneração variaram conforme o genótipo em *Lotus spp.* (NIIZEKI & GRANT 1971) e *Trigonella spp.* (SEN & GUPTA 1979). As distintas variações genotípicas para regeneração e a relativa facilidade com que a seleção pode aumentar a frequência de regeneração, sugere que em leguminosas a habilidade de recuperar plantas teria um controle genético. Seleção para regeneração não foi ainda testada para outras famílias. MALMBERG (1979) sugeriu que a seleção de um grande número de linhas genéticas pode ser útil na tentativa de obter regeneração de plantas de uma determinada espécie.

As gemas podem ser enraizadas muito rapidamente na maioria das leguminosas. Em quase todos os casos raízes foram obtidas em meio contendo uma auxina, tais como: 0,5 μM de NAA (*Vicia faba*); 0,6 - 26,9 μM de NAA (*Crotalaria*); 2,7 - 5,4 μM de NAA (*Arachis villosa*); 1 μM de IBA (*Acaíia koa*) e 0,6 μM de IAA (*Stylosanthes hamata*). Para *L.corniculatus* o enraizamento das gemas foi feito na ausência de RCs (TOMES 1979), o mesmo ocorrendo em soja (CHENG *et al.*

1980). Na maioria dos casos quando uma citocinina está presente no meio de cultura (KIN ou 6-BA), a razão auxina/citocinina tem sido maior que 10, por exemplo: 5,7 μM de IAA/0,4 μM de 6-BA (*T. alexandrinum*); 0,5 μM de NAA/0,05 μM de KIN (*P. tetragonolobus*) e 10,8 μM de NAA/0,9 μM de 6-BA (*I. enneaphylla*). Em algumas leguminosas forrageiras como *M. sativa* e *T. pratense* a indução de raízes em gemas desenvolvidas tem sido mais difícil. MUKHOPADHYAY & BHOJAWANI (1978) encontraram dificuldade em induzir raízes em gemas diferenciadas de *L. sativus*. Entretanto GHARYAL & MAHESHWARI (1980) conseguiram obter plântules completos desta espécie, utilizando um único meio de cultura. PHILLIPS & COLLINS (1979a) desenvolveram um meio de enraizamento efetivo para trevo vermelho que usou mineirais em concentração reduzida e 3-AP. A impossibilidade de enraizar gemas de *C. burhia* foi atribuída ao baixo nível de auxina do meio de cultura (RAJ BHANSALI *et al.* 1978b).

A obtenção de plantas *in vitro* de *Indigofera enneaphylla* descrita por BHARAL & RASHID (1979b) está entre os exemplos mais bem descritos de regeneração de leguminosas em meio sólido. A frequência regenerativa nesta espécie esteve entre 70 - 90% das culturas, com até cerca de 180 gemas induzidas por explante. Os plântules uma vez enraizados, chegaram a florescer *in vitro*. Em *L. sativus* também foi conseguido diferenciação de gemas em alta frequência (45/82 gemas por ápice meristemático cultivado) porém estas gemas não puderam ser enraizadas (MUKHOPADHYAY & BHOJAWANI 1978). Apesar de GHARYAL & MAHESHWARI (1980) terem descrito a ob

tenção de plântules completos de *L. sativus*, a frequência regenerativa não foi dada, o que questiona os resultados apresentados por estes autores. Para várias espécies tais como *Lotus* spp., *M. sativa*, *P. vulgaris*, *T. pratense* e *T. repens* a frequência regenerativa foi dada apenas em termos de total de plantas recuperadas (TABELA 1). Este tipo de informação limita muito a avaliação do sucesso do trabalho. Em *T. Alexandrinum* apesar de terem sido obtidas apenas quatro gemas/calos este evento se deu em 100% das culturas (MOKHTARZADEH & CONSTANTIN 1978). Este pode ser considerado um bom resultado, uma vez que demonstra bastante repetibilidade. Já em *T. repens*, as 70 plantas que puderam ser recuperadas foram derivadas de um só calo entre os quatro produzidos a partir de um cotilédone (PELLETIER & PELLETIER 1971). Para que se possa avaliar o resultado de um trabalho em cultura de tecido que vise regeneração de plantas, as frequências regenerativas devem ser dadas em termos de número de plantas produzidas por calo ou explante e frequência das culturas que responderam aos tratamentos. Em leguminosas muitas vezes a frequência regenerativa nem é citada o que limita a avaliação do sucesso descrito pelos autores.

O estabelecimento de suspensões celulares a partir de calos já foi relatado para a maioria das leguminosas estudadas *in vitro*. Entretanto, descrição da sequência reversa, de células em suspensão para calos e plantas, imprescindíveis para os trabalhos de indução e seleção de mutantes, tem sido muito pouco frequente. Apenas para cin

co leguminosas forrageiras tal metodologia foi definida (TABELA 3). A sequência mais comumente utilizada tem sido: indução de calos, estabelecimento de suspensões celulares, recuperação de calos pelo plaqueamento das suspensões em meio sólido e indução de gemas em meio regenerativo. Porém em *L. corniculatus* e *T. repens* a recuperação de calos e regeneração de gemas foi obtida num mesmo meio de cultura e, em *T. pratense* os explantes foram inoculados diretamente no meio líquido, sem a intermediária formação de calos. O meio básico de cultura, os RCs e a idade das culturas foram bem específicas obtendo-se também diferentes frequências regenerativas (TABELA 3). A manutenção das células em suspensão diminuiu o potencial morfogênético de culturas de *M. sativa* e *L. corniculatus*. Entretanto para *T. pratense* a recuperação de plantas somente ocorreu após seis meses de manutenção das células em meio líquido. Tentativas de regenerar plantas a partir de células em suspensão resultaram apenas na formação de primórdios de gemas em *Stylosanthes hamata* (SCOWCROFT & ADAMSON 1976) e soja (OSWALD *et al.* 1977). Estruturas semelhantes a embriões foram recuperadas a partir de suspensões celulares de *Glycine* spp., porém não foi conseguido desenvolvimento além deste estágio (BEVERSDORF & BINGHAM 1977).

A recuperação de plantas a partir de protoplastos foi obtida apenas para duas leguminosas, apesar do frequente uso de protoplastos de leguminosas em trabalhos de genética celular e hibridação somática (CONSTABEL *et al.* 1976, FOWKE 1977, GAMBORG 1977, KAO 1977, CONSTABEL 1978): *Medica*

TABELA 3: Espécies de Leguminosas regeneradas *in vitro* a partir de cultura líquida.

Espécie	Explant	Indução de calos		Cultura líquida		Recuperação de calos		Meio regenerativo		Frequência regenerativa	Modo de regeneração	Referência
		Reguladores de crescimento (dias)	Tempo (dias)	Reguladores de crescimento (dias)	Tempo (dias)	Reguladores de crescimento (dias)	Tempo (dias)	Reguladores de crescimento e (dias) aditivos orgânicos	Tempo (dias)			
<i>Lotus corniculatus</i>	inzer-nó	4,5 µM 2,4-D	18	4,5 µM 2,4-D	10	0,2 µM 6-BA	-	-	7-14	-	algumas plantas	SWANSON & TOMES 1980
<i>Medicago sativa</i>	ovário	9,0 µM 2,4-D	28	9,0 µM 2,4-D	7-21	9,0 µM 2,4-D	2x10 ⁴	2 g/l EL	60	96% das colônias	0	Mc COY & BINGHAM 1977
	amature	9,2 µM KIN		9,2 µM KIN		9,2 µM KIN						
<i>Trifolium alexandrinum</i>	hipocótilo	5,4 µM NAA	40	10,8 µM NAA	11	10,8 µM NAA	1x10 ³	2,7 µM NAA	40	4% das colônias	0	MONTEARZENH & CONSTANTIN 1978
		6,9 µM KIN		1,0 µM 2ip		1,0 µM 2ip		2,3 µM KIN	14			
<i>Trifolium pratense</i>	hipocótilo	-	-	0,25 µM picloram	180	0,045 µM 2,4-D	1x10 ⁶	0,004 µM picloram	40	40% das colônias	E	PHILLIPS & COLLINS 1980
	epicótilo			0,44 µM 6-BA		14,8 µM Ad		0,9 µM 6-BA				
<i>Trifolium repens</i>	embrião	19,6 µM 2,4,5-T	10-14	2,3 µM 2,4-D	21	2,3 µM 2,4-D	1x10 ⁶	-	7	37 entre 50 culturas	0	OSWALD <i>et al.</i> 1977
		0,5 µM KIN		0,5 µM KIN		4,6 µM KIN						

go sativa (KAO & MICHAYLUK 1980, SANTOS *et al.* 1980) e *Trifolium repens* (GRESSHOFF 1980).

O isolamento de protoplastos a partir de células de mesófilo foliar foi descrito para *Cicer arietinum*, *Melilotus alba* (GAMBORG *et al.* 1974b), *Lathyrus odoratus* L. (RAZDAN *et al.* 1980), *Melilotus officinalis* Lam. (FOWKE *et al.* 1976), *Phaseolus vulgaris* (PELCHER *et al.* 1974), *Pisum sativum* (CONSTABEL *et al.* 1973, ARNOLD & ERIKSSON 1976), *Vicia faba* (BINDING & NEHLS 1978, ROEPER *et al.* 1980), *Vicia narbonensis* L. (DONN 1978) e *Vigna sinensis* (DAVEY *et al.* 1974). Protoplastos foram também isolados a partir de tecidos de raiz de *P. sativum* (LANDGREN & TORREY 1973), ápices meristemáticos de *P. sativum* (GAMBORG *et al.* 1975) e *Vicia faba* (BINDING & NEHLS 1978) e de tecidos de vagem de soja (ZIEG & OUTKA 1980). Culturas de células em suspensão serviram como fonte de protoplastos em *G. max* (KAO *et al.* 1970, FOWKE *et al.* 1976), *P. vulgaris*, *P. sativum* (GAMBORG *et al.* 1974b) e *Vicia hajastana* Grossheim (GAMBORG *et al.* 1974b, KAO & MICHAYLUK 1975). Protoplastos de *Vigna sinensis* foram isolados a partir de hipocótilos, caules, folhas e calos (BHARAL & RASHID 1979a). Em todos estes exemplos os protoplastos se mostraram viáveis, regenerando a parede celular e sofrendo divisões sucessivas até a produção de calos. Em nenhum destes exemplos porém foi possível a recuperação de plantas. Alguns experimentos foram realizados com *Vicia faba* (SCHEURICH & ZIMMERMANN 1981) exclusivamente para demonstração de técnicas de isolamento e fusão de protoplastos

Interessante notar que em *T. pratense* a

recuperação de plantas através de suspensões celulares se deu via embriogênese somática (PHILLIPS & COLLINS 1980) enquanto que a regeneração a partir de calos ocorreu por organogênese (PHILLIPS & COLLINS 1979a). Existem poucos exemplos na literatura de cultura de tecidos onde os dois processos regenerativos ocorrem numa mesma espécie. Nestes casos os RCs determinaram o tipo de expressão regenerativa. Outras espécies capazes de sofrer organogênese ou embriogênese somática, dependendo dos RCs presentes no meio de cultura incluem *Allium sativum* L. (ABO EL-NIL 1977), *Asparagus officinalis* L. (BUI DANG HA *et al.* 1975), *Brassica oleracea* L. (PAREEK & CHANDRA 1978, BARONCELI *et al.* 1973), *Daucus carota* (KESSELL & CARR 1972, JONES 1974), *Nicotiana tabacum* (HACCIUS & LAKSHMANAN 1965, TRAN THANH VAN & TRINH 1978), *Petunia hybrida* Hort. ex Vilm. (RAO *et al.* 1973) e *Solanum melongena* L. (MATSUOKA & HINATA 1979). SAUNDERS & BINGHAM (1972) sugeriram a ocorrência simultânea de gemas adventícias e embriões somáticos em calos de alfafa. Recentemente, SANTOS *et al.* (1980) constataram tal ocorrência em culturas derivadas de protoplastos ou explantes foliares de *Medicago sativa*. Estes autores observaram a formação de gemas adventícias e embriões somáticos ocorrendo como dois eventos distintos, simultaneamente no mesmo calo. Este representa um raro exemplo onde os diferentes processos regenerativos ocorrem sob condições idênticas de cultura. A regeneração *in vitro* de leguminosas tem ocorrido mais frequentemente via organogênese. Por outro lado, algumas famílias vegetais sofrem embriogênese somática com maior frequência. A família que apresenta a maior fre

quência de embriogênese somática é a Umbelliferae, enquanto que as gramíneas não contêm espécies embriogênicas. Tais observações implicam que a constituição genética, os RCs, os fatores nutricionais, além da fonte de explante, estão todos envolvidos na regulação dos processos regenerativos.

2. Cultura de Tecidos de *Phaseolus* spp.

2.1. Crescimento de calos e citodiferenciação

As primeiras observações de diferenciação de raízes em *P. vulgaris* foram feitas por LIAU & BOLL (1970) e MEER *et al.* (1971). A morfogênese de raízes foi inibida modificando a fração inorgânica do meio de cultura, mas não houve inibição com a manipulação da fração orgânica (LIAU & BOLL 1970). A formação de raízes adventícias em epicôtilos cultivados *in vitro* foi estudada por MEER *et al.* (1971). Os fatores limitantes mais importantes na formação de raízes adventícias foram açúcar, auxina e luz. A morfogênese de raiz não ocorreu na ausência de açúcar e auxina e foi grandemente reduzida na presença da luz (MEER *et al.* 1971).

A indução de diferenciação vascular em tecidos de calos de *P. vulgaris* pela aplicação de IAA e sacarose e a modificação desta diferenciação por outros fatores, em particular açúcares alternativos e certos inibidores de processos celulares, foram estudados por JEFFS & NORTHCOTE (1967). Calos cultivados na ausência de sacarose e IAA não apresentaram diferenciação constituindo-se apenas de células parenquimatosas homogêneas. Na presença destas substâncias padrões de diferenciação ocorreram variando com as concentrara

ções utilizadas dos nutrientes. Com IAA ($0,6 \mu\text{M}$) e sacarose (2%) ocorreu a diferenciação em forma de nódulos arranjados espacialmente como células de floema, com uma camada semelhante ao câmbio entre elas. Diferentes monossacarídeos não estimularam a diferenciação, enquanto que outros α -glicosídeos também induziram a formação de nódulos contendo atividade meristemática de floema e xilema.

Aspectos morfológicos das células de calos de duas variedades de *P. vulgaris* (Navy Bean e Red Kidney Bean) e de outras espécies de angiospermas comestíveis foram estudados por KANT & HIDEBRANDT (1969). Demonstrou-se que a maioria das células destes tecidos poderia ser diferenciada umas das outras por características morfológicas como tamanho e formato celular. A maioria das células com formato semelhante diferiam quanto ao tamanho. Em alguns casos, como as diferenças de tamanho entre as células alongadas de "Navy Bean" e cenoura não eram apreciáveis. Para estes casos as distinções poderiam ser feitas por outros aspectos citomorfológicos tal como a presença ou ausência de cloroplastos e grânulos de amido ou variações nos tamanhos de núcleo e nucléolo. Pelos resultados obtidos foi concluído que informações desta natureza poderiam ser utilizadas para caracterizar o crescimento e a diferenciação de células em cultura mista.

LIAU & BOLL (1970) testaram diferentes meios de cultura para a produção de calos de *P. vulgaris*. O meio de MS foi o mais favorável entre os diversos testados.

O crescimento vigoroso dos calos neste meio ocorreu não só por um estímulo da divisão celular, mas também devido a uma maior absorção de água, com consequente expansão celular.

O crescimento de calos em segmentos de folhas de *P. vulgaris* var. Bico de Ouro, foi estudado por CROCOMO *et al.* (1975). O efeito do pH, concentração de sacarose, presença de CH e 2,4-D na proliferação de calos foram determinados. O pH e a concentração de sacarose pouco tiveram efeito no crescimento de calos (dentro das faixas estudadas). Na composição de meio de cultura adotada (meio 67-V) a CH se mostrou necessária para a obtenção de um crescimento favorável e o 2,4-D mostrou-se altamente efetivo em aumentar a proliferação de calos.

Os efeitos das necessidades nutricionais e da origem do tecido no potencial morfogênético e no nível de ploidia em tecidos de feijão cultivados *in vitro* foram estudados por HADDON & NORTHCOTE (1976). Embora a proliferação de calos a partir de vários explantes (tecidos meristemáticos e anteras) tenha se iniciado com diferentes taxas de crescimento, uma vez estabelecida a cultura, os calos foram similares em aparência e taxa de crescimento, independentemente do tecido de origem. A proporção de células diplóides presentes nos calos não foi alterada com a perda da capacidade de formação de tecidos vasculares. Todas as culturas perderam seu potencial morfogênético após 5 a 7 subculturas, exceto calos de anteras que formaram tecidos vasculares após um período prolongado de cultura em meio de manutenção. Após 6

subculturas, calos de anteras continham mais células poli
plóides do que culturas somáticas. A maioria dos explantes so
máticos continham células meristemáticas ou cambiais e as
propriedades similares na cultura de calos foram atribuídas
à proliferação do mesmo tipo de célula em cada explante. Ca
los de hipocótilo crescido na presença de AC continham prin
cipalmente células diplóides e mantiveram seu potencial mor
fogenético por um maior número de subculturas do que calos
mantidos em meio definido. A transferência de calos cultiva
dos em meio definido para meio contendo AC aumentou a pro
porção de células diplóides e evitou a perda do potencial mor
fogenético. Uma concentração de KIN ($2\ \mu\text{M}$) equivalente à de
AC (20%) impediu a perda do potencial morfogênético mas não
afetou a ploidia das culturas. A importância das interações
célula-célula foi enfatizada por estudos de culturas em sus
pensão, onde uma grande proporção de células estão em íntimo
contato com o meio. A transferência direta destas células
para meio indutor aumentou a quantidade de crescimento orga
nizado na forma de raízes. Por outro lado, a cultura em meio
líquido de manutenção alterou as respostas de crescimento das
células e acelerou a perda do potencial morfogênético.

PETERS *et al.* (1977) relataram a
indução de calos a partir da cultura de anteras de feijão
(*P. vulgaris* var. Bico de Ouro) no meio 67-V suplementado
com 2,4-D ($4,5\ \mu\text{M}$) ou com NAA ($5,4\ \mu\text{M}$); IAA ($11,4\ \mu\text{M}$) e KIN
($0,9\ \mu\text{M}$). Em ambos os meios de cultura, cerca de 57% das an
teras cultivadas produziram calos, entretanto a quantidade

de calos produzidos foi cerca de duas vezes maior quando as anteras foram cultivadas na presença de 2,4-D. A distribuição de células haplóides e diplóides foi quase a mesma entre as 40 células examinadas. Poliploidia foi observada em menos de 3% das células.

PETERS *et al.* (1976) procuraram estudar os efeitos dos alcalóides nicotina e cafeína (0-500 mg/l) sobre o crescimento de calos e indução de raízes em culturas de explantes foliares de feijão (*P. vulgaris* var. Bico de Ouro). Teores elevados de alcalóides ocorrem em muitas das espécies vegetais que regeneram *in vitro* como por exemplo *Datura*, fumo, tomate, café, lírio e cenoura. A nicotina possui uma atividade reguladora de crescimento. Explantes cultivados em meio contendo IAA (11,4 μ M) e nicotina (50 mg/l) produziram quantidades mínimas de calos com o desenvolvimento de raízes geotrópicas, enquanto que explantes cultivados em meio contendo IAA (11,4 μ M), KIN (0,9 μ M) e nicotina (200 mg/l) desenvolveram massivas quantidade de calos e raízes aéreas. A cafeína (1 - 500 mg/l) adicionada ao meio de cultura teve um efeito inibitório tanto no crescimento de calos como no desenvolvimento de raízes.

A reação de sete genótipos de *Phaseolus* na indução de crescimento de calos, utilizando quatro diferentes auxinas, foi estudada por MOK & MOK (1977). Variações nas respostas de *Phaseolus* à auxinas ocorreram entre e dentro das espécies. Os genótipos de *P. lunatus* L. requerem maiores concentrações de auxinas para o crescimento de

calos em relação aos genótipos de *P. acutifolius* Gray. A diferença entre o cultivar Romano e outros dois genótipos de *P. vulgaris* estudados, em relação ao requerimento de auxina, foi pelo menos de 8 vezes. Foi sugerido que esta extrema diferença entre genótipos dentro das espécies seria particularmente útil no estudo do controle genético das respostas hormonais em cultura de tecido.

A atividade de oito citocininas para promover o crescimento de calos em duas espécies de *Phaseolus* (*P. vulgaris* cv. Great Northen e *P. lunatus* cv. Kingston) foi estudada por MOK *et al.* (1978a). Em *P. vulgaris* 6-BA foi a citocinina mais ativa, seguida de dihidro-Z, KIN, trans-Z, cis-Z e 2ip. Em *P. lunatus* 6-BA e 2ip foram igualmente ativas seguidas por KIN. Ainda para *P. lunatus*, entre os derivados de Z, a trans-Z foi 3 vezes mais ativa do que a dihidro-Z e 30 vezes mais ativa do que a cis-Z. Os autores deste estudo sugeriram que as diferenças encontradas entre as citocininas nestas duas espécies de *Phaseolus* refletiriam diferenças na atividade de citocinina oxidase numa correlação positiva com os teores endógenos presentes em plântulas intactas.

2.2. Estudos citológicos e bioquímicos

O primeiro trabalho que estabeleceu a cultura *in vitro* de leguminosas foi apresentado por NICKELL (1956). Células em suspensão foram obtidas a partir de calos produzidos de hipocótilos de feijão (*Phaseolus vulgaris*). E

xames microscópicos revelaram a presença de células isoladas com capacidade de divisão e crescimento. BERGMANN (1960) cultivou células isoladas de *P. vulgaris* var. Early Golden Cluster para estudar o processo de divisão celular. Conseguiu pela primeira vez a formação de clones de tecidos a partir do plaqueamento de células em meio líquido. DOUGALL (1964) e LAMPORT (1964) independentemente examinaram culturas em suspensão de vegetais superiores. Demonstraram que *P. vulgaris* poderia ser facilmente cultivado em suspensão, com uma alta taxa de crescimento. METHA (1966) apresentou um método para a obtenção de células em suspensão com altas taxas de crescimento, a partir de raízes de *P. vulgaris* maceradas. A atividade mitótica destas células alcançou im pico após 7-10 dias de inoculação no meio fresco caindo acentuadamente logo em seguida. Um declínio na frequência de mitose durante as subculturas sucessivas foi observado (METHA *et al.* 1967). VELIKY & MARTIN (1970) desenvolveram um meio de cultura líquida (67-V) para realizar experimentos de fermentação com *P. vulgaris*.

As condições para o estabelecimento de cultura e obtenção de rápida taxa de crescimento celular em suspensões de "Bush Bean" (*P. vulgaris* cv. Contender) foram descritas por LIAU & BOLL (1970). Um estudo detalhado do padrão de crescimento celular e formação de "clumps" foi conduzido por LIAU & BOLL (1971), a fim de estimar o valor potencial deste material para estudos fisiológicos e morfogenéticos. As células em suspensão de feijão apresentaram um ciclo

de crescimento de 12 dias, iniciando a divisão celular e síntese de material celular após 24 horas de inoculação. A fase exponencial não foi acompanhada pelo aumento no tamanho celular nem pelo peso seco. O aumento no peso seco ocorreu após 2 dias e o aumento do volume celular começou apenas quando a fase logarítmica estava quase completa. Uma grande variedade de tipos celulares foi observada durante o ciclo de crescimento. Suspensões celulares de "Bush Bean" provenientes de raiz, hipocótilo e cotilédones produziram grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares (LIAU & BOLL 1972). A produção por célula destes polissacarídeos diminuiu durante a fase logarítmica da cultura e aumentou na fase estacionária. Foi demonstrado que a densidade da cultura em suspensão era uma consequência não só do grande número de células, mas também da presença de grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares no meio de cultura.

O crescimento celular e a produção de polissacarídeos extracelulares em suspensão de células estabelecidas a partir do cotilédones de feijão (*P. vulgaris* cv. Contender), foram comparados em meio contendo AC e meio sintético, na presença de 2,4-D (13,5 μM) e KIN (3 μM) (MANTE & BOLL 1975). Polissacarídeos extracelulares foram produzidos em todos os estádios das culturas. Os mesmos açúcares neutros estavam presentes nos polissacarídeos recuperados de ambas as culturas e a análise de sua composição mostrou algumas trocas durante o ciclo da cultura. Fatores presentes na AC tiveram relativamente pouco efeito na composição dos açú

cares neutros dos polissacarídeos extracelulares. Três diferentes polissacarídeos extracelulares, produzidos por células em suspensão derivadas de cotilédones de feijão, estavam associados com as diferentes fases do ciclo da cultura (MANTE & BOLL 1976).

ARNISON & BOLL (1974) realizaram estudo de padrões isoenzimáticos de calos de raiz, hipocótilo e cotilédone de feijão. Foram estudadas a peroxidase, polifenol oxidase, catalase, malato e glutamato desidrogenases, esterase e leucina amino peptidase. Os padrões de eletroforese mudaram durante o ciclo da cultura e várias isoenzimas apareceram somente em determinadas fases. Os padrões isoenzimáticos das três culturas foram bastante similares, mas diferenças persistentes entre elas foram observadas. Estas diferenças não foram atribuídas à ploidia, seleção de clones especiais ou a variações flutuacionais, mas sim representando diferenças relacionadas aos tecidos originais. Evidências adicionais de que diferenças bioquímicas são mantidas em culturas *in vitro* de feijão foram apresentadas por células em suspensão derivadas de calos de raiz, hipocótilo e cotilédone (ARNISON & BOLL 1975). Comparação dos padrões de isoenzimas das culturas em suspensão com as respectivas culturas de calos (ARNISON & BOLL 1974) mostrou que os padrões de certas enzimas foram muito similares em ambos os tipos de cultura, em contraste com os padrões de outras enzimas que foram completamente diferentes. Os resultados demonstraram o valor de padrões isoenzimáticos como marcadores em cultura celular.

res e o grau de estabilidade de tais culturas durante prolon
gada subcultura.

Um estudo fisiológico e citoquímico em células em suspensão de cotilédone de feijão, na presença ou ausência de 2,4-D e KIN, foi realizado por ARNISON & BOLL (1976). A omissão dos RCs alterou o crescimento e a divis
ão celular e provocou mudanças acentuadas nas características morfológicas. Estudos citoquímicos da atividade peroxidase mostraram que as enzimas eram principalmente citoplasmáticas nas células jovens e predominantemente associadas com a pare
de celular nas células mais velhas. Não foram encontradas di
ferenças aparentes de atividade de peroxidase entre os trata
mentos de RCs, mas as células cultivadas na ausência de RCs mostraram reação enzimática muito mais intensa. A locali
zação e o aumento de atividade de peroxidase com a idade das células foram consistentes com a hipótese de que peroxidase está envolvida na expansão da parede celular e diferencia
ção. Posteriormente, as enzimas fosfatase ácida, leucina ami
no peptidase, glutamato oxalacetato transaminase, estearase e malato glutamato desidrogenase foram também estudadas (ARNISON & BOLL 1978). As diferenças nos padrões isoenzimáti
cos das células de feijão cultivadas na presença ou ausência de RCs foram predominantemente quantitativas. Todas as isoen
zimas estudadas em suspensão celular mostraram trocas nos padrões durante o ciclo da cultura, resultado idêntico às cé
lulas de calos (ARNISON & BOLL 1974). O efeito da omissão de RCs na expressão dos padrões isoenzimáticos foi o mesmo rela

tado para a peroxidase (ARNISON & BOLL 1976) ou seja, predominantemente quantitativo. Os autores concluíram que o perfil isoenzimático das células estava relacionado com o estádio de desenvolvimento da cultura e portanto com as atividades celulares durante aquele estádio. Assim, no caso das células de feijão, os padrões isoenzimáticos poderiam ser usados para identificar as diferentes fases do ciclo da cultura.

BASSARI & CARLSON (1978) utilizaram segmentos de folha primária, epicôtilo, cotilédone, hipocôtilo e radícula de *P. vulgaris* e calos derivados destes tecidos para estudos eletroforéticos. Foram analisados os padrões isoenzimáticos da fosfatase ácida, peroxidase e malato desidrogenase encontrando muito poucas isoenzimas específicas do tecido de origem expressas em calos com crescimento ativo. Os calos apresentaram um padrão isoenzimático distinto, independente do seu tecido de origem.

A manipulação de nutrientes em culturas em suspensão tem levado à indução de vias biossintéticas não encontradas em tecidos vegetais *in vivo*. A enzima quinato desidrogenase foi detectada em culturas de feijão, representando a primeira descrição desta enzima em vegetal (GAMBORG 1966). VELIKY (1972) encontrou que culturas em suspensão de *P. vulgaris* possuíam um potencial biossintético para transformar triptofano nos alcalóides "harman" e "norharman" que não são encontrados em plantas de *Phaseolus*. A presença das enzimas epoxidase e hidrase de epóxido em suspensões celulara

res de *P. vulgaris* foi demonstrada por ROSS *et al.* (1978). Os resultados indicaram altos níveis de atividade enzimática ao se utilizar estilbeno e óxido de estilbeno como substratos.

2.3. Efeitos de radiação no crescimento de calos

A cultura de tecidos de feijão também tem sido usada para estudo dos efeitos de radiação. BAJAJ *et al.* (1970) encontraram que culturas de calos de *Phaseolus* se mostraram muito mais tolerantes à radiação do que plantas intactas ou sementes. Os calos de feijão foram tratados com várias doses de radiação gamma e seus efeitos no crescimento, RNA total, proteína solúvel e conteúdo de nitrogênio foram estudados (BAJAJ 1970). O crescimento de calos foi estimulado por baixos níveis de radiação (0,5 kRad). Entretanto de 1 a 10 kRad houve um gradual e linear decréscimo no crescimento. As células exibiram uma grande variedade de formas e tamanhos, inibição mitótica, degeneração do citoplasma, escurecimento da parede celular e reduzida eficiência de plaqueamento. Entre 20 a 30 kRad o crescimento foi drasticamente reduzido, seguido por uma severa morte das células e parada de crescimento a 40 kRad. Com o aumento de dose o conteúdo de RNA e proteína solúvel decresceram. Nas doses menores (0,5 e 1,0 kRad), não houve diferença significativa no conteúdo total de nitrogênio do controle e das culturas irradiadas. Entretanto, com doses maiores que 2 kRad houve um aumento gradual no nitrogênio total (ug/mg peso seco calos). Os resultados mostraram a existência de uma correlação direta entre os níveis

de crescimento, RNA e proteína. A radiação gamma em geral causou inibição de crescimento de calos, juntamente com queda no conteúdo de RNA e subsequentemente na síntese proteica.

2.4. Estudos fisiológicos

A primeira tentativa de isolamento enzimático de células de folhas de feijão foi feita por JACOBY & DAGAN (1967). Os autores compararam a eficiência deste método com o uso de secções finas de tecidos de folha no estudo da absorção iônica. O fluxo de entrada de Na^+ em secções finas de folhas de feijão foi 65 vezes maior do que o fluxo nas células isoladas enzimaticamente. Como a acumulação de íons na célula depende da integridade da membrana plasmática, o método de isolamento enzimático de células foi considerado impróprio para estudos de absorção iônica em células de feijão. DE VILLIERS & ASHTON (1976) utilizaram células isoladas de mesófilo de *P. vulgaris* para estudar o efeito de IAA, GA_3 , ethrel (10^{-7} a 10^{-3} M) na fotossíntese, respiração e síntese de RNA, proteína e lipídeo. De modo geral, nenhum dos três RCs tiveram um efeito estimulatório pronunciado nos processos estudados, enquanto que altas concentrações de IAA inibiram severamente (60 - 95%) os diferentes processos. GALE & BOLL (1979) utilizaram suspensões de *P. vulgaris* expostas a NaCl para estudar os efeitos do aumento da concentração osmótica no metabolismo. Foi constatado que a sensibilidade de feijão a NaCl foi muito menor em suspensões celulares do que em plantas intactas.

2.5. Aplicações em fitopatologia

A possibilidade de utilização de culturas de tecidos de feijão para estudos fitopatológicos foi primeiramente demonstrada por BAJAJ & SAETTLER (1970). O crescimento de calos de feijão foi inibido 77%, 41% e 10% quando 10% (v/v) de filtrado de cultura de *Pseudomonas phaseolicola* (Burk.) Dows, *P. syringae* van Hall e *P. morsprunorum* Wormald respectivamente, foram adicionados ao meio de cultura para o crescimento de calos. Apenas filtrado da cultura de *P. phaseolicola* induziram halos em folhas de feijão. Pelas similaridades encontradas entre os efeitos fisiológicos da toxina contida no filtrado de *P. phaseolicola*, em calos de feijão e nos tecidos verdes das folhas foi sugerido a possibilidade do uso de tecido de calos para estudar o modo de ação da toxina.

A produção de fitoalexinas em muitas interações naturais planta-fungo é estimulada nas células do hospedeiro por compostos de origem fúngica denominados "indutores". Estudos nesta área tem utilizado metais pesados ou antibióticos como substâncias com capacidade "indutora". Utilizando a cultura de células em suspensão de *P. vulgaris*, DIXON & FULLER (1976) demonstraram a produção da fitoalexina faseolina na ausência de estimulação fúngica ou química. A extensão desta produção não induzida foi afetada pelos níveis de RCs do meio de cultura. Já FRAME *et al.* (1976) obtiveram resultados negativos ao tentarem induzir a síntese de faseolina em calos derivados de cotilédones de feijão (*P. vulgaris* cv. Canadian Wonder), apesar de terem investigado uma

grande variedade de condições nutricionais. Posteriormente DIXON & FULLER (1977) caracterizaram componentes do filtrado da cultura de *Botrytis cinerea* Fr. capazes de induzir biossíntese de faseolina em células em suspensão de *P. vulgaris*. Foi considerado que o sistema em cultura *B. cinerea* - feijão poderia ser útil para o estudo do modo de ação de indutores a nível celular e também um conveniente sistema para o estudo da biossíntese de isoflavonóides em geral. Entretanto os níveis de produção de faseolina em resposta a tratamento com o filtrado da cultura do fungo foram baixos, sob as condições de cultura utilizadas. Posteriores investigações foram feitas (DIXON & FULLER 1978) visando-se estudar os efeitos da composição do meio de cultura na capacidade de síntese de faseolina, tanto em culturas induzidas (contendo o filtrado do fungo), como em culturas não induzidas. As concentrações dos RCs no meio de cultura afetaram o crescimento das culturas e a quantidade de faseolina produzida, tanto em culturas não tratadas como em resposta ao tratamento das culturas de feijão com filtrados de *Botrytis cinerea*.

HARGREAVES & SELBEY (1978) relataram a produção de faseolina em suspensões celulares de *P. vulgaris* após tratamento com extrato de hipocótilo de feijão. BAKER *et al.* (1980) também utilizaram suspensões celulares de feijão para estudos fitopatológicos. A degradação da parede celular por patógenos tem um papel relevante na patogênese. Paredes celulares foram preparadas a partir de células em suspensão de feijão e arroz, para examinar os efeitos da endopectase lyase na solubilização dos carboidratos da parede

celular e concomitantes alterações ultraestruturais.

2.6. Isolamento e cultura de protoplastos

O isolamento e cultivo de protoplastos de tecido foliar de *P. vulgaris* foi demonstrado por PELCHER *et al.* (1974). Os protoplastos foram isolados a partir de folhas primárias e trifolioladas. A idade da planta não foi um fator crítico na produção de protoplastos, entretanto as condições em que as plantas foram crescidas e o pH do meio de isolamento influenciaram significativamente o rendimento de protoplastos. A regeneração da parede celular foi observada entre 24 - 48 horas após o isolamento e a divisão celular após 60 horas. Após 3 - 4 semanas de cultura em meio líquido (em gotas) os "clusters" produzidos foram transferidos para meio sólido, obtendo-se subsequente formação de calos.

2.7. Organogênese

Até o presente, somente um trabalho mostrou organogênese em feijão (CROCOMO *et al.* 1976a). Plântules foram obtidos através da cultura de explantes foliares de *P. vulgaris* var. Bico de Ouro em meio de cultura com composição química indefinida. Além dos RCs IAA (11,4 μ M), NAA (5,4 μ M) e KIN (0,9 μ M) foi adicionado ao meio básico de cultura (67-V), extrato de semente de feijão. Na concentração de 1/4 sementes/ml dois plântules se desenvolveram entre todos os experimentos realizados, representando cerca de 400 culturas.

Na tentativa de induzir e controlar tanto a morfogênese de raízes como a diferenciação de plântulas em *P. vulgaris* utilizando meio de cultura quimicamente definido, CROCOMO *et al.* (1976b) testaram diferentes interações de RCs combinando uma auxina com uma citocinina. As interações hormonais testadas (IAA x KIN, NAA x KIN e IAA x Z) foram efetivas em controlar o crescimento de calos e a morfogênese de raízes, mas não se mostraram efetivas na indução de gemas. Foi inferido que provavelmente para *P. vulgaris* as exigências para a indução de gemas seriam dependentes de fatores mais complexos, químicos e físicos, além da interação auxina x citocinina.

2.8. Cultura de embrião e meristema

O cruzamento de *Phaseolus vulgaris* com *Phaseolus ritensis* Jones foi obtido com o auxílio da cultura de embrião (BRAAK & KOOISTRA 1975). Procurou-se transferir a tolerância a temperaturas baixas, característica presente em *P. ritensis*, às variedades de feijão cultivado. Plantas híbridas foram obtidas apenas quando *P. vulgaris* foi usado como planta fêmea e os embriões foram cultivados *in vitro*. A cultura de embrião foi também necessária para obter as plantas triplóides resultantes do primeiro retrocruzamento com o feijão comum. Entre 684 embriões cultivados, apenas 71 (cerca de 10%) se desenvolveram em plântulas. Porém, apenas três destes se desenvolveram em plantas adultas, quando transplantados para solo.

A possibilidade de hibridação interespecífica em *Phaseolus*, através de técnicas de cultura *in vitro*, foi também demonstrada por MOK *et al.* (1978b). Utilizando técnicas convencionais de cruzamento, embriões híbridos de *P. vulgaris* x *P. lunatus* se desenvolveram apenas até o estágio de coração. Cruzamentos recíprocos foram experimentados, mas as vagens abortaram muito cedo. Embriões derivados de *P. vul*garis x *P. acutifolius* e de cruzamentos recíprocos chegaram ao estágio de cotilédone, porém não foram obtidas plantas adultas. Embriões imaturos, resultantes de cruzamentos interespecíficos, foram cultivados em meio básico de MS acrescido de GA_3 (0,1 μ M). Por esta técnica, plantas foram obtidas derivadas dos cruzamentos de *P. vulgaris* x *P. lunatus*, *P. vulgaris* x *P. acutifolius* e *P. acutifolius* x *P. vulgaris*. O GA_3 apesar de não ter aumentado a sobrevivência dos embriões, auxiliou o alongamento das plântulas.

CROCOMO *et al.* (1979) estudaram o controle do desenvolvimento de *P. vulgaris* através da cultura de embrião. Modificações da composição do meio de cultura, principalmente das interações de RCs, permitiram a obtenção de calos, morfogênese de raízes ou desenvolvimento de plantas.

Através da cultura de meristemas (0,2 - 2 mm), plantas de *Phaseolus aureus* Roxb. (cvs. ML-1, ML-5 e G-65) e *P. mungo* L. cv. Mash 1-1 foram recuperadas (BAJAJ & DHANJU 1979). Meristemas extraídos de plântulas com duas a três semanas de idade foram cultivados em meio básico de MS, suplementado com diferentes concentrações e combinações de

IAA, 2,4-D e KIN. Os meristemas apresentaram sinais de cre
scimento após uma semana de cultura, entretanto o desenvolvi
mento posterior foi determinado pelo seu tamanho. Houve uma
correlação direta entre o tamanho do meristema e a porcenta
gem de recuperação de plantas. Adição de 2,4-D (4,5 - 9,0 μ M)
causou profusa proliferação de calos; alta concentração de
KIN (9,2 μ M) inibiu a formação de raiz enquanto que IAA
(11,4 μ M) promoveu a produção de plantas. Melhor crescimento
e desenvolvimento de plantas foi observado na combinação de
IAA (11,4 μ M) com KIN (2,3 μ M), entretanto as respostas fo
ram genotipicamente orientadas. Em *P. aureus* a melhor respos
ta de crescimento foi apresentada pelo cultivar ML-5, seguida
por 'ML-1' e 'G-65'. A porcentagem de explantes com respos
tas, variou entre 20-90% dependendo do genótipo e do tamanho
do meristema.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Material Vegetal

Sementes do banco de germoplasmas de fei
jão, existente na Seção de Genética do Instituto Agronômico
de Campinas, foram utilizadas para a realização deste
trabalho. Um total de 36 cultivares foram cultivados *in vi*
tro (TABELA 4).

2. Preparo dos Explantes

Sementes ou folhas trifolioladas de plan
tas cultivadas em casa de vegetação, serviram como fonte de
explante. Estas foram lavadas inicialmente com detergente
(Neo-dish) a 1% e água de torneira, sendo posteriormente es
terilizadas superficialmente em condições assépticas. O tra
tamento esterilizante adotado para cada fonte de explante
foi escolhido a partir dos resultados de testes de esterili
zação. Uma vez esterilizadas, as sementes ou folhas trifolio
ladas foram lavadas três vezes com água estéril para remover
os resíduos do esterilizante.

As sementes, após esterilização e lava
gem, foram colocadas em frascos de vidro de 120 ml de volu
me, contendo algodão umedecido em água (4 sementes por fras
co). As sementes foram deixadas para germinar no escuro. A
pós 2 dias de germinação os cotilédones foram extraídos, usan
do-se a metade de um cotilédone como explante inicial. Seg
mentos de hipocótilo (1 cm de comprimento), segmentos de fo

TABELA 4: Cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. utilizados nas culturas *in vitro* de tecidos de feijão.

Actopan	Fígado de Galinha	Piratã-1
Bayo	Gold Korrel	Puebla-153
Bico de Ouro	Jules	N/12/110 - Rapê
Brasil 1087	Linea-17	Red Kloud
Carioca	Linea-29	Rosinha G-2
Catu	2063 N 1892 Mamoninha	Roxinho
Cavalo Xaxim	Moruna	1052-Roxote
Chumbinho - 63	Mulatinho 46	2013 Sacavem
Coco Blanchi	N 203	Sel. L-132
Copinha Manteiga	Nep-2	541 Sujo
60 Dias	Palmital Precoce	2086 Tupi
Fartura	Pintado	73 Vul 3208

lha primária ($0,5 \text{ cm}^2$) e ápice meristemático ($0,1$ a $0,2 \text{ cm}$ de comprimento) foram extraídos de plântulas de 7 dias de idade. Quando se usou embrião como explante inicial, estes foram extraídos de sementes previamente enbebidas em água por 24 horas. A partir de folhas trifolioladas, segmentos de 1 cm^2 foram utilizados como explantes iniciais.

Os explantes (embrião, ápice meristemático, segmentos de folha trifoliolada, folha primária, hipocótilo ou cotilédone) foram transferidos logo após a extração para placas de Petri contendo meio de cultura de incubação. Este meio foi composto por: sais de MS (TABELA 5) na metade da concentração normal; sacarose (2%); agar (0,8%). O pH foi ajustado para 5,5 com KOH e HCL, após a adição de todos os componentes, antes da autoclavagem. A incubação foi feita por 3 a 5 dias no escuro para se verificar a eficiência da esterilização e a viabilidade dos explantes. Este período de incubação pré-experimental mostrou-se muito útil na seleção de explantes foliares viáveis e eliminação de material contaminado, em experimentos de cultura *in vitro* de café (SONDAHL & SHARP, 1979).

Explante viável foi considerado aquele que apresentou coloração escura (oxidação) no caso de embrião e segmentos de folha e cotilédone; transparência no caso de hipocótilo e não entumescimento no caso de ápice meristemático.

Após incubação, os explantes não contaminados e viáveis foram transferidos para meio de cultura primi

TABELA 5: Concentrações dos sais minerais de MS (MURASHIGE & SKOOG 1962), PC-L2 (PHILLIPS & COLLINS 1979), B5 (GAMBORG *et al.* 1968) e MM (MOREL & MILLER 1964).

Macronutrientes (mM)	MS	PC-L2	B5	MM
NH_4NO_3	20,6	12,5	-	-
KNO_3	18,8	20,8	25,0	1,2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,0	4,1	1,0	-
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	2,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5	1,8	1,0	0,5
KH_2PO_4	1,25	2,4	-	0,9
KCl	-	-	-	13,4
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	1,0	7,5
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	0,6	1,1	-
 Micronutrientes (μM)				
KI	5,0	6,0	4,5	0,06
H_3BO_3	100,0	82,0	50,0	1,7
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100,0	-	-	0,4
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	90,0	60,0	-
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	30,0	-	-	-
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	17,5	7,0	4,3
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	1,7	1,0	-
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	0,1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,4	0,1	0,1
AlCl_3	-	-	-	0,2
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,4	0,1	-
Na_2EDTA	100,0	90,0	100,0	100,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100,0	90,0	100,0	100,

nária. Culturas secundárias, terciárias, etc foram realizadas conforme o experimento.

Quando se usou segmentos nodais como explante, as sementes foram colocadas para germinar em frascos contendo meio de cultura ou algodão umedecido em solução a quosa de 6-BA. Após germinação das sementes, os segmentos nodais foram transferidos diretamente para meios de cultura primário, secundário, etc. A composição do meio de cultura, a condição de luminosidade e o tempo, tanto para germinação como para as culturas, variaram conforme o experimento.

3. Meios e Condições de Cultura

As vidrarias e os meios de cultura foram autoclavados por 20 minutos a 120 °C e 1 atmosfera de presão. Todo o trabalho de esterilização e transferência de explantes para meios de cultura foi feito em câmara asséptica de fluxo laminar. Os frascos (com meio de cultura e explante) foram vedados com filme plástico de PVC (16,5 µm de espessura). As culturas foram mantidas no escuro a $26 \pm 3^\circ\text{C}$, para a produção de calos. Para regeneração de plântletes e desenvolvimento de plântulas, as culturas foram mantidas sob condições controladas de luz (fotoperíodo de 12 horas, 400-800 lux) e temperatura ($26 \pm 3^\circ\text{C}$). Algumas culturas foram mantidas em casa de vegetação.

4. Esterilização do Material Vegetal

4.1. Testes de esterilização de sementes

Para a obtenção de explantes estéreis (embrião, ápice meristemático, segmentos nodais, segmentos de folha primária, hipocótilo ou cotilédone) sementes de *P. vulgaris* cv. Moruna tiveram diferentes tratamentos esterilizantes agrupados em dois testes (TABELAS 6 e 7). Os resultados dos tratamentos de esterilização foram lidos após 7 dias de germinação das sementes, anotando-se a porcentagem de contaminação e comprimento de hipocótilo. Durante a germinação, as sementes foram mantidas no escuro, em frascos com algodão e água.

4.2. Testes de esterilização de folhas trifolioladas

Folhas trifolioladas de *P. vulgaris* cv. Moruna foram testadas com diferentes tratamentos esterilizantes agrupados em dois testes (TABELAS 8 e 9). Após esterilização as folhas foram cortadas em segmentos de 1 cm^2 e incubadas por 7 dias em placas de Petri contendo meio de cultura. Ao término do período de incubação foi feita leitura anotando-se a porcentagem de contaminação e viabilidade dos explantes.

5. Estabelecimento de Cultura Sólida

As respostas de crescimento *in vitro* de diferentes explantes e cultivares, em interação com reguladores de crescimento (RCs) foram testadas no meio de cultura primário I (TABELA 10). Ao meio básico foram adicionados RCs, combinando-se uma fonte de auxina com uma fonte de citocinina.

TABELA 6: Teste 1 para esterilização de sementes de *P. vulgaris* cv. Moruna.

Trata/o nº	Etanol		NaOCl	
	Conc. (%)	Tempo (min.)	Conc. (%)	Tempo (min.)
1	-	-	1,6	30
2	70	5	1,6	30
3	70	10	1,6	30
4	70	15	1,6	30
5	96	5	1,6	30
6	96	10	1,6	30
7	96	15	1,6	30

TABELA 7: Teste 2 para esterilização de sementes de *P. vul*
garis cv. Moruna.

Trato/º nº	Etanol		NaOCl	
	Conc. (%)	Tempo (min)	Conc. (%)	Tempo (min)
1	96	5	2,6	10
2	96	5	3,9	10
3	96	5	5,2	10
4	96	10	2,6	20
5	96	10	3,9	20
6	96	10	5,2	20
7	96	15	2,6	30
8	96	15	3,9	30
9	96	15	5,2	30

TABELA 8: Teste 1 para esterilização de folhas trifoliadas de *P. vulgaris* cv. Moruna.

nº	NaOCl	
	Conc. (%)	Tempo (min)
1	1,0	3
2	1,3	3
3	1,6	3
4	1,0	6
5	1,3	6
6	1,6	6

TABELA 9: Teste 2 para esterilização de folhas trifolioladas de *P. vulgaris* cv. Moruna.

nº	Etanol	NaOCl	
	(96%)	Conc. (%)	Tempo (min)
1	dip	1,0	3
2	"	1,3	3
3	"	1,6	3
4	"	1,0	6
5	"	1,3	6
6	"	1,6	6

TABELA 10: Meios de cultura utilizados para o cultivo de tecidos de feijão.

Micronutrientes (mM)	Meio de cultura															
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI
NH_4NO_3	20,6	10,3	10,3	10,3	12,5	-	-	20,6	20,6	-	-	-	-	10,3	-	20,6
KNO_3	18,0	9,4	9,4	9,4	20,8	25,0	1,2	18,8	18,8	20,6	20,6	17,5	20,0	18,8	2,7	18,8
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	1,5	1,5	1,5	4,1	1,0	-	1,0	3,0	1,0	1,0	0,5	1,0	1,5	-	3,0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	-	-	2,1	-	-	-	-	-	-	-	4,0	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5	0,7	0,7	0,7	1,0	1,0	0,5	1,5	1,5	1,5	1,0	0,5	1,0	0,7	1,1	1,5
KH_2PO_4	1,25	0,6	0,6	0,6	2,4	-	0,9	1,25	1,25	-	-	-	-	0,6	0,9	1,25
KCl	-	-	-	-	-	-	13,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	-	-	-	1,0	7,5	-	-	1,0	1,0	0,5	1,0	-	0,04	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	0,6	1,1	-	-	-	1,1	1,1	0,6	1,1	-	-	-
Micronutrientes (µM)																
KI	5,0	2,5	5,0	2,5	6,0	4,5	0,06	5,0	5,0	4,5	4,5	2,3	4,5	6,5	-	5,0
H_3BO_3	100,0	50,0	100,0	50,0	82,0	50,0	1,7	100,0	100,0	50,0	50,0	25,0	50,0	10,0	48,4	100,0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100,0	50,0	100,0	50,0	-	-	0,4	100,0	100,0	-	-	-	-	10,0	9,0	100,0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	98,0	68,0	-	-	-	60,0	60,0	30,0	60,0	-	-	-
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	30,0	15,0	30,0	15,0	-	-	-	30,0	30,0	-	-	-	-	-	3,0	30,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	17,5	7,8	4,3	-	-	7,0	7,0	3,5	7,0	-	-	-
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	0,5	1,0	0,5	1,7	1,0	-	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0	0,1	1,0	1,0
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,05	0,1	0,05	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05	0,1	0,01	0,5	0,1
AlCl_3	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,05	0,1	0,05	0,4	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05	0,1	0,01	-	-
Na_2EDTA	100,0	50,0	100,0	50,0	90,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	50,0	100,0	100,0	110,0	100,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100,0	50,0	100,0	50,0	90,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	50,0	100,0	100,0	147,5	100,0
Vitaminas (µM)																
tiamina	30	30	30	30	6,0	30	15	15	15	30	30	3	30	30	-	-
piridoxina	15	15	15	15	2,5	5	7,5	7,5	7,5	5	15	2,4	5	15	-	1,2
ácido nicotínico	30	30	30	30	-	10	15	15	15	10	30	41	10	30	-	-
ácido glutâmico	-	3,4	-	3,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
glutamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
histidina	-	64	-	64	-	-	-	-	-	-	-	68	-	-	-	-
cisteína	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
													200	-	-	-
Reguladores do Crescimento (µM)																
KIN	-	10,0	2,5	10,0	-	-	-	-	10,0	-	-	-	-	-	-	-
6-BA	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	0,5	-	-	-	2,5	-	-
2ip	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
2,4-D	-	-	-	-	10,0	5,0	-	-	0,0	-	-	-	-	-	-	-
IAA	-	-	-	-	-	-	-	-	10,0	-	-	-	-	-	-	-
NAA	-	-	0,25	2,5	-	-	5,0	1,0	-	-	-	1,0	-	0,5	-	-
IBA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GA_3	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
Outros Componentes																
caseína hidrolisada (g/l)	-	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
meso-inositol (µM)	550	550	550	550	550	550	225	225	225	550	550	655	550	550	-	550
sacarose (g/l)	40	20	20	20	20	30	20	30	30	20	20	20	20	20	10	30
agar (g/l)	8	8	8	8	-	8	8	8	8	8	8	8	8	8	10	10
pH	5,5	5,5	5,5	5,5	5,8	5,5	5,5	5,5	5,5	5,8	5,5	5,5	5,8	5,5	5,5	5,5

(a) Ver TABELA 11.

TABELA 11: Combinações de citocininas utilizadas no meio de cultura sólido XI.

Tratamento	Citocinina (μM)			Z
	6-BA	KIN	2ip	
1	5	5	5	5
2	2,5	2,5	2,5	2,5
3	1,0	1,0	1,0	1,0
4	0,5	0,5	0,5	0,5
5	0,25	0,25	0,25	0,25
6	0,125	0,125	0,125	0,125
7	0,5	-	-	-
8	-	-	-	-

na, testando-se os diferentes RCs em várias interações dialélicas que variaram conforme o experimento. Para cada interação testada foram feitas 10 repetições, utilizando-se frascos quadrados com 10 ml de meio sólido.

Ao término da cultura primária foram feitas leituras avaliando-se a contaminação, aspecto dos calos e indução de raízes. Dois critérios foram utilizados para avaliar o crescimento de calos: índice de crescimento e aumento de peso fresco. Para a avaliação do índice de crescimento atribuiu-se notas de 0 a 5 (FIGURA 1) conforme o tamanho do calo. Nota zero foi dada ao explante que permaneceu viável, com bom aspecto, porém sem crescimento de calo. O índice de crescimento foi determinado usando-se a seguinte fórmula (SONDAHL & SHARP 1979):

$$X = \frac{n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4 + 5n_5}{N - n_c}$$

onde: $n_{1,2...5}$ = nº de explantes com crescimento 1, 2...5 respectivamente; N = nº total de repetições e n_c = nº de repetições contaminadas. O crescimento de calos também foi avaliado pelo peso fresco dos calos obtidos. O valor do peso fresco foi dividido pelo peso do explante inicial, utilizando-se como avaliação de crescimento o aumento de peso fresco dos tecidos. Os calos foram também avaliados quanto à cor e rigidez. A indução de raízes foi avaliada por notas numa escala de zero a três (FIGURA 2), calculando-se uma média de crescimento de raiz por tratamento com fórmula semelhante à utili

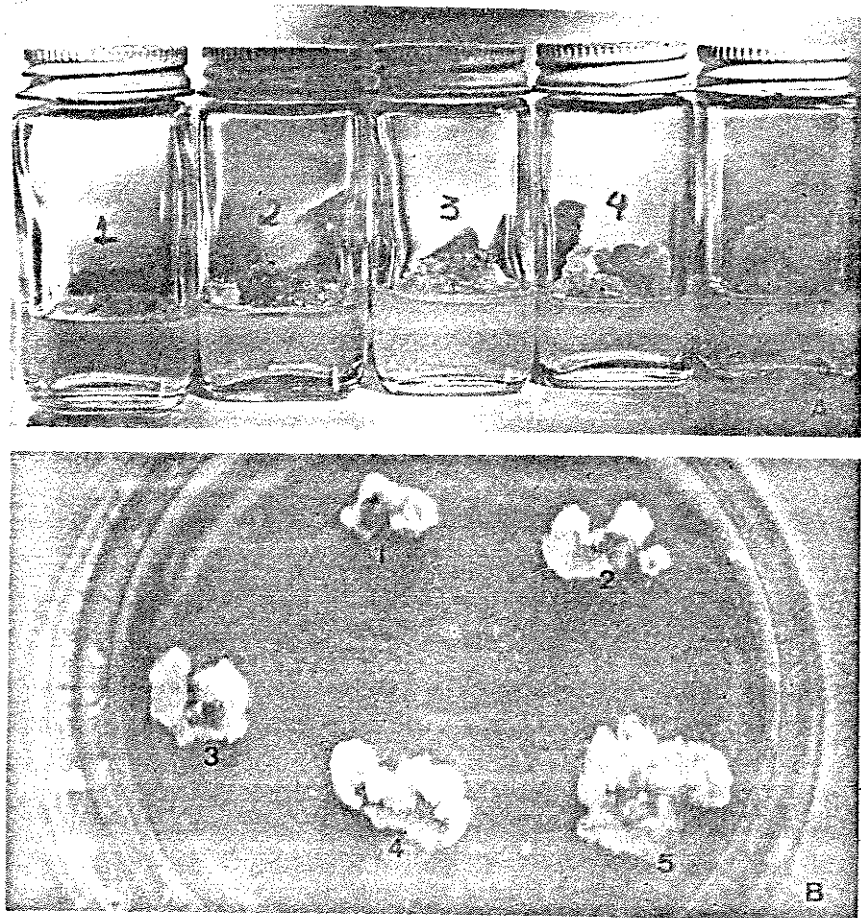


FIGURA 1. Caracterização de crescimento de calos de tecidos de *Phaseolus vulgaris*. Avaliação visual por volume de calos com notas variando de 1 a 5: (A) calos de hipocótilos; (B) calos de folhas.

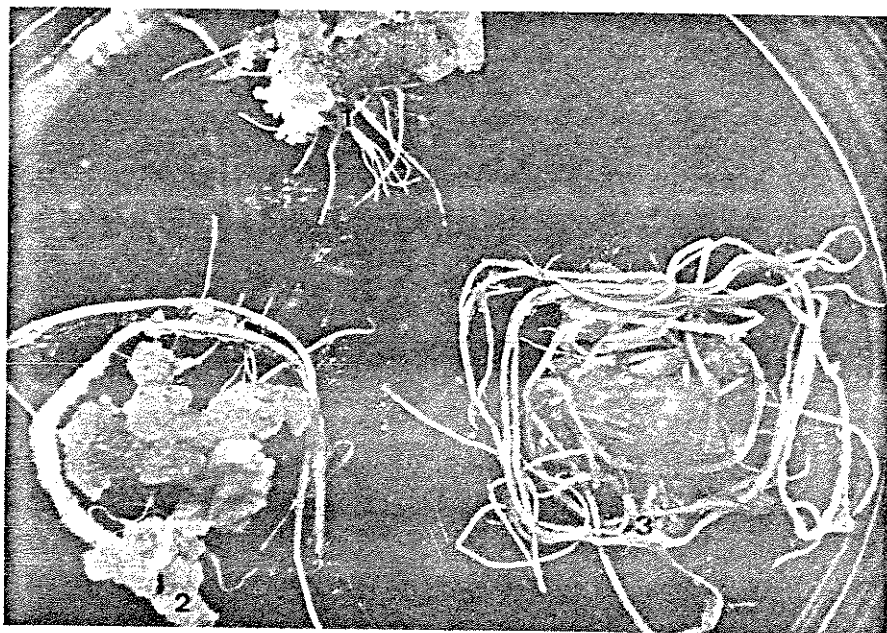


FIGURA 2. Caracterização da diferenciação de raízes em calos de *Phaseolus vulgaris*. Avaliação visual por intensidade de enraizamento com notas variando de 1 a 3.

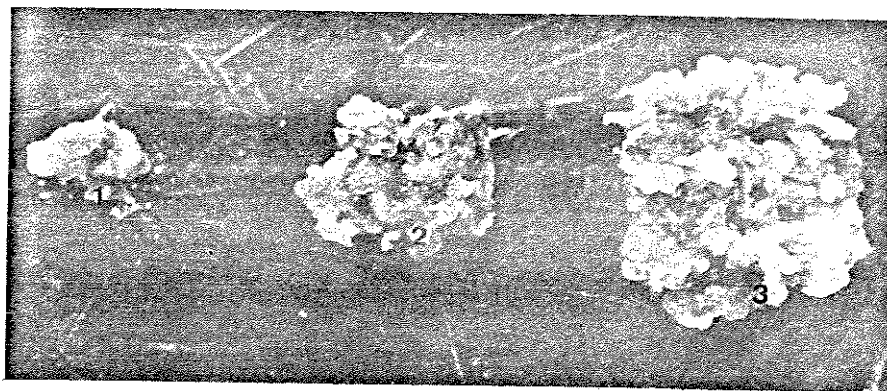


FIGURA 3. Caracterização de crescimento de calos de *Phaseolus vulgaris* derivados da cultura de ápices meristemáticos. Avaliação visual por volume de calos, com notas variando de 1 a 3.

zada no cálculo do índice de crescimento de calos. A diferenciação de raízes foi também avaliada quanto a presença ou ausência. A partir dos dados obtidos de crescimento de calos e raízes foram construídos gráficos para melhor expressar os resultados.

Ao término da cultura primária, após leitura, os calos obtidos foram inoculados nos meios secundários II, III e IV (TABELA 10) visando indução de morfogênese. As culturas secundárias foram mantidas sob condições de temperatura e fotoperíodo controlados.

5.1. Cultura de diferentes explantes

Os seguintes explantes foram testados para a produção de calos: embrião, segmentos de hipocótilo, folha trifoliolada, folha primária e cotilédone de *P. vulgaris* cv. Moruna. Os explantes foram cultivados no meio básico I, acrescido dos RCs KIN e 2,4-D nas concentrações de 1; 5; 10; 20 e 50 μM em delineamento dialético, totalizando 25 tratamentos com 10 repetições. A cultura primária teve a duração de 25 a 26 dias. O crescimento de calos e raízes foi avaliado através de notas. Os calos obtidos na cultura primária foram inoculados no meio indutor II. Esta cultura secundária teve a duração de 90 dias.

5.2. Cultura em diferentes interações de reguladores de crescimento

Diferentes RCs foram testados em cultura

primária para a obtenção de calos a partir de folhas primárias de *P. vulgaris* cv. Moruna. Como fonte de citocinina foram testadas: KIN, 6-BA e 2ip nas concentrações de 0; 5; 10; 20; 50 e 75 μM . Como fonte de auxina foram testadas: 2,4-D (0; 1; 5; 10; 20 e 50 μM), IAA (0; 10; 20; 50; 75 e 100 μM) e NAA (0; 5; 10; 20; 50 e 75 μM). Nove interações dialélicas de fontes de citocinina x auxina foram testadas utilizando-se o meio básico I. Após 29 dias de cultura, o crescimento de calos foi avaliado por notas e por peso fresco. A presença ou ausência de raízes foram também consideradas. Os calos provenientes destes nove experimentos foram inoculados em meio secundário III e cultivados durante 100 dias.

5.3. Cultura de diferentes cultivares

Diferentes cultivares foram testados para a produção de calos em culturas contendo a composição do meio básico I. Explantes foliares de *P. vulgaris* cultivares Carioca, Piratã-1, Roxinho e Puebla-153, extraídos a partir de folhas primárias, foram cultivados na combinação dialélica de 6-BA x 2,4-D (ambos nas concentrações de 1; 5; 10; 20 e 50 μM). Após 29 dias de cultura primária, o crescimento de calos foi avaliado pelo aumento de peso fresco.

A indução de calos também foi testada a partir de folhas trifolioladas do cultivar Piratã-1 no meio básico I suplementado com KIN x 2,4-D em interação dialélica (ambos nas concentrações de 1; 5; 10; 20 e 50 μM). A avaliação da indução de calos foi feita por notas, aos 25 dias de

cultura primária.

Os calos obtidos a partir da cultura de explantes foliares dos diferentes cultivares, foram inoculados no meio indutor IV onde permaneceram por 90 dias.

6. Estabelecimento de Cultura Líquida

Calos friáveis (com cerca de 30 dias de idade) obtidos a partir da cultura sólida de embrião, segmentos de hipocótilo e cotilédone de *P. vulgaris* cv. Moruna, serviram como inóculo inicial para o estabelecimento da cultura de células em suspensão. O meio de cultura V foi utilizado (TABELA 10). A esta composição básica foi adicionada ou não CH (2g/l). Como inóculo inicial utilizou-se cinco gramas de calos em 50 ml de meio líquido, utilizando-se erlenmeyers de 250 ml de volume para estas culturas. Estes permaneceram em agitador orbital horizontal com aproximadamente 150 rotações por minuto, em condições ambientais de laboratório. O meio de cultura foi renovado a cada três dias, substituindo-se 30% da suspensão por meio líquido fresco.

As células em suspensão derivadas da cultura líquida foram transferidas para meio sólido VI (TABELA 10), distribuídos em frascos de 50 ml, com 10 ml de meio em cada. As células em suspensão foram filtradas a vácuo, em filtro de porcelana (filtro Buchner) de 15 cm de diâmetro, com papel de filtro "Whatman" nº 1, para eliminar o meio líquido. Este papel de filtro, contendo uma camada superficial de células, foi cortado com tesoura, em condições assépti

cas, em segmentos de 1 cm². Estes segmentos foram inoculados no meio de cultura VI, mantendo-se a cultura sob condições controladas, no escuro.

7. Estabelecimento de Cultura de Ápice Meristemático

Ápices meristemáticos de *P. vulgaris* cv.

Moruna foram cultivados em diferentes meios sólidos. Os meios de cultura testados foram os seguintes: VII, VIII, IX e X (TABELA 10). Os ápices meristemáticos foram cultivados sob condições controladas de iluminação (400-800 lux; fotoperíodo de 12 horas) e temperatura (26±3°C). Utilizou-se 20 repetições para cada meio de cultura testado.

8. Cultura de Ápices Meristemáticos de 36 Cultivares de *Phaseolus vulgaris*

8.1. Indução de calos

O meio de cultura sólido IX foi utilizado para induzir o crescimento de calos em 36 cultivares de *P. vulgaris* (TABELA 4). Ápice meristemático foi utilizado como explante inicial, fazendo-se 20 repetições por cultivar. Após 35 dias de cultura foi feita uma avaliação de crescimento de calos através de um critério de notas por cultivar. Nota um foi dada quando o crescimento foi insatisfatório; nota dois quando se obteve crescimento satisfatório e nota três para o crescimento ótimo (FIGURA 3).

8.2. Cultura líquida

Calos obtidos a partir da cultura de ápices meristemáticos no meio IX serviram como inóculo inicial para estudar o crescimento de células de 36 cultivares (TABELA 4), em cultura líquida. As condições de cultura, concentração de inóculo e renovação de meio foram feitos conforme metodologia adotada para o estabelecimento de cultura de células em suspensão do cultivar Moruna. Utilizou-se o meio de cultura líquido V acrescido de CH (2g/l). As células crescidas neste meio foram filtradas e transferidas para o meio sólido XI (TABELA 10). Para cada cultivar foram feitas cinco repetições por tratamento, sendo os frascos mantidos em casa de vegetação, durante 60 dias.

8.3. Indução de morfogênese

Âpices meristemáticos dos 36 cultivares (TABELA 4) foram cultivados no meio sólido X (TABELA 10) visando o desenvolvimento de plântulas. Foram feitas 20 repetições por cultivar. Após 45 dias de cultura em condições de luz e temperatura controladas, as culturas foram transferidas para meio secundário com a mesma composição do meio anterior (meio X), porém sem 6-BA. Metade das repetições desta cultura secundária foi mantida na sala de cultura iluminada e o restante em casa de vegetação. Após 40 dias de cultura secundária, os cultivares que responderam melhor às condições *in vitro* foram transferidos para meio terciário XII (TABELA 10) acrescido ou não de GA_3 (2 μ M). Após 50 dias de cultura em casa de vegetação, foi feita a avaliação final de crescimento.

8.4. Cultura de ápices meristemáticos de 'Palmital Precoce'

Submeristemas de *P. vulgaris* cv. Palmital Precoce foram cultivados no meio básico XIII, acrescido de 6-BA (0,5 - 1,0 - 2,0 - 5,0 μM) e 2,4-D (0 - 0,025 - 0,05 - 0,1 μM) em ensaio dialético (16 tratamentos, 10 repetições). Após quatro semanas de cultura primária sob condições controladas, os tecidos foram sub-cultivados no mesmo meio básico XIII (sem RCs) e transferidos para casa de vegetação. Cinco a seis semanas depois, as gemas obtidas foram subcultivadas no meio terciário XIV. As plântulas em desenvolvimento foram transferidas para uma mistura de areia-vermiculite (2:3) contendo o meio XIV, sem sacarose.

9. Testes de Meios de Cultura Regenerativos em Leguminosas

Tecidos de *P. vulgaris* cvs. Moruna e Palmital Precoce foram testados para regeneração, repetindo-se protocolos utilizados com sucesso em outras leguminosas. A TABELA 12 apresenta a composição salina, RCs e aditivos orgânicos, adotados nas culturas primárias e secundárias para testar a capacidade regenerativa em 'Moruna' e 'Palmital Precoce'. Apresenta também a espécie e respectiva fonte de explante onde tal metodologia levou à regeneração de plantas *in vitro*. Nos experimentos com feijão foram testados tecidos derivados de ápice meristemático, cotilédone, hipocótilo e folha primária, extraídos de plântulas de sete dias de idade, germinadas em condições estéreis no escuro. Para cada tratamento foram feitas 20 repetições por explante. Cada período

TABELA 12: Composição dos meios de cultura (primário e secundário) utilizados para testar a capacidade regenerativa em *Phaseolus vulgaris*. A espécie e respectiva fonte de explante nas quais metodologia semelhante levou à regeneração de plantas *in vitro* são também apresentadas, com as respectivas referências.

Espécie	Explante	Meio Básico	RCs e Aditivos Orgânicos		Referência
			Meio 1º	Meio 2º	
<i>Crotalaria juncea</i>	caule, folha	MS	25 µM NAA 2,5 µM KIN	230 µM KIN	RAMAWAT <i>et al.</i> 1977
<i>Indigofera enneaphylla</i>	cotilédone,	B5	2,5 µM IAA	10 µM NAA	BHARAL & RASHID 1979b
	hipocótilo		5,0 µM 6-BA	1 µM 6-BA	
<i>Lathyrus sativus</i>	ápice meris- temático	B5	2,5 µM IAA	2,5 µM IAA	MUKHOPADHYAY & BHOJWANI 1978
			5,0 µM 6-BA	5,0 µM 6-BA	
<i>Medicago sativa</i>	ápice meris- temático	B5	10 µM NAA	10 µM NAA	CHARYAL & MAHESHWARI 1980
			2,5 µM 6-BA	2,5 µM 6-BA	
<i>Medicago sativa</i>	ovário, hipocótilo	B5	50 µM 2,4-D 5 µM KIN	2 g/l EL	WALKER <i>et al.</i> 1978
<i>Pisum sativum</i>	epicótilo	MS	10 µM NAA	1 µM IAA	NALMBERG 1979
			5 µM 6-BA	20 µM 6-BA	
<i>Stylosanthes hamata</i>	cotilédone, radicula	B5	10 µM 2,4-D 0,2 µM KIN	sem RC	SCOWCROFT & ADAMSON 1976
<i>Trifolium alexandrinum</i>	hipocótilo	MS	5 µM NAA	10 µM NAA	MOKHTARZADEH & CONSTANTIN 1978
			7,5 µM KIN	0,5 µM 2ip	

de cultura durou quatro semanas, anotando-se as respostas de crescimento após cada período. As culturas foram sempre mantidas sob condições controladas de luz e temperatura.

A metodologia apresentada por HANH *et al.* (1981) para regeneração em *Psophocarpus tetragonolobus* também foi testada em *Phaseolus vulgaris* cv. Puebla-153. As sementes foram germinadas em frascos contendo o meio de cultura XV. Após sete dias de germinação, finas camadas celulares (contendo a epiderme) extraídas de hipocôtilo, folha primária e cotilédone foram cultivadas no meio XVI. Calos obtidos com 8 a 12 dias de cultura primária foram transferidos para mesmo meio básico, removidos os RCs, onde permaneceram por 40 dias. Tanto a germinação de sementes como as culturas (primária e secundária) foram feitas sob condições controladas de luz e temperatura.

10. Cultura de Segmentos Nodais

Diferentes cultivares e condições de cultura foram testados para a indução do brotamento de gemas axilares em regiões nodais de plântulas de feijão. Sementes de 'Moruna', 'Piratã-1' e 'Puebla-153' foram germinadas em solução aquosa de 6-BA (5 ou 10 μ M). Metade das repetições foram mantidas sob fotoperíodo de 12 h de luz. A outra metade permaneceu no escuro, por um período inicial de 9 dias, quando então foi transferida para luz. Após 12 a 15 dias de germinação foi feita a leitura, observando-se o número e altura das gemas axilares desenvolvidas nas regiões no

dais das plântulas desenvolvidas. A região nodal correspondente à inserção dos cotilédones foi designada n^o I, enquanto que a região nodal correspondente à inserção das folhas primárias foi designada n^o II. Neste experimento foram feitas 30 repetições / cultivar / concentração de 6-BA / condição de cultura.

Num segundo experimento, sementes de 'Moruna' e 'Carioca' foram germinadas em frascos contendo o meio de cultura básico XIII (TABELA 10) acrescido de 6-BA (50 μ M) e IBA (0,025 μ M). Após 19 dias de germinação, as gemas axilares desenvolvidas nas regiões nodais das plântulas (n^o I e n^o II) foram extraídas. Estas gemas foram denominadas G1. Após a extração das gemas G1, os nós foram destacados das plântulas e cultivados no meio básico XIII acrescido de 6-BA (20 μ M) e IBA (0,025 μ M) por um período de 17 dias. Após este tempo, as gemas desenvolvidas denominadas G2, foram extraídas e os nós inoculados no meio básico XIII, sem adição de RCs. As gemas desenvolvidas após 25 dias de cultura neste meio terciário foram denominadas G3. Para cada cultivar fez-se 20 repetições.

No experimento 3, sementes de 'Puebla-153' foram germinadas no meio básico XIII acrescido de 6-BA (20 μ M) e IBA (0,025 μ M) por 16 dias. Após este período, os nós (n^o I e n^o II) foram destacados e cultivados durante 18 dias no meio XIII, sendo que para metade das repetições acrescentou-se 6-BA (20 μ M) e IBA (0,025 μ M). A outra metade foi cultivada na presença de 6-BA (5 μ M) e IBA (0,025 μ M). Um

total de 30 repetições por tratamento foi utilizado.

Num último experimento, sementes de 'Moru na' foram germinadas em solução aquosa de 6-BA em diferentes concentrações, a saber: 5; 10; 20 e 50 μM . Após 15 dias de germinação, os segmentos nodais foram destacados e cultivados no meio básico XIII. Para metade das repetições, acrescentou-se ao meio básico os RCs 6-BA (5 μM) e IBA (0,025 μM). A outra metade foi cultivada na presença de 6-BA (5 μM). Utilizou-se 20 repetições para cada tratamento tendo a cultura 20 dias de duração.

Nos experimentos 2 a 4, a germinação das sementes e a cultura dos nós foram feitas sob condições controladas de luz (fotoperíodo de 12 hs; 400-800 lux) e temperatura ($26 \pm 3^{\circ}\text{C}$). Na leitura destes experimentos foram anotados o número de gemas axilares desenvolvidas por nó e a altura das gemas.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Esterilização do Material Vegetal

Sementes ou folhas adultas trifolioladas de *P. vulgaris* cv. Moruna foram utilizadas como fonte de explantes, para a realização dos experimentos de cultura de tecidos *in vitro* de feijão. Testes de esterilização foram realizados com ambas as fontes de explantes, para encontrar tratamentos eficientes na eliminação de contaminantes externos e obtenção de explantes assépticos e viáveis. Esta desinfecção superficial deve eliminar completamente qualquer forma de microorganismo do explante em cultivo pois, caso contrario, haveria o desenvolvimento rápido de colônias com consequente morte do material vegetal.

Material vegetal asséptico é normalmente obtido utilizando-se um dos seguintes métodos: (a) desinfecção de sementes (LINDSEY 1967), (b) remoção asséptica de sementes de frutos (WHITE 1943), (c) remoção asséptica de embriões de sementes previamente esterilizadas (MIFLIN 1969), (d) esterilização superficial de órgãos de plantas adultas (BAKER & PHILLIPS 1962). Os diferentes métodos de esterilização não apresentam os mesmos resultados quando repetidos em outros locais, utilizando-se ou não as mesmas espécies vegetais. Isto porque vários fatores podem modificar o inóculo presente no material vegetal, tais como: tipo específico e nível de inóculo que parece ser característico de cada espé

cie (SWEET & BOLTON 1979); lotes de sementes com diferentes intervalos e tipos de armazenamento; condições ambientais de desenvolvimento do material vegetal (estufa, campo etc); grau de resistência de microorganismos às soluções esterilizantes, entre outros. Desta forma, o melhor tratamento esterilizante para determinado material vegetal, considerando sua origem, deve ser escolhido em testes de esterilização prévios. Este tratamento esterilizante deve ser de execução simples, não deletério no material vegetal e com alta eficiência de controle da fonte de inóculo original.

1.1. Testes de esterilização de sementes

Embora exista em literatura (SWEET & BOLTON 1979) numerosos procedimentos para esterilização de sementes, poucas publicações relatam seus efeitos nas plântulas resultantes das sementes tratadas. Neste trabalho, para a escolha do melhor tratamento esterilizante, considerou-se simultaneamente a eficiência de esterilização e a viabilidade da semente, a fim de obter o maior número de plântulas estéreis e sadias.

Os resultados dos testes para esterilização de sementes de *P. vulgaris* cv. Moruna são apresentados nas TABELAS 13 e 14. A análise dos resultados do Teste 1 (TABELA 13) mostrou que a esterilização com hipoclorito de sódio a 1,6% por 30 minutos não foi eficiente para eliminar os contaminantes externos da semente (70% de contaminação). Este tratamento porém foi o que menos afetou a viabilidade das se

TABELA 13: Resultado do teste 1 para esterilização de sementes de *P. vulgaris* cv. Moruna. Leitura feita após 7 dias de germinação em frascos com algodão embebido em água, no escuro.

Tratamento de Esterilização					Sementes				Altura média de hipocótilo (cm)
Etanol		NaOCl		Total Total	Contaminadas (%)	Não germinadas Total	Germinadas Total % (a)		
Conc. (%)	Tempo (min)	Conc. (%)	Tempo (min)						
nº									
1	-	-	1,6	30	20	14	70	2 33	4 67
2	70	5	1,6	30	18	10	56	4 50	4 50
3	70	10	1,6	30	19	7	37	7 58	5 42
4	70	15	1,6	30	20	5	25	10 67	5 33
5	96	5	1,6	30	20	4	20	7 44	9 56
6	96	10	1,6	30	20	6	30	10 71	4 29
7	96	15	1,6	30	20	2	10	13 72	5 28

(a) Porcentagem calculada entre as sementes não contaminadas.

TABELA 14: Resultados do teste 2 para esterilização de sementes *P. vulgaris* cv. Moruna. Leitura feita após 7 dias de germinação em frascos com algodão embebido em água, no escuro.

Tratamento de Esterilização										Sementes			Altura																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
nº	Etanol		NaOCl		Total	Contaminadas		Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total	%	(a)	Total

(a) Porcentagem calculada entre as sementes não contaminadas

mentes (67% germinadas entre as não contaminadas). Nos tratamentos esterilizantes seguintes, as sementes foram esterilizadas com etanol e em seguida com NaOCl 1,6% - 30 min. Nestes tratamentos houve uma diminuição na porcentagem de contaminação e na viabilidade das sementes. Quando na primeira etapa de esterilização o etanol foi usado a 70% por 5, 10 ou 15 min, a porcentagem de contaminação diminuiu de 56 para 37 e 25% enquanto que a viabilidade das sementes diminuiu de 50 para 42 e 33%, respectivamente. Quando na primeira etapa de esterilização utilizou-se etanol a 96% obteve-se uma contaminação média de 20% com os diferentes tempos de tratamento no etanol, enquanto que a viabilidade das sementes diminuiu de 56 para 29 e 28% com o aumento de tempo de tratamento em etanol de 5 para 10 e 15 min respectivamente. O etanol 96% mostrou-se efetivo em diminuir a contaminação das sementes. A viabilidade das sementes diminuiu com um maior tempo de tratamento em etanol. Isto se deve à ação desidratante prolongada do etanol, com o seu efeito na superfície externa da semente, facilitando a penetração da solução de hipoclorito de sódio.

SWEET & BOLTON (1979) ao testarem diferentes tratamentos para a esterilização de sementes de espinafre, observaram o efeito deletério na viabilidade das sementes, quando tratadas por tempo prolongado em NaOCl. Sementes de espinafre tratadas com NaOCl a 5% por 60 e 120 min, apresentaram após 6 dias, 16 e 12% de contaminação e 81 e 45% de germinação, respectivamente.

O comprimento médio dos hipocótilos de

feijão, obtidos das sementes submetidas ao Teste 1, foi calculado. Considerou-se que o melhor tratamento de esterilização foi aquele que permitiu melhor germinação e desenvolvimento normal de plântulas. Os hipocótilos foram mais longos quando não foi usado etanol na primeira etapa de esterilização (7,4 cm). Com etanol 70%, obteve-se um comprimento médio de 5,9 cm e com etanol 96% a média de comprimento dos hipocótilos abaixou para 4,6 cm. Os resultados mostram que o etanol, apesar de ser efetivo em eliminar contaminantes externos à casca das sementes, pode afetar a germinação das mesmas.

A partir dos resultados anteriores analisados, o Teste 2 foi montado procurando-se estudar os efeitos da segunda etapa de esterilização, utilizando-se maiores concentrações de hipoclorito de sódio e variações de tempo (TABELA 14). O aumento do tempo de tratamento com etanol 96% de 5 para 10 e 15 min foi efetivo em reduzir as porcentagens de contaminação de 36 para 11 e 5%, respectivamente. A viabilidade das sementes foi de 59, 65 e 11%, respectivamente ao aumento de exposição ao etanol. Os resultados mostraram que 15 min de tratamento em etanol inibe a germinação das sementes, quando na 2ª etapa de esterilização utiliza-se NaOCl por 30 min. Este efeito pôde também ser notado analisando-se o comprimento médio dos hipocótilos das sementes germinadas após tratamento em etanol (96% 15 min) e NaOCl (30 min) que foi de 4,2 cm. Quando as sementes foram tratadas apenas por 10 e 5 min com etanol e com NaOCl 20 e 10 min, o comprimento

médio dos hipocótilos foi de 6,3 e 6,8 cm, respectivamente . Os tratamentos em etanol por 10 min e NaOCl por 20 min foram os mais efetivos, uma vez que nestes tratamentos as porcentagens de contaminação foram baixas e a viabilidade das sementes não foi muito afetada em relação aos tratamentos com menores tempos de esterilização. Nestes tratamentos, com o aumento da concentração de NaOCl de 2,6 para 3,9 e 5,2% obteve-se 9, 10 e 15% de contaminação e 75, 72 e 47% de germinação, respectivamente.

Os resultados mostraram que as sementes de feijão contêm contaminantes que não podem ser completamente eliminados sem que sejam afetados parcialmente a germinação e o desenvolvimento das plântulas. Adotou-se o tratamento 5 do Teste 2 de esterilização das sementes (10 min em etanol 96%, seguido de 20 min em NaOCl 3,9% como o mais adequado para as sementes a serem usadas como fonte de explante.

1.2. Testes de esterilização de folhas trifolioladas

As TABELAS 15 e 16 apresentam os resultados dos testes para esterilização de folhas trifolioladas de *P. vulgaris* cv. Moruna. Os dados apresentados foram obtidos de leituras feitas após 7 dias de incubação dos explantes foliares.

Quando as folhas foram esterilizadas apenas com hipoclorito de sódio (Teste 1, TABELA 15) a contaminação em qualquer tratamento foi sempre inferior a 10%. Porém, notou-se o aparecimento de pontos necróticos nos explantes

TABELA 15: Resultados do teste 1 para esterilização de folhas trifolioladas de *P. vulgaris* cv. Moruna. Leitura feita após 7 dias de permanência dos explantes foliares no escuro, em placas de Petri com meio de cultura de incubação.

Tratamento					
		NaOCl			
nº	Conc. (%)	Tempo (min)	Total de explantes	Contaminação total	Viabilidade total %
1	1,0	3	67	6	61 91
2	1,3	3	75	7	68 91
3	1,6	3	73	5	68 93
4	1,0	6	106	9	97(a) 92
5	1,3	6	126	9	117(a) 93
6	1,6	6	106	5	101(a) 95

(a) Explantes foliares com pontos necróticos

TABELA 16: Resultado do teste 2 para esterilização de folhas trifolioladas de *P. vulgaris* cv. Moruna. Leitura feita após 7 dias de permanência dos explantes foliares no escuro, em placas de Petri contendo meio de cultura de incubação.

Tratamento de Esterilização										
nº	Etanol		NaOCl		Tempo (min)	Total de explantos	Contaminação		Viabilidade	
	(96%)	Conc. (%)					total	%	total	%
1	dip	1,0		3	92		4	4	82	93
2	"	1,3		3	86		6	7	61	76
3	"	1,6		3	98		4	4	43	46
4	"	1,0		6	104		34	33	25	36
5	"	1,3		6	113		37	33	5	7
6	"	1,6		6	111		22	20	1	1

foliares expostos a 6 min de esterilização (tratamentos 4, 5 e 6). Os tratamentos de esterilização com NaOCl a 1 ; 1,3 e 1,6% por 3 min mostraram-se eficientes pelas baixas porcentagens de contaminação apresentadas (9 ; 9 e 7% respectivamente) e pela total viabilidade dos explantes. Desta forma, o aumento de concentração do agente esterilizante e do tempo de esterilização não melhoraram a esterilização, mas sim reduziram a viabilidade dos explantes foliares.

No Teste 2 para esterilização de folhas trifolioladas (TABELA 16) foram repetidos os tratamentos do teste anterior, acrescentando-se uma pré-imersão rápida (dip) em etanol 96%. O pré-tratamento em etanol diminuiu a viabilidade dos explantes. A porcentagem de explantes não viáveis foi aumentada com o aumento da concentração do NaOCl e com o aumento do tempo de esterilização. As folhas esterilizadas por 3 min tiveram sua viabilidade diminuída de 93 para 76 e 46% com a variação da concentração de NaOCl de 1,0 para 1,3 e 1,6%, respectivamente. Estes resultados sugeriram que o pré-tratamento das folhas com etanol causou danos à epiderme tendo-se como consequência uma maior penetração do NaOCl nas folhas. Ainda neste Teste 2, os tratamentos de esterilização de 6 min em NaOCl não produziram resultados satisfatórios. As porcentagens de viabilidade foram baixas (36 ; 7 e 1%) e as porcentagens de contaminação foram de 33 ; 33 e 20% usando-se NaOCl a 1,0 - 1,3 e 1,6 respectivamente. Os níveis de contaminação foram mais altos nos explantes submetidos a tratamentos de 6 min em NaOCl. Este resultado é interpretado

pela infecção secundária de patógenos saprófitas nos explantes não viáveis.

Analisando-se conjuntamente os Testes 1 e 2 para a esterilização de folhas trifolioladas, constatou-se que com o tempo de 3 min de esterilização em NaOCl obteve-se baixa porcentagem de contaminação (menor que 10%) e total viabilidade dos explantes que não tiveram pré-tratamento em etanol. Neste tempo de exposição (3 min), o aumento de concentração do NaOCl de 1,0 até 1,6% não promoveu diminuição efetiva de contaminação.

O NaOCl a 1% por 3 min foi escolhido como tratamento esterilizante das folhas trifolioladas a serem utilizadas como fonte de explantes durante a realização dos experimentos, uma vez que este tratamento foi o menos tóxico, obtendo-se explantes com ótimo aspecto. Considera-se que o melhor tratamento de esterilização é aquele que permite obter os mais baixos índices de contaminação e o maior número de explantes viáveis. KELLER *et al.* (1972) observaram que a formação de novas células em seções de sementes imaturas de café ocorreu nas regiões que não tinham sido afetadas durante a esterilização.

2. Estabelecimento de Cultura Sólida

2.1. Cultura de diferentes explantes

Diferentes explantes do cultivar Moruna foram cultivados em ensaios dialélicos no meio de MS (meio

básico I). A escolha de um meio basal adequado para a cultura *in vitro* de uma espécie vegetal é de fundamental importância. LIAU & BOLL (1970) avaliaram a eficiência de diferentes composições salinas na produção de calos de feijão (*P. vulgaris* cv. Contender). A maior proliferação e o melhor aspecto (creme e friável) dos calos ocorreu no meio contendo os sais mineirais de MS, em comparação com outros testados, tais como White, RM e B5. No meio de MS também foi obtida a menor razão de peso seco para peso fresco indicando que, as células crescidas neste meio estavam grandemente expandidas. Para alfafa (WALKER *et al.* 1978) a indução e proliferação de calos foi substancialmente maior na composição básica de SH do que no meio de Blaydes.

Procurou-se estudar as respostas de crescimento de cada tipo de explante de feijão para uma mesma combinação de reguladores de crescimento (KIN x 2,4-D, ambos variando de 1 a 50 μ M). Sabe-se que as condições nutricionais necessárias para o crescimento variam com a origem e o tipo de tecido (HILDEBRANDT *et al.* 1963). Parece que a capacidade regenerativa das culturas pode ser influenciada não somente pelas concentrações auxina-citocinina, mas também pela origem do tecido (GREEN & PHILLIPS 1975, TISSERAT *et al.* 1979, SHARP *et al.* 1980) consideradas constantes as demais condições de cultura.

A leitura dos resultados, feita após 25-26 dias de cultura no escuro, utilizando-se como fontes de explante: hipocótilo, cotilédone, embrião, folha primária e trifoliolada mostrou porcentagens de contaminação de 6,0 ;

2,4 ; 8,8 ; 12,0 e 3,2 respectivamente. As FIGURAS 4 a 8 mostram os índices de crescimento de calos e raízes obtidos após a cultura primária destas fontes de explantes.

O maior índice de crescimento de calos (3,6) a partir de hipocótilo foi obtido com KIN (5 μ M) e 2,4-D (1 ou 10 μ M). Não foram observadas nítidas diferenças de resposta à indução de calos com a variação da concentração de KIN, na faixa de concentração estudada. Quanto ao 2,4-D, notou-se uma redução de crescimento com o aumento da concentração desta auxina, porém sem variações muito acentuadas nos índices de crescimento (FIGURA 4). Resultados semelhantes foram encontrados por SHIMADA *et al.* (1969). A KIN não exerceu influência (estimulatória ou inibitória) na formação de calos de trigo derivados de segmentos de raiz de plântulas. Já BEVERSDORF & BINGHAM (1977), observaram significativa interação entre diferentes concentrações de KIN e 2,4-D, em culturas de soja. Aumento substancial do peso fresco de calos derivados de hipocótilos de *G. max* ocorreu com o aumento da concentração de 2,4-D e KIN.

A indução de raízes nos calos derivados de hipocótilos do cultivar Moruna foi limitada às baixas concentrações de 2,4-D (1 e 5 μ M), independentemente da concentração de KIN utilizada (FIGURA 4). Para trigo (SHIMADA *et al.* 1969) e soja (BEVERSDORF & BINGHAM 1977) a inibição do desenvolvimento de raízes também ocorreu em níveis superiores a 5 μ M de 2,4-D. GRANT & FULLER (1968) também obtiveram inibição de raízes em calos de *Vicia faba*, com o aumento da

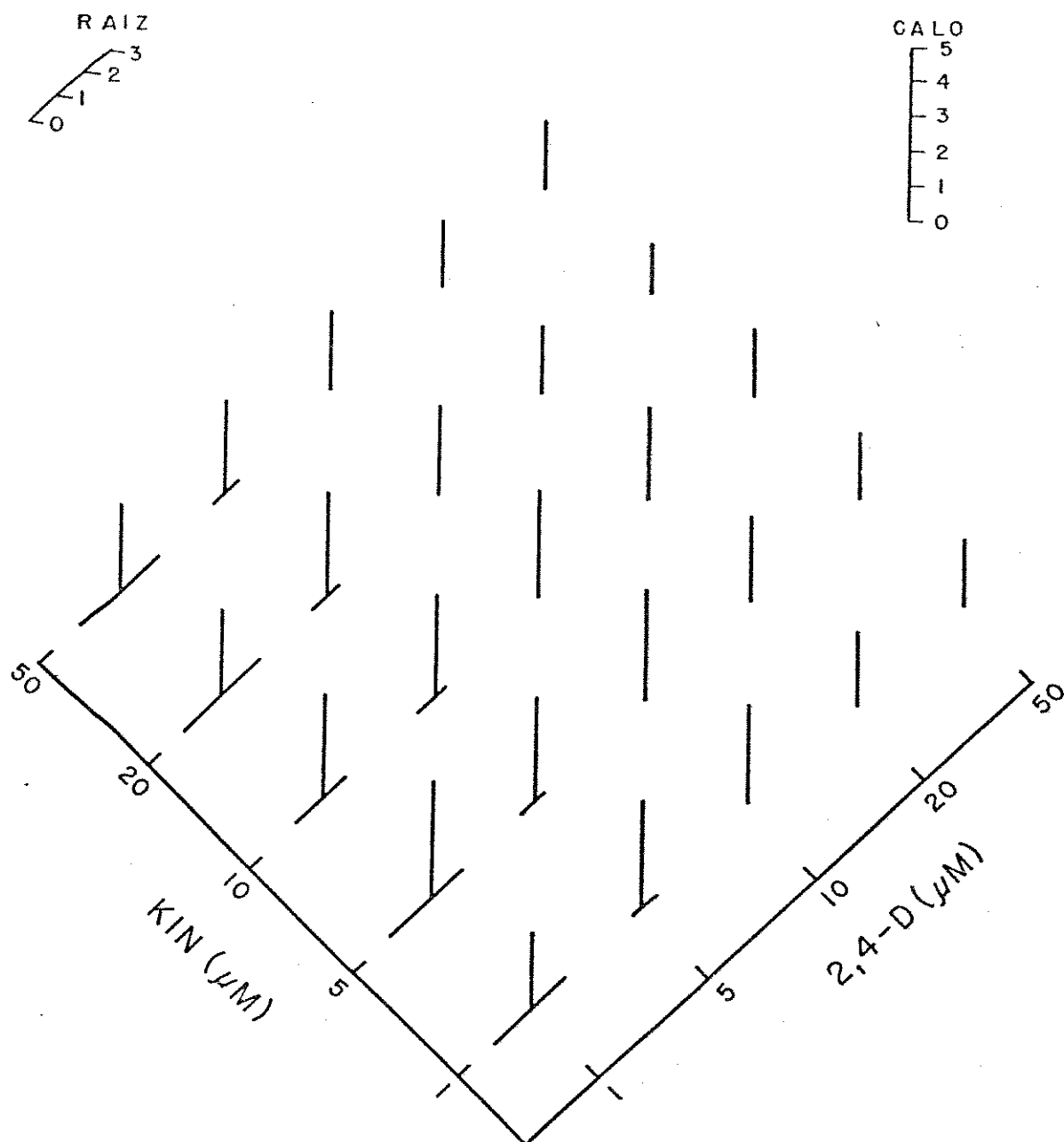


FIGURA 4. Crescimento de calos e raízes a partir de hipocótilos de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido por KIN e 2,4-D, após 25 dias de cultura no escuro. Dados de 7 a 10 repetições. Avaliação por índice de crescimento.

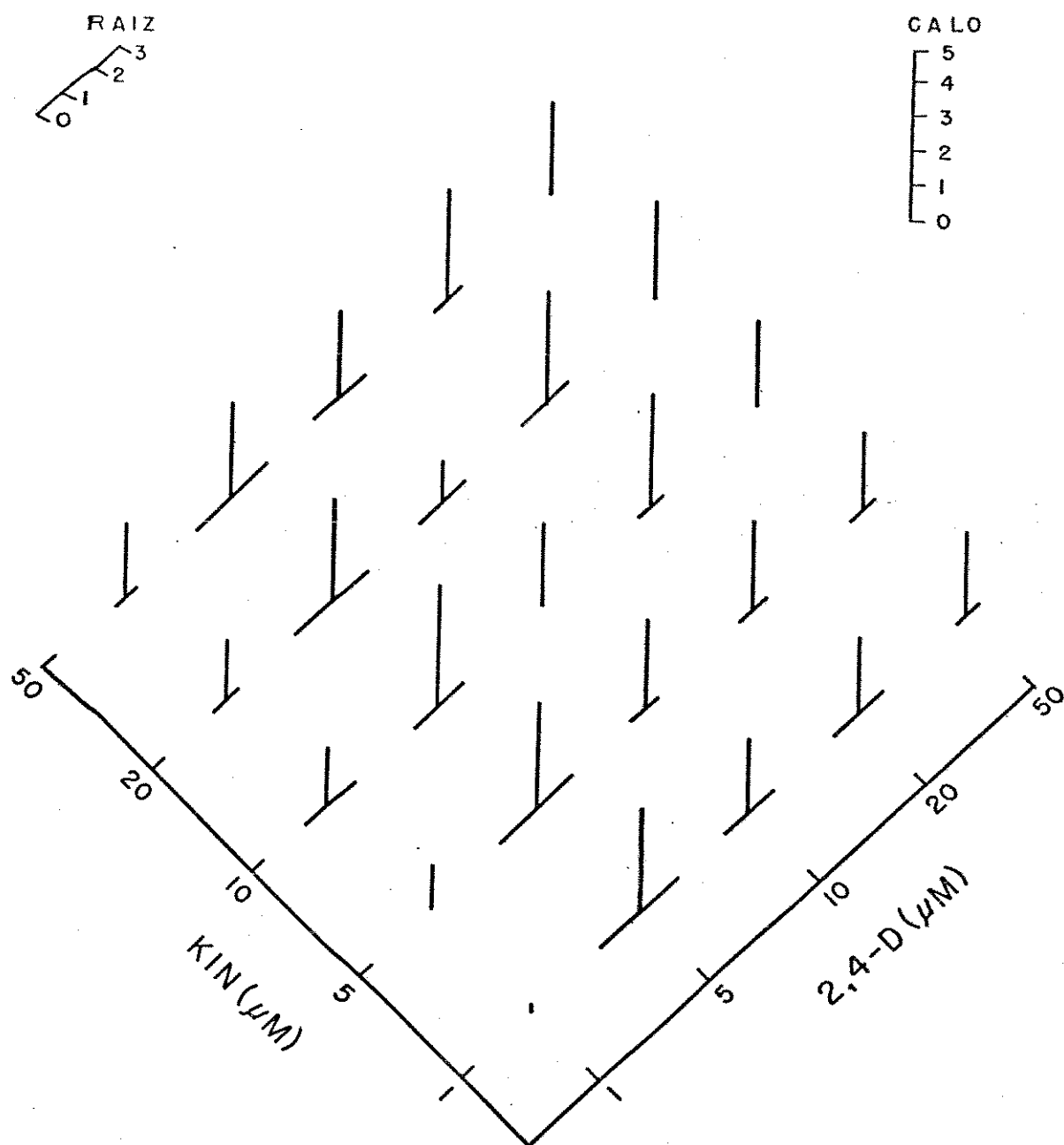


FIGURA 5. Crescimento de calos e raízes a partir de cotilédones de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido por KIN e 2,4-D, após 26 dias de cultura no escuro. Dados de 7 a 10 repetições. Avaliação por índice de crescimento.

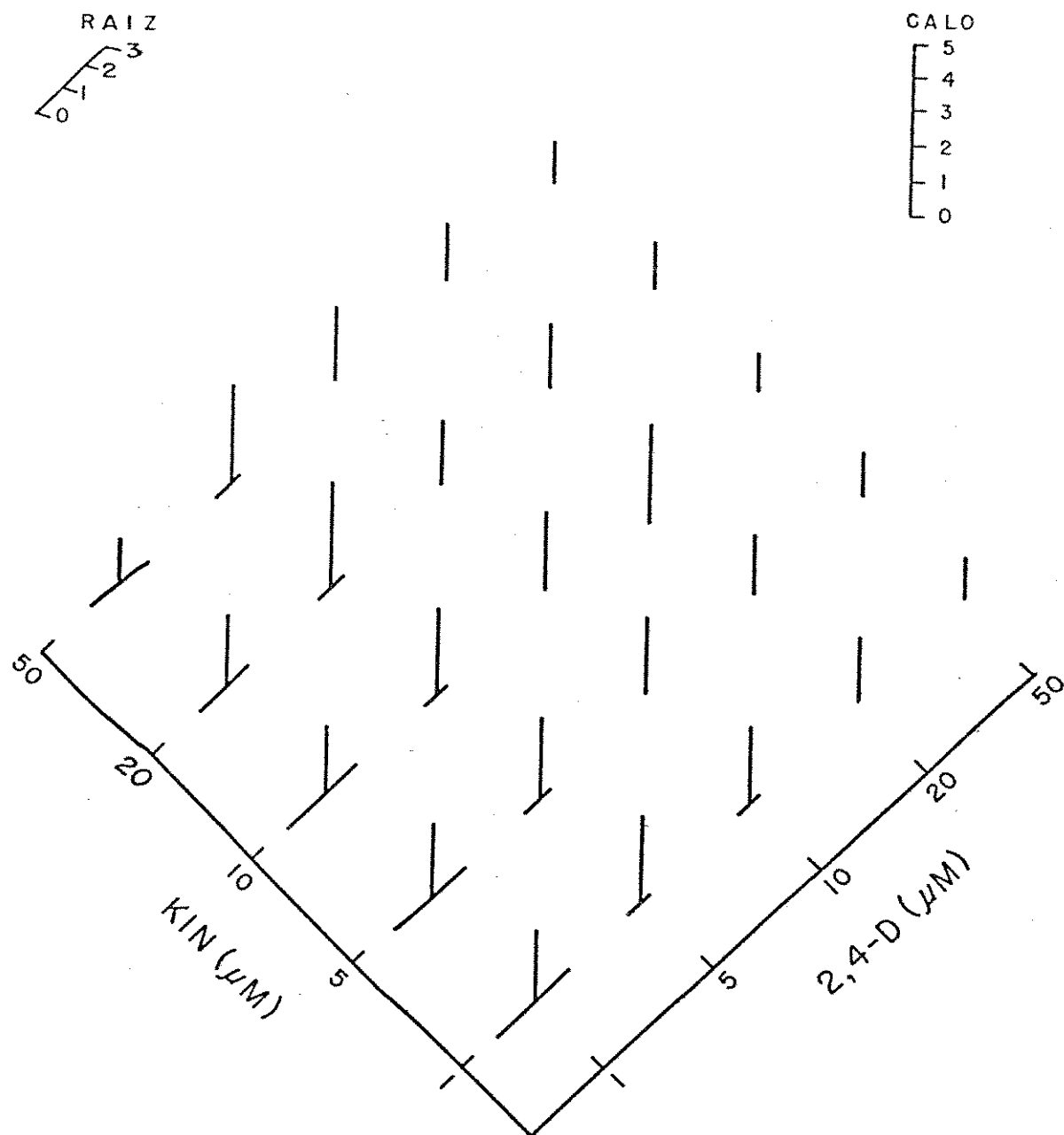


FIGURA 6. Crescimento de calos e, raízes a partir de embriões de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido por KIN e 2,4-D, após 26 dias de cultura no escuro. Dados de 7 a 10 repetições. Avaliação por índice de crescimento.

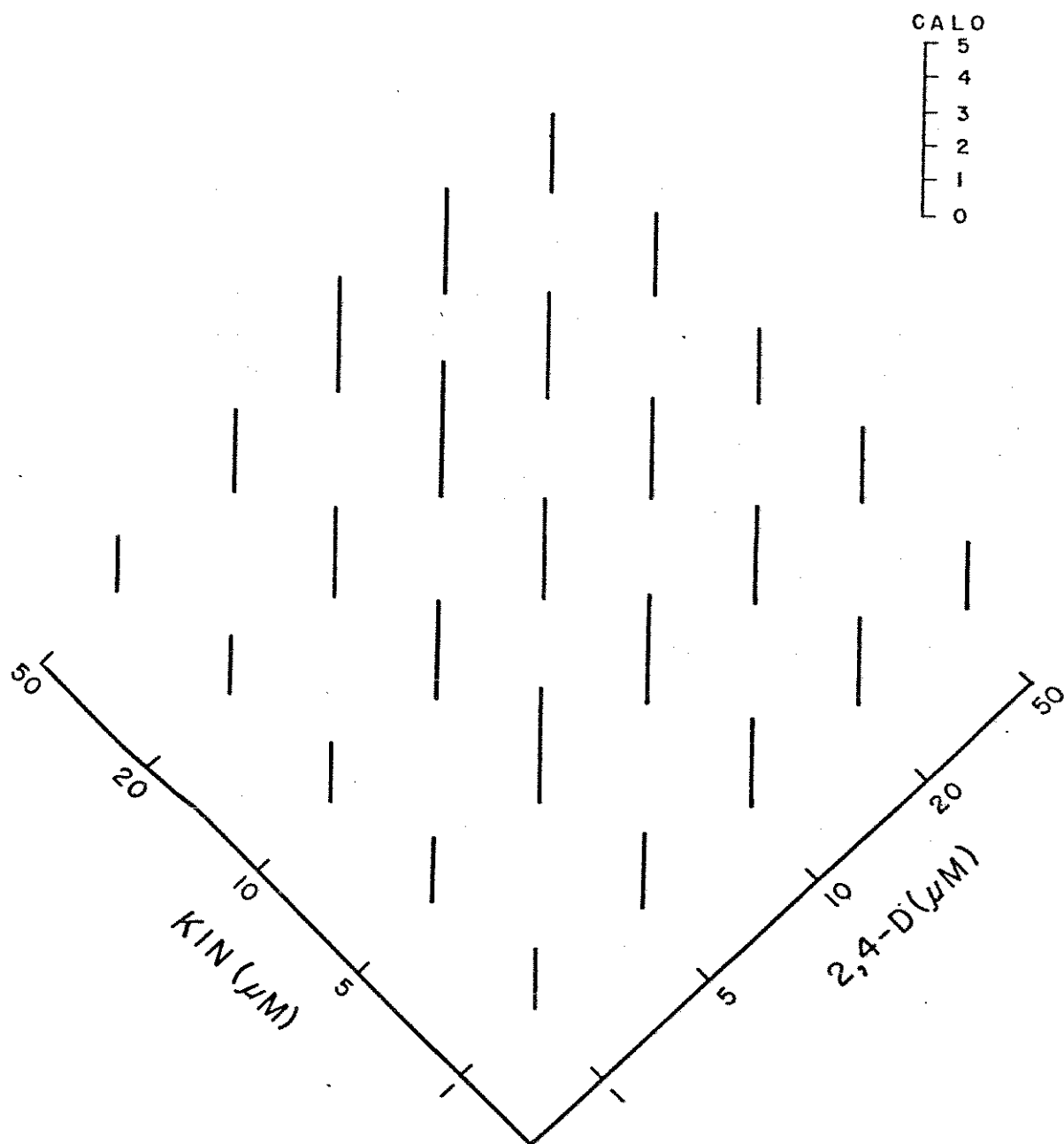


FIGURA 7. Crescimento de calos a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido por KIN e 2,4-D, após 25 dias de cultura no escuro. Dados de 7 a 10 repetições. Avaliação por índice de crescimento.

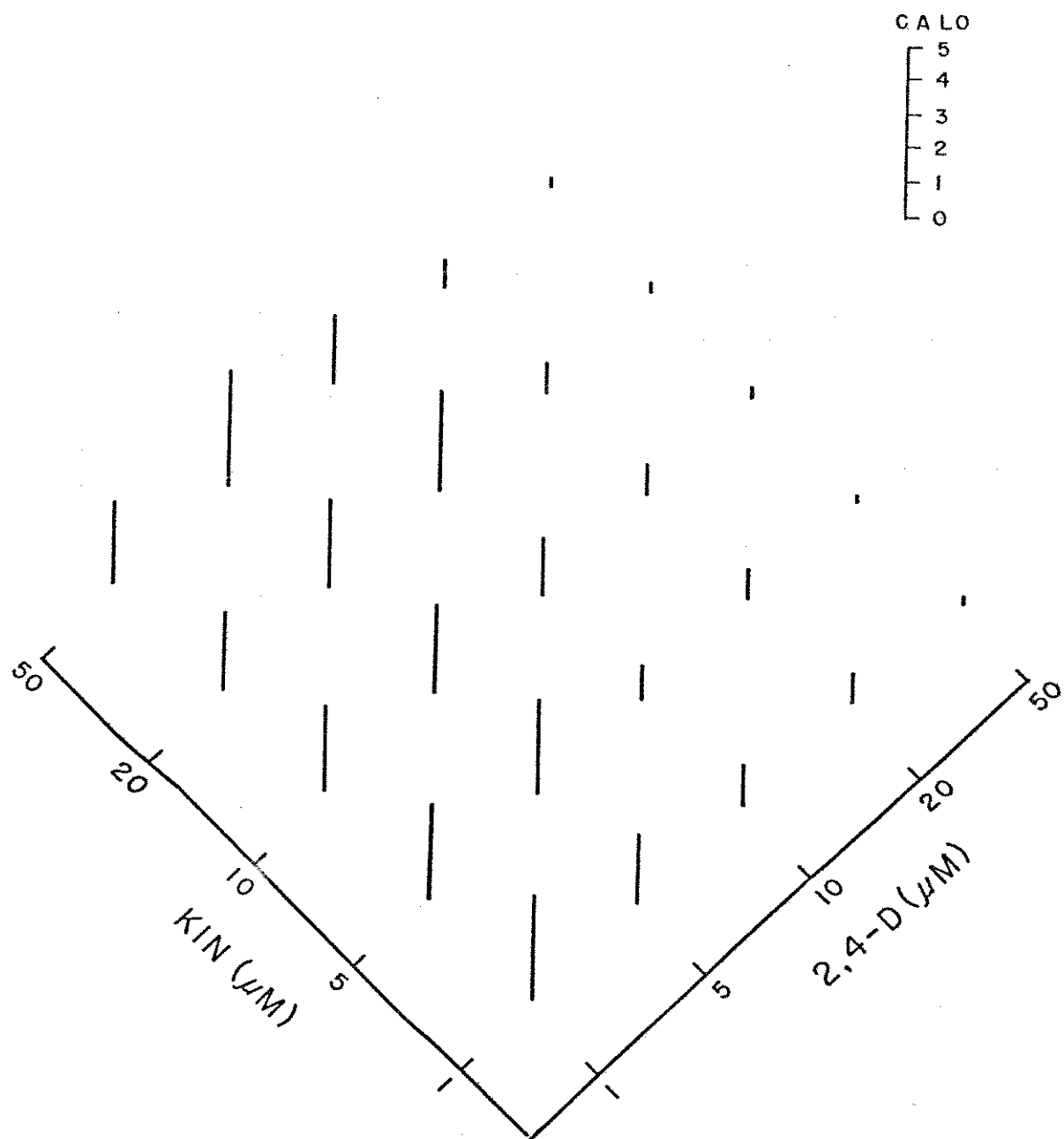


FIGURA 8. Crescimento de calos a partir de folhas trifoliodas de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido KIN e 2,4-D após 25 dias de cultura no escuro. Dados de 7 a 10 repetições. Avaliação por índice de crescimento.

concentração de 2,4-D no meio de cultura. Para esta espécie porém, a concentração inibitória foi de 1 μM , indicando que existe uma diferença de sensibilidade entre as espécies, à inibição de diferenciação e crescimento de raízes.

Para calos obtidos de cotilédones o índice de crescimento mais alto foi constatado na combinação de KIN (10 μM) e 2,4-D (5 μM). Uma leve tendência à inibição de crescimento de calos foi observada com o aumento de concentração de 2,4-D de 5 para 50 μM , enquanto que as variações nas concentrações de KIN proporcionaram diferentes interações de crescimento. A concentração de 2,4-D de 1 μM foi considerada insatisfatória para a obtenção de calos a partir de cotilédones. A indução de raízes ocorreu na ampla faixa de reguladores de crescimento estudada, a não ser nas suas concentrações mais altas ou seja, na presença de 2,4-D a 50 μM em combinação com KIN em níveis superiores a 10 μM . A melhor obtenção de raízes ocorreu na presença de 2,4-D (5 μM), indicando novamente que este RC seria o principal componente do meio na indução de raízes (FIGURA 5). Estes resultados demonstram que as interações entre RCs são altamente significantes na regulação da proliferação de células e diferenciação. Este fato foi bem discutido por SKOOG & MILLER (1957) e TRAN THANH VAN (1974) quando demonstraram que a organogênese em tecidos de fumo cultivados *in vitro* era controlada pelas concentrações relativas de auxina e citocinina do meio de cultura.

Utilizando-se embriões como explantes i

iniciais também se obteve ótimos índices de crescimento de calos. O maior índice de crescimento foi obtido com KIN (20 μ M) e 2,4-D (5 μ M). Novamente não foi observada nítida resposta para as variações dos níveis de KIN. A indução de raízes foi limitada às baixas concentrações de 2,4-D (1 e 5 μ M), resultado semelhante ao obtido quando se usou hipocótilo como fonte de explante indicando que, ambos exigem os mesmos níveis de auxina para a indução de raízes (FIGURA 6).

BEVERSDORF & BINGHAM (1977) ao testarem 96 combinações dialélicas de KIN x 2,4-D, na cultura de segmentos de hipocótilos de *G. max* observaram que, o crescimento máximo de calos ocorreu em combinações de RCs que proporcionaram limitada diferenciação de raízes. No presente trabalho, nas combinações de RCs que induziram maior proliferação de calos, foram também observadas altas frequências de diferenciação de raízes, utilizando-se hipocótilo, embrião ou cotilédone como explante.

Um índice máximo de crescimento igual a 4,1 foi obtido quando se cultivou segmentos de folha primária, na combinação de KIN (20 μ M) x 2,4-D (10 μ M). Altos índices de crescimento de calos foram obtidos na ampla faixa de interação dialélica testada (1 a 50 μ M), mostrando esta fonte de explante responde facilmente à indução de calos (FIGURA 7).

O maior índice de crescimento de calos (3,5) obtido a partir de folhas trifolioladas foi encontrado utilizando-se KIN (50 μ M) e 2,4-D (5 μ M). Uma nítida res

posta de crescimento de calos foi observada com a variação da concentração de 2,4-D (1 a 50 M), notando-se claramente uma acentuada queda nos índices de crescimento com o aumento da concentração desta auxina (FIGURA 8).

Quando se usou folhas (primária jovem ou trifoliolada adulta) como fonte de explante em meio de cultura contendo KIN e 2,4-D, não ocorreu morfogênese de raízes em nenhuma das combinações hormonais testadas. Isto sugere que estes tecidos não seriam sensíveis à indução de raízes, na presença destes dois RCs ou que, os níveis de RCs necessários para estes explantes foliares seriam bem diferentes dos que induzem raízes em culturas de outros tipos de explantes, tais como: embrião, hipocótilo e cotilédone. HADDON & NORTH-COTE (1976) observaram que a indução e a quantidade de raízes produzidas em culturas de feijão, variaram em função dos RCs e da fonte de explante.

Considerando-se as ótimas respostas à indução de calos a partir de vários explantes, o meio de cultura utilizado foi considerado satisfatório para a cultura *in vitro* de tecidos de feijão. Estas culturas, feitas na presença dos sais inorgânicos de MS e dos RCs KIN e 2,4-D sempre produziram calos de boa consistência (aquoso-friável) e não oxidados (cor creme). As culturas foram também avaliadas quanto à cor e consistência dos calos pois, tem sido sugerido que culturas de tecidos com o objetivo de diferenciação de plantas devem conter calos estruturados e de natureza friável (FRIDBORG 1971, PHILLIPS & COLLINS 1979a). TORREY (1967)

encontrou que calos de ervilha com coloração marrom (oxidados), textura rígida e pouco friáveis não tinham a capacidade de desenvolver primórdios de raízes, embora crescessem prontamente no meio utilizado. Calos friáveis de *Stylosanthes hamata* puderam ser mantidos em estado indiferenciado por pelo menos 15 meses sem perderem sua capacidade regenerativa quando transferidos para condições indutoras (SCOWCROFT & ADAMSON 1976). BEACH & SMITH (1979) relataram que a regeneração de plantas de *T. pratense* e *T. incarnatum* ocorreu mais frequentemente em calos brancos, friáveis e com regiões esverdeadas do que em calos uniformemente verdes.

As diferenças de resposta encontradas nas culturas de feijão conforme o tipo de explante utilizado, mostraram grande especificidade. LIAU & BOLL (1970) observaram que, o crescimento de calos derivados de diferentes explantes (raiz, hipocótilo ou cotilédone de feijão) cultivados em vários meios de cultura foi muito similar em aparência morfológica. No entanto, deve-se ressaltar que os meios de cultura utilizados por LIAU & BOLL (1970) variaram principalmente quanto à composição salina, de aminoácidos e pelo método de esterilização.

Os resultados obtidos com o cultivar Moruna permitiram verificar que os experimentos dialélicos com KIN e 2,4-D foram bastante específicos na detecção de variações endógenas, conforme a origem do explante.

A folha (primária ou trifoliolada) de *P. vulgaris* cv. Moruna foi a fonte de explante que forneceu a

melhor resposta para a indução de calos na presença dos RCs KIN e 2,4-D, uma vez que os índices de crescimento foram elevados e não se observou morfogênese de raízes. A ausência de raízes se justifica uma vez que, combinações hormonais que propiciam o desenvolvimento de raízes, não são favoráveis ao desenvolvimento de gemas vegetativas (SKOOG & MILLER 1957, TRAN THANH VAN & TRINH 1973).

As relações entre concentrações de RCs e tipo de organogênese em cultura de tecidos de leguminosas foram claramente evidenciadas por WALKER *et al.* (1978) em cultura de alfafa. As concentrações ótimas de KIN e 2,4-D para a organogênese de parte aérea foram diferentes das concentrações ótimas destes RCs para a morfogênese de raízes, a partir da cultura de calos. Na grande maioria dos trabalhos de cultura de tecidos a diferenciação de parte aérea precede a diferenciação de raízes (SKOOG & MILLER 1957; REINERT 1973; STREET 1977a,b; EVANS *et al.* 1981). Entretanto, no caso de *Stylosanthes hamata* ocorreu a diferenciação de raízes quando os calos foram cultivados em meio de cultura sem RC (SCOWCROFT & ADAMSON 1976). Quando estas culturas foram transferidas para meio contendo KIN, houve a indução de parte aérea. Estes autores notaram porém, que partes aéreas formadas em calos contendo elevado número de pequenas raízes originaram plantas menos robustas. Nota-se assim, que nesta leguminosa as condições de cultura que favoreceram a diferenciação de poucas raízes permitiram também a diferenciação de parte aérea.

O uso de folhas trifolioladas é menos

recomendável em relação ao emprego de folhas primárias como fonte de explante inicial. As folhas trifolioladas são obtidas de plantas cultivadas em casa de vegetação por cerca de 20 dias que em seguida devem sofrer uma esterilização superficial. As folhas primárias são extraídas de plântulas com 7 dias de idade, obtidas de sementes germinadas em condições estêreis e portanto, evita-se danos a estas folhas pelo tratamento com soluções esterilizantes. Fontes convenientes de explantes que são menos afetadas pela esterilização, são mais indicadas. MCCOY & BINGHAM (1977) por exemplo, selecionaram ovários imaturos de alfafa, entre outras fontes de explante, a fim de evitar efeitos prejudiciais consequentes da esterilização. A folha primária foi portanto selecionada como fonte de explante mais indicada para a indução de calos de feijão. Os calos obtidos a partir de hipocótilo, cotilédone e embrião apresentaram alta frequência de diferenciação de raízes enquanto que, as folhas trifolioladas necessitam de esterilização direta.

Calos obtidos com a cultura primária de diferentes explantes do cultivar Moruna foram transferidos para o meio indutor II contendo somente KIN ($10 \mu\text{M}$). Segundo FOSKET & TORREY (1969) e TORREY & FOSKET (1970) a citodiferenciação em soja e ervilha é dependente dos altos níveis de citocinina. A KIN é efetiva em manter o potencial de formação de embriões em culturas sólidas de cenoura por um longo período (HALPERIN 1966) e permite a diferenciação de embriões de aspargo em concentrações acima de $0,5 \mu\text{M}$ (WILLMAR &

HELLENDORF 1963). Em *Apium*, KIN na concentração de 0,5 μ M promove embriogênese (HALPERIN & JENSEN 1967).

Após 16 dias em meio indutor foi observado em tecidos obtidos a partir da cultura de embrião a presença de gemas vegetativas, originadas provavelmente pelo desenvolvimento de regiões meristemáticas pré-existentes no embrião (FIGURA 9A.). Deve-se interpretar criticamente este tipo de resultado, uma vez que a ocorrência de plântules em massas de calos derivados de cultura de embrião, após a remoção da auxina do meio de cultura, é simplesmente o resultado do desenvolvimento do meristema apical do embrião cultivado.

Calos obtidos a partir de outras fontes de explante (como hipocótilo, cotilédone, folha primária e trifoliolada) permaneceram por 90 dias em meio indutor sem auxina, na presença de KIN, sem apresentaram qualquer indicio macroscópico de diferenciação de parte aérea.

STREET (1976, 1978) desenvolveu o conceito de que a indução de divisão (levando à formação de calos a partir de tecidos do explante) não revela por si só a totipotência das células e que este evento posterior depende do estado fisiológico das células no explante e das condições operantes na cultura primária. A importância do estado fisiológico das células no explante é bem evidenciado em vários exemplos, onde culturas embriogênicas são mais prontamente obtidas a partir de botões florais, ou plântules derivados de embriões somáticos. Similarmente, culturas com capa

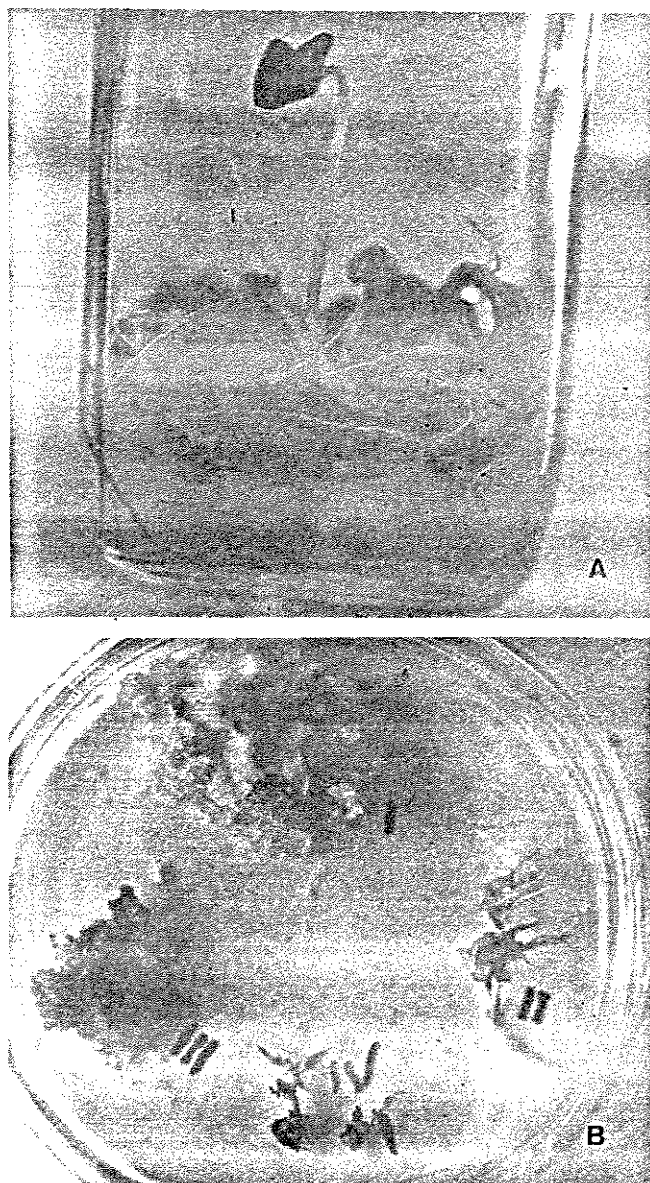


FIGURA 9. Desenvolvimento de gemas a
picais de *Phaseolus vulgaris* cv. Mo
runa. (A) Cultura de embrião; (B) Cul
tura de ápices meristemáticos nos me
ios: (I) NOVAK (1977), (II) MOREL &
MILLER (1964), (III) KARTHA & GAMBORG
(1975) e (IV) KARTHA *et al.* (1979).

cidade regenerativa frequentemente podem ser obtidas a partir de tecidos da planta jovem, mas não da planta adulta (SHARP *et al.* 1980).

2.2. Cultura em diferentes interações de reguladores de crescimento

Folhas primárias foram usadas como fonte de explantes para testar diferentes interações dialéticas de reguladores de crescimento (RCs), combinando-se uma auxina (2,4-D; IAA ou NAA) com uma citocinina (KIN; 6-BA ou 2ip), visando selecionar as melhores fontes de RCs e respectivas relações de concentrações para a produção de calos do cultivar Moruna.

Esta série de experimentos baseou-se no conhecimento de que a indução de morfogênese frequentemente ocorre em resposta a alterações nas relações de concentração dos RCs, as quais podem ser decisivas para determinar o tipo e a frequência de diferenciação. Exemplos de tal regulação são vistos em tecidos derivados de parênquima medular de caule de fumo (SKOOG & MILLER 1957) ou de explantes foliares de tomate (PADMANABHAN *et al.* 1974), onde as razões de concentração de KIN e IAA exógenas determinam o nível de crescimento de calos e o tipo de morfogênese. Similarmente, em cultura de folhas de café, as interações de KIN e 2,4-D durante a cultura primária tem efeito nítido nos índices de diferenciação das culturas secundárias (SHARP *et al.* 1980).

O crescimento de calos foi avaliado pelo

aumento de peso fresco e pelo índice de crescimento. Os dois critérios utilizados expressaram resultados semelhantes. O crescimento de calos, nas diferentes interações dialéticas de RCs, foram discutidos somente em relação ao peso fresco dos tecidos. A contaminação das culturas primárias foi sempre menor que 5%. Os resultados das culturas em diferentes interações dialéticas de RCs são apresentados nas FIGURAS 10 a 15.

Na interação 6-BA/2,4-D (0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 ; 75/0 ; 1 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 μ M) o maior aumento de peso fresco foi obtido com 2,4-D (50 μ M) e 6-BA (5 μ M) (FIGURA 10). As faixas de concentrações consideradas ótimas para a indução de calos foram 2,4-D entre 20 e 50 μ M, juntamente com 6-BA entre 5 e 10 μ M. Na ausência de 6-BA, o 2,4-D foi capaz de promover bom crescimento de calos na faixa de 5 a 50 μ M, porém estes calos foram sempre de consistência aquosa. Resultado semelhante também foi citado por WITHAM (1968) em calos de soja e PHILLIPS E COLLINS (1979a) em calos de trevo vermelho (*T. pratense*). Na presença de 6-BA os calos de feijão se tornaram mais firmes, sendo muito rígidos na concentração de 75 μ M. Na faixa de concentração de 5 a 50 μ M de 6-BA, obteve-se os melhores calos quanto ao aspecto de rigidez (friáveis), independentemente da concentração de 2,4-D utilizada. Todas as interações de 6-BA/2,4-D promoveram a indução de calos de cor creme.

Na interação 2ip/2,4-D (0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 ; 75 / 0 ; 1 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 μ M) obteve-se um progressivo escurecimento dos calos com o aumento da concentração

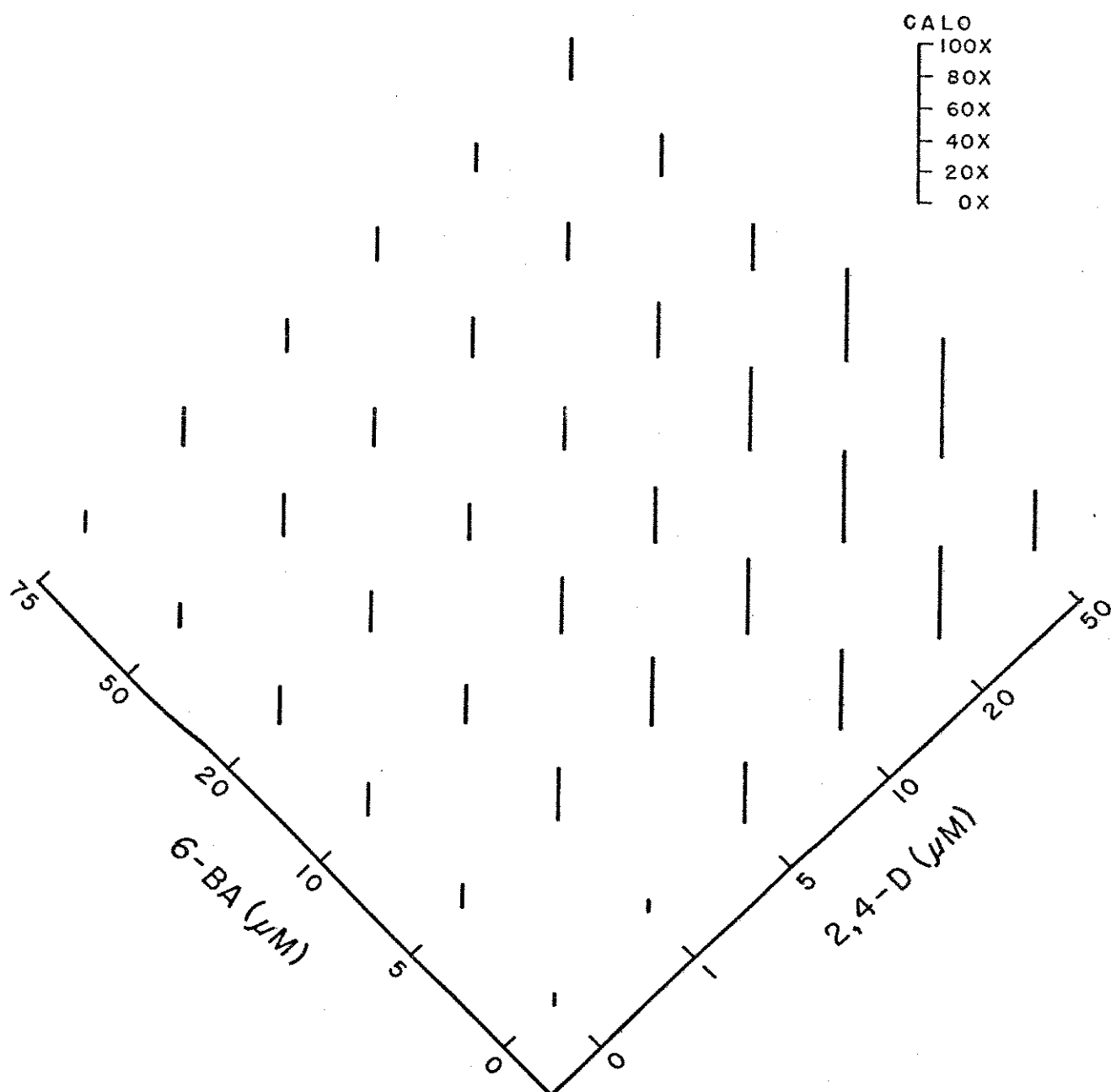


FIGURA 10. Crescimento de calos a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido por 6-BA e 2,4-D, após 29 dias de cultura no escuro. Dados de 8 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido.

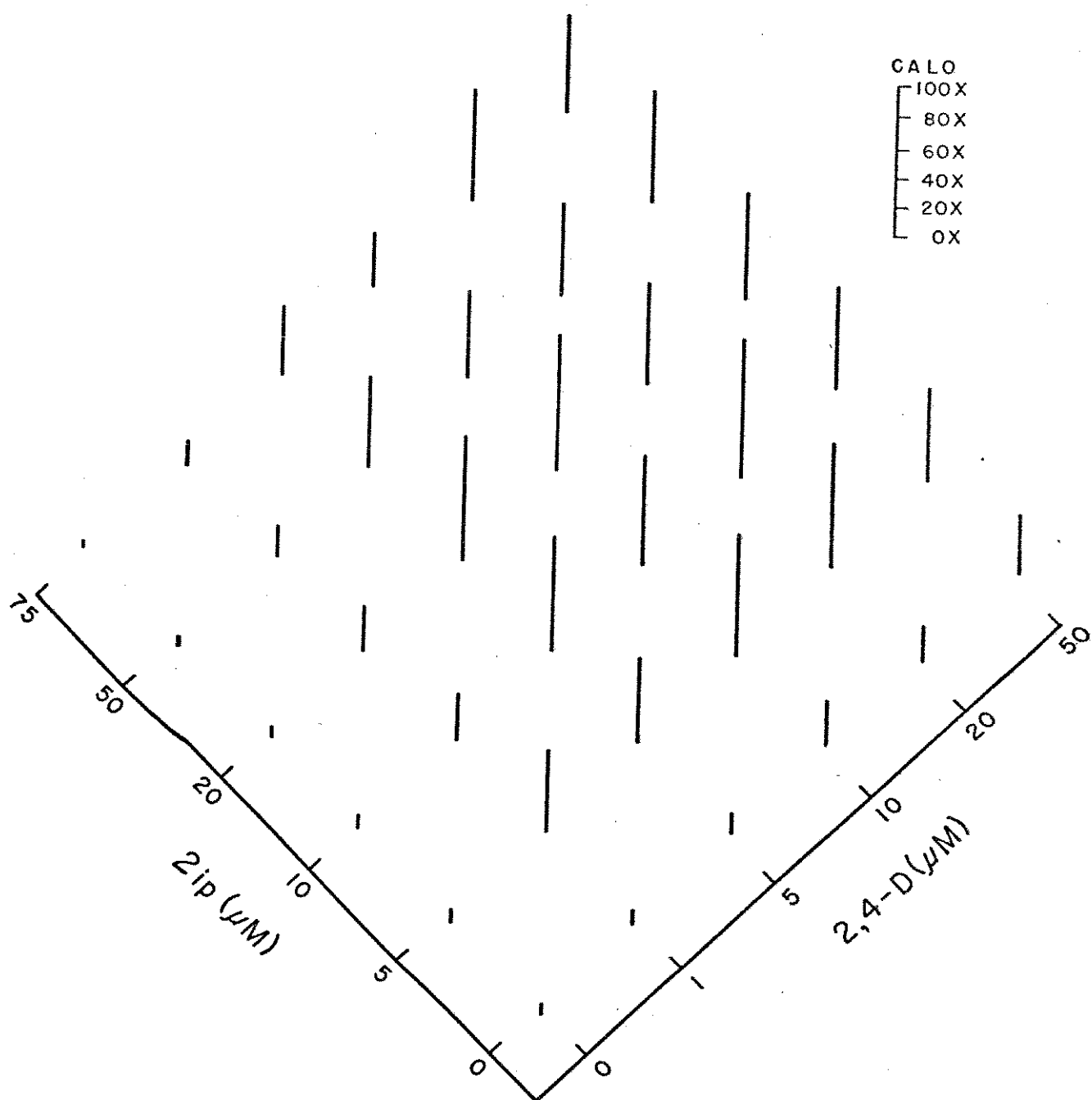


FIGURA 11. Crescimento de calos a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido por 2ip e 2,4-D, a pós 29 dias de cultura no escuro. Dados de 9 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido.

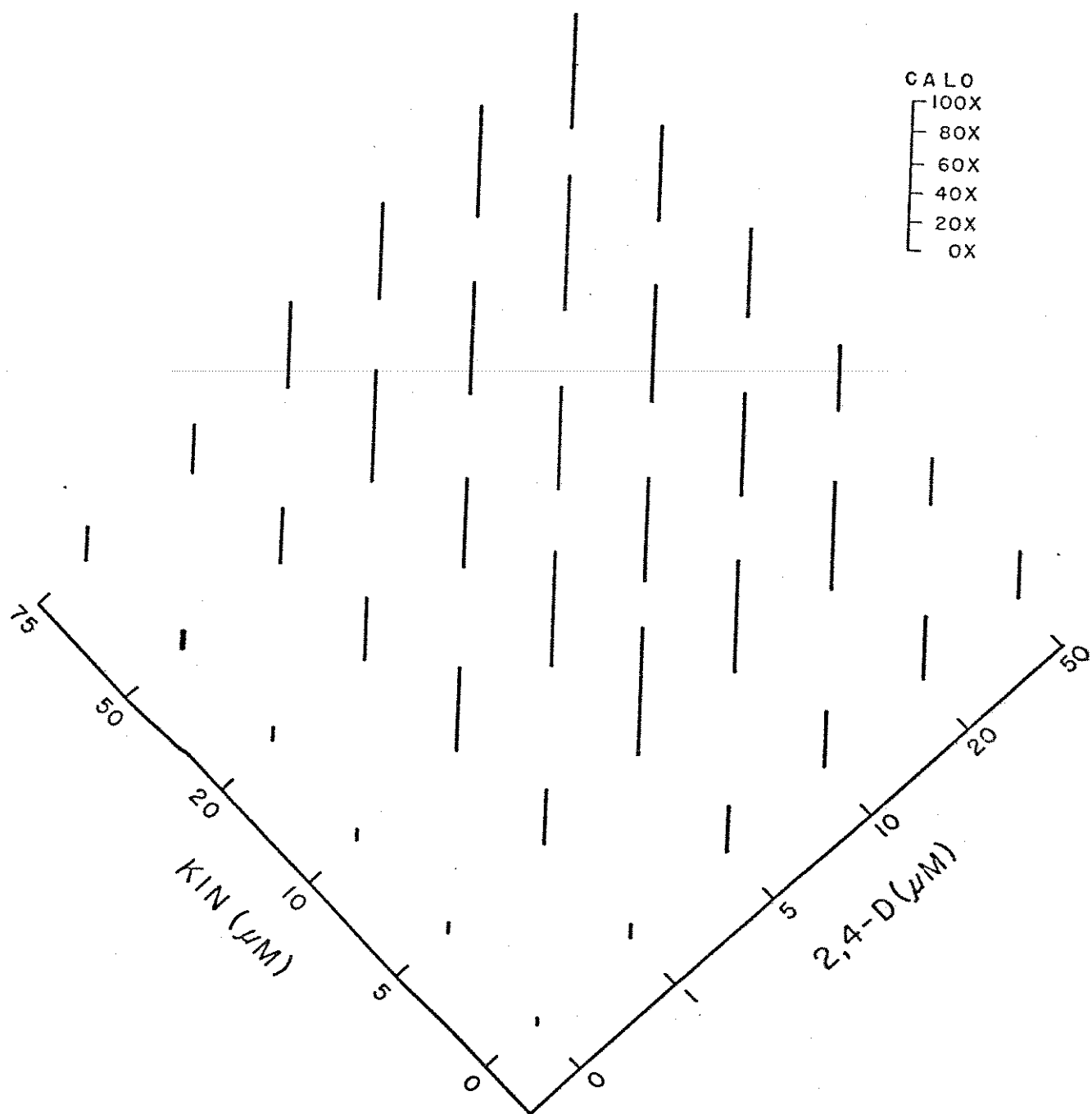


FIGURA 12. Crescimento de calos a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido por KIN e 2,4-D, a pós 29 dias de cultura no escuro. Dados de 7 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido.

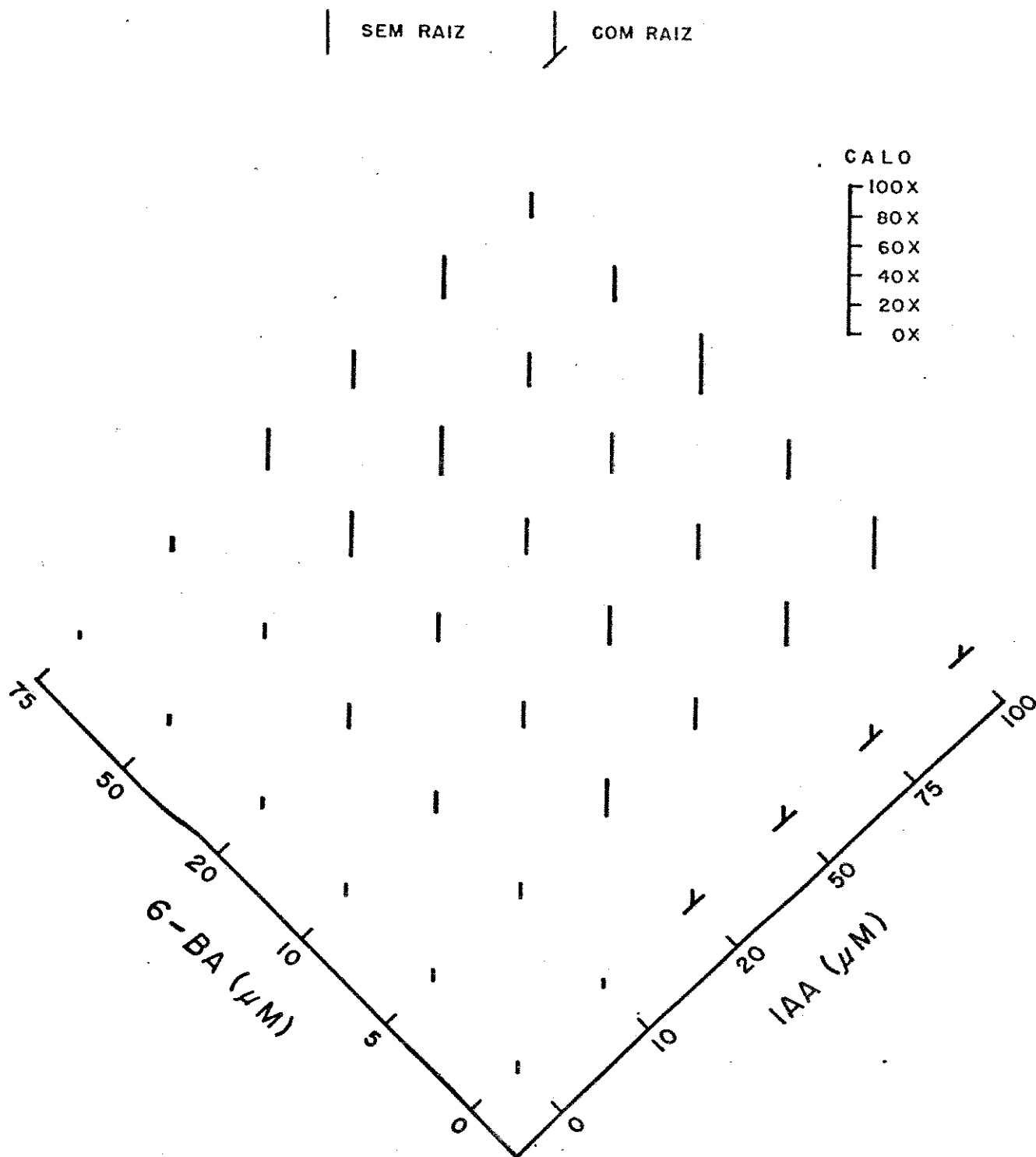


FIGURA 13. Crescimento de calos e raízes a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido por 6-BA e IAA, após 29 dias de cultura no escuro. Dados de 8 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido (calos) e pela presença ou ausência de raiz.

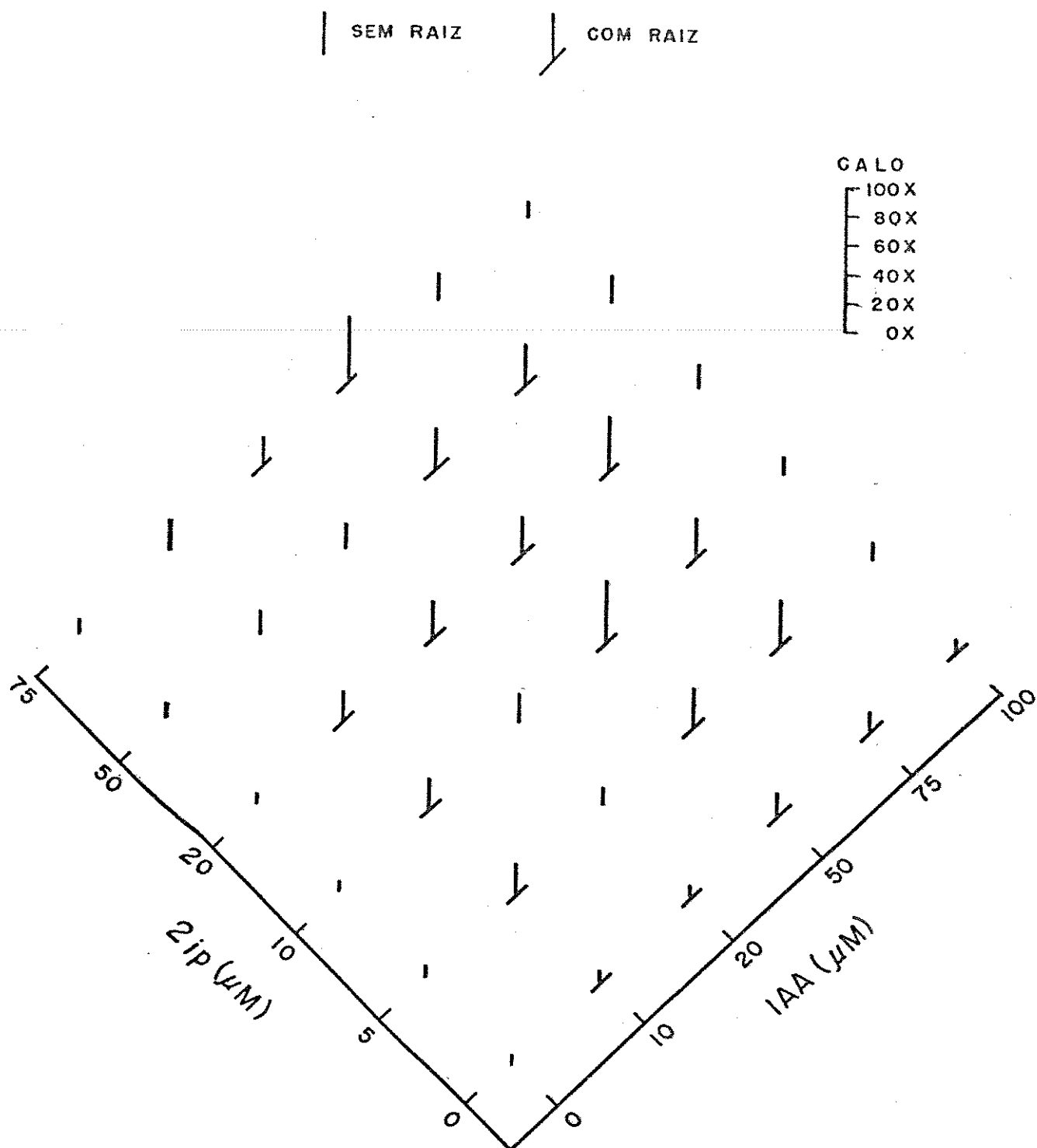


FIGURA 14. Crescimento de calos e raízes a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido por 2ip e IAA, após 29 dias de cultura no escuro. Dados de 9 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido (calos) e pela presença ou ausência de raiz.

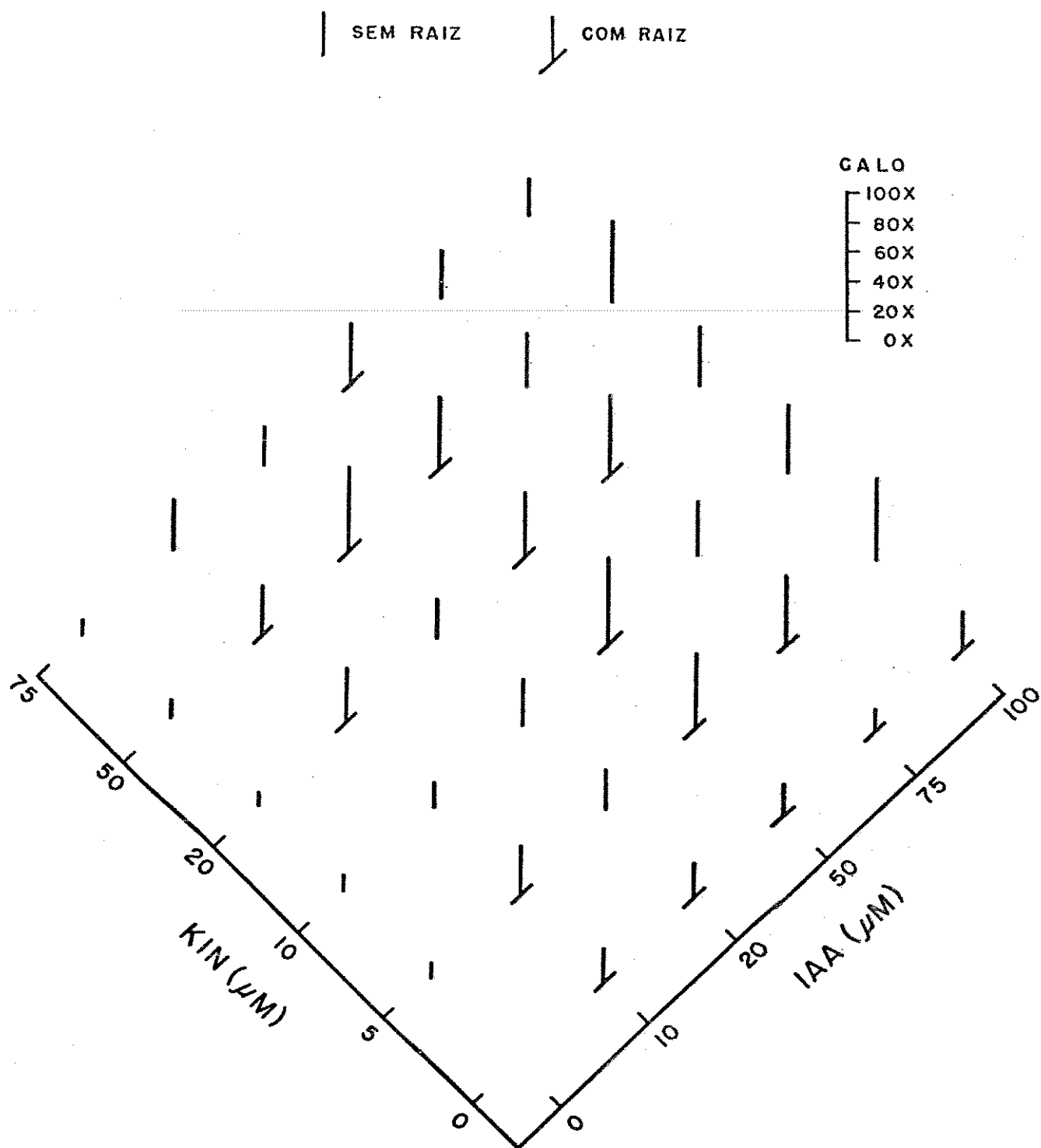


FIGURA 15. Crescimento de calos e raízes a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna induzido por KIN e IAA, após 29 dias de cultura no escuro. Dados de 9 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido (calos) e pela presença ou ausência de raiz.

de 2ip. A consistência friável dos calos foi obtida na relação 1/1 de 2ip/2,4-D em todas as interações testadas. Quanto maior foi esta relação, mais rígidos foram os calos; quanto menor, os calos se tornaram mais aquosos. A influência da interação citocinina/auxina na friabilidade de calos foi também observada em experimentos com tecidos foliares de café (SONDAHL & SHARP 1979). Quanto maior a concentração de KIN mais rígida foi a consistência dos calos; quanto maior a concentração de auxina, mais friáveis os calos de café se apresentaram. Em *Crotalaria juncea* calos rígidos e compactos foram obtidos quando os explantes foram cultivados na presença de KIN (RAMANAT *et al.* 1977). A maior proliferação de calos de feijão foi obtida com 2ip (20 μ M) e 2,4-D (10 μ M) (FIGURA 11). A faixa de concentração considerada ótima para o crescimento de calos ficou entre 5 a 75 μ M de 2ip combinado com 2,4-D entre 5 a 50 μ M, sempre numa relação próxima ou igual a 1. Acredita-se que a exploração de uma faixa de concentração mais baixa de 2ip (0 a 5 μ M) provavelmente apresentasse melhores resultados quanto à consistência e cor dos calos. Segundo SKOOG *et al.* (1967), esta fonte de citocinina é cerca de 10 vezes mais ativa do que a KIN.

Na combinação dialética de KIN / 2,4-D (0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 ; 75 / 0 ; 1 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 μ M) o maior índice de crescimento de calos foi obtido com 2,4-D (20 μ M) e KIN (50 μ M) (FIGURA 12). As concentrações de 2,4-D de 5 a 20 μ M, juntamente com KIN na faixa de 5 a 75 μ M, foram capazes de induzir ótima proliferação de calos. Com o aumento da concentração de KIN, pôde-se notar uma maior prolifera

ção de calos nas concentrações mais elevadas de 2,4-D. Em calos obtidos a partir da cultura de cotilédones de soja, WIT HAM (1968) observou que quando o 2,4-D era utilizado em alta concentração, a KIN poderia inibir o crescimento dos calos. Para feijão entretanto, este tipo de inibição foi constatado na combinação de 6-BA com 2,4-D (FIGURA 9). A comparação destes resultados confirma a interpretação de que a especificidade das culturas *in vitro* é dependente da fonte de explante, dos reguladores de crescimento e da espécie em estudo.

Ainda na combinação KIN x 2,4-D observou-se uma boa consistência (friável) e ótimo aspecto (coloração creme) dos calos, na concentração de 20 μ M de KIN, independentemente da concentração de 2,4-D. Nos níveis mais elevados de KIN (50 e 75 μ M) os calos já se tornaram muito rígidos e com coloração escura (marrom), enquanto que as menores concentrações de KIN (5 a 10 μ M) induziram calos de consistência aquosa. RAMAWAT *et al.* (1977) também observaram o enrijecimento de tecidos em culturas de *Crotalaria juncea* crescidas na presença de altas concentrações de KIN. A oxidação em calos de *T. pratense* e *T. incarnatum* foi evitada controlando-se o nível de tiamina do meio de cultura (BEACH & SMITH 1979).

Analisando-se conjuntamente o aspecto dos calos dos experimentos onde se usou o 2,4-D como fonte de auxina, pôde-se verificar que a utilização de uma fonte de citocinina (KIN; 6-BA ou 2ip) é necessária para a consistência ideal dos calos. Assim, apesar de haver proliferação

de calos apenas com a adição de 2,4-D no meio de cultura primário, deve-se usar uma fonte de citocinina numa concentração adequada, afim de obter-se calos friáveis. FOSKET & TORREY (1969) também observaram que a citocinina parece antagonizar o efeito de 2,4-D na friabilidade de calos de soja. Na presença apenas de 2,4-D (10 μ M) os calos de soja apresentaram muito aquosos e translúcidos, mas com a mesma concentração de 2,4-D, na presença de KIN (0,5 μ M), os tecidos se mostraram moderadamente firmes.

Além da consistência pôde-se notar que também o crescimento de calos de feijão foi favorecido com a adição de citocinina (principalmente KIN e 2ip). Resultado semelhante foi encontrado por WITHAM (1968) em calos de soja derivados de cotilédones. O 2,4-D pôde estimular o crescimen to na ausência de uma citocinina, porém a adição de KIN permitiu o crescimento em níveis mais altos do que apenas na presença de 2,4-D. Deve-se mencionar ainda que citocinina é um RC presente na grande maioria dos meios de cultura utilizados para obter morfogênese em cultura secundária (SAUNDERS & BINGHAM 1972, KOHENBACH 1978, STREET 1979, SHARP *et al.* 1980).

Na interação dialética IAA/6-BA (0 ; 10 20 ; 50 ; 75 ; 100 / 0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 ; 75 μ M) obteve-se o maior aumento de peso fresco de calos na presença de IAA (100 μ M) e 6-BA (20 μ M) (FIGURA 13). As faixas de concentrações dos RCs que promoveram proliferação satisfatória de calos foram com IAA (20-100 μ M) combinado com 6-BA (5-20 μ M).

Porém, a proliferação de calos não foi muito intensa nos tratamentos utilizados. Neste experimento o aspecto dos calos foi sempre escuro (marrom) e rígido.

No experimento dialélico utilizando IAA/2ip (0 ; 10 ; 20 ; 50 ; 75 ; 100 / 0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 ; 75 μ M) obteve-se calos escuros e rígidos na presença de ambos os RCs ou de cada um isoladamente. O escurecimento e a rigidez dos calos foram mais intensos com o aumento das concentrações de IAA e 2ip. Houve desenvolvimento de raízes em vários tratamentos não tendo-se encontrado uma faixa de interação destes RCs satisfatória para a proliferação de calos (FIGURA 14).

Quando IAA (0 ; 10 ; 20 ; 50 ; 75 ; 100 μ M) foi usado como fonte de auxina e a KIN (0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 ; 75 μ M) como fonte de citocinina, as respostas de crescimento de calos foram maiores, em relação às interações de IAA com outras citocininas (6-BA e 2ip). No entanto, as diferentes interações testadas de IAA/KIN não foram suficientes para determinar uma faixa ótima para o crescimento de calos, ou mesmo níveis inibitórios (FIGURA 15). O aspecto dos calos nas interações IAA/KIN foi sempre escuro e rígido. Todos os tratamentos que incluíram IAA e KIN proporcionaram maior proliferação de calos, quando comparados às respostas obtidas na presença destes RCs isoladamente. Resultados semelhantes foram observados por PETERS *et al.* (1976) em calos de feijão da variedade Bico de Ouro. Quando KIN foi removida do meio de cultura, na presença apenas de IAA, houve uma drástica redução no índice de crescimento de calos.

Interessante notar que na presença de KIN ou 2ip, o IAA promoveu o desenvolvimento de raízes em várias combinações, o mesmo não ocorrendo na presença de 6-BA. SCOWCROFT & ADAMSON (1976) também constataram que a morfogenese de raiz (e plântules) de *Stylosanthes hamata* foi variável dependendo da fonte e da concentração dos RCs utilizados. A inibição do desenvolvimento de raízes pela presença de 6-BA no meio de cultura, também foi observada em culturas de segmentos nodais de *Lotus corniculatus* (TOMES 1979). Na presença de 6-BA (0,2 μ M) não houve a formação de raízes em nenhuma das repetições. Porém, quando segmentos nodais foram cultivados na ausência de 6-BA, a formação de raízes ocorreu em 58% das culturas.

O IAA é uma fonte de auxina que favorece o desenvolvimento de raízes (SYONO 1965, GRANT & FULLER 1968, GAMBORG & EVELEICH 1968, SHIMADA *et al.* 1969, FRIDBORG 1971, DAVEY *et al.* 1974, SCOWCROFT & ADAMSON 1976, HADDON & NORTHCOTE 1976, PETERS *et al.* 1976, OPPENMORTH 1976, PHILLIPS & COLLINS 1979a). No entanto, pelos resultados obtidos, seu efeito parece ser dependente do tipo de citocinina com a qual ele é combinado. O 6-BA parece estar mais relacionado à regeneração de plantas do que de raízes. NIIZEKI & GRANT (1971) trabalhando com *Lotus* spp. observaram o desenvolvimento de parte aérea e raízes em meio contendo KIN. Quando KIN foi substituída por 6-BA a organogênese de raiz foi inibida, enquanto que o desenvolvimento da parte aérea foi estimulado.

PETERS *et al.* (1976) obtiveram uma inibi

ção do desenvolvimento de raízes em calos derivados de folha de feijão (var. Bico de Ouro) quando KIN foi removida do meio de cultura (na presença de 10 μ M de IAA). Estes resultados diferem dos obtidos com o cultivar Moruna, uma vez que para este o desenvolvimento de raízes foi induzido na ausência de KIN e presença de IAA em várias concentrações (FIGURA 14). Deve-se salientar que nos experimentos com 'Bico de Ouro' a composição inorgânica do meio de cultura foi diferente da utilizada na cultura do cultivar Moruna. A composição salina também parece influenciar as respostas de crescimento *in vitro*. LIAU & BOLL (1970) trabalhando com calos de feijão (var. Contender) obtiveram supressão de organogênese de raiz e crescimento de calos pela simples modificação da fração inorgânica do meio de cultura. Em alfafa (WALKER *et al.* 1978) a regeneração de raízes foi suprimida quando o meio de Blaydes suplementado com extrato de levedura e inositol foi usado em substituição aos meios de SH e B5.

Quando se usou NAA como fonte de auxina a indução de calos foi incipiente em todas as interações deste RC com as três fontes de citocinina testadas (KIN, 6-BA e 2ip). Nos resultados das outras interações dialélicas estudadas, constata-se que a presença de uma auxina altamente efetiva (2,4-D) parece ser essencial para as respostas às fontes de citocinina em culturas de explantes foliares de feijão do cultivar Moruna. Resultados diferentes foram obtidos por CROCOMO *et al.* (1976b) com explantes foliares de feijão da variedade Bico de Ouro. Uma excelente correlação entre

crescimento de calos e concentrações de NAA/KIN foi observa
vada. Estes autores observaram ainda que a frequência de indu
ção de raízes foi menor na presença de NAA em relação a
IAA. No entanto, o controle da morfogênese de raiz foi mais
específico para os tratamentos com NAA. As diferenças de respo
sta destes dois cultivares de feijão pode ser atribuída à
composição do meio de cultura básico, onde o meio VM foi utili
zado por CROCOMO *et al.* (1976b). Além deste aspecto existe
a possibilidade de ser a var. Bico de Ouro mais sensível ao
NAA do que 'Moruna'. MOK & MOK (1977) relataram a eficiência
de NAA (10-40 μ M) na proliferação de calos, em diferentes gen
ótipos de *Phaseolus*. Além disso foi constatado a ineficiênc
cia de IAA em induzir o crescimento de calos nos genótipos
estudados. Estes autores utilizaram como explantes iniciais
pequenas porções de calos, previamente induzidos com 2,4-D
(5 μ M) e KIN (5 μ M). Portanto, os seus resultados com NAA
são podem ser interpretados sob o aspecto de crescimento de
calos e não de indução de calos a partir de segmentos de fol
has. Em nossas culturas, observou-se que o NAA embora fosse
de pouca ou nenhuma eficiência para induzir calos foi sempr
e uma excelente fonte de auxina para a manutenção dos mesmos.

As diferentes fontes de RCs utilizadas
para a indução de calos a partir de folhas primárias, tivera
ram como objetivo escolher combinações dialélicas de citocini
nas e auxinas para aplicar no cultivo de diferentes genóti
pos de *P. vulgaris*. Nesta seleção de RCs foram considerada

das as seguintes características: o aspecto dos calos (cor creme, consistência friável); ausência de raízes; ótima proliferação de calos e respostas específicas para as variações das concentrações dos RCs. A fonte de auxina escolhida foi o 2,4-D, uma vez que o NAA não foi eficiente para promover crescimento de calos, enquanto que o IAA induziu calos de aspecto e crescimento insatisfatórios e presença de raízes quando em combinação com KIN e 2ip. Verifica-se assim que, para feijão e também para soja (WITHAM 1968), a fonte de auxina influencia o tipo de resposta de formação de calos, em interação com uma citocinina. O 2,4-D foi considerado a melhor fonte de auxina, promovendo maior crescimento de calos com as três citocininas testadas. LIAU & BOLL(1970) observaram que 2,4-D foi mais efetivo do que IAA na produção de calos de feijão, em concentrações equivalentes. Na interação 2,4-D/2ip apesar de ótimos índices de crescimento, os calos foram rígidos e escuros. A interação dialélica 2,4-D/KIN foi excelente para a proliferação de calos. Não se observou grande especificidade de resposta com a variação da concentração de KIN, havendo pequenas diferenças somente pela variação da concentração de 2,4-D. A falta de especificidade para variação de concentração de KIN apresentou-se como uma limitação para as comparações de crescimento entre os cultivares. A combinação 2,4-D/6-BA foi considerada a melhor para a caracterização de cultivares. Com o aumento da concentração de 6-BA de 5 para 75 μM obteve-se uma inibição crescente do desenvolvimento de calos, para qualquer das concentrações de

2,4-D testadas. O aumento da concentração de 2,4-D favoreceu a proliferação de calos, principalmente quando se usou 5 e 10 μM de 6-BA. Nesta interação dialélica não se obteve raízes e o aspecto dos calos foi considerado ótimo (friáveis e creme). Para a proliferação de calos da var. Bico de Ouro (CROCOMO *et al.* 1976b) a interação dialélica IAA/Z foi considerada a melhor em comparação às interações de IAA/KIN e NAA/KIN. Na interação IAA/Z também ocorreu a melhor morfogênese de raiz. A coloração verde dos calos foi notada apenas em culturas contendo Z. Foi sugerido que a presença de clorofila nas células dos calos induzidos em meio contendo Z, seria um aspecto favorável para a morfogênese de parte aérea.

Os calos obtidos nas diferentes interações dialélicas de RCs foram transferidos para cultura secundária (meio III) contendo KIN (2,5 μM) e NAA (0,25 μM). Em geral, a diferenciação de gemas a partir de calos, ocorre na presença de níveis mais elevados de citocinina em relação aos níveis de auxina (FRIDBORG 1971, BEVERSDORF & BINGHAM 1977, OSWALD *et al.* 1977, SHARP & LARSEN 1977, WALKER *et al.* 1978). Cultura de explantes foliares de *Coffea arabica* requerem uma alta relação KIN/auxina para a indução de embriões somáticos em alta frequência, tanto no meio condicionante (18,4 μM KIN/4,5 μM 2,4-D) como no meio indutor (2,5 μM KIN/0,5 μM NAA) (SONDAHL & SHARP 1977).

Apesar de testadas 216 interações dialélicas em cultura primária, não se observou morfogênese de

parte aérea durante 100 dias de cultura secundária, usando-se folhas primárias de *P. vulgaris* cv. Moruna como fonte de explante. Em abóbora (*Cucurbita pepo* L.) a embriogênese foi induzida por diferentes RCs em diferentes concentrações (JELASKA 1974). A diferenciação de embriões somáticos em abóbora, seria determinada muito mais pelas condições endógenas do explante utilizado do que pelas interações de RCs no meio de cultura. Esta hipótese sugere que a dificuldade de regeneração em tecidos de feijão seria função do tipo de explante cultivado. TISSERAT *et al.* (1979) atribuem à fonte de explante todas as chances de sucesso na obtenção de morfogênese de parte aérea. O meio de cultura seria importante tão somente para suprir as condições necessárias para o desenvolvimento pleno dos núcleos meristemáticos. Similarmente, STREET (1978) propõe que os RCs devem ser considerados como agentes ativadores de células previamente induzidas. A importância da fonte de explantes e das interações dos RCs foram bem discutidas nos trabalhos de revisão de SHARP *et al.* (1980) e SHARP & EVANS (1981). Estes autores apresentam os vários exemplos em que a diferenciação de parte aérea (embriogênese ou organogênese) pode ser obtida a partir de dois tipos de células: (1) células pré-determinadas (PEDC) e (2) células induzíveis à determinação (IODC e IEDC), ou seja, células que retornam ao ciclo mitótico diferenciando-se em células determinadas. Portanto, a morfogênese de parte aérea pode ser obtida a partir de explante do tipo PEDC ou IODC/IEDC. No primeiro caso, o meio de cultura incluindo os fitoreguladores, tem o papel

de prover as condições para desencadear o processo regenerativo (JELASKA 1974, STREET 1978, TISSERAT *et al.* 1979). No segundo caso, a interação dos RCs, bem como a composição dos demais componentes do meio de cultura, são fundamentais para induzirem o reingresso de células no ciclo mitótico (dediferenciação) e determinar nova regulação funcional das mesmas. Assim, células de parênquima, mesófilo e outras, assumem uma sequência de divisão orientada para a regeneração de novos indivíduos. Frente à teoria de SHARP & EVANS (1981) acredita-se que as diferentes fontes de explantes de feijão utilizadas são do tipo IODC ou IEDC, faltando no entanto meios específicos para a indução do reingresso no ciclo mitótico. A ausência de regeneração a partir das culturas das diferentes fontes de explantes de feijão, em diferentes interações e fontes de RCs, sugerem não se tratar de explantes do tipo PEDC.

2.3. Cultura de diferentes cultivares

Após a escolha da melhor combinação dialética de RCs para a produção de calos a partir de folhas primárias, diferentes cultivares foram estudados. Procurou-se analisar a especificidade de resposta à indução de calos em tecidos de diferentes genótipos, comparando-se as exigências para auxina e citocinina e também, uma possível variabilidade quanto à capacidade de regeneração *in vitro*. BEVERSDORF & BINGHAM (1977) trabalhando com *Glycine* spp., encontraram que tanto os RCs utilizados no meio de cultura, como os genó

tipos dos tecidos influenciaram a capacidade regenerativa e o crescimento de células.

Segmentos de folhas primárias de quatro cultivares de *P. vulgaris* (Carioca, Piratã-1, Roxinho e Puebla-153) foram cultivados na presença de 6-BA/2,4-D (FIGURAS 16-19). Os quatro cultivares testados apresentaram crescimento de calos na ampla faixa de concentração de RCs testados, apresentando diferenças na intensidade de resposta. O cultivar Piratã-1 foi o que mais produziu calos, seguido do cultivar Roxinho. Já 'Carioca' apresentou uma resposta pouco intensa de indução de calos e 'Puebla-153' não apresentou crescimento satisfatório. Não se observaram diferenças acentuadas no peso fresco dos calos em função das diferentes concentrações de 6-BA utilizadas. A diferença de crescimento de calos entre cultivares foi analisada fixando-se a concentração de 6-BA (5 μ M) em função das concentrações crescentes de 2,4-D que variaram de 1 - 50 μ M (FIGURA 20). O peso fresco dos calos de 'Puebla-153' foi praticamente constante. Os cultivares Piratã-1 e Carioca apresentaram curvas de crescimento semelhantes, ambos com máxima proliferação de calos na presença de 20 μ M de 2,4-D. O aumento de peso fresco para "Piratã-1" foi em média o dobro do aumento de peso dos calos de 'Carioca' mostrando resposta diferencial ao 2,4-D nestes dois genótipos. O cultivar Roxinho requer níveis menores de 2,4-D (5 μ M) para crescimento ótimo de calos. A concentração de 20 μ M de 2,4-D foi necessária para o crescimento ótimo de 'Piratã-1' e 'Carioca', mas causou inibição de crescimento no culti

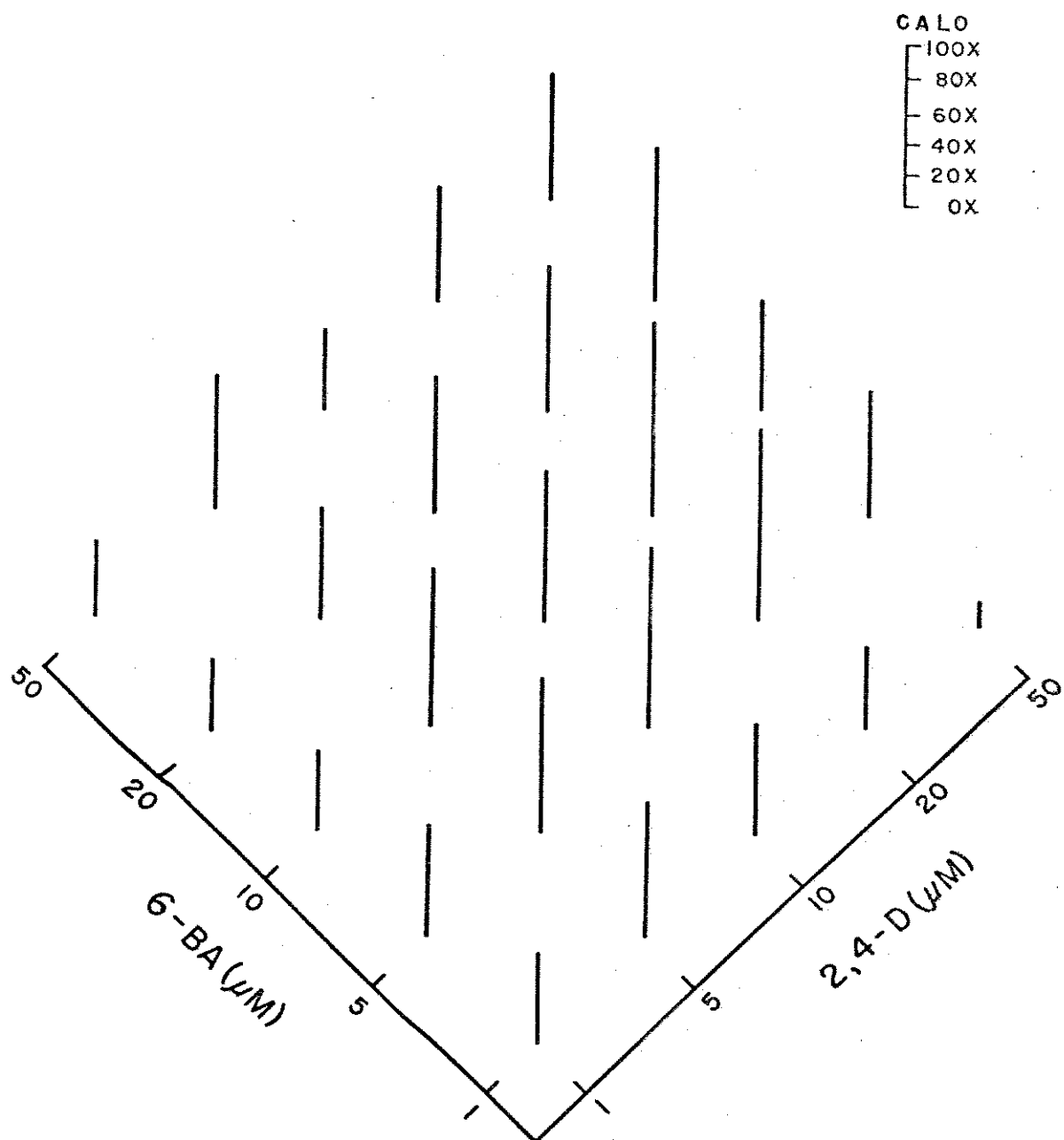


FIGURA 16. Crescimento de calos a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Piratã-1 induzido por 6-BA e 2,4-D após 29 dias de cultura no escuro. Dados de 8 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido.

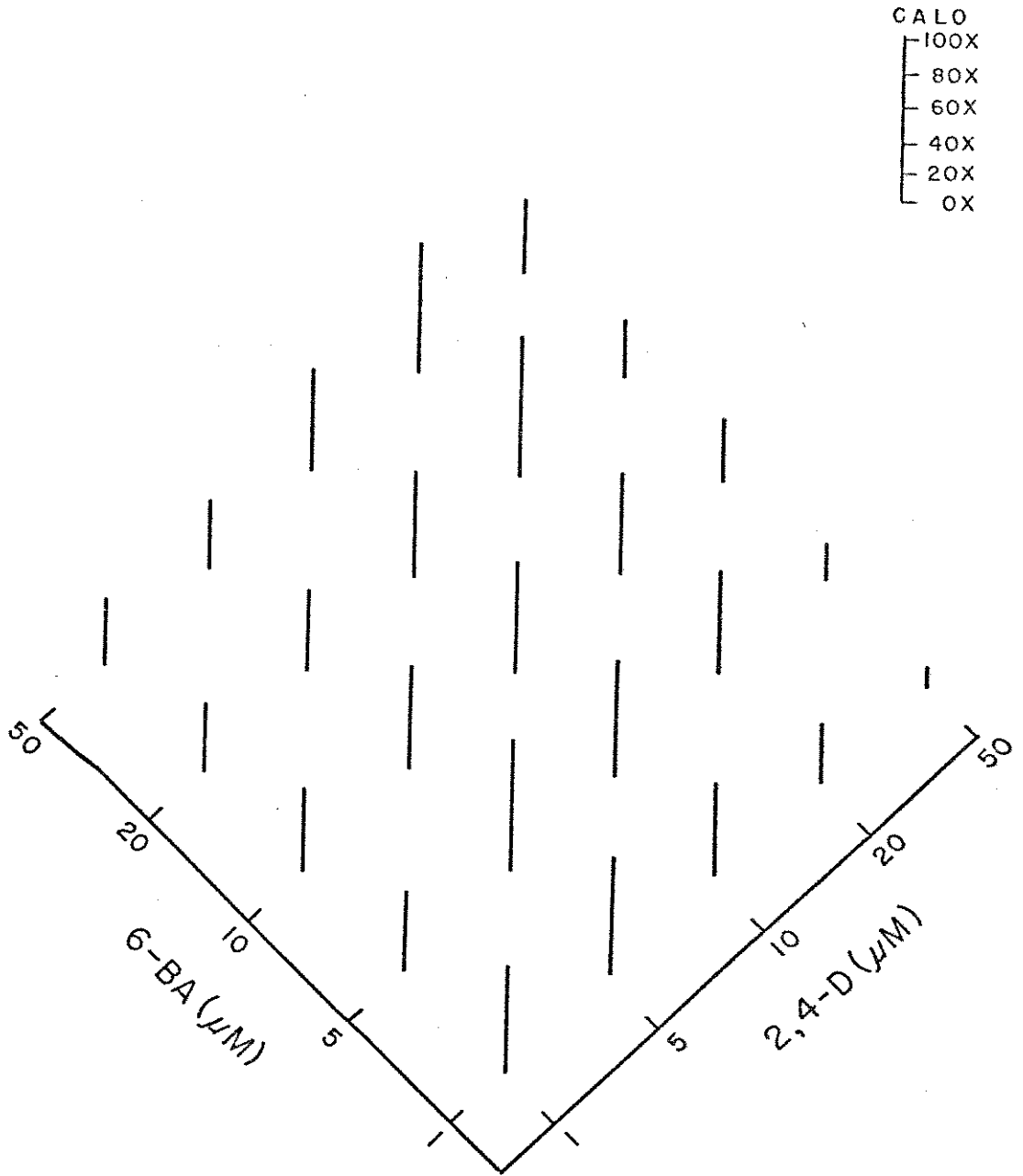


FIGURA 17. Crescimento de calos a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Roxinho induzido por 6-BA e 2,4-D, após 29 dias de cultura no escuro. Dados de 8 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido.

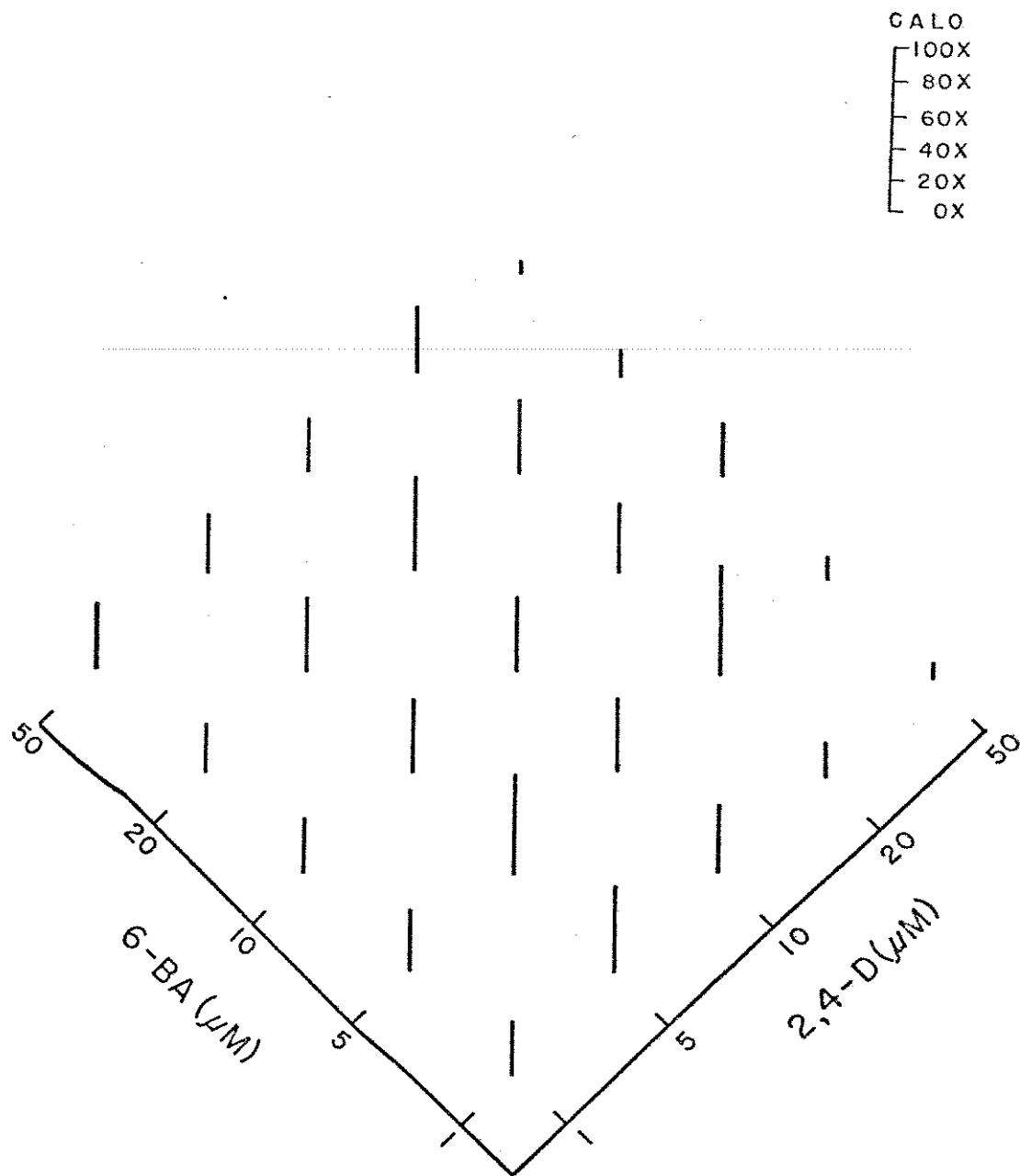


FIGURA 18. Crescimento de calos a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Carioca induzido por 6-BA e 2,4-D, após 29 dias de cultura no escuro. Dados de 8 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido.

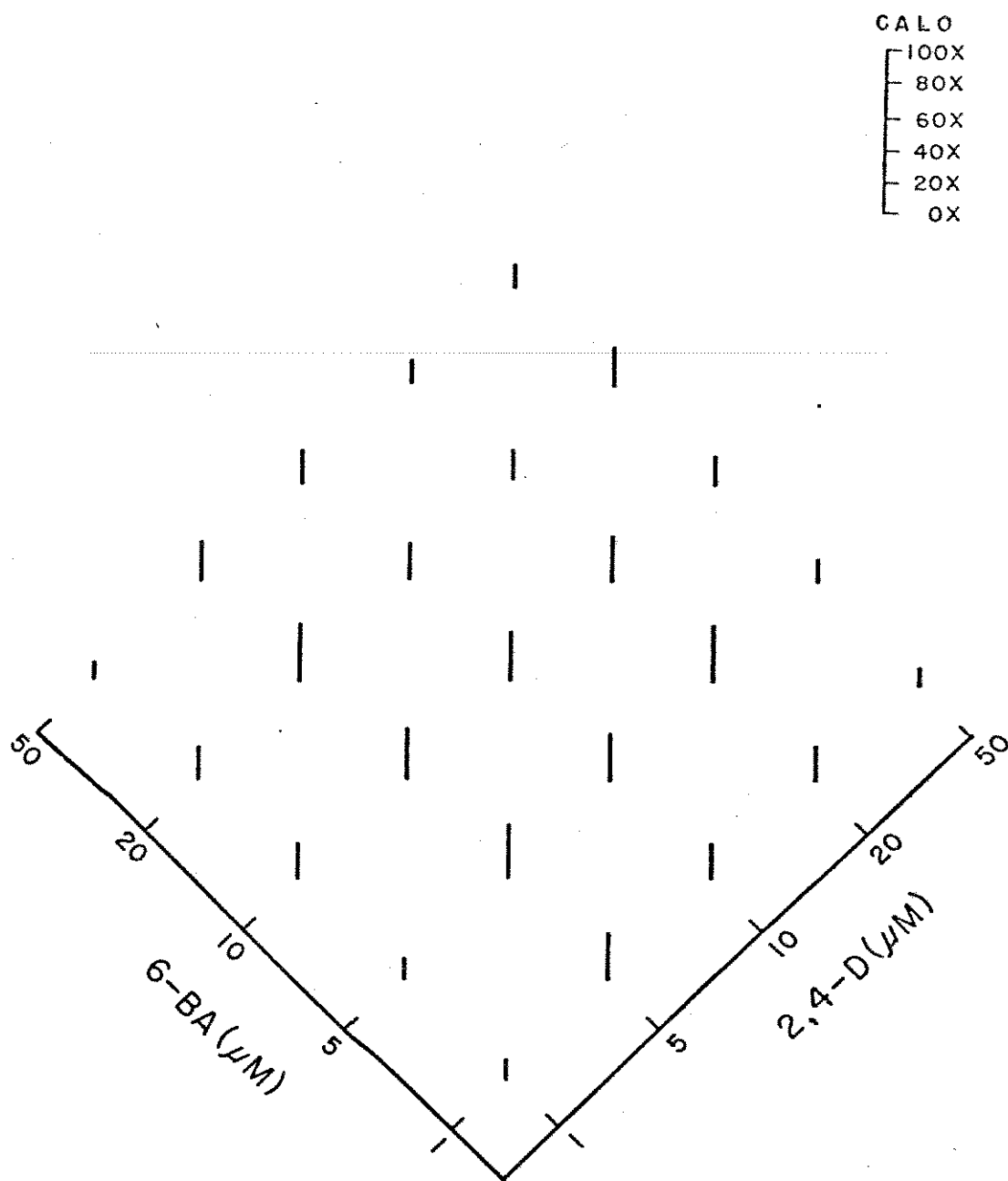


FIGURA 19. Crescimento de calos a partir de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* cv. Puebla-153 induzido por 6-BA e 2,4-D, após 29 dias de cultura no escuro. Dados de 8 a 10 repetições. Avaliação pelo aumento de peso fresco do tecido.

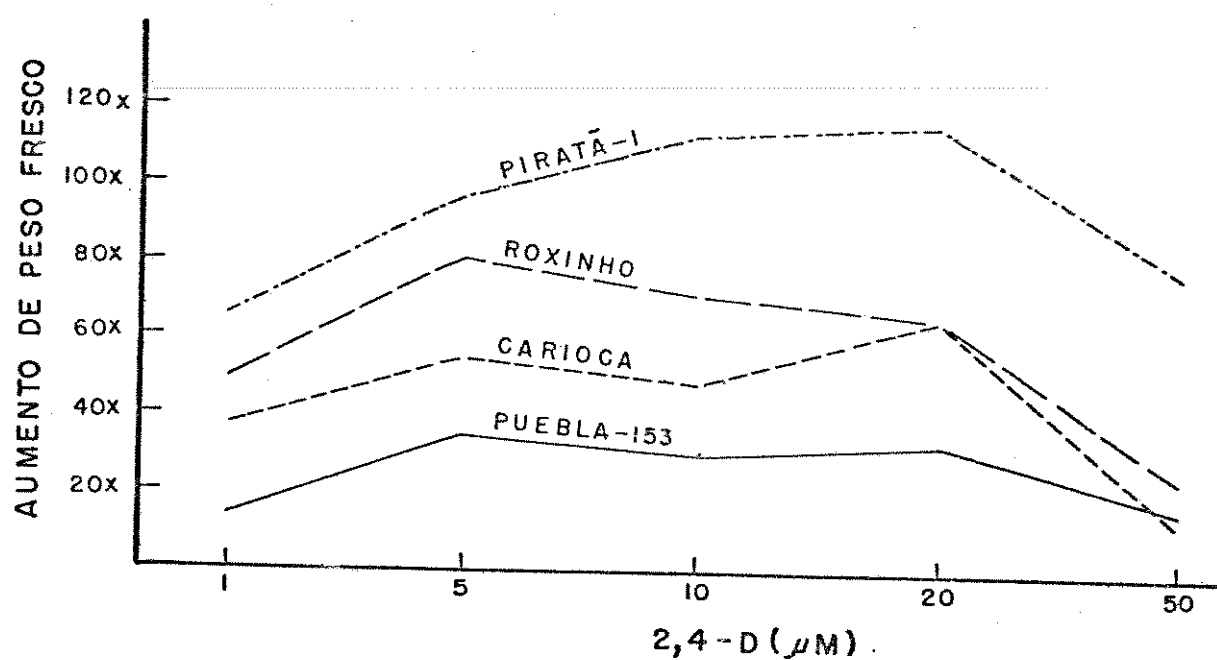


FIGURA 20. Crescimento de calos a partir de folhas primárias de diferentes cultivares de *Phaseolus vulgaris* cultivados na presença de 6-BA (5 μM) e 2,4-D (1 - 50 μM).

var Roxinho.

Comparando-se os resultados da cultura de folhas primárias destes quatro cultivares (interação 6-BA/2,4-D) com aqueles obtidos na cultura de segmentos de folhas trifolioladas de 'Moruna' (interação KIN/2,4-D; FIGURA 8) constata-se maior especificidade à indução de calos para explantes de folhas trifolioladas. As respostas de crescimento de folhas trifolioladas do cultivar 'Piratã-1' foram então estudadas com a interação KIN/2,4-D (FIGURA 21). A faixa de RCs que promoveu maior proliferação de calos foi de 10-20 μ M de KIN e 2,4-D, observando-se o pico de maior crescimento no tratamento KIN/2,4-D a 20/20 μ M. Comparando-se as respostas de crescimento dos cultivares Moruna e Piratã-1 (FIGURAS 8 e 21 respectivamente), nota-se diferenças genotípicas na indução de calos a partir de folhas trifolioladas em interação - com KIN/2,4-D. Para 'Moruna' o crescimento de calos foi grandemente inibido na faixa de 5-50 μ M de 2,4-D, enquanto que para 'Piratã' a faixa de 1-20 μ M de 2,4-D favoreceu a indução de calos. A faixa ótima de concentração de 2,4-D para 'Moruna' situa-se entre 1-5 μ M, enquanto que para 'Piratã-1' seria de 10-20 μ M. Estes resultados mostram que o cultivar Piratã-1 exige níveis mais elevados de 2,4-D (4 a 10 vezes) do que o cultivar Moruna para a indução de calos a partir de folhas trifolioladas.

MOK & MOK (1977) também observaram diferenças genotípicas nas respostas a RCs em *Phaseolus* spp. Variações de resposta à auxina ocorreram entre e dentro das espécies do gênero *Phaseolus*. O crescimento de calos de *P.*

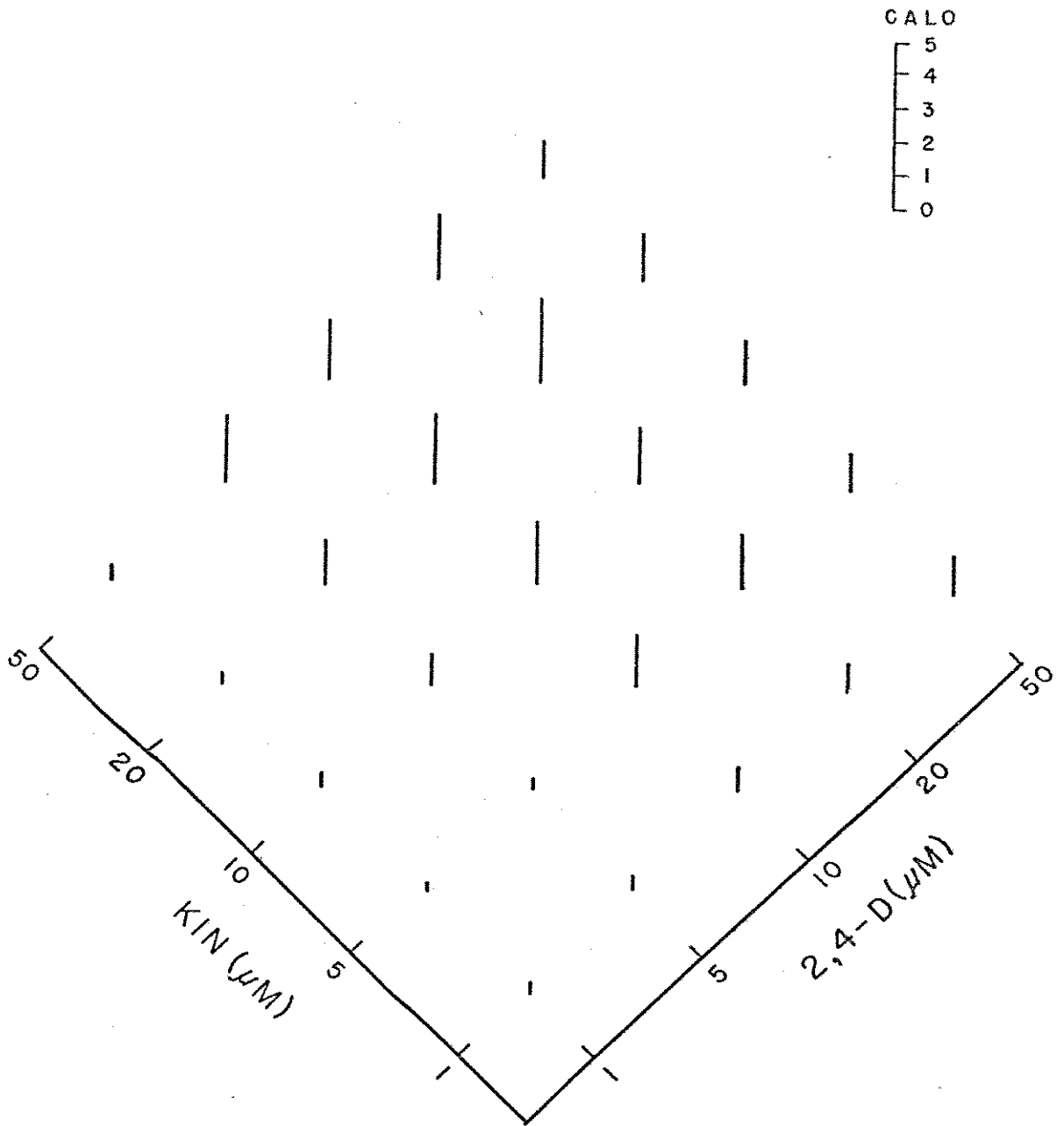


FIGURA 21. Crescimento de calos a partir de folhas trifolioladas de *Phaseolus vulgaris* cv. Piratã-1 induzido por KIN e 2,4-D, após 25 dias de cultura no escuro. Dados de 8 a 10 repetições. Avaliação por índice de crescimento.

lunatus foi inibido na presença de 2,5 μM de 2,4-D, enquanto que os tecidos de *P. vulgaris* foram inibidos somente a 10 μM de 2,4-D. Em *P. lunatus* a concentração de 20 μM de 2,4-D foi próxima de ótima para o cultivar Kingston e inibitória para o cultivar P.I. 194314. Em *P. vulgaris* o cultivar Romano diferiu cerca de oito vezes de dois outros cultivares, na exigência de auxina para um crescimento ótimo de calos.

Os resultados obtidos com a cultura de explantes de folhas (primária e trifoliolada) de diferentes cultivares variaram quanto ao genótipo, idade do explante e condições de cultura. Variações semelhantes foram encontradas por PHILLIPS & COLLINS (1979a), trabalhando com trevo vermelho.

Após cultura primária, os calos obtidos de explantes foliares de diferentes cultivares foram transferidos para cultura secundária contendo KIN (10 μM) e NAA (2,5 μM). A indução de morfogênese de plântletes foi testada em todos os calos obtidos, mesmo naqueles que não apresentaram crescimento de calos satisfatório, uma vez que nem sempre existe relação entre proliferação de calos e formação de plântletes (PADMANABHAN *et al.* 1974). Esta mesma observação foi notada em calos de folhas de café. As mais altas frequências de formação de embriões somáticos ocorreram quando os explantes foram cultivados em meio primário contendo KIN/2,4-D a 18,4/4,5 μM (60%); 18,4/18 μM (50%) e 36,5/4,5 μM (60%). Ótima proliferação de calos ocorreu nos tratamentos de KIN/

2,4-D de 10/5 a 18/9 μM (SONDAHL & SHARP 1979)

Os calos foram mantidos em cultura secundária durante 90 dias, procurando-se explorar uma possível variabilidade genética na capacidade regenerativa em *Phaseolus vulgaris*. No entanto, não foi observada regeneração em nenhuma das culturas realizadas. A capacidade regenerativa em calos de alfafa (*Medicago sativa*) dependeu dos níveis dos RCs do meio primário e do genótipo da planta doadora (SAUNDERS & BINGHAM 1972). No caso de feijão, apesar do grande número de combinações de RCs e dos diferentes genótipos testados, não foram encontradas as condições favoráveis para o processo regenerativo em culturas sólidas.

3. Estabelecimento de Cultura Líquida

Para o estabelecimento das condições de cultura líquida para *P. vulgaris* cv. Moruna, utilizou-se como inóculo inicial, calos obtidos de diferentes explantes (hipocótilo, cotilédone embrião) e sais inorgânicos PC-L2. Esta formulação salina se mostrou superior à de MS para a cultura de algumas leguminosas, como soja e alfafa (PHILLIPS & COLLINS 1979a). As diferenças significantes na formulação inorgânica do meio PC-L2 incluem maiores níveis de Ca, Mg, K e PO_4 em comparação à de MS (TABELA 5). Em relação aos micronutrientes a composição de PC-L2 e MS são semelhantes. Níveis relativamente elevados de Bo, Mn e Zn podem causar problemas de toxicidade para algumas espécies de leguminosas (PHILLIPS & COLLINS 1979a).

Os sais PC-L2 foram considerados eficientes no estabelecimento da cultura de células em suspensão de 'Moruna'. Não houve diferença de resposta de crescimento quanto à origem do calo e sim quanto à presença ou não de caseína no meio líquido (FIGURA 22 A). LIAU & BOLL (1970) também não observaram grandes diferenças de crescimento entre culturas de células de diferentes origens (raiz, hipocótilo e cotilédone) de *P. vulgaris* cv. Contender. No meio contendo caseína houve ótimo crescimento celular ($10^5 - 10^6$ células/ml). A análise microscópica das células de feijão revelou a existência de várias formas e tamanhos: esférica (10-40 μm de diâmetro); alongada (30-60 μm x 10-20 μm); forma de garrafa (40 x 90 μm) e outras formas alongadas não definidas. Em café, a adição de CH (0,2%) ao meio líquido também estimulou a proliferação celular (TOWNSLEY 1974). A cultura líquida de feijão se apresentou com células isoladas e pequenos agregados (clumps). Após 10 passagens (1 a cada 3 dias), a suspensão foi filtrada e transferida para o meio sólido VI, obtendo-se subsequente crescimento de calos em 20 dias.

No meio líquido sem caseína, o crescimento de células foi baixo, porém ocorreu a formação de estruturas globulares (FIGURA 22 B) semelhantes às células embrionárias, correspondentes ao estágio globular da formação de embriões (STREET & WITHERS 1974, SONDAHL & SHARP 1977). Células em suspensão mantidas em meio com CH foram transferidas para meio sem CH e também houve a formação destas estruturas. Estes resultados são opostos aos de SYONO (1965) que mostrou ser



FIGURA 22. Cultura líquida de células de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna. (A) Células em suspensão derivadas de calos de hipocótilos, cultivadas em meio PC-L2 contendo 2,4-D ($10 \mu\text{M}$) na presença de 2 g/l de caseína hidrolizada (1) ou na ausência de caseína (2). (B) Estruturas globulares originadas em cultura líquida, estabelecida a partir de calos derivados de ápices meristemáticos.

a CH capaz de promover a formação de embriões, quando adicionada à cultura líquida de células de cenoura. As estruturas globulares de feijão foram transferidas para diferentes meios de cultura sólidos, porém não foi observado o desenvolvimento subsequente destas estruturas. DAVEY *et al.* (1974) também observaram estas estruturas globulares cultivando células de *Vigna sinensis*. Utilizando o meio de cultura regenerativo para *Medicago sativa* (SAUNDERS & BINGHAM 1972) obtiveram somente desenvolvimento de raízes a partir destes glóbulos. O aparecimento de estruturas globulares em culturas em suspensão de *Glycine* spp. foi reportado por BEVERSDORF & BINGHAM (1977), porém não ocorreu desenvolvimento além deste estágio.

Os resultados aqui obtidos com feijão, juntamente com os relatados por DAVEY *et al.* (1974) com caupi e por BEVERSDORF & BINGHAM (1977) com *Glycine* spp. sugerem que não foram definidas as condições de cultura para desenvolvimento subsequente destas estruturas globulares até a formação de plântulas. STEWARD *et al.* (1958) sugere que as condições nutricionais para este desenvolvimento se assemelham às que normalmente nutrem os embriões imaturos provenientes de zigotos. Teoricamente seria possível obter o desenvolvimento destes embriões *in vitro* através da manipulação adequada do meio de cultura.

4. Estabelecimento da Cultura de Ápice Meristemático

Com a finalidade de se estudar o desen

volvimento de plantas de feijoeiro *in vitro*, ápices meristemáticos de *P. vulgaris* cv. Moruna foram cultivados em diferentes meios de cultura. Utilizou-se os meios descritos para a cultura de meristemas de batata (meio VII, MOREL & MILLER 1964), mandioca (meio VIII, KARTHA & GAMBORG 1975), alho (meio IX, NOVAK 1977) e ervilha (meio X, KARTHA *et al.* 1979). As respostas de crescimento obtidas após 30 dias de cultivo dos ápices meristemáticos nos diferentes meios de cultura são apresentadas na FIGURA 9.B. Nos meios de cultura VIII e IX não houve desenvolvimento de gemas. O primeiro produziu pouco calos e estes se apresentaram oxidados. O meio IX promoveu ótimo crescimento de calos indicando que o ápice meristemático é uma fonte de explante ideal para a produção de calos, quando em condições de cultura apropriadas. Para trevo vermelho (leguminosa forrageira), meristemas e cotilêdones foram explantes superiores para a produção de calos, em relação às outras fontes de explantes (PHILLIPS & COLLINS 1979a). HADDON & NORTHCOTE (1976) também observaram rápida proliferação de calos de feijão quando ápice meristemático foi utilizado como explante. Estes autores atribuíram este fato a presença de células ativamente em divisão, em contraste com outros explantes que apresentam células diferenciadas e ausência de região meristemática. O meio de cultura VII não foi considerado satisfatório para a cultura de ápice meristemático de feijão. Promoveu ligeiro crescimento de calos, pequeno desenvolvimento de gema apical e indução de raízes. O meio de cultura X promoveu ótimo desenvolvimento de plântu-

las a partir do meristema apical. Talvez esta melhor resposta se deva ao fato do meio X ter sido desenvolvido originalmente para a cultura de meristemas de ervilha, outra leguminosa.

5. Cultura de Ápices Meristemáticos de 36 Cultivares de *Phaseolus vulgaris*

A cultura de ápices meristemáticos de 'Moruna' mostrou grande capacidade morfogênética, diferindo dos outros explantes até então utilizados (hipocótilo, cotilédone, etc). O emprego de embrião como explante inicial demonstrou alguma capacidade morfogênética, talvez pela presença do ápice meristemático. Baseando-se nestes resultados, 36 cultivares de *P. vulgaris* (TABELA 4) foram cultivados utilizando-se ápice meristemático como fonte de explante. Procurou-se desta forma explorar a variabilidade genética em feijão na tentativa de encontrar um genótipo mais favorável à regeneração de plantas *in vitro*.

5.1. Indução de calos

O meio de cultura sólido IX, contendo os RCs IAA (10 μM), 2,4-D (5 μM) e KIN (10 μM) foi utilizado para induzir o crescimento de calos nos 36 cultivares em estudo, considerando-se as respostas de crescimento para 'Moruna' (FIGURA 9.B). NIIZEKI & GRANT (1971) observaram que para *Lotus* spp., outra leguminosa, a combinação de 2,4-D com KIN e IAA, embora tenha suprimido a organogênese, promoveu

Ótimo crescimento de calos.

Ao término da cultura primária (35 dias) as respostas de crescimento dos cultivares foram agrupadas em três tipos : (a) 14 cultivares não responderam satisfatoriamente obtendo-se calos pequenos e parcialmente oxidados; (b) 8 cultivares apresentaram respostas intermediárias e (c) 14 cultivares mostraram ótimo crescimento de calos (FIGURA 3; TABELA 17).

Pelo grau de especificidade que costuma-se encontrar nas respostas de crescimento *in vitro*, o meio de cultura utilizado foi considerado pouco específico, uma vez que pelo menos 14 variedades apresentaram ótimos índices de crescimento. Para alfafa por exemplo, WALKER *et al.* (1978) relataram que a indução de calos variou entre indivíduos do cultivar Regen-S.

5.2. Cultura líquida

O meio de cultura V contendo os sais PC-L2 acrescido de CH (2g/l), foi utilizado para estudar as respostas de crescimento em cultura líquida dos 36 cultivares. O meio V mostrou-se eficaz para a obtenção de células em suspensão de 'Moruna'. Em culturas de *T. pratense* os sais PC-L2 suportaram 10 a 12% a mais de genótipos do que a formulação de MS (PHILLIPS & COLLINS 1979a).

Aos 21 dias (6 trocas de meio), as culturas em suspensão dos cultivares Moruna, Piratã-1 e Linea-29 apresentaram ótima densidade de células. Nestas culturas foram

TABELA 17: Respostas de crescimento de calos em 36 cultivares de *Phaseolus vulgaris*. Calos obtidos a partir de ápice meristemático cultivado em meio básico de MS acrescido de IAA (10 µM), 2,4-D (5 µM) e KIN (10 µM): (1) crescimento em meio básico de MS acrescido de IAA (3) crescimento ótimo. Média de 16 a 20 repetições.

<u>Crescimento 1</u>		
Fartura	<u>Crescimento 2</u>	<u>Crescimento 3</u>
Roxote	Chumbinho	Moruna
Rosinha G-2	Catu	Piratã-1
Pintado	Palmital Precoce	Roxinho
60 Dias	Sel. L-132	Puebla-153
Cavalo Xaxim	Brasil 1087	Linea-29
Red Kloud	Copinha Manteiga	Carioca
Sacavem	2086 Tupi	Nep-2
Linea-17	N/12/110 - Rapê	Bico de Ouro
Gold Korrel		Mulatinho 46
73 Vul 3208		541 Sujo
Fígado de Galinha		Côco Blanchi
Bayo		N 203
Mamoninha		Jules
		Actopan

observadas a presença de estruturas globulares, semelhantes ao estágio globular do desenvolvimento de embriões sexuais (FIGURA 22.B) após a retirada de CH do meio de cultura.

As culturas líquidas dos cultivares Pue
bla - 153, Sujo, Palmital Precoce, Tupi, Actopan, Rapê e Bayo apresentaram grande densidade celular e formação de "clumps", após 10 trocas de meio (33 dias de cultura).

O estabelecimento de uma cultura de cél
ulas em suspensão é caracterizado por uma fase inicial onde o crescimento celular é lento (lag phase). Numa fase seguinte, a velocidade de divisão celular aumenta obtendo-se uma curva de crescimento exponencial, quando então a cultura é conside
rada estabelecida. Na prática, reconhece-se esta fase pela grande densidade celular (cerca de 5×10^5 células/ml) e nece
sidade de subculturas frequentes. Numa terceira fase denomi
nada estacionária, a estabilidade da cultura em suspensão se
ria mantida por uma reposição de células equivalente ao núme
ro de células senescentes. Não havendo adição de meio fresco, a cultura passaria então para a quarta fase-senescência.

Os cultivares Roxinho, Carioca, Chumbi
nho, Catu, Bico de Ouro, Rosinha-G2, Coco Blanchi, Nep-2, Pintado, Sel. L-132, Jules, Brasil 1087, Copinha Manteiga, Sacavem e Gold Korrel apresentaram suspensões de células de pouca densidade, aos 33 dias de cultura, após 10 trocas de meio. Os cultivares Fartura, Mulatinho-46, N-203, Cavalo Xa
xim, Red Kloud, Linea-17, 73 Vul 3208 e Fígado de Galinha não apresentaram crescimento de células em suspensão, após

24 dias de cultura (7 trocas de meio). Os cultivares Roxote, 60 Dias e Mamoinha não foram avaliados devido a contaminações.

O meio líquido utilizado foi capaz de sustentar ótimas suspensões de células para três cultivares aos 21 dias e para outros sete aos 33 dias. Um grupo de 15 cultivares apresentou suspensões celulares de pouca densidade, enquanto que num último grupo de 8 cultivares não houve crescimento de células em meio líquido.

Diferenças genotípicas explicam parcialmente estas respostas de crescimento em meio líquido. Calos pequenos e não friáveis também podem contribuir para o insucesso do estabelecimento de culturas em suspensão. A importância do tamanho do inóculo inicial em determinar a perfomance da suspensão celular foi constatada para trevo doce (TAIRA *et al.* 1977) trevo vermelho (PHILLIPS & COLLINS 1979a) e cenoura (MANETTI 1981). JEFS & NORTHCOTE (1967) trabalhando com *P. vulgaris* observaram que calos de cor creme e extremamente friáveis proporcionavam o estabelecimento rápido de células em suspensão. Tal relação também foi sugerida por GRANT & FULLER (1968), GAMBORG & EVELEIGH (1968), LIAU & BOLL (1970), SCHENK & HILDEBRANDT (1972). Além disso, sabe-se que o estabelecimento de cultura de células em suspensão é dependente do genótipo das células (PHILLIPS & COLLINS 1979a). Em alfafa, KAO & MICHAYLUK (1981) demonstraram que as condições nutricionais necessárias para induzir embriogênese em suspensões celulares foi dependente do genótipo, a nível de indi

víduo.

Uma indicação de que não foi apenas o inóculo inicial que determinou as respostas de crescimento em cultura líquida é encontrada nas respostas de 'Mulatinho-46' e 'N-203'. A cultura de ápices meristemáticos destes cultivares no meio sólido IX, gerou calos friáveis, de cor creme e com grande crescimento. Porém, estes calos utilizados como inóculo inicial para o estabelecimento de cultura líquida, proporcionaram resultados negativos. O inverso ocorreu com o cultivar Bayo, o qual não produziu calos de bom aspecto mas, quando estes foram inoculados em meio líquido, deram o rigem a suspensão celular densa, após 33 dias. TAIRA *et al.* (1977) ao trabalharem com *Melilotus alba* também observaram que o crescimento de calos friáveis em meio sólido não estava associado com a facilidade de estabelecimento de culturas em suspensão. Estas variações nas culturas líquidas de 33 cultivares de feijão, podem ainda ser atribuídas à diluição durante subcultura. Deve ser considerada ainda a possibilidade de subpopulações de células com diferentes ciclos mitóticos entre os diferentes cultivares (GAMBORG 1966).

Entre os 10 cultivares estabelecidos em meio líquido, 6 tiveram como inóculo inicial calos que apresentaram crescimento ótimo no meio primário IX. Entre os 8 cultivares para os quais não se estabeleceu a cultura líquida, 6 não cresceram satisfatoriamente na cultura primária. Pode-se notar aqui a importância do inóculo inicial para o estabelecimento da cultura de células em suspensão.

A análise conjunta dos resultados encontrados mostra que existiu pelo menos uma interação entre genótipo, inóculo inicial e meio de cultura como fatores responsáveis pelas respostas de crescimento *in vitro* de *P. vul*garis. Para cada genótipo devem ser estabelecidas condições de cultivo que serão específicas para cada etapa da cultura. Sabe-se que para reintroduzir células no ciclo mitótico e isolar subpopulações com nova regulação para desenvolvimento organizado, sequências de estímulos são necessárias. A célula ovo contém todas as informações genéticas para o desenvolvimento da planta. Assim, qualquer célula de um indivíduo, que é um descendente do zigoto por divisões mitóticas, retém as informações genéticas no seu núcleo. A necessidade de estímulos morfogênicos exógenos pode muitas vezes ser breve e ocorrer cedo na vida de uma célula e, depois disso, esta célula se especializa. Desta maneira, o mecanismo para o controle na morfogênese em cultura de células deve utilizar a aplicação de estímulos químicos exógenos sequenciais. Teoricamente, as células seriam induzidas a recapturar a embriogênenese. As células de *Daucus carota* e *Sium* sp. particularmente respondem a tratamentos sequenciais, crescendo vegetativamente em meio primário e sofrendo divisões organizadas para recapturar a embriogênese em meio secundário (STEWART *et al.* 1970). Não existe um meio básico universal capaz de garantir o crescimento de células de qualquer espécie vegetal *in vi*tro. É necessário encontrar uma composição de meio de cultura adequada para cada tipo de tecido, em condições de cultura

ra determinadas, para atingir diferentes estádios de diferen
ciação.

Nota-se que entre os 33 cultivares estu
dados em cultura líquida, apenas em três (Moruna, Piratã-1 e Linea-29) obteve-se certo grau de diferenciação (estruturas globulares) o que confirma a especificidade das respostas *in vitro* . BEVERSDORF & BINGHAM (1977) também observaram centros de crescimento, contendo células semelhantes às me
ristemáticas, em suspensões celulares de *Glycine* spp. Neste caso porém, o grau de diferenciação variou conforme o culti
var. Em feijão, quando houve o aparecimento destas estrutu
ras globulares elas sempre se assemelharam ao estágio globu
lar típico do desenvolvimento de embriões (FIGURA 22.B) não havendo variações no grau de diferenciação conforme o genóti
po.

As estruturas globulares e os "clumps" obtidos em cultura líquida, foram transferidos para o meio sólido XI, procurando-se explorar a eficiência pa
ra regeneração da combinação de quatro diferentes fontes de citocinina, em várias concentrações. Após 60 dias de cultura em casa de vegetação, não se obteve desenvolvi
mento posterior das estruturas globulares nem regeneração a partir dos "clumps". Embora as células tenham crescido em meio líquido, com organização interna bem desenvolvida, o es
tímulo morfogenético não foi encontrado sob as condições ado
tadas. Nem sempre é fácil recaptular em culturas de células *in vitro* o estímulo ao qual elas respondem *in vivo*. Teórica

camente, todas as Angiospermas podem formar culturas de células capazes de serem clonadas e produzirem plantas genotipicamente idênticas (STEWART *et al.* 1970).

Estudos com *Atropa belladonna* (THOMAS & STREET 1970) indicaram que as condições prévias da cultura de calos podem controlar a organogênese subsequente em meio líquido. A expressão deste potencial regenerativo pode ser mudada quantitativamente e qualitativamente, de acordo com o tipo de subcultura. Para esta espécie foram obtidas raízes, estruturas globulares ou plântules, conforme a sequência de meios de cultura utilizada. As estruturas globulares, embora fossem produzidas frequentemente em *A. belladonna*, apareciam em pequenas quantidades e não se desenvolviam além deste estágio.

5.3. Indução de morfogênese

Sub-meristemas de 36 cultivares de *P. vulgaris* (TABELA 4) foram cultivados *in vitro* a fim de se estudar a capacidade morfogenética diferencial entre estes genótipos. Os sub-meristemas foram cultivados em meio sólido B5 com 0,5 μ M de 6-BA. Após 45 dias de cultura, em condições de temperatura e luminosidade controladas, obteve-se o desenvolvimento de gema apical, raiz e/ou calo conforme o cultivar (FIGURAS 23, 24 e 25). Os cultivares Pintado, Sel. L-132 e Fígado de Galinha apresentaram contaminação total por bactéria não tendo sido estudado as respostas de desenvolvimento nestes genótipos.

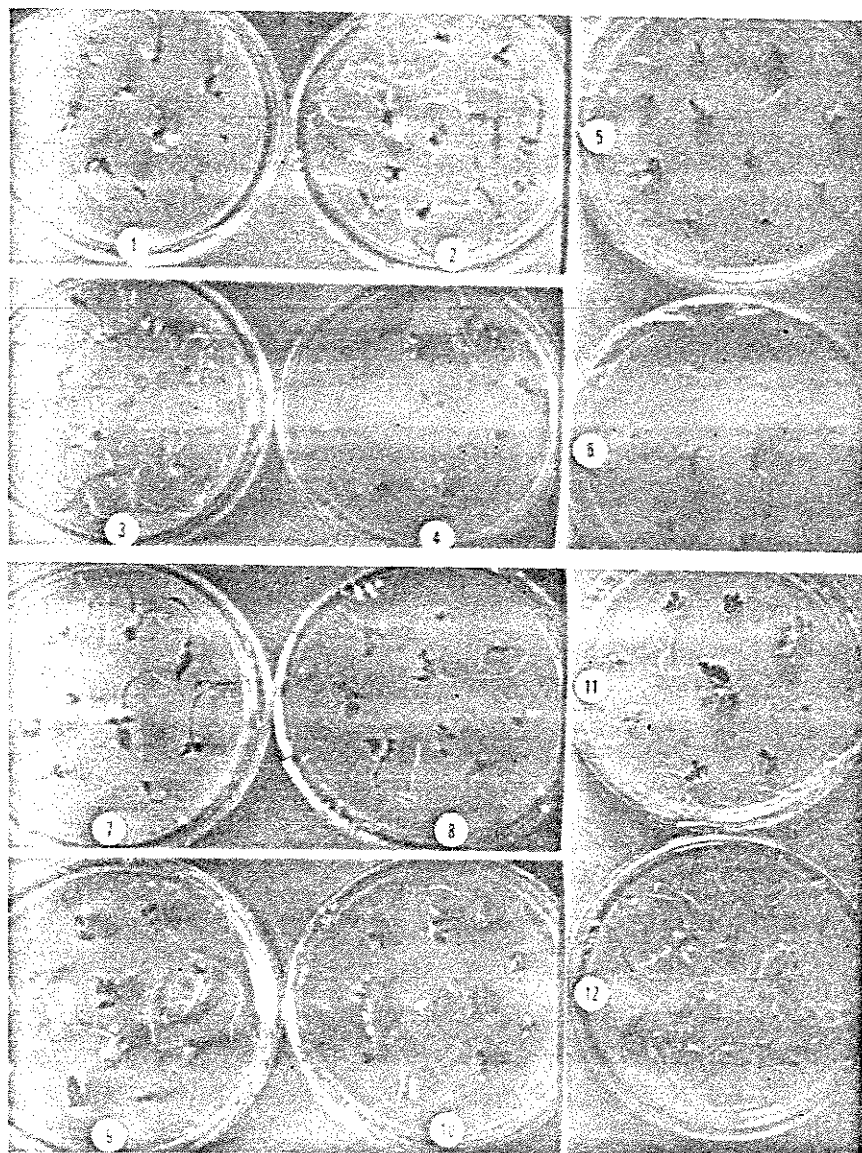


FIGURA 23. Respostas de crescimento de ápices meristemáticos de *Phaseolus vulgaris* cultivados em meio B5 com 6-BA ($0,5 \mu\text{M}$). Leitura após 45 dias de cultura sob luz: (1) Moruna, (2) Piratã-1, (3) Roxinho, (4) Puebla-153, (5) Linea-29, (6) Carioca, (7) Chumbinho, (8) Catu, (9) Bico de Ouro, (10) Fartura, (11) Roxote e (12) Mulatinho.

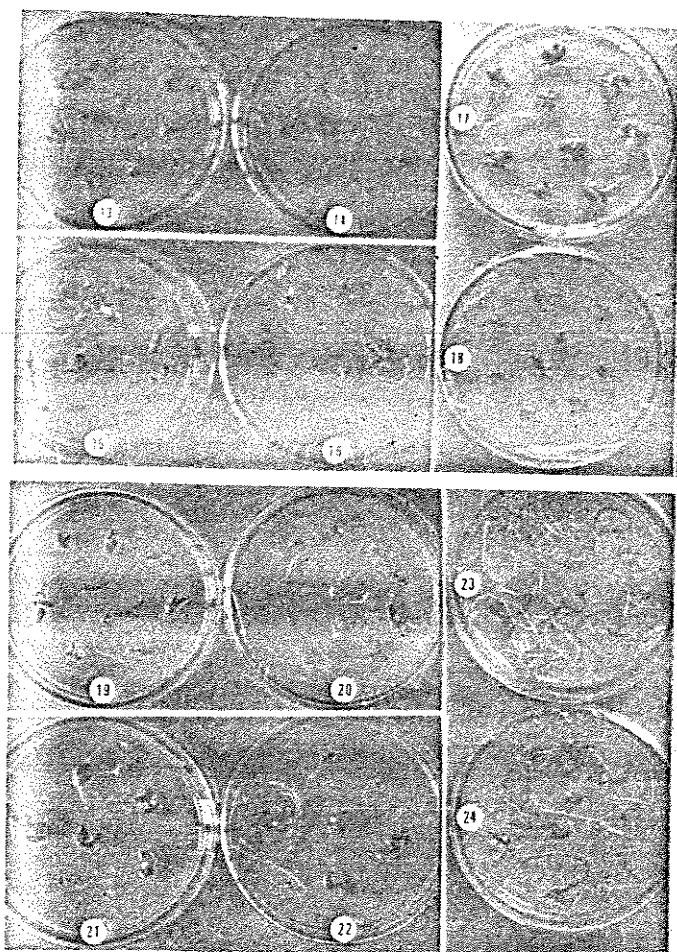


FIGURA 24. Respostas de crescimento de ápices meristemáticos de *Phaseolus vulgaris* cultivados em meio B5 com 6-BA ($0,5 \mu\text{M}$). Leitura após 45 dias de cultura sob luz: (13) Rosinha, (14) Sujo, (15) Coco Blanchi, (16) Nep-2, (17) Palmital Precoce, (18) 60-Dias, (19) N-203, (20) Jules, (21) Cavalo Xaxim, (22) Red Kloud, (23) Brasil e (24) Copinha Manteiga.

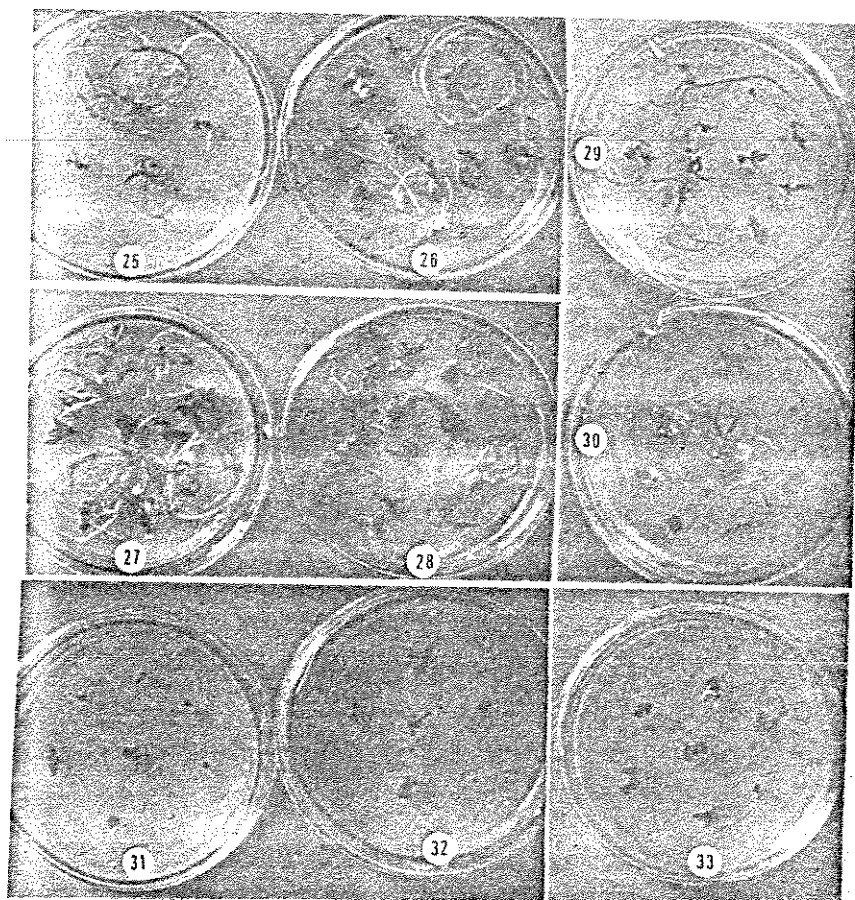


FIGURA 25. Respostas de crescimento de âpices meristemáticos de *Phaseolus vulgaris* cultivados em meio B5 com 6-BA ($0,5 \mu\text{M}$). Leitura após 45 dias de cultura sob luz : (25) Sacavem, (26) Linea-17, (27) Gold Korrel, (28) Tupi, (29) Actopan, (30) Rapê , (31) 73 Vul, (32) Bayo e (33) Mamoinha.

Pelas respostas de crescimento obtidas, o meio de cultura utilizado foi considerado satisfatório para o desenvolvimento inicial de plântulas de feijão. A mesma resposta de crescimento foi obtida para uma série de diferentes cultivares ou seja, desenvolvimento de gema apical a partir de sub-meristema. Mesmo assim, notou-se diferenças genotípicas pois houve variações na formação de calos, desenvolvimento de raízes e gemas apicais conforme o cultivar (FIGURAS 23, 24 e 25).

Visando-se encontrar um meio favorável ao desenvolvimento posterior destas gemas, os tecidos foram transferidos para meio secundário com a composição básica do meio anterior, porém sem RC. Para melhor explorar as condições de cultura metade das repetições foi levada para casa de vegetação e a outra metade permaneceu em sala de cultura (com fotoperíodo e temperatura controlados). Após 15 dias da transferência, notou-se que as gemas mantidas em sala de cultura estavam levemente oxidadas. Estas foram levadas para casa de vegetação, onde as gemas se desenvolveram com ótimo aspecto. Após 40 dias de cultura secundária ocorreu a formação de gemas adventícias múltiplas em 12 dos 36 genótipos em estudo (TABELA 18). Este resultado indica uma capacidade morfogenética diferencial entre os genótipos de feijão, nas condições de cultura adotadas. Estas diferenças genotípicas abrem novas perspectivas no estudo de regeneração de plantas de feijão. Para outras espécies tem sido relatado influência genotípica na capacidade regenerativa dos tecidos, como é o

TABELA 18: Frequência de formação de gemas adventícias em 12 cultivares de *Phaseolus vulgaris*.
 Ápices meristemáticos cultivados em diferentes condições de desenvolvimento.

Cultivar	Casa de Vegetação		Sala de Cultura		Total Gemas (nº médio)
	Repetições (Nº)	Gemas (nº médio)	Repetições (Nº)	Gemas (nº médio)	
Palmital Precoce	10	15,6	4	5,0	12,6
60-Dias	6	8,7	8	5,2	6,7
Linea - 17	10	8,0	6	2,6	6,0
Cavalo Xaxim	7	6,5	8	4,8	5,6
Mamoninha	9	4,0	9	2,5	3,2
Actopan	6	4,0	9	1,0	2,2
Gold Korrel	6	3,5	5	2,0	2,6
Red Kloud	10	3,0	8	5,0	3,6
2086 Tupi	8	3,0	7	1,5	2,2
73 Vul 3208	9	3,0	6	2,0	2,4
Bayo	9	2,0	7	2,0	2,0
Sacavem	8	2,0	7	2,0	2,0

caso de *Lotus* spp. (NIIZEKI & GRANT 1971), alfafa (SAUNDERS & BINGHAM 1972, WALKER *et al.* 1978), *Glycine* spp. (BEVERSDORF & BINGHAM 1977), trevo vermelho (PHILLIPS & COLLINS 1979a), milho (GREEN & PHILLIPS 1975), tomate (PADMANABHAN *et al.* 1974) e *Coffea* spp. (MONACO *et al.* 1977). As gemas apicais dos demais cultivares não apresentaram crescimento posterior em meio secundário, bem como não foi notado formação de gemas adventícias.

A formação de gemas adventícias em 12 cultivares sugere que o meio e as condições de cultura secundária não foram adequados para o desenvolvimento posterior de plântulas de feijão a partir da gema apical. No entanto favoreceram a formação de gemas adventícias múltiplas em alguns cultivares, pelo desenvolvimento de regiões meristemáticas pré-existentes no explante.

Quando se trabalha com tecidos que contêm centros meristemáticos, a análise dos resultados deve ser crítica. Isto porque as condições de cultura podem servir simplesmente para desencadear o desenvolvimento de gemas dormentes pré-existentes no explante. Exemplos destes tipos de cultura em leguminosas foram apresentados por SKOLMEN & MAPES 1976 (*Acacia koa*), TOMES 1979 (*Lotus corniculatus*), PHILLIPS & COLLINS 1979b (*Trifolium pratense*), AUBRY *et al.* 1975 e MARTIN *et al.* 1975 (*Vicia faba*). Entretanto em alguns casos este tipo de cultura é considerado pelos autores como exemplos de regeneração *de novo*. Nestes casos incluem os trabalhos com *Cicer arietinum* (BAJAJ & DHANJU 1979), *Glycine max*

(KIMBALL & BINGHAM 1973, CHENG *et al.* 1980, SAKA *et al.* 1980), *Pisum sativum* (GAMBORG *et al.* 1974, KARTHA *et al.* 1974) e *Vicia faba* (GALZY & HAMOUI 1981). Nos últimos exemplos acima citados, as baixas frequências de formação de plântulas (TABELA 2) sugerem tratar simplesmente do desenvolvimento de gemas pré-existentes nos explantes.

A regeneração *de novo* pode ocorrer a partir de tecidos meristemáticos quando calos são formados numa cultura primária e gemas se diferenciam a partir destes calos, na cultura secundária. A distinção entre os dois processos, ou seja, regeneração *de novo* ou desenvolvimento de gemas pode ser feita verificando-se a frequência de formação de gemas. Por exemplo, em *Lathyrus sativus* (MUKHOPADHYAY & BHOJWANI 1978) a alta frequência de formação de gemas por ápice meristemático cultivado (45 - 82) indica se tratar de regeneração *de novo*.

Os resultados obtidos com feijão sugerem que as condições de cultura primária estimulariam o crescimento de calos a partir de tecido já diferenciado contido no explante original (ápice meristemático), enquanto que as gemas dormentes pré-existentes no explante não seriam estimuladas a crescimento nesta primeira cultura. Entretanto, as condições de cultura secundária estimulariam o desenvolvimento das gemas pré-existentes, enquanto que o crescimento de calos cessaria. Desta forma, o desenvolvimento de gemas não ocorreria a partir de tecido calogênico (regeneração *de novo*) e sim a partir de meristemas pré-existentes (desenvolvimen

to de gemas). Em cultura de tecidos de leguminosas estes diferentes processos muitas vezes não são esclarecidos, o que resulta numa falta de repetibilidade dos experimentos quando se trabalha com tecidos diferenciados. Por exemplo, KAMEYA & WIDHOLM (1981) não foram capazes de regenerar plantas de ervilha utilizando metodologia descrita por MALMBERG (1979) quando trabalharam com segmentos de epicôtilo ausentes de regiões meristemáticas (os segmentos nodais não foram cultivados).

A frequência de formação de gemas adventícias variou de 0 a 12,6 entre os 12 cultivares de *P. vulga*ris que formaram gemas indicando diferenças na capacidade morfogênética entre estes cultivares (TABELA 18). Verificou-se maior frequência de formação de gemas adventícias nas culturas mantidas em casa de vegetação (TABELA 18). A intensidade e a qualidade da luz estão entre os fatores que podem influenciar a capacidade morfogênética dos tecidos (ABO EL-NIL & HILDEBRANDT 1971, WINTON 1970). Em casa de vegetação, 'Palmital Precoce', '60-Dias' e 'Linea-17' produziram em mêdia 15,6 ; 8,7 e 8,0 gemas adventícias por sub-meristema cultivado, respectivamente. Quando as culturas foram mantidas inicialmente em sala de cultura observou-se 5,0 ; 5,2 e 2,6 gemas adventícias/meristema, respectivamente.

As gemas adventícias destes 12 cultivares foram transferidos para meio terciário contendo NAA (1 μ M) e GA_3 (2 μ M) ou apenas NAA (1 μ M). Após 50 dias em casa de vegetação, apenas 'Palmital Precoce' apresentou bom

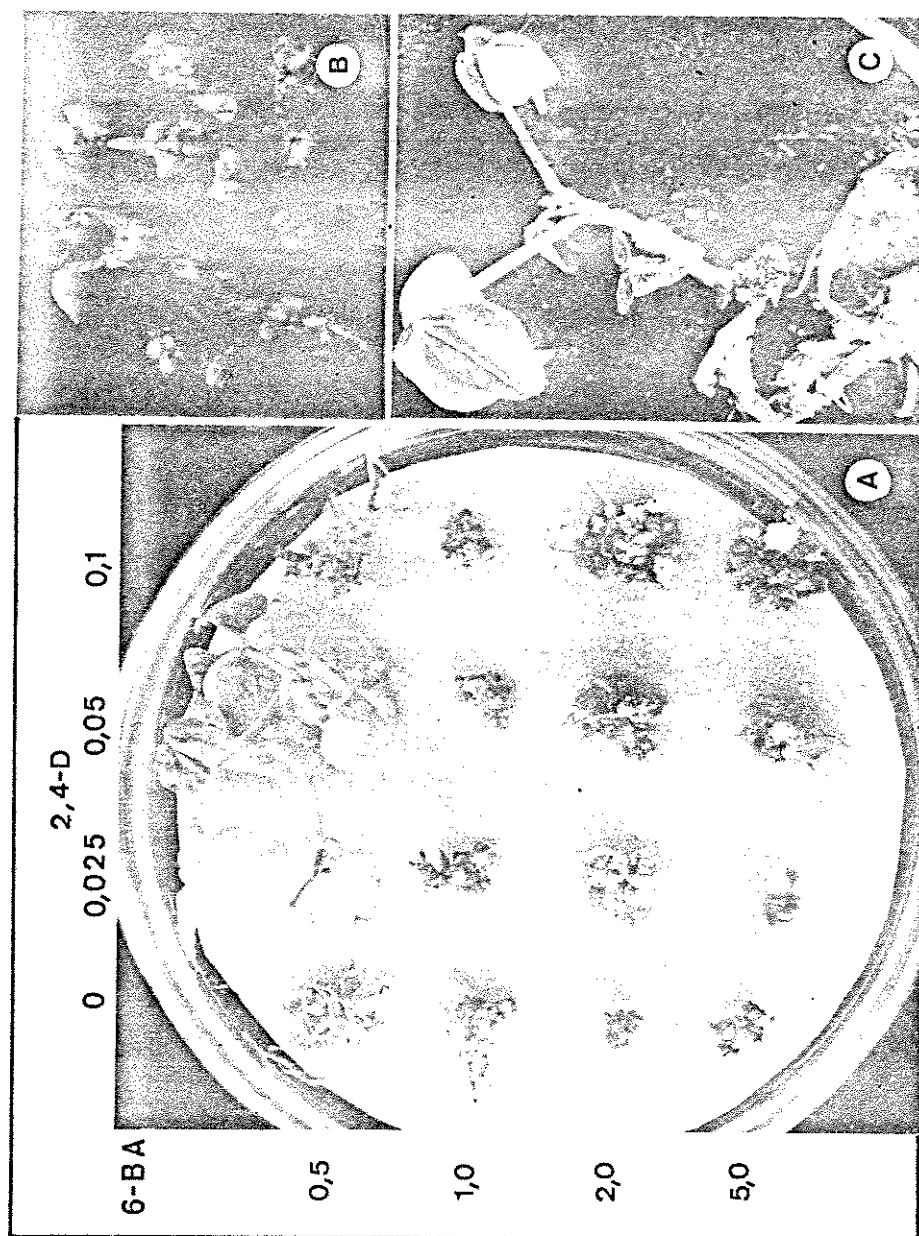
desenvolvimento das gemas, principalmente na presença de GA_3 . As gemas adventícias dos outros cultivares se apresentaram oxidadas, indicando que as condições de cultura terciária adotadas não foram adequadas para estes genótipos.

Na cultura secundária de 'Palmital Precoce' obteve-se uma média de 12,6 gemas adventícias por sub-meristema cultivado. Uma média de 7,3 plântulas de cerca de 1,5 cm por sub-meristema foi obtida em cultura terciária. As gemas cultivadas na presença de GA_3 apresentaram melhor desenvolvimento, indicando que este regulador de crescimento favorece o desenvolvimento de plântulas de 'Palmital Precoce'. Os resultados obtidos confirmam a idéia de que cada genótipo de feijão requer condições de cultivo específicas nas diferentes fases de diferenciação e crescimento.

5.4. Cultura de ápices meristemáticos de 'Palmital Precoce'

Um ensaio dialélico foi conduzido com 'Palmital Precoce' visando otimizar um meio de cultura eficiente para a indução do desenvolvimento de gemas adventícias, a partir de sub-meristemas deste cultivar. A avaliação deste experimento durante a cultura secundária (ausência de RCs) claramente mostrou o efeito do meio primário em sub-meristemas de feijão (FIGURA 26.A). A exposição do 6-BA ($0,5 \mu M$) e ao 2,4-D ($0,025 - 0,05 \mu M$) durante a cultura primária produziu o melhor desenvolvimento do meristema apical. Gemas adventícias múltiplas foram observadas com as seguin

FIGURA 26. Formação de gemas adventícias múltiplas e desenvolvimento de plântulas de *Phaseolus vulgaris* cv. Palmital Precoce, a partir da cultura de ápices meristemáticos. (A) Crescimento de calos, indução do desenvolvimento de gemas adventícias, desenvolvimento de gema apical e diferenciação de raízes durante cultura secundária (meio sem RC) de acordo com diferentes tratamentos de RCs durante cultura primária (ensaio dialélico). (B) Gemas em desenvolvimento após quatro semanas em cultura terciária (note o crescimento assincrônico das gemas derivadas da cultura de um único sub-meristema). (C) Desenvolvimento de uma planta de feijão de 12 semanas de idade, derivada de gema adventícia, crescendo em substrato de areia-vermiculite, em lugar sombreado na estufa.



tes interações: 6-BA (1 ; 2 ; 5 μ M) combinado com 2,4-D (0 ; 0,025 ; 0,05 ; 0,1 μ M). Houve pouca diferença no número de gemas obtidas entre as diferentes interações de RCs, obtendo-se uma média de 15 gemas/sub-meristema cultivado. Na presença de 6-BA (2 ; 5 μ M) e 2,4-D (0,05 ; 0,1 μ M) ocorreu maior formação de calos. As gemas adventícias múltiplas cultivadas no meio terciário XIV mostravam crescimento assíncrono, após quatro semanas (FIGURA 26.B). A maioria destas gemas desenvolveram folhas e raízes normais na 8ª semana de cultura terciária. Estas plântulas foram então transferidas para vasos com areia-vermiculite contendo meio terciário, sem sacarose. Desta forma 8 plantas de feijão com várias folhas trifolioladas se desenvolveram após mais 4-5 semanas de cultura (FIGURA 26.C).

6. Testes de Meios de Cultura Regenerativos em Leguminosas

Protocolos utilizados com sucesso para obter regeneração em outras leguminosas foram testados com tecidos de *Phaseolus vulgaris*. Em nenhum caso entretanto obteve-se regeneração de plantas de feijão (TABELA 19 a 26) o que confirma a especificidade de resposta das culturas *in vitro*. Em alguns casos ocorreu o desenvolvimento de gemas (TABELAS 19, 20, 21, 24 e 26) quando se cultivou tecidos meristemáticos. Notou-se uma diferença de resposta genotípica para a formação de gemas, bem como para as outras formas de crescimento, ou seja, calos e diferenciação de raízes (TABELAS 19 a 26).

TABELA 19: Respostas de crescimento *in vitro* de tecidos de *Phaseolus vulgaris*, utilizando a metodologia descrita para *Crotalaria juncea*. (a)

Explant	'Moruna'			'Palmital Precoce'	
	Cultura primária(b)	Cultura secundária(c)		Cultura primária(b)	Cultura secundária(c)
Ápice meristemático	Grande crescimento de calos de cor creme; raízes finas.	Calos semi-oxidados; duas repetições com gemas.		Grande crescimento de calos creme, com raízes finas.	Calos semi-oxidados; duas repetições com gemas.
Cotilédone	Crescimento de calos friáveis, com pequenas raízes aéreas em 23% das culturas.	Calos semi-oxidados.		Pequeno crescimento de calos oxidados em 17% das culturas.	Calos oxidados e grande diferenciação de raízes.
Hipocótilo	Grande diferenciação de raízes aéreas finas.	Calos semi-oxidados.		Pequeno crescimento de calos e grande diferenciação de raízes.	Calos creme.
Folha	Pequeno crescimento de calos friáveis, com raízes aéreas.	Calos semi-oxidados.		Calos friáveis e diferenciação de raízes.	Calos oxidados.

(a) Sob condições de cultura semelhantes, explantes derivados de tecidos foliares ou de caule de *Crotalaria juncea* produziram calos durante cultura primária e gemas em subseqüente cultura secundária (RANAWAT et al.1977).

(b) saís de MS; NAA (25 µM); KIN (2,5 µM).

(c) saís de MS; KIN (230 µM).

TABELA 20: Respostas de crescimento *in vitro* de tecidos de *Phaseolus vulgaris*, utilizando a metodologia descrita para *Indigofera enneaphylla*. (a)

Explant	'Moruna'		'Palmital precoce'	
	Cultura primária(b)	Cultura secundária(c)	Cultura primária(b)	Cultura secundária(c)
Ápice meristemático	Calos pequenos e oxidados; regiões verdes e pequenas gemas.	Crescimento médio de calos com regiões verdes e diferenciação de raízes.	Desenvolvimento de gemas, algumas com pequeno calos oxidado na base.	Calos com regiões verdes.
Cotilédone	Pequena intumescência na região de corte.	Calos oxidados.	Cotilédones 50% oxidados e 50% verdes; raízes finas em 30% dos explantes verdes.	Calos totalmente oxidados.
Hipocótilo	Crescimento de calos e raízes na região de corte.	Grande diferenciação de raízes.	Crescimento de calos creme friáveis; raízes finas.	Grande diferenciação de raízes.
Folha	Pequeno crescimento de calos oxidados e raízes finas.	Maior crescimento de calos com raízes finas.	Raízes finas diferenciando-se diretamente a partir das folhas.	Grande diferenciação de raízes.

(a) Sob condições de cultura semelhantes, explantes derivados de tecidos de cotilédone ou hipocótilo de *Indigofera enneaphylla* produziram calos com gemas durante cultura primária. A cultura secundária permitiu o desenvolvimento destas gemas (BHARAL & PASHID 1979b).

(b) sais B5; IAA (2,5 µM); 6-BA (5,0 µM).

(c) sais B5; NAA (10 µM); 6-BA (1 µM).

TABELA 21: Respostas de crescimento *in vitro* de tecidos de *Phaseolus vulgaris*, utilizando metodologia descrita para *Lathyrus sativus*. (a)

Explant	'Moruna'		'Palmital Precoce'	
	Cultura primária(b)	Cultura secundária(b)	Cultura primária(b)	Cultura secundária(b)
Ápice meristemático	Calos pequenos e oxidados; regiões verdes e pequenas gemas.	2 plântulas (5 e 1 cm de comprimento) com crescimento de calos e raízes na base.	Desenvolvimento de pequenas gemas, al- gumas com pequeno - calo semi-oxidado na base.	1 plântula (1 cm); calos oxidados com regiões ver- des.
Cotilédone	Pequena intumescên- cia na região de corte.	Calos oxidados com re- giões verdes.	50% oxidados, 50% verdes; raízes fi- nas em 30% dos ex- plantos verdes.	Calos oxidados.
Hipocótilo	Crescimento de ca- los e raízes na re- gião de corte.	Grande diferenciação de raízes.	Crescimento médio de calos creme friã- veis; raízes finas.	Grande diferenciação de raízes.
Folha	Pequeno crescimento de calos oxidados e raízes finas.	Calos oxidados e raí- zes finas.	Raízes finas dife- renciando-se dire- tamente a partir - dos explantes.	Grande diferenciação de raízes.

(a) Sob condições de cultura semelhantes, explantes derivados de tecidos de ápico meristemático de *Lathyrus sati- vus* produziram calos durante cultura primária e gemas em cultura secundária (MUKHOPADHYAY & BHOJWANI 1978).

(b) sais B5; IAA (2,5 µM); 6-BA (5 µM).

TABELA 22: Respostas de crescimento *in vitro* de tecidos de *Phaseolus vulgaris*, utilizando metodologia descrita para *Lathyrus sativus*. (a)

Explante	'Moruna'		'Palmital precoce'	
	Cultura primária(b)	Cultura secundária(b)	Cultura primária(b)	Cultura secundária(b)
Âpice meristemático	Pequenos calos cremes com regiões verdes; algumas raízes.	Calos semi-oxidados; grande diferenciação de raízes.	Crescimento médio de calos semi-oxidados, com regiões verdes; raízes finas.	Grande diferenciação de raízes.
Cotilédone	Cotilédones oxidados; intumescência verde na região de corte.	Bom crescimento de calos; grande diferenciação de raízes.	Cotilédones oxidados, alguns verdes com mínimo crescimento de calos oxidados.	Crescimento médio de calos verde amarelados.
Hipocótilo	Calos creme-claros; grande diferenciação de raízes.	Bom crescimento de calos; grande diferenciação de raízes.	Crescimento médio de calos creme; diferenciação de raízes.	Grande diferenciação de raízes.
Folha	Mínimo crescimento de calos creme, com raízes finas e pequenas.	Bom crescimento de calos; muitas raízes finas.	Pequeno crescimento de calos amarelados; algumas raízes finas.	Grande diferenciação de raízes.

(a) Sob condições de cultura semelhantes, explantes derivados de tecidos de ápice meristemático de *Lathyrus sativus* produziram calos e gemas com raízes durante cultura primária. A cultura secundária aumentou a frequência regenerativa (GHARYAL & MAHESHWARI 1980).

(b) sais B5; NAA (10 µM); 6-BA (2,5 µM).

TABELA 23 Respostas de crescimento *in vitro* de tecidos de *Phaseolus vulgaris*, utilizando metodologia descrita para *Medicago sativa*. (a)

Explant	'Moruna'		'Palmital precoce'	
	Cultura primária(b)	Cultura secundária(c)	Cultura primária(b)	Cultura secundária(c)
Ápice meristemático	Bom crescimento de calos creme claro.	Calos semi-oxidados.	Bom crescimento de calos creme.	Calos creme claros.
Cotilédone	Bom crescimento de calos friáveis na região de corte.	Calos semi-oxidados.	Crescimento médio de calos creme-claros na região de corte.	Calos semi-oxidados.
Hipocótilo	Crescimento de calos creme e friáveis.	Calos semi-oxidados.	Crescimento médio de calos friáveis creme-claros.	Calos claros e oxidados.
Folha	Bom crescimento de calos creme e friáveis.	Calos semi-oxidados.	Ótimo crescimento de calos friáveis.	Calos semi-oxidados.

(a) Sob condições de cultura semelhantes, explantes derivados de tecidos de ovário ou hipocótilo de *Medicago sativa*, produziram calos em cultura primária e plântulas durante cultura secundária (SAUNDERS & BINGHAM 1972).

(b) sais B5; 2,4-D (50 µM); KIN (5 µM).

(c) sais B5; EL (2g/l).

TABELA 24: Respostas de crescimento *in vitro* de tecidos de *Phaseolus vulgaris*, utilizando metodologia descrita para *Pisum sativum*. (a)

Explante	'Moruna'			'Palmital Precoce'	
	Cultura primária(b)	Cultura secundária(c)		Cultura primária(b)	Cultura secundária(c)
Ápice meristemático	Calos amarelos oxidados com regiões verdes ou pequenas gemas.	Calos totalmente oxidados.		Bom crescimento de calos crone amarelos com pequenas gemas.	Calos amarelo-verdes com gemas.
Cotilédone	Pequeno crescimento de calos verdes na região de corte; algumas raízes na região verde.	Calos e cotilédones oxidados.		Cotilédones verdes com mínimo crescimento de calos brancos; 30% oxidados.	Cotilédones oxidados com mínimo crescimento de calos verdes.
Hipocótilo	Pequeno crescimento de calos, grande diferenciação de raízes.	Calos amarelo-oxidados; muitas raízes.		Pequeno crescimento de calos; grande diferenciação de raízes.	Crescimento médio de calos amarelados; raízes.
Folha	Mínimo crescimento de calos verdes; raízes em algumas repetições.	Calos amarelo-oxidados; muitas raízes.		Mínimo crescimento de calos; algumas raízes finas.	Folhas amarelo-oxidadas; raízes finas.

(a) Sob condições de cultura semelhantes, explantes derivados de tecidos de epicótilo de *Pisum sativum* produzem calos em cultura primária e gemas durante cultura secundária (MALMBERG 1979).

(b) sais de MS; NAA (10 µM); 6-BA (5 µM).

(c) sais de MS; IAA (1 µM); 6-BA (20 µM).

TABELA 25: Respostas de crescimento *in vitro* de tecidos de *Phaseolus vulgaris*, utilizando metodologia descrita para *Stylosanthes hamata*. (a)

Explante	'Moruna'		'Palmital Precoce'	
	Cultura primária(b)	Cultura secundária(c)	Cultura primária(b)	Cultura secundária(c)
Âpice meristemático	Ótimo crescimento de calos creme e friáveis.	Calos grandes semi-oxidados.	Ótimo crescimento de calos creme claros e friáveis.	Calos grandes, semi-oxidados.
Cotilédone	Bom crescimento de calos friáveis na região de corte.	Crescimento de calos aumentado; calos semi-oxidados; algumas raízes finas.	Crescimento médio de calos friáveis na região de corte.	Crescimento médio de calos semi-oxidados; raízes finas porém longas.
Hipocótilo	Ótimo crescimento de calos friáveis e brancos.	Calos claros com raízes finas.	Crescimento médio de calos claros.	Bom crescimento de calos brancos; algumas raízes finas.
Folha	Ótimo crescimento de calos friáveis claros.	Calos claros com raízes finas.	Bom crescimento de calos friáveis.	Grande crescimento de calos semi-oxidados; algumas raízes finas.

(a) Sob condições de cultura semelhantes, explantes derivados de tecidos de cotilédone e radícula de *Stylosanthes hamata* produziram calos em cultura primária, raízes em cultura secundária, a partir das quais gemas se desenvolveram durante cultura terciária (SCOWCROFT & ADAMSON 1976).

(b) sais B5; 2,4-D (10 µM); KIN (0,2 µM).

(c) sais B5; sem Rcs.

Um experimento foi montado com tecidos de *P. vulgaris* cv. Puebla-153 repetindo-se a metodologia apresentada por HANH *et al.* (1981) para regeneração em *Psophocarpus tetragonolobus*. Camadas celulares finas de 'Puebla - 153', cultivadas na presença de 6-BA (10 μ M) e IAA (1,0 μ M) produziram calos visíveis já aos 7 dias de cultura. Porém, a cultura secundária na ausência de RCs não levou à regeneração de gemas.

A dificuldade em obter regeneração em *Phaseolus vulgaris*, mesmo utilizando-se metodologias que proporcionaram resultados positivos para outras leguminosas, sugere que condições muito especiais de cultura devem ser requeridas para a indução da diferenciação de gemas em feijão.

7. Cultura de Segmentos Nodais

A manutenção de germoplasmas de feijão, exige, além de instalações adequadas, plantios periódicos para manter a viabilidade das sementes. As técnicas de cultura de tecidos podem auxiliar os bancos de germoplasma desta espécie através da manutenção de gemas em meios de cultura e/ou preservação em N₂ líquido. A cultura de gemas em condições assépticas, também permite a troca de material genético entre países ou regiões distintas, sem o risco de introdução de novos fitoparasitos. As plantas derivadas da cultura de gemas garantem a uniformidade genética, uma vez que se trata de um processo de reprodução vegetativa.

A possibilidade e as vantagens da manu

tenção de genótipos de *Lotus corniculatus* pela cultura de segmentos nodais foi demonstrada por TOMES (1979). Através desta técnica 100 genótipos, com 4 replicatas por genótipo, puderam ser armazenados usando $0,24 \text{ m}^2$ de espaço em prateleiras em um incubador, enquanto que um espaço de campo equivalente para o mesmo número de plantas seria de 400 m^2 . Trinta e quatro dos 100 genótipos de *Lotus corniculatus* estudados foram perdidos durante o inverno de 1977 - 1978 quando mantidos em condições de campo, enquanto que nenhum destes genótipos armazenados e reduzidos às baixas temperaturas foram perdidos no mesmo período. O tempo requerido para obter uma planta adulta em sala de crescimento pela cultura de tecido foi essencialmente equivalente aquele necessário para obter uma planta adulta a partir da semente. Em soja, o desenvolvimento de gemas axilares de segmentos nodais foi induzido através de variações nas concentrações de 6-BA e IBA presentes nos meios de cultura (CHENG *et al.* 1980; SAKA *et al.* 1980).

Visando-se desenvolver as técnicas para propagação vegetativa de feijão através da cultura de segmentos nodais, testou-se condições de cultura baseando-se nos resultados obtidos com soja (CHENG *et al.* 1980; SAKA *et al.* 1980) na tentativa de desenvolver as condições para propagação vegetativa em *Phaseolus vulgaris*. Como teste inicial, sementes dos cultivares Moruna, Piratã-1 e Puebla - 153 foram colocadas para germinar na presença de solução aquosa de 6-BA ($5 - 10 \mu\text{M}$) no escuro, ou sob fotoperíodo de 12 horas.

Após 9 dias de germinação foi notado que independentemente do cultivar e da concentração de 6-BA, as plântulas germinadas na presença de luz já apresentavam pequenas gemas axilares (1 - 2 mm) nas regiões nodais. Por outro lado, plântulas germinadas no escuro não apresentavam qualquer indício de desenvolvimento de gemas axilares. Notando-se a essencialidade da luz para o brotamento de gemas axilares em regiões nodais de plântulas de feijão, os frascos até então mantidos no escuro foram transferidos para sala com fotoperíodo de 12 horas. Após 12 - 15 dias de germinação, os resultados foram avaliados (TABELA 27). O desenvolvimento de gemas axilares, tanto no nó I (correspondente à inserção dos cotilédones) como no nó II (correspondente à inserção das folhas primárias) foi reduzido a metade quando as sementes permaneceram por um período inicial de 9 dias no escuro, utilizando-se 6-BA (5 μ M). Na concentração de 10 μ M de 6-BA, o brotamento de gemas axilares foi semelhante em ambas as condições de cultura. Estes resultados demonstram a importância de 6-BA e luz no desenvolvimento de gemas axilares em regiões nodais de feijão. No nó II (correspondente à inserção das folhas primárias) observou-se uma diferença na frequência de formação de gemas axilares conforme o genótipo, na concentração de 10 μ M de 6-BA. A frequência de gemas axilares em 'Puebla - 153' foi o dobro em relação à 'Moruna', em ambas as condições de luminosidade. Sementes germinadas no escuro (9 dias) e transferidas para luz apresentavam 1,8 e 0,9 gemas axilares/nó II, respectivamente para 'Puebla - 153'

TABELA 27: Desenvolvimento de gemas axilares em nós cotiledonares (nó I) e nós de folhas primárias (nó II) de plântulas de *Phaseolus vulgaris*.

Cultivar	Condição de cultura (a)	6-BA (μM)	Tempo (dias)	nº gemas/nó I		nº gemas/nó II	
				total	média	total	média
Moruna	1	5	15	15/24	0,6	10/24	0,4
Moruna	1	10	15	34/25	1,4	23/25	0,9
Moruna	2	5	12	31/26	1,2	23/26	0,9
Moruna	2	10	12	29/22	1,3	23/22	1,0
Piratã-1	1	5	15	10/16	0,6	7/16	0,4
Piratã-1	2	5	15	12/12	1,0	16/12	1,3
Puebla-153	1	10	15	38/26	1,5	46/26	1,8
Puebla-153	2	10	12	30/24	1,25	48/24	2,0

(a) Sementes germinadas em solução aquosa de 6-BA, por um período inicial de 9 dias no escuro, e então transferidas para fotoperíodo de 12 horas (condição de cultura 1) ou, germinadas sob fotoperíodo de 12 horas durante todo o experimento (condição de cultura 2).

e 'Moruna'. Para as sementes germinadas sob fotoperíodo de 12 horas, obteve-se 2,0 e 1,0 gemas axilares/nó II para 'Puebla - 153' e 'Moruna', respectivamente. Observou-se também que as gemas de 'Puebla - 153' se apresentavam mais desenvolvidas (5 - 7 mm de altura) do que as gemas dos outros cultivares (3 - 4 mm de altura), após o mesmo tempo de germinação.

Procurou-se determinar o número máximo de gemas axilares possíveis de serem desenvolvidas em regiões nodais de plântulas de feijão. Para tanto, sementes de 'Moruna' e 'Carioca' foram germinadas na presença de 6-BA (50 μ M) e IBA (0,025 μ M). Os segmentos nodais foram cultivados na presença de 6-BA (20 μ M) e IBA (0,025 μ M) e transferidos para meio secundário, na ausência de RCs. As gemas axilares desenvolvidas foram extraídas após 19 dias de germinação (G1); após 17 dias de cultura primária (G2) e 25 dias de cultura secundária (G3). Adotou-se este procedimento devido a uma possível inibição no desenvolvimento de novas gemas, pela presença de plântulas desenvolvidas na mesma axila. Analisando-se o total de gemas desenvolvidas por nó, não se notou diferenças genotípicas (entre 'Moruna' e 'Carioca') ou pela posição do nó (TABELA 28). Um número máximo de seis gemas por axila foi observado em nós cotiledonares de 'Moruna', sugerindo que esta região nodal de plântulas de *Phaseolus vulgaris* teria pelo menos 12 gemas dormentes, seis em cada axila.

Considerando-se os resultados obtidos com as culturas de segmentos nodais e com as culturas de seg

TABELA 28: Desenvolvimento de gemas axilares em regiões nodais de plântulas de *Phaseolus vulgaris*.

Cultivar	Nó	Gemas primárias (a)	Total de nós	Nº nós c/ resposta		Gemas primárias/nó		Altura média das gemas (mm)
				total	%	Nº	total	
Moruna	I	G1	20	20	100	1,7		3,2
Moruna	I	G2	20	2	10	1,0		6,5
Moruna	I	G3	16	11	69	2,3	5,0	7,6
Moruna	II	G1	20	20	100	1,4		2,5
Moruna	II	G2	20	10	50	1,4		9,5
Moruna	II	G3	15	14	93	1,7	4,5	9,9
Carioca	I	G1	16	12	75	1,5		2,8
Carioca	I	G2	15	9	60	1,3		13,4
Carioca	I	G3	11	8	73	1,5	4,3	14,7
Carioca	II	G1	16	15	94	1,9		3,6
Carioca	II	G2	15	10	67	1,6		10,6
Carioca	II	G3	11	6	54	1,3	4,8	8,9

(a) Extração de gemas G1 após 19 dias de germinação (B5, 6-BA 50 μ M, IBA 0,025 μ M); G2 após 17 dias de cultura dos segmentos nodais (B5, 6-BA 20 μ M, IBA 0,025 μ M) e G3 após 25 dias de subcultura - (B5, sem RCs).

mentos de hipocótilos de feijão, supõe-se que *Phaseolus vulgaris* não apresenta centros meristemáticos distribuídos ao longo do hipocótilo ou epicótilo. Portanto em feijão as gemas dormentes somente ocorreriam nas regiões nodais. KAMEYA & WIDHOLM(1981) demonstraram a regeneração de gemas em culturas de segmentos de hipocótilos de *Glycine canescens*, discutindo a possibilidade das gemas obtidas serem resultantes do desenvolvimento de centros meristemáticos pré-existentes ao longo do hipocótilo. Esta hipótese se fundamenta na observação de maior frequência de formação de gemas, nos segmentos de hipocótilos obtidos próximos da região do nó cotiledonar. Neste mesmo trabalho, plantas de *Glycine max* não puderam ser regeneradas a partir de segmentos de hipocótilos, quando as regiões nodais foram eliminadas. Isto sugere que similarmente ao feijão, em soja gemas dormentes estariam presentes somente nas regiões nodais.

O efeito marcante do emprego de 6-BA para o desenvolvimento de gemas axilares de feijão, observado nos experimentos anteriores, foi melhor estudado através da utilização de diferentes concentrações de 6-BA, tanto na germinação das sementes como na cultura primária de nós. Sementes de 'Puebla - 153' germinadas em meio B5 com 6-BA (20 μ M) e IBA (0,025 μ M) tiveram seus segmentos nodais destacados e cultivados na presença de 6-BA (20 e 5 μ M). Os segmentos nodais cultivados na presença de 20 μ M de 6-BA apresentaram intenso brotamento de pequenas gemas (1 - 2 mm) em número de 30 - 50/nó, impossibilitando o cálculo da frequên

cia de formação de gemas axilares por segmento nodal. O intenso brotamento representa o acúmulo de gemas primárias, secundárias, terciárias, etc, que se desenvolvem nos respectivos nós. A alta concentração de 6-BA no meio de cultura inibe o crescimento das gemas, ao mesmo tempo que favorece o superbrotamento na região nodal originalmente cultivada. Por outro lado, segmentos nodais cultivados na presença de 5 μM de 6-BA apresentaram ótimo brotamento de gemas (FIGURA 27). Entre 28 segmentos nodais cotiledonares (nó I), 27 (96%) apresentaram gemas axilares, obtendo-se uma média de 4,2 gemas/nó com altura média de 9,1 mm após 33 dias de cultura. Entre os 25 segmentos nodais cultivados correspondentes à inserção das folhas primárias (nó II), 100% apresentaram gemas axilares, obtendo-se 4,8 gemas/nó com uma altura de 8,2 mm, após 33 dias de cultura. Estes resultados sugerem que a melhor sequência para o desenvolvimento de gemas axilares dormentes, em segmentos nodais de feijão seria: (1) indução do desenvolvimento destas gemas pela germinação na presença de alto nível de 6-BA (20 μM); e (2) posterior crescimento das gemas induzidas, na presença de menor concentração de 6-BA (5 μM) durante a cultura dos segmentos nodais (nó I e nó II). Observações similares foram feitas em culturas de soja (CHENG *et al.* 1980). O crescimento de gemas axilares foi estimulado pela transferência dos segmentos nodais de soja, cultivados sob altas concentrações de 6-BA (10 - 50 μM), para menor concentração de 6-BA (1 μM).

Comparando-se os resultados deste ter



FIGURA 27. Gemas axilares desenvolvidas em nós cotiledonares de plântulas de *Phaseolus vulgaris* cv. Puebla-153, após 18 dias de cultura dos segmentos nodais.

ceiro experimento com os resultados do experimento 2, nota-se que no segundo experimento pôde-se desenvolver gemas axilares nas culturas nodais, na presença de 20 μ M de 6-BA. Esta diferença de resposta permite sugerir três hipóteses. Para o desenvolvimento de gemas axilares em segmentos nodais de feijão, o essencial seria utilizar uma concentração de 6-BA, inferior à concentração necessária para a indução do desenvolvimento das gemas dormentes nas plântulas intactas. Desta forma, as gemas axilares induzidas na presença de 50 μ M de 6-BA (experimento 2) desenvolveram-se, quando a concentração de 6-BA foi reduzida para 20 μ M. Entretanto no experimento 3, quando uma mesma concentração de 6-BA (20 μ M) foi mantida, tanto para a indução do desenvolvimento das gemas dormentes, presentes nas regiões nodais das plântulas, como para a cultura primária dos segmentos nodais, ocorreu um superbrotamento. Porém, quando a concentração de 6-BA foi reduzida para 5 μ M, as gemas apresentaram crescimento satisfatório. Uma segunda hipótese seria que a extração das gemas a cada subcultura facilitaria o desenvolvimento de novas gemas primárias. A hipótese mais provável entretanto, se refere a diferenças genotípicas para o desenvolvimento de gemas axilares em segmentos nodais de feijão. O cultivar 'Puebla - 153' apresentou melhor desenvolvimento de gemas axilares em culturas nodais, em relação aos outros cultivares estudados. Esta maior tendência ao brotamento já havia sido notada no experimento 1, quando após a germinação das sementes em solução de 6-BA, observou-se que nas regiões nodais de plântulas de 'Pue

bla - 153' as gemas axilares eram mais frequentes, maiores e sobretudo mais vigorosas. Mais uma vez constata-se a especificidade das condições de cultura *in vitro*, a nível de cultivares.

Sabendo-se que o nível de 5 μ M de 6-BA é ótimo para o desenvolvimento de gemas axilares induzidas em segmentos nodais de plântulas de feijão, procurou-se verificar o efeito de diferentes níveis de 6-BA na indução do brotamento destas gemas axilares. Para tanto utilizou-se diferentes concentrações de 6-BA (5 - 50 μ M) na germinação de sementes de 'Moruna', cultivando-se posteriormente os segmentos nodais na presença de 5 μ M de 6-BA, acrescido ou não de IBA (0,025 μ M). Tanto a altura média das gemas, como o número de gemas induzidas por nó, foi sempre ligeiramente maior no nó I (cotiledonar) do que no nó II (das folhas primárias). Variações na concentração de 6-BA (5 - 50 μ M) durante a germinação, ou presença de IBA (0,025 μ M) durante a cultura dos segmentos nodais, não produziram diferenças na altura das gemas ou na frequência de gemas desenvolvidas (TABELA 29).

A análise dos resultados das culturas nodais de feijão, permite sugerir que o melhor tratamento, para a obtenção de gemas axilares, consiste em germinar as sementes na presença de 6-BA (5 - 50 μ M), para a indução do desenvolvimento das gemas axilares. Posteriormente os segmentos nodais devem ser destacados das plântulas e cultivados em meio de cultura contendo 6-BA (5 μ M), para permitir o desenvolvimento posterior das gemas induzidas. Tanto a germina

TABELA 29: Altura e frequência de gemas axilares em segmentos nodais de plântulas de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna. Dados de 15-20 repetições.

Germinação 6-BA (µM)	Condição de cultura 1 (a)				Condição de cultura 2 (a)			
	Altura (mm)		Nº gemas/nº		Altura (mm)		Nº gemas/nº	
	nº I	nº II	nº I	nº II	nº I	nº II	nº I	nº II
5	8,4	7,2	5,5	3,5	9,2	6,4	5,4	5,4
10	9,6	6,7	5,3	4,8	8,7	7,2	5,7	3,8
20	8,7	6,6	5,9	4,6	7,8	8,4	6,4	4,7
50	9,6	8,2	4,4	3,6	8,4	7,0	5,8	4,5
Média	9,0	7,2	5,3	4,0	8,5	7,2	5,8	4,6

(a) Sementes germinadas em solução aquosa de 6-BA por 15 dias; segmentos nodais cultivados por 20 dias, em meio B5 com 5 µM de 6-BA e 0,025 µM de IBA (condição de cultura 1), ou em meio B5 com 5 µM de 6-BA (condição de cultura 2).

ção como a cultura dos segmentos nodais devem ser feitas na presença de luz.

O enraizamento das gemas axilares desenvolvidas a partir dos segmentos nodais de feijão foi induzido em meio B5, contendo IBA (10 μ M). Após 10 dias de cultura neste meio, a transferência para meio básico, desprovido de RC, resultou no rápido desenvolvimento do sistema radicular, após 20 dias de cultura.

V. CONCLUSÕES

Sementes de feijão esterilizadas com etanol 96% por 10 min. seguido de NaOCl 3,9% por 20 min. apresentaram ótima germinação. Folhas trifolioladas tratadas com NaOCl 1% por 3 min. produziram explantes viáveis e com baixo nível de contaminação.

A cultura *in vitro* de tecidos de *P. vulgaris* cv. Moruna foi estabelecida na presença dos sais inorgânicos de MS e dos RCs, KIN e 2,4-D. Especificidade de resposta à indução de calos e raízes variou conforme a origem do explante. Explantes foliares foram os mais favoráveis à indução de calos, considerando os índices de crescimento e a ausência de diferenciação de raízes. O 2,4-D foi o principal componente na indução de raízes nesta interação.

Entre várias interações de auxina x citocinina, a interação KIN/2,4-D foi a mais indicada para a obtenção de calos em grandes quantidades. Nesta interação não ocorre diferenciação de raízes e obtém-se calos de cor creme e friáveis, quando se utiliza segmentos foliares como explantes.

Caracterização genotípica quanto ao crescimento de calos ocorreu na presença de 6-BA/2,4-D em interação dialélica. Existiram diferenças na intensidade de resposta entre os cultivares (Carioca, Piratã-1, Roxinho e Puebla-153). Diferenças específicas de crescimento de calos fo

ram melhor visualizadas na concentração de 5 μ M de 6-BA em função de concentrações crescentes de 2,4-D (1 - 50 μ M).

Diferenças genotípicas na indução de calos foram melhor observadas com o uso de folhas trifolioladas como fonte de explantes, cultivadas na interação de KIN/2,4-D. Nestas condições pôde-se constatar que 'Piratã-1' exige níveis mais elevados de 2,4-D (4-10 vezes) do que 'Moruna' para a indução de calos.

Baseando-se na variabilidade dos germoplasmas utilizados neste trabalho, pode-se concluir que culturas de *Phaseolus vulgaris* visando caracterização genotípica, com base no crescimento de calos, podem ser estabelecidas a partir de segmentos de folha primária na interação de 6-BA/2,4-D. Porém, segmentos de folha trifoliolada, cultivados na interação de KIN/2,4-D, fornecem respostas de crescimento mais específicas, conforme os tratamentos de RCs.

Calos de tecidos de feijão, produzidos a partir de diferentes cultivares, fontes de explantes (hipocótilo, cotilédone, embrião e folha), em diferentes interações e fontes de RCs, não foram capazes de regenerar plantas em culturas secundárias. As células contidas nos explantes testados devem ser interpretadas como do tipo induzível à determinação (IODC ou IEDC) e não células pré-determinadas (PEDC). As condições de cultura necessárias para induzir as células (organogênicas ou embriogênicas) à determinação não foram encontradas.

O meio líquido testado para estabelecer suspensões celulares de 'Moruna' (meio PC-L2, com 10 μ M de 2,4-D e 2 g/l de CH) foi adotado para estudar as respostas de crescimento de 36 cultivares de feijão, utilizando-se calos derivados de ápices meristemáticos. Ótimas suspensões celulares foram obtidas para três cultivares aos 21 dias de cultura e para outros sete cultivares aos 33 dias. Um grupo de 15 cultivares apresentou suspensões celulares de pouca densidade, enquanto que no último grupo de 8 não houve cres_cimento de células no meio líquido adotado. Existiu uma interação entre genótipo, inóculo inicial e meio de cultura como fatores responsáveis pelas respostas de crescimento em meio líquido em *P. vulgaris*. Para cada cultivar devem ser estabelecidas as condições de cultivo que serão específicas para cada etapa da cultura. Entre os 33 cultivares de feijão que puderam ser estudados em meio líquido, três (Moruna, Piratã-1 e Linea-29) formaram estruturas globulares, indicando a especificidade das respostas *in vitro*.

Ápice meristemático de feijão, cv. Moruna foi uma fonte ideal de explante para a cultura *in vitro* desta espécie. Ótimo crescimento de calos e desenvolvimento de plântulas puderam ser obtidos a partir deste explante, conforme as combinações de RCs utilizados. Um total de 36 cultivares de *P. vulgaris* foram cultivados em meio sólido, utilizando-se ápice meristemático como fonte de explante, na tentativa de encontrar um genótipo mais favorável à regeneração de plantas *in vitro*. Pela cultura de ápices meristemáticos

de feijão na presença de IAA ($10\ \mu\text{M}$), 2,4-D ($5\ \mu\text{M}$) e KIN ($10\ \mu\text{M}$) obteve-se ótimos índices de crescimento de calos em 14 cultivares entre os 36 testados. A cultura de ápice meristemático dos 36 cultivares, em meio B5, na presença de 6-BA ($0,5\ \mu\text{M}$) levou a formação de calos, morfogênese de raiz e/ou gema apical, conforme o genótipo. A cultura secundária destes tecidos, em meio livre de RC, permitiu a formação de gemas adventícias múltiplas em 12 dos 36 cultivares em estudo. Estas gemas teriam se desenvolvido a partir de centros meristemáticos pré-existentes no explante. A frequência de formação de gemas adventícias variou entre os 12 cultivares (2,0 a 12,6 gemas/explante) indicando diferenças na capacidade morfogenética entre estes genótipos, nas condições de cultura adotadas. Maior frequência de formação de gemas adventícias ocorreu quando as culturas foram mantidas em casa de vegetação, do que em sala de cultura. Apenas oito gemas de 'Palmital Precoce' puderam ser desenvolvidas até plântulas, na presença de NAA ($1\ \mu\text{M}$) e GA_3 ($2\ \mu\text{M}$). Isto sugere que cada genótipo de feijão requer condições de cultura específicas nas diferentes fases de diferenciação e crescimento.

Protocolos utilizados com sucesso para obter regeneração em outras leguminosas foram testados em tecidos de *Phaseolus vulgaris* cvs. Moruna e Palmital Precoce. Em nenhum caso, entretanto, obteve-se regeneração de plantas de feijão. A dificuldade em obter regeneração em *Phaseolus vulgaris* sugere que condições muito especiais de cultura devem

ser requeridas para a indução da diferenciação de gemas nesta espécie.

Através da produção de gemas axilares, pode ser desenvolvida a metodologia para manutenção de bancos de germoplasmas de feijão. O melhor tratamento para a produção de gemas axilares em regiões nodais de plântulas de feijão consistiu em: (1) germinação das sementes na presença de 6-BA (5 - 50 μ M); (2) cultura subsequente dos segmentos nodais em meio B5 contendo 6-BA (5 μ M); (3) enraizamento das gemas na presença de IBA (10 μ M) e (4) desenvolvimento das plântulas obtidas *in vitro* em meio livre de RC. A frequência de desenvolvimento de gemas axilares dependeu da luz, do genótipo, da concentração de 6-BA e da posição do nó na plântula.

VI. RESUMO

Tecidos de 36 cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. foram cultivados *in vitro*, visando desenvolvimento metodológico para o controle da diferenciação, a fim de permitir a aplicação das técnicas de cultura de células e tecidos no melhoramento desta espécie.

A cultura *in vitro* de tecidos de *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna foi estabelecida na presença dos sais inorgânicos de MS suplementados com KIN e 2,4-D (1 - 50 μ M). A especificidade de resposta à indução de calos e raízes variou conforme a origem do explante (hipocótlito, cotilédone, embrião, folha primária ou trifoliolada). Nesta interação, a diferenciação de raízes foi inibida em concentrações superiores a 5 μ M de 2,4-D. Explantes foliares foram os mais favoráveis à indução de calos.

Folhas primárias de 'Moruna' serviram como fonte de explante para testar diferentes interações de citocinina (KIN, 6-BA e 2ip = 0 - 75 μ M) e auxina (2,4-D = 0 - 50 μ M; NAA = 0 - 75 μ M; IAA = 0 - 100 μ M)). A interação KIN/2,4-D foi a mais efetiva para a proliferação de calos. Nesta interação não ocorreu diferenciação de raízes e obteve-se calos de cor creme e friáveis.

O crescimento comparativo de calos de quatro cultivares de *P. vulgaris* permitiu uma caracterização genotípica. Calos de folhas trifolioladas, na interação de

KIN/2,4-D, apresentaram melhor especificidade de crescimento em comparação com a utilização de folhas primárias na interação 6-BA/2,4-D.

Calos de feijão produzidos a partir de diferentes fontes de explantes e cultivares, em diferentes interações e fontes de RCs, não foram capazes de regenerar plantas em culturas secundárias.

Os sais PC-L2 foram eficientes no estabelecimento da cultura líquida de tecidos de feijão cv. Moruna, na presença de 2,4-D (10 μ M). O plaqueamento das células em suspensão em meio contendo 2,4-D (5 μ M) permitiu a recuperação dos calos. A adição de CH (2 g/l) ao meio líquido estimulou a proliferação celular, sendo que na sua ausência ocorreu a formação de estruturas globulares, semelhantes ao estágio globular típico de desenvolvimento embrionário. Não foram encontradas as condições de cultura necessárias para o desenvolvimento destas estruturas globulares, quando transferidas para meios sólidos. Calos derivados da cultura de ápices meristemáticos de 36 cultivares foram também utilizados para estabelecimento de culturas líquidas. Existiu uma interação entre genótipo, inóculo inicial e meio de cultura como fatores responsáveis pelas respostas de crescimento dos diferentes cultivares testados. Os cultivares Moruna, Piratã-1 e Linea-29 formaram estruturas globulares em cultura líquida, as quais não desenvolveram-se além deste estágio.

Um total de 36 cultivares de *P. vulgaris*

foram estudados, utilizando-se ápice meristemático como fonte de explante, na tentativa de encontrar um genótipo de feijão mais favorável à regeneração de plantas *in vitro*. Em testes preliminares esta fonte de explante se mostrou ideal para a cultura *in vitro* desta espécie. O cultivo de ápices meristemáticos em meio sólido de MS contendo IAA (10 μM), 2,4-D (5 μM) e KIN (10 μM), permitiu discriminar ótimo crescimento de calos para 14 cultivares, crescimento médio para 8 cultivares e crescimento insatisfatório para os 14 cultivares restantes. Ápices meristemáticos destes 36 cultivares, cultivados em meio B5 na presença de 6-BA (0,5 μM) formaram calos e apresentaram morfogênese de raiz e/ou gema apical, conforme o genótipo. A cultura secundária destes tecidos, em meio livre de RC, estimulou a formação de gemas adventícias múltiplas em 12 dos 36 cultivares em estudo. A frequência de formação de gemas adventícias variou conforme o genótipo e as condições de cultura (casa de vegetação e sala de cultura). Apenas oito gemas de 'Palmital Precoce' se desenvolveram até plântulas.

Protocolos utilizados com sucesso para obter regeneração em outras leguminosas foram testados com tecidos de *Phaseolus vulgaris* cvs. Moruna e Palmital Precoce. Em nenhum caso entretanto obteve-se regeneração de plantas de feijão.

Culturas de nós de plântulas de feijão foram estabelecidas após germinação das sementes em meio B5, na presença de 6-BA (5 - 50 μM). A luz mostrou ser elemento

essencial para o desenvolvimento de gemas axilares em regiões nodais de feijão. A frequência de desenvolvimento de gemas axilares variou conforme o genótipo e a posição do nó na plântula. Na presença de 20 μM de 6-B durante germinação e subsequente cultura dos segmentos nodais, o cultivar Puebla-153 apresentou superbrotamento (30 - 50 gemas/nó). Reduzindo-se a concentração de 6-BA para 5 μM durante cultura dos segmentos nodais de 'Puebla-153', houve um desenvolvimento médio de 4,5 gemas/nó. Para 'Moruna', a germinação das sementes na presença de 6-BA (50 μM) e IBA (0,025 μM) e subsequente cultura dos segmentos nodais em 6-BA (20 μM) e IBA (0,025 μM), resultou no desenvolvimento médio de 2,8 gemas/nó.

VII. ABSTRACT

Tissues of 36 cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. were established *in vitro* aiming toward the development of a protocol for plant differentiation from bean tissues in order to apply the *in vitro* techniques for the improvement of this species.

Callus cultures of *Phaseolus vulgaris* cv. Moruna were established in the presence of MS medium supplemented with KIN and 2,4-D (1 - 50 μ M). Callus proliferation differed according with the source of explant (hypocotil, cotyledone, embryo, primary leaf or trifoliolate leaf). Root differentiation was inhibited at levels of 2,4-D 5 μ M or higher, in the presence of KIN. Leaf cultures were more favorable to callus induction than other sources of explants.

Primary leaves of "Moruna" were inoculated to test different interaction of cytokinin (KIN, 6-BA and 2ip = 0 - 75 μ M) versus auxin (2,4-D = 0 - 50 μ M; NAA = 0 - 75 μ M; IAA = 0 - 100 μ M). The interaction of KIN/2,4-D was the most effective for callus proliferation. In the presence of these growth regulators creamish friable callus developed with the absence of roots.

A genotypic characterization among four cultivars of *P. vulgaris* were obtained based on callus induction from trifoliolate leaves in the presence of KIN/2,4-D. These conditions were superior to discriminate in contrast

to callus induction from primary leaves in the presence of 6-BA/2,4-D.

All bean cultures established from different explants sources, excised from four different cultivars using several growth regulators interactions, were unable to regenerate plantlets during secondary cultures.

Inorganic PC-L2 salts were efficient to sustain liquid cultures of 'Moruna' cells in addition of 2,4-D (10 μ M). Fast callus growth were recuperated after subculturing these cells onto solid medium supplemented by 5 μ M of 2,4-D. The addition of CH (2 g/l) to the liquid medium improve cell growth. However when CH was taken from the above medium, meristematic globular structures differentiated. The globular structures did not develop further upon transferring to solid media. Callus tissues derived from shoot apexes of 36 bean cultivars were also inoculated into liquid media. These liquid cultures presented growth differences concerning to genotype, amount of initial inoculum, and culture media. Only the cultivars Moruna, Piratã-1 and Linea-29 were able to produce globular structures during liquid cultures.

Shoot apex of 36 bean cultivars were cultivated in order to explore possible genotypic differences pertaining to *in vitro* plant regeneration. This explant source was found very promising during preliminary tests. Callus tissues induced by MS medium in the presence of IAA

(10 μM), 2,4-D (5 μM) and KIN (10 μM) demonstrated optimum proliferation for 14 cultivars, medium growth for 8 cultivars, and poor or no growth for the remaining 14 cultivars. Another set of shoot apex cultures of these 36 cultivars were established with B5 medium in the presence of 6-BA (0,5 μM). Callus, roots and/or apical bud differentiation were found according to the genotype. During secondary culture of these tissues (no growth regulator added) adventitious buds developed according with the culture conditions (growth room or shaded green house) and genotypes. From all adventitious buds developed, eight buds of "Palmital Precoce" were successfully grown to full plants.

Several protocols described for regeneration of leguminous tissues were tested with *Phaseolus vulgaris* cvs. Moruma and Palmital Precoce. Plant regeneration was not detected in any of these cultures.

Nodal cultures of bean seedlings were established following germination in B5 medium in the presence of 6-BA (5 - 50 μM). The presence of light was essential to the development of axillary buds from nodal cultures of bean. The frequency of axillary bud development was different according to the node position (cotyledonary of primary leaf) and genotype. During germination and subsequent nodal culture in the presence of 20 μM 6-BA, 'Puebla-153' presented a very high number of axillary buds (30 - 50). If 6-BA was reduced to 5 μM during nodal culture 4.5 axillary buds/node were

registred. With the case of 'Moruna', seed germination in the presence of 6-BA (50 μM) and IBA (0.025 μM) following no dal culture on 6-BA (20 μM) and IBA (0.025 μM) presented an average of 2.8 axillary buds/node.

VIII. APÊNDICE

1. Morfogênese in vitro

A obtenção de plantas *in vitro* pode ocorrer através da cultura de explantes meristemáticos ou não-meristemáticos. Plântulas podem ser recuperadas pelo desenvolvimento de meristemas. Células não meristemáticas podem rediferenciar *in vitro* tornando-se comprometidas a um desenvolvimento típico de formação de plântuletes, via organogênese ou embriogênese somática, quando submetidas às condições apropriadas de cultura.

1.1. Desenvolvimento de meristemas

Certas espécies ou variantes genéticas podem apresentar dificuldade para propagação vegetativa, através dos métodos convencionais de horticultura. A propagação clonal através da cultura de ápices meristemáticos, gemas axilares ou meristemas isolados, visando produzir plantas geneticamente uniformes, tem grande aplicação comercial (MURASHIGE 1974) e em programas de pesquisa. A uniformidade é o resultado do desenvolvimento *in vitro* de meristemas pré-existent. Os diferentes explantes podem ser cultivados em meio de cultura de composição simples para a produção de gemas múltiplas, as quais são subsequentemente separadas e subcultivadas em meio de enraizamento. As plantas enraizadas são transplantadas para vasos e em seguida transferidas para estufa e campo.

A frequência de obtenção de plantas de explantes meristemáticos pode ser manipulada pela alteração das fontes e concentrações de reguladores de crescimento utilizados no meio de cultura. Um estágio intermediário de calos pode multiplicar centros meristemáticos, aumentando a frequência de obtenção de plantas *in vitro*. Alguns esquemas de propagação em larga escala são baseados no uso de gemas de plântulas obtidas *in vitro*, diminuindo o tempo de multiplicação e evitando perdas por contaminação e oxidação.

1.2. Organogênese

A organogênese de gemas ou raízes se origina de um pequeno grupo de células derivadas de tecidos diferenciados tais como floema, câmbio, parênquima, epiderme, mesófilo, etc. A redeterminação destas células levando à formação de gemas ou raízes é geralmente dependente da razão citocinina/auxina do meio de cultura (SKOOG & MILLER 1957, TRAN THANH VAN *et al.* 1974, EVANS *et al.* 1981). Altas razões de concentrações favorecem a formação de gemas enquanto que baixas razões de concentrações favorecem a formação de raízes.

A organogênese pode ser direta, na qual gemas se originam sem a proliferação intermediária de calos (por exemplo: finas camadas celulares de fumo, células epidérmicas de feijão alado). Organogênese indireta se refere à proliferação de calos e posterior diferenciação de gemas (tomate, batata, fumo, etc). As células que sofrem organogênese (direta ou indireta) são chamadas células organogênicas

induzidas à determinação (IODC), segundo SHARP & EVANS (1981).

1.3. Embriogênese somática

De forma semelhante, embriogênese *in vi*
tro pode ocorrer através de dois processos distintos: (1) em
briogênese direta, onde embriões somáticos se originam de cé
lulas, sem a formação intermediária de calos (por exemplo: cé
lulas nucelares de variedades poliembriônicas de Citrus, cé
lulas epidérmicas de hipocótilo de *Ranunculus sceleratus* L.);
(2) embriogênese indireta, onde a proliferação de calos ocor
re antes da diferenciação do embrião (por exemplo: floema se
cundário de cenoura, tecidos foliares de café). Estes dois
diferentes padrões de diferenciação dependem da determinação
de eventos na citodiferenciação durante o ciclo celular. Sa
be-se que as células tem sua regulação determinada pelo menos
um ciclo mitótico antes da diferenciação (YEOMAN 1970). Em
outras palavras, células que sofrem embriogênese diretamente
são descendentes de uma prévia divisão celular determinativa.
Tais células determinadas podem sofrer inibição pós-mitótica
(estado Go) até que condições de cultura sejam favoráveis pa
ra o início da sequência do ciclo mitótico, característico da
embriogênese. Os dois tipos gerais de diferenciação embriogê
nica (direta ou indireta) podem ser também caracterizados pe
los seus relativos tempos de determinação e diferenciação do
tecido embriogênico. Embriogênese direta ocorre a partir de
células embriogênicas pré-determinadas (PEDC), enquanto que
embriogênese indireta, requer a redeterminação de células di
ferenciadas, proliferação de calos e diferenciação de cél
u

las embriogênicas induzidas a determinação (IEDC) (SHARP *et al.* 1980).

Aparentemente, PEDCs requerem a síntese de uma substância indutora ou remoção de uma substância inbidora para a retomada da atividade mitótica levando ao desenvolvimento embriogênico. As células que sofrem diferenciação do tipo IEDC requerem a presença de substâncias que permitem o reinício do ciclo mitótico. A citodiferenciação e a emergência de uma organização multicelular são processos com várias fases, onde cada fase leva ao estabelecimento de um padrão particular de ativação gênica, resultando na transição para o próximo estágio de diferenciação (STREET 1978). Inibição pode ocorrer em qualquer fase deste processo.

2. Cultura de Tecidos de Leguminosas

2.1. Acacia koa

Acacia koa Gray é uma árvore de grande porte, endêmica das florestas do Hawai, importante pela qualidade de sua madeira. Espécies florestais produtoras de madeira de boa qualidade estão se tornando raras. Clones de matrizes selecionadas para produção de madeiras de lei são necessários para novos projetos de reflorestamento. No entanto, a propagação vegetativa de matrizes selecionadas nem sempre é possível pelos métodos convencionais. SKOLMEN & MAPES (1976) descreveram um método para a propagação vegetativa de *A. koa* através da cultura de ápices meristemáticos. A presen

ça de calos foi observada na base dos ápices meristemáticos cultivados em meio de MS suplementado com AC (1%) e 2,4-D (11,3 μ M). Estes tecidos foram transferidos para meio de MS suplementado com 6-BA (22 μ M) onde ocorreram gemas com primórdios foliares. Água de côco (10%) e 6-BA (4,4 μ M) foram benéficos para o crescimento posterior das plântulas. A indução de raízes foi obtida no mesmo meio básico, na presença de IBA (1 μ M). Suspensão celular pôde ser estabelecida em meio de MS acrescido de AC (10%) e 2,4-D (11,3 μ M) porém, não foi possível recuperar plantas a partir de cultura líquida.

2.2. Arachis spp.

O primeiro trabalho de cultura de tecidos *in vitro* de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) visando regeneração de plantas foi descrito por YUNG RU & YU - HUNG (1978). A partir da cultura de embriões ou raízes foram obtidos calos e células em suspensão que quando transferidas para meio sólido originaram raízes. Em outro experimento foi possível induzir o desenvolvimento de plântulas a partir da cultura de embriões. Três plântulas foram obtidas uma das quais não possuía raiz e sobreviveu por enxertia.

DAVIS & SHIMABUKURO (1980) utilizaram células de mesófilo de amendoim isoladas enzimaticamente e susensões celulares de calos de amendoim no estudo da toxicidade e modo de ação de herbicidas. Culturas de células de amendoim também tem sido utilizadas para estudos bioquímicos (STEPHAN & VAN HUYSTEE 1981).

Recentemente BAJAJ *et al.* (1981) demonstraram a indução de androgênese em culturas de anteras da espécie tetraplóide de amendoim (*A. hypogaea*) e de uma espécie diplóide selvagem (*A. villosa* Benth.). Anteras com pólenes no primeiro estágio de divisão mitótica, cultivadas em meio de MS, acrescido de IAA (23 μM) e KIN (9,2 μM) ou 6-BA (8,8 μM), apresentaram calos em 3 semanas em cerca de 13% (*A. hypogaea*) e 11% (*A. villosa*) das culturas. Calos subcultivados na presença de NAA (5,4 μM) e 6-BA (8,8 μM) originaram gemas múltiplas em 3 semanas. O enraizamento foi feito na presença de NAA (2,7 - 5,4 μM). As respostas de crescimento foram genótípicas: anteras de *A. villosa* apresentaram pouca proliferação de calos mas regeneraram gemas e plântules com maior frequência (40 - 70% dos calos) enquanto que, em *A. hypogaea* houve profusa proliferação de calos que na maioria das vezes originaram raízes, sendo que gemas se formaram apenas ocasionalmente. Os calos e as plantas regeneradas eram mixaplóides variando de haplóides a octaplóides. Foi concluído que a regeneração de plantas a partir da cultura de anteras de amendoim permitiria a aplicação desta técnica para o cruzamento de haplóides e também para a indução *in vitro* de variabilidade genética nesta importante cultura.

2.3. Cajanus cajan

SHAMA RAO & NARAYANASWAMY (1975) utilizaram 5 kRad de irradiação gamma em calos de hipocótilos de *Cajanus cajan* (L.) Millsp. cv. T 21. A inoculação destes calos irradiados em meio contendo sais de White, KIN (4,7 μM),

IAA (0,06 μ M) e CH (400mg/l) permitiu a obtenção de plantas.

Cultura de anteras de "pigeon pea" (*Cajanus cajan*) visando a obtenção de plantas haplóides foi feita por BAJAJ *et al.* (1980). Anteras contendo pólen uninucleados, extraídas de botões florais de plantas de *Cajanus cajan* cv. T 21, foram cultivadas em meio de MS suplementado com IAA (22,8 μ M) e KIN (9,2 μ M), sob luz difusa. Cerca de 36% das anteras formaram calos em 3 semanas de cultura. Uma suspensão de pólen derivada da cultura de anteras foi incubada em gotas (0,1 ml) sobre meio de agar. Os pólenes sofreram repetidas divisões nucleares e celulares formando embriões, entretanto a frequência de androgênese foi baixa (1,8% de pólen multinucleados ou multicelulares). Calos derivados da cultura de anteras se apresentaram mixaplóides com grande variabilidade cromossômica. Não foi descrito desenvolvimento além do estágio de embrião.

2.4. Cicer arietinum

A diferenciação de gemas adventícias múltiplas, a partir de cotilédones de *Cicer arietinum* L. var. BG-8 foi relatada por MUKHOPADHYAY & BHOJWANI (1978), utilizando meio B5 acrescido de IAA (2,9 μ M) e 6-BA (4,4 μ M). A diferenciação destas gemas foi precedida pela formação de um pequeno calo no explante. Calos com crescimento vigoroso foram também estabelecidos a partir de segmentos foliares e ápices meristemáticos de *C. arietinum*. Estes calos foram man

tidos em meio B5 com IAA (2,9 μ M) e 6-BA (4,4 μ M) durante um ano, através de subculturas mensais em diferentes combinações de RCs. Embora raízes tenham sido obtidas ocasionalmente, a diferenciação de gemas nunca foi observada.

Plantas de diferentes cultivares de *C. arietinum* foram recuperadas (BAJAJ & DHANJU 1979) pela cultura de meristemas (0,2 - 2 mm). Entre os vários meios testados, a melhor resposta de crescimento e desenvolvimento de plantas foi obtida em meio de MS suplementado com IAA (11,4 μ M) e KIN (2,3 μ M). A porcentagem de recuperação de plantas foi diretamente proporcional ao tamanho do meristema. Diferenças genotípicas foram observadas nas respostas de crescimento. O cultivar G 130 apresentou o melhor desenvolvimento de plântulas seguido por 'G 543' e 'L 550'.

2.5. *Crotalaria* spp.

O gênero *Crotalaria* contém cerca de 24 alcalóides do tipo pirrolizidino, utilizados como agentes antitumor, hipotensivo e mutagênico (RAO *et al.* 1975, SATYAVATI *et al.* 1976). Trabalhos com cultura de tecidos de *Crotalaria juncea* L. tem sido realizados visando extração de produtos secundários como "quercetin" (JAIN & KHANNA 1974).

RAMAWAT *et al.* (1977) descreveram a indução de calos e gemas em *C. juncea*. A indução de calos a partir de segmentos de raiz, caule e folha foi feita em meio de MS com KIN (2,3 μ M), NAA (27 μ M), ácido aspártico (7,5 μ M), ácido glutâmico (6,8 μ M) e serina (9,5 μ M). Os calos se apre

sentaram friáveis e escuros quando mantidos no escuro, enquanto que calos de folhas e raízes se mostraram compactos, enrijecidos e verdes quando cultivados na luz e em altas concentrações de KIN. A habilidade em regenerar plantas pareceu ser dependente da fonte de explante e das condições culturais. O desenvolvimento de gemas foi inibido na presença de auxina embora embriões tenham sido produzidos. Calos obtidos de caule e folha desenvolveram gemas quando cultivados em altas concentrações de KIN. Os calos derivados de raiz não produziram gemas. O número de gemas regeneradas em calos derivados de folha (15-20), na presença de KIN (230 μM) foi maior do que aqueles produzidos em calos derivados de caule, na mesma concentração de KIN. Estes calos produziram menor número de gemas (5-7) na presença de KIN (46 μM). O enraizamento destas gemas foi realizado em meio contendo NAA (0,5 μM). A morfogênese de raízes ocorreu em calos produzidos a partir dos deferentes explantes, sendo bastante frequente nos vários tratamentos e apenas inibida em altas concentrações de citocinina.

Calos foram induzidos em segmentos de caule e folha de *Crotalaria burhia* Buch.-Ham. cultivados em meio de MS, suplementado com 2,4-D (1,1 μM), NAA (1,3 μM) e KIN (1,1 μM) (RAJ BHANSALI *et al.* 1978b). A formação de gemas ocorreu em calos e diretamente em segmentos de caule, em meio de MS contendo 2-5 μM de 6-BA e KIN (isolados ou em combinação). O 6-BA mostrou um efeito estimulatório na indução de gemas. A maior frequência de gemas ocorreu em meio contendo 6-BA (2,2 μM), EM (1 g/l) e NAA (1,3 μM). Maiores

concentrações de NAA (27 μ M) induziram raízes nos segmentos de caule e nos calos. 0,2,4-D se mostrou inibitório à organogênese. Não foi possível o enraizamento das gemas, fato que foi justificado pelas baixas concentrações de auxina utilizadas no meio de cultura.

RAJ BHANSALI *et al.* (1978a) foram capazes de regenerar plantas de *Crotalaria medicagenia* Lam. a partir da cultura de segmentos de caule e folha. Calos foram induzidos na presença de 2,4-D (2,3 - 14,3 μ M). A transferência dos calos obtidos para meio de cultura contendo os sais de MS e 6-BA (2,2 - 8,9 μ M) resultou na organogênese de gemas.

2.6. Glycine spp.

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é uma outra leguminosa, além de feijão, extensivamente estudada em culturas *in vitro*. Suspensões celulares de soja tem sido utilizadas para estudos bioquímicos (GAMBORG 1966, GAMBORG & EVELEIGH, 1968, GAMBORG & FINLAYSON 1969, GAMBORG 1970, MATTHEWS & WIDHOLM 1979). O meio B5 descrito por GAMBORG *et al.* (1968) foi baseado nas respostas de crescimento de células de soja em meio líquido. SCHENK & HILDEBRANDT (1972) após testarem diferentes composições de meio de cultura, desenvolveram um meio útil para o cultivo de várias mono e dicotiledôneas. A soja esteve entre as leguminosas que produziram calos friáveis, com crescimento vigoroso e facilmente desagregáveis. Suspensões celulares de soja também foram usadas para testar técnicas para a obtenção de suspensões ce

lulares contínuas em fitostato (MILLER *et al.* 1968), para a produção de células isoladas em suspensão (KUBEK & SHULER 1978a) ou para a determinação de massa celular (KUBEK & SHULER 1978b). WITHAM (1968) utilizou calos de cotilêdones de soja para estudar o efeito de 2,4-D e KIN no crescimento de calos. COLLINS *et al.* (1978) utilizaram tecidos de soja para comparar o efeito de picloram com o de outras auxinas em culturas *in vitro*. O estudo da toxicidade e modo de ação de herbicidas em suspensões celulares de soja foi descrito por DAVIS & SHIMABUKURO (1980). A diferenciação de elementos traqueários em soja foi relatada por FOSKET & TORREY (1969). HOLSTEN *et al.* (1971) e PHILLIPS (1974a, b) utilizaram células de soja em suspensão para estudar a relação simbiótica de fixação de nitrogênio entre leguminosas e bactéria *Rhizobium*. O controle da morfogênese de raízes em calos de soja foi estudado por EVANS *et al.* (1976). SCHWENK (1980) obteve calos a partir do plaqueamento de células de soja em suspensão derivadas de cotilêdones. O isolamento e cultura de protoplastos de soja foi descrito por ZIEG & OUTKA (1980). Tecidos de vagem tratados enzimaticamente liberaram protoplastos, os quais recuperaram a parede originando calos e morfogênese de raiz.

KIMBALL & BINGHAM (1973) relataram o desenvolvimento de gemas axilares em segmentos de hipocótilos de soja, sem a formação intermediária de calos. Quando segmentos de hipocótilo do cultivar Dunn foram cultivados no meio PRL-4, acrescido de AC (15%) e IAA (0,6 - 11 μ M) houve o desenvolvimento de raízes na extremidade basípeta dos seg

mentos ou de gemas axilares na extremidade acrópeta. Embora gemas tenham desenvolvido em todo o gradiente de IAA testado, o crescimento mais consistente de gemas ocorreu com IAA a 2,8 e 5,7 μM (1 - 10% das repetições). Segmentos do cultivar Corsoy também desenvolveram gemas quando cultivados na presença de IAA (0,6 e 6,0 μM) indicando que a formação de gemas axilares não foi específica para cultivar no meio adotado. Entre os segmentos que apresentaram gemas, 50% continham duas gemas opostas simetricamente e apenas em um segmento houve o desenvolvimento de mais de duas gemas. A formação de raízes ocorreu em 35 - 90% ('Dunn') ou 16 - 20% ('Corsoy') dos segmentos, incluindo a maioria daqueles onde previamente houve o desenvolvimento de gemas. O meio de Miller com KIN (2,3 ou 9,2 μM) e IAA (2,9 μM) foi tão efetivo para o desenvolvimento de gemas axilares quanto o meio PRL-4 acrescido de AC (15%) e IAA (2,9 μM). As plântulas obtidas foram transplantadas para solo e transferidas para estufa onde cresceram, floresceram e produziram sementes e plantas normais.

OSWALD *et al.* (1977) descreveram a diferenciação de estruturas globulares a partir da cultura de cotilédones de *Glycine max* cv. Bragg. O meio de Phillips modificado pela adição de biotina (0,82 μM) e pantotenato de cálcio (12,6 μM) foi utilizado para o estabelecimento das culturas (meios de Phillips-M). Calos proliferaram nos segmentos de cotilédones, na presença de 2,4,5-T (20 μM) e KIN (0,5 μM), após 12 dias de cultura. Estes calos foram inoculados em meio líquido contendo 2,4-D (2,3 μM) e KIN (0,5 μM). Após

3 semanas as suspensões celulares foram plaqueadas em meio sólido contendo 2,4-D (2,3 μM) e KIN (4,6 μM). Em 7 dias observou-se a formação de calos clorofilados e em 3 semanas observou-se 2 primórdios de gemas entre 65 culturas, não sendo descrito desenvolvimento além deste estágio.

Tecidos de soja e de várias espécies de *Glycine* selvagens, totalizando 56 cultivares, foram cultivados com o objetivo de regeneração de plantas (BEVERSDORF & BINGHAM 1977). Hipocótilos e ovários foram cultivados em meio sólido e líquido com várias concentrações e combinações de RCs. Proliferação máxima de calos ocorreu em meio B5 acrescido de 2,4-D (1,8 - 3,6 μM) e KIN (1,1 - 2,3 μM) em culturas com 28 dias de idade. Centros de crescimento compactos (nódulos com células semelhantes à meristemáticas) se desenvolveram quando os calos foram inoculados em meio líquido de Miller suplementado com várias interações auxina/citocinina. Culturas líquidas com 2,4-D (4,5 μM), IAA (2,9 μM) e KIN (2,3 μM) produziram muitos centros de crescimento, na maioria dos quais houve o desenvolvimento de raízes com subsequente formação de calos. Culturas líquidas contendo 2,4-D (2,3 μM) e KIN (0,05 μM) produziram centros de crescimento onde se iniciaram menos raízes, mas que, frequentemente se alongaram em estruturas semelhantes a embriões. Estes centros de crescimento entretanto, não apresentaram crescimento posterior. A produção de centros de crescimento em meio líquido pareceu ser específica para o meio testado. Centros de crescimento foram frequentemente observados em culturas de células de *G. soja* Sieb & Zucc, *G. max* e *G. tabacina* Benth mas não foram observa

das em culturas semelhantes de *G.wightii* (Grah. ex Wight & Arn) Verdc., *G. clandestina* Wendl. ou *G.tomentella* Hayata. Todos os genótipos de *G. max* testados desenvolveram centros de crescimento em cultura líquida. Entretanto, alguns cultivares mostraram uma maior tendência em desenvolver estruturas semelhantes a embriões.

O desenvolvimento de gemas axilares em culturas de soja foi obtido pelo uso de segmentos de nós cotiledonares condicionados (CHENG *et al.* 1980). A germinação de sementes de soja em meio de B5-M2 na presença de IBA (0,025 μ M) e 6-BA (10 - 50 μ M) estimulou a formação de várias gemas na região do nó cotiledonar. A cultura dos segmentos de nós cotiledonares condicionados, em meio sólido contendo IBA (0,025 μ M) e 6-BA (5 - 50 μ M), estimulou a formação de gemas axilares múltiplas. A multiplicação contínua de gemas foi obtida pelas subculturas periódicas das massas de tecidos organizados no mesmo meio original. O crescimento posterior destas gemas foi obtido pela subcultura em meio contendo baixa concentração de 6-BA (1 μ M). Plantas de soja foram produzidas após o enraizamento em meio básico sem RC. Cada fase acima descrita teve um período de cultura de 4 semanas.

Segmentos nodais de caule de soja foram também testados para propagação vegetativa (SAKA *et al.* 1980). O estímulo da formação de gemas axilares nos segmentos nodais foi aumentado pela germinação das sementes em meio básal, sem RCs. As concentrações de citocinina requeridas para os segmentos nodais condicionados produzirem gemas foram: (a)

6-BA (1 - 5 μ M) no meio MS-M e (b) 6-BA (1 - 50 μ M) no meio B5-M2. As respostas dos explantes cultivados nestes dois meios basais, contendo 6-BA, foram diferentes. Por exemplo, com 25 μ M de 6-BA o número médio de gemas induzidas por cultura foi de 2 no meio MS-M e 10 no meio B5-M2. O meio B5-M2 foi superior ao meio MS-M não só para a indução de gemas mas também para seu desenvolvimento posterior. O crescimento de gemas foi estimulado pela redução da concentração de 6-BA e substituição de frutos e por sacarose.

Os trabalhos anteriores apresentando desenvolvimento de gemas em tecidos de soja foram realizados com explantes que continham meristemas apicais e axilares (KIMBALL & BINGHAM 1973, CHENG *et al.* 1980, SAKA *et al.* 1980). A capacidade regenerativa em várias espécies de *Glycine* usando tecidos ausentes de meristemas foi examinada por KAMEYA & WIDHOLM (1981). Segmentos de hipocótilo, cotilédone e raiz de plântulas de oito espécies de *Glycine* foram cultivados em meio de MS suplementado com NAA (0,5 - 27 μ M) e 6-BA (0,4 - 44 μ M). A região do nó cotiledonar foi eliminada. Das oito espécies testadas, a regeneração de gemas em alta frequência foi observada somente a partir de segmentos de hipocótilo de *G. canescens* F.J. Hermann (60% dos explantes formaram gemas). Um pequeno número de gemas foi induzido em 5% dos segmentos de hipocótilo de *G. tomentella* a partir das quais obteve-se plantas. Cotilédones de *G. canescens* formaram gemas (5% das culturas) que não apresentaram desenvolvimento posterior. A indução de gemas nos segmentos de hipocótilos ocorreu apenas nas combinações de 6-BA (4,4 μ M) com

NAA (10,8 μM) e 6-BA (22 μM) com NAA (0,5 μM). A frequência regenerativa em hipocótilo de *G. canescens* foi influenciada pela idade da planta e pelo comprimento e posição do segmento. Estas gemas puderam ser enraizadas e transplantadas para solo onde plantas normais se desenvolveram. Tecidos de soja, *G. soja*, *G. clandestina*, *G. falcata* Benth. *G. tabacina* e *G. latifolia* não regeneraram gemas nas mesmas condições utilizadas para *G. canescens* e *G. tomentella*.

2.7. Indigofera enneaphylla

A regeneração de plantas de *Indigofera enneaphylla* L. foi descrita por BHARAL & RASHID (1979b). A cultura de segmentos foliares, cotilédones verdes e hipocótilos em meio quimicamente definido contendo sais B5, IAA (2,9 μM) e 6-BA (4,4 μM) levou à regeneração de numerosas gemas. Estas apareceram em pequenos calos induzidos nos explantes. O número de gemas originadas em cada explante foliar variou entre 10 - 50 em cerca de 50 - 60% das culturas. Entretanto, não foi observado desenvolvimento posterior das gemas induzidas nestes explantes. Quando se utilizou cotilédones como fonte de explante 70% das repetições produziram estruturas semelhantes a pequenas gemas, após 4-5 semanas de cultura. Uma semana depois, 90% destas culturas apresentavam gemas e 50% destas continham folhas bem desenvolvidas. O número de gemas com folhas por cotilédone cultivado variou de 5-30 e o número de gemas sem folhas de 50-150, enquanto que o número de gemas diferenciadas por hipocótilo cultivado variou entre 40-100. Estes resultados demonstraram uma diferença no poten

cial morfogênético nas diferentes partes da mesma planta (hipocótilo x cotilédone). A obtenção de raízes e crescimento adequado das gemas ocorreram em tecidos contendo calos cultivados na presença de NAA (10,8 μM) e 6-BA (0,9 μM) seguido de transferência das gemas para o meio basal. Os plântules desenvolveram-se normalmente chegando a florescer *in vitro* no meio basal. A utilização de IAA como fonte de auxina e 6-BA como fonte de citocinina foi determinante para a regeneração de gemas. Quando 6-BA foi substituído por 2ip ou Z, não houve diferenciação de gemas em segmentos de hipocótilo ou cotilédone. A substituição de IAA por 2,4-D (2,3 μM) ou NAA (2,7 μM) levou à formação de calos em explantes de cotilédones. Os calos induzidos na presença de 2,4-D quando transferidos para o meio de diferenciação, contendo IAA e 6-BA, originaram gemas.

2.8. Lathyrus sativus

Lathyrus sativus L. é uma leguminosa de regiões áridas e semi-áridas da Índia, cujos grãos apresentam alto teor proteico, sendo também utilizada como forragem.

Ápices meristemáticos de *L. sativus* var. LSD-6 foram cultivados em meio B5 suplementado com IAA (2,9 μM) e 6-BA (4,4 μM) obtendo-se calos em 70% das culturas (MUKHOPADHYAY & BHOJWANI 1978). Em três semanas os calos se apresentaram compactos e verde brilhantes. Após 4-5 semanas de cultura primária, estes calos se tornaram opacos com regiões verdes localizadas. Em 10% destes calos, estruturas semelhantes a gemas adventícias foram notadas nas regiões ver

des. Nesta época, todos os calos (com ou sem gemas) foram transferidos para meio fresco, idêntico ao da cultura primária. Após quatro semanas de cultura secundária, 70% dos calos exibiram diferenciação de gemas. Inicialmente um único calo produziu 4-5 gemas em diferentes locais. Durante as culturas subsequentes a frequência de diferenciação por calo foi aumentada. Após quatro subculturas, a diferenciação de gemas ocorreu em quase 100% das repetições. Dependendo de seu tamanho, o número de gemas produzidas por calo variou entre 45-82. As culturas mantidas por mais de um ano retiveram a habilidade morfogênética para diferenciar gemas. As gemas foram subcultivadas em meio contendo 6-BA (0,9 μM) e NAA (1,1 μM) ou IAA (1,1 μM) para a indução de raízes porém, organogênese de raiz ocorreu apenas ocasionalmente. Calos induzidos no meio primário apresentaram crescimento vigoroso, quando transferidos para meio contendo 2,4-D (2,3 μM) e 6-BA (4,4 μM).

Posteriormente GHARYAL & MAHESHWARI (1980) descreveram um meio de cultura capaz de promover organogênese e formação completa de plantas de *L. sativus* var. LSD-3. Ápices meristemáticos cultivados em meio B5 suplementado com NAA (10,8 μM) e 6-BA (2,2 μM) produziram calos em 90% dos explantes, após 6 dias de cultura. A diferenciação de gemas (100% das culturas) e raízes (40% das culturas) foi observada após cerca de 6 semanas de cultivo no mesmo meio. Subcultura no mesmo meio resultou no aumento do número de gemas por repetição. Plântules completos foram observados após cerca de 6 semanas de subcultura. A diferença de resposta morfo

nética da var, LSD-3 com relação à var. LSD-6 (estudada por MUKHOPADHYAY & BHOJWANI 1973) na qual plântulas completas não foram obtidas foi atribuída a um dos seguintes fatores: (1) diferença genotípica, (2) diferença dos reguladores de crescimento utilizados, ou (3) diferença das condições de crescimento e idade das plantas doadoras de explantes.

2.9. Lotus spp.

A regeneração de plantas de *Lotus* spp., uma leguminosa forrageira, foi demonstrada primeiramente por NIIZEKI & GRANT (1971). Anteras de três coleções de *Lotus corniculatus* L. (cv. Empire, cv. Viking e uma variedade selvagem) e de *L. caucasicus* Kuprian foram cultivadas em meio sólido na tentativa de induzir plantas haplóides. Porém, as plantas regeneradas apresentaram o mesmo número cromossômico que o material parental, com exceção de alguns poliplóides. Este resultado sugere que as plantas de *Lotus* obtidas foram derivadas de tecidos somáticos (das paredes das anteras ou dos filetes) e não dos micrósporos. A indução de gemas e raízes ocorreu em calos destas duas espécies de *Lotus* cultivadas em meio de Miller, suplementado com IAA(8,6 - 22,8 μ M) e KIN (6,9 - 18,4 μ M) ou 6-BA (6,6 - 17,6 μ M) depois de um considerável período de incubação. Tanto gemas como raízes se desenvolveram em meio contendo KIN mas, quando esta foi substituída por 6-BA, o desenvolvimento de raízes foi inibido enquanto que o desenvolvimento de gemas foi promovido. A frequência e o tempo para a regeneração de gemas variaa

ram conforme o genótipo. Para *L. corniculatus* cv. Empire a regeneração de grande número de gemas ocorreu em calos com três meses de cultura. O cultivar 'Viking' de *L. corniculatus* e *L. caucasicus* produziram poucas gemas e somente após 9 a 10 meses de cultura. As gemas obtidas na presença de 6-BA foram enraizadas em meio contendo IAA (0 - 11,4 μ M) e KIN (0 - 9,2 μ M), obtendo-se melhores resultados nas baixas concentrações dos RCs. Desta forma foram obtidas quatro plantas adultas de *L. corniculatus* cv. Viking, 38 de cv. Empire e duas de *L. caucasicus*.

TOMES (1979) estabeleceu um método de propagação vegetativa *in vitro* de "birdsfoot trefoil" (*L. corniculatus* cv. Leo) visando manutenção de genótipos. Segmentos nodais (5 mm) e submeristemas (0,3 mm) foram cultivados em meio B5 na presença ou não de 6-BA (0,2 μ M). Por esta técnica, gemas pré-existentes no explante se desenvolveram sem a intermediária formação de calos. As culturas foram estabelecidas mais rapidamente a partir de segmentos nodais. Mais de 95% das culturas nodais desenvolveram gemas, após duas semanas, em ambos os meios de cultura. No mesmo período submeristemas produziram gemas em 21% (meio sem RC) e 44% (meio com 6-BA) das culturas. O número de gemas aumentou significativamente com a idade da cultura, independentemente do meio e do explante utilizado. Na presença de 6-BA os segmentos nodais produziram uma média de 1,32 gemas (após 2 semanas) e 5,20 gemas (após 3 semanas) enquanto que submeristemas produziram 0,49 gemas (após 2 semanas) e 6,64 gemas (após 8 semanas). No

meio sem RC os segmentos nodais produziram uma média de 1,01 gemas (após 2 semanas) e 1,31 gemas (após 3 semanas) anquanto que os submeristemas produziram 0,21 gemas (após 2 semanas) e 0,53 gemas (após 8 semanas). Nota-se que a adição de 6-BA ao meio de cultura aumentou o número de gemas produzidas por explante. As gemas obtidas dos segmentos nodais foram enraizadas (58%) quando subcultivadas em meio sem RC. A incubação das culturas em temperaturas reduzidas (2 - 4 °C) durante um mês pouco alterou o número e altura das gemas produzidas durante o período de incubação. Plântules transferidos das culturas incubadas às baixas temperaturas para sala de crescimento apresentaram uma alta taxa de sobrevivência.

"Birdsfoot trefoil" é um legume de forragem sensível ao herbicida 2,4-D. SWANSON & TOMES (1980) procuraram estudar a tolerância *in vitro* ao 2,4-D de linhas celulares do cultivar Leo. Segmentos de internós (1,5 cm) de nove diferentes genótipos serviram como explante. O meio básico utilizado em todos os experimentos foi o meio B5 modificado (B5-M1), com maiores níveis de CaCl_2 (440 mg/l) e MgSO_4 (370 mg/l). A indução de calos foi feita na presença de 2,4-D (4,5 μM). Após 4 semanas de cultura foi selecionado um genótipo com crescimento rápido. Calos do genótipo selecionado e calos de um controle não selecionado foram subcultivados em meio básico acrescido de 6-BA (0,4 μM) visando regeneração de gemas e raízes. Após 14 dias estes calos foram transferidos para meio de cultura livre de RC. Calos do genótipo controle levaram mais tempo para produzir raízes e gemas do

que calos do genótipo selecionado de crescimento rápido. Entretanto, embora o genótipo selecionado tenha produzido raízes mais prolíficas e num tempo menor, ele produziu menor número de plantas por grama de calo (10 - 11 plantas) do que o genótipo controle (16 - 17 plantas) após 6 semanas. O efeito de altos níveis de 2,4-D no crescimento de calos foi testado nas duas linhas celulares usando 2,4-D (4,5 e 180 μ M). A exposição prolongada de calos do genótipo controle ao nível citotóxico de 2,4-D (180 μ M) suprimiu quase que completamente o crescimento de calos após 5 subculturas. Por outro lado, calos do genótipo selecionado apresentaram 60% de sua taxa de crescimento, após 7 subculturas na presença de 2,4-D (180 μ M). Além disso, enquanto que calos do genótipo controle se apresentaram cloróticos, com pequenas regiões verdes após 5 subculturas, calos do genótipo de crescimento rápido permaneceram verdes após 7 subculturas na presença de 2,4-D (180 μ M). Após 7 subculturas, os calos do genótipo selecionado e as regiões verdes dos calos do genótipo controle foram transferidos para o meio basal acrescido de 6-BA (0,4 μ M), para regeneração. Suspensões celulares foram estabelecidas na presença de 2,4-D (4,5 μ M). Após o período necessário para o estabelecimento de culturas líquidas do genótipo controle (10 dias) e do genótipo selecionado (6 dias), a diferenciação foi induzida pelo plaqueamento em meio básico suplementado com 6-BA (0,2 μ M). Seleção de células em suspensão tolerantes a 2,4-D foi feita pela inoculação de calos do genótipo controle em meio líquido contendo 2,4-D (67,5 μ M). Após duas subculturas

(14 dias cada) as células foram plaqueadas no meio básico contendo 2,4-D (4,5 μ l). Regiões verdes isoladas dos calos produzidos após duas semanas de plaqueamento diferenciaram em plânt^letes. As plantas diferenciadas a partir de calos ou células em suspensão, tratados com altos níveis de 2,4-D, foram multiplicadas pela cultura de meristema para posterior análise.

2.10. Medicago sativa

A primeira demonstração de regeneração de plantas em alfafa (*M. sativa* L. var. Saranac - Clone S-4) foi apresentada por SAUNDERS & BINGHAM (1972). A regeneração o correu em calos derivados de anteras, ovários imaturos e segmentos de hipocótilo ou internô. A melhor indução de calos foi obtida no meio básico de Blaydes, acrescido de 2,4-D (9,0 μ M), NAA (10,8 μ M) e KIN (9,2 μ M). Plantas foram recuperadas em calos subcultivados no meio basal, porém a adição de inositol (555 μ M) e EL (2,0 g/l) melhorou a obtenção de plân^ltetes. Foi sugerido a ocorrência simultânea de gemas adventícias e de embriões somáticos. A frequência de diferenciação de plânt^letes dependeu do nível de RC do meio primário e também do genótipo da planta doadora. O comprimento do dia pareceu não ser crítico para diferenciação de plantas alfafa. Calos foram obtidos de anteras que se encontravam entre os estádios pré-meiótico e quase maduro. Estudos histolôgicos indicaram que na maioria dos casos os calos de anteras derivaram de células somáticas do tecido conectivo interlocu

lar. A maioria das 200 plantas recuperadas dos calos eram tetraplóides, como a planta doadora. Foram ainda obtidos nove octaplóides e alguns tipos variantes incluindo albinos.

Estudos complementares com variedade Saranac demonstraram que o uso de 2,4-D como fonte de auxina no meio primário proporcionava melhor recuperação de plântletes (SAUNDERS & BINGHAM 1975) e que a frequência de regeneração em tecidos de alfafa podia ser aumentada por seleção recorrente (BINGHAM *et al.* 1975). Nos estudos iniciais (SAUNDERS & BINGHAM 1972) a proporção de genótipos de alfafa capazes de regeneração era baixa (0 - 5%). Através de seleção recorrente dois terços de plantas de alfafa tetraplóides produziram culturas de calos com capacidade regenerativa (BINGHAM *et al.* 1975). A frequência de regeneração foi de 12% no ciclo 0, cerca de 50% no ciclo 1 e 67% no ciclo 2. Sementes produzidas pelo cruzamento manual de 75 plantas regeneradas no ciclo 2 foram denominadas 'Regen-S'.

Posteriormente McCOY & BINGHAM (1977) trabalharam com o clone de alfafa diplóide HG2 (derivado do clone S-4) que possuía a habilidade de regenerar plantas a partir de culturas em suspensão. Calos produzidos a partir de ovarios imaturos foram inoculados em meio líquido. Após o estabelecimento da cultura em suspensão os agregados celulares foram filtrados e plaqueados em meio sólido visando recuperação de plântletes. Os meios de cultura adotados para a produção de calos e regeneração de plantas foram os mesmos descrititos por SAUNDERS & BINGHAM (1972). O meio líquido foi o mesme

mo utilizado para a produção de calos. Colônias de calos e regeneração de plântulas foram obtidas com uma densidade de plaqueamento de apenas $2 \cdot 10^3$ cels/ml, porém o desenvolvimento de colônias foi melhor em uma densidade de $2 \cdot 10^4$ cel/ml. Tanto a habilidade regenerativa (96% das colônias) como a proporção de plantas diplóides (70%), mantiveram-se em níveis altos quando o plaqueamento foi feito com células mantidas por 21 dias em suspensão, derivadas de calos de 4 semanas de idade. A porcentagem de regeneração diminuiu com o aumento da idade da cultura em suspensão: 42 dias - 68%; 77 dias - 3,5% e 98 dias - 0%. Um decréscimo similar na capacidade regenerativa foi observado quando as células foram mantidas em cultura sólida.

Em continuação aos estudos de SAUNDERS & BINGHAM (1972) a frequência de regeneração de plantas em 14 clones de alfafa do cultivar Regen-S foi estudada por WALKER *et al.* (1978). A capacidade regenerativa variou quantitativamente entre os clones analisados. O clone RA-3 foi o que apresentou melhor regeneração *in vitro* e o clone RA-5 teve a pior resposta. Também foi analisada a importância da composição dos sais inorgânicos do meio regenerativo. Quando o meio de Blaydes, suplementado com inositol ($555 \mu\text{M}$) e EL (2g/l) foi utilizado, a organogênese de raiz foi inibida o que não aconteceu com os meios de SH e B5. Gemas adventícias ocorreram em todos estes meios.

Através de variações das condições de cultura WALKER *et al.* (1979) definiram um sistema para o estudo

da morfogênese em alfafa que permite a separação temporal entre a indução e a subsequente diferenciação tanto de plantas como de raízes. Tecidos de ovário de alfafa (clone RA-3 do cv. Regen-S, que respondia bem às condições *in vitro*) foram cultivados em diferentes interações dialéticas de 2,4-D e KIN (ambos variando de 0,1 a 100 μM) em meio básico de SH. Aos 28 dias de cultura os calos obtidos foram transferidos para meio de SH, sem RC (meio regenerativo). Diferentemente de muitos sistemas convencionais, nos quais a organogênese tem sido estudada, tecidos de alfafa pré-tratados com altos níveis de 2,4-D em relação a KIN formaram gemas, enquanto que tecidos pré-tratados com baixos níveis de 2,4-D em relação a KIN produziram raízes. Tecidos desenvolvidos na presença de NAA (25 μM) e KIN (10 μM) formaram calos com intenso crescimento, porém quando estes foram transferidos para meio regenerativo, usualmente não ocorreu diferenciação de gemas ou raízes. Porém quando estes calos eram transferidos para meio contendo 2,4-D (50 μM) e KIN (5 μM) ou 2,4-D (5 μM) e KIN (50 μM) ocorreu a formação de gemas ou raízes respectivamente, após transferência para meio regenerativo. Desta forma calos não induzidos, obtidos na presença de NAA e KIN, foram capazes de diferenciar gemas ou raízes quando expostos ao 2,4-D. Resposta máxima de diferenciação foi obtida com três dias (gemas) ou quatro dias (raízes) de exposição ao 2,4-D. Foi ainda demonstrado que em alfafa a competência de resposta à indução era dependente do tamanho dos agregados celulares derivados da cultura líquida. Um diâmetro de 105 μm apresentou o limite mínimo do agregado celular morfogenetico

mente competente. Agregados celulares menores e células isoladas não se mostraram competentes para a regeneração. Porém, puderam dar origem a novas plantas após subsequente crescimento em meio regenerativo.

KAO & MICHAYLUK (1980) descreveram as condições para o isolamento e cultura de protoplastos de mesófilo de *Medicago sativa* cv. Canadian e posterior regeneração de plantas. Folhas de plantas com crescimento vigoroso, sob baixa intensidade de luz, mostraram-se o melhor material para o isolamento de protoplastos. A liberação completa de protoplastos de mesófilo foi obtida em meio de Kao contendo solução enzimática com celulase Onozuka (0,5%), Rhozyme (0,5%), pectinase (0,25%) e cálcio (300 mg/l) a 0,5 osmolal, por 5-6 horas a 23-25 °C. Os protoplastos uma vez isolados foram cultivados no meio A. Grandes variações foram observadas na divisão celular de protoplastos produzidos de diferentes plantas. Protoplastos provenientes de folhas mais jovens geralmente se dividiram mais rapidamente do que os de folhas mais velhas. Na maioria dos casos a frequência de divisão celular foi mais alta quando a razão do volume de protoplastos para o volume de meio de cultura foi de 0,1% ou menos. Após a regeneração da parede celular e formação das estruturas globulares, os RCs foram removidos do meio A para o desenvolvimento de embriões. A habilidade das estruturas globulares para formar embriões e regenerar plantas variou consideravelmente entre indivíduos do mesmo cultivar.

SANTOS *et al.* (1980) relataram a obtenção

de plantas de alfafa (European Lucerne) derivadas de proto
plastos via organogênese e embriogênese somática. As condi
ções de desenvolvimento e idade das plantas, bem como a ida
de fisiológica das folhas utilizadas para o isolamento de pro
toplastos foram fatores determinantes no sucesso do estabelele
cimento das culturas. Protoplastos isolados de folhas expan
didas, de tamanho uniforme, de plântulas com 30-35 dias de
idade se dividiram e formaram colônias celulares quando cul
tivados no meio KM8P (no escuro) em substrato de papel de filtr
o sobre meio semi-sólido. Calos derivados de protoplastos
ou de explantes foliares cultivados em meio basal UM, suple
mentado com 2,4-D (9,0 μ M) e KIN (1,2 μ M), deram origem a
áreas meristemáticas verdes após 4 semanas. SAUNDERS & BINGHAM
(1972) utilizaram meio regenerativo indefinido contendo
EL, enquanto que WALKER *et al.* (1978) omitiram RCs. No pre
sente trabalho, um meio regenerativo contendo alta concentraça
o de citocinina em relação a auxina (2,2 μ M 6-BA/0,27 μ M
NAA) foi efetivo em promover o desenvolvimento posterior das
áreas meristemáticas verdes, dando origem a gemas e embriões.
Estas estruturas foram transferidas para meio basal de MS,
sem RCs, obtendo-se plântletes. A formação de gemas adventíci
as e embriões somáticos se apresentaram como dois eventos
distintos nas culturas de 'European Lucerne', ambos ocorren
do simultaneamente no mesmo calo independente de sua origem
(a partir de protoplastos ou explantes foliares). Embora te
nha ocorrido abundante formação de gemas na maioria das cul
turas, maior número de plântletes foram recuperados via em

briogênese.

Alfafa é uma planta de polinização aberta, desta forma cada variedade é uma população altamente heterozigota. Tem sido reportado (SAUNDERS & BINGHAM 1972, BINGHAM *et al.* 1975, SAUNDERS & BINGHAM, 1975, Mc COY & BINGHAM 1977, WALKER *et al.* 1978, KAO & MICHAYLUK 1980) que apenas uma pequena porcentagem de plantas, entre diversas variedades de alfafa estudadas, são capazes de produzir calos ou células em suspensão com a capacidade de regenerar plantas. Esta habilidade regenerativa foi considerada como um carater inerente na espécie (BINGHAM *et al.* 1975). Recentemente KAO & MICHAYLUK (1981) estabeleceram suspensões celulares a partir de ápices meristemáticos de 9 plantas de alfafa da variedade Canadian. Seus resultados mostraram que condições nutricionais consideravelmente diferentes foram necessárias para induzir embriogênese nas suspensões celulares derivadas destas plantas. Pelo ajustamento apropriado dos níveis hormonais e da concentração dos sais mineirais foi possível induzir embriogênese em todas as nove culturas testadas. Seis entre nove culturas formaram embriões em meio com baixas concentrações de sais. Em concentrações maiores, estas seis culturas tiveram o crescimento diminuído e menor produção de embriões. As três culturas restantes formaram embriões somente em alta concentração de sais. A combinação de 2,4-D (ou NAA) com Z (ou 6-BA) foi essencial para a indução de embriões. A concentração destes compostos foi crítica para a embriogênese. Por exemplo três culturas formaram embriões em meio contendo alta concentração de 2,4-D (4,5 μ M), na presença de 9,2 ou 0,5 μ M de Z. Duas

culturas produziram embriões somente em meio contendo baixa concentração de 6-BA ($0,4 \mu\text{M}$) e 2,4-D ($0,4 \mu\text{M}$) ou NAA ($0,25 \mu\text{M}$). Plantas foram recuperadas em sete das nove culturas estabelecidas.

2.11. Pisum sativum

TORREY (1967) descreveu as condições de cultura para a morfogênese de raízes em calos de ervilha (*P. sativum* L. cv. Alaska). Através do cultivo de pontas de raiz em meio de Bonner modificado, acrescido de EL (1 g/l) e 2,4-D ($1 \mu\text{M}$) foram produzidos calos que quando transferidos para meio líquido, sem a adição destes componentes, produziram raízes. A subcultura por período prolongado resultou na perda progressiva da capacidade regenerativa das culturas. Estudos citológicos mostraram anormalidades cromossômicas com o envelhecimento das culturas, incluindo poliploidia e aneuploidia. Este autor sugeriu que a perda da capacidade de regeneração de raízes estaria relacionada com o aumento de anormalidades cromossômicas. Utilizando o mesmo sistema, TORREY & FOSKET (1970) mostraram que a citodiferenciação em calos de ervilha era dependente de citocinina. O aumento da concentração de KIN em 10 vezes (de $0,5 \mu\text{M}$ para $5 \mu\text{M}$) aumentou em 5 vezes o número de novas células produzidas por explante, em 10 dias de cultura e, aproximadamente em 50 vezes a formação de elementos traqueáreos.

HILDEBRANDT *et al.* (1963) cultivaram segmentos de caule de ervilha em meio de cultura contendo AC, pantotenato de cálcio e NAA. Em muitos casos houve o desenvolvimento

volvimento do caule com a formação de folhas e flôres e também crescimento de calos na região basal do segmento.

O desenvolvimento de plântulas de ervilha (*P. sativum* cv. Century), a partir de tecidos meristemáticos, foi primeiramente descrito por GAMBORG *et al.* (1974a). O cultivo de ápices meristemáticos (2 - 3 mm) em meio B5 contendo 6-BA (0,2 - 5 μ M) e NAA (1 μ M) provocou a formação de calos com uma ou mais gemas. A diferenciação de raízes ocorreu em algumas destas gemas, porém não foi relacionada aos tratamentos de RCs. As plântulas obtidas cresceram até a maturidade produzindo flôres e vagens com aspecto normal.

KARTHA *et al.* (1974) obtiveram plantas inteiras de ervilha, a partir da cultura de meristemas (200 - 300 μ m), em três cultivares: 'Century', 'Laxton's Progress' e 'Afghanistan'. A cultura dos meristemas em meio contendo os sais B5, acrescido de 6-BA (0,5 μ M) ou em combinação com NAA (1 μ M) resultou no desenvolvimento de gemas. O enraizamento destas gemas foi obtido com os sais B5 na metade da concentração, suplementado com NAA (1 μ M). Notou-se também a presença de plântulas em culturas de meristemas em meio contendo apenas NAA (1 μ M).

MALMBERG (1979) demonstrou pela primeira vez a regeneração de plantas de ervilha *in vitro* a partir da cultura de tecido não-meristemático. Nos trabalhos anteriores foi relatado o desenvolvimento de gemas pré-existentes nos segmentos de caule (HILDEBRANDT *et al.* 1963) ou no meristema apical (GAMBORG *et al.* 1974a, KARTHA *et al.* 1974). Nestes

trabalhos descreveu-se a obtenção de uma a duas plantas por explante cultivado, enquanto que MALMBERG (1979), através do cultivo de segmentos de epicótilo, obteve o desenvolvimento de 2-8 plantas por explante. Os segmentos de epicótilo foram cultivados em meio de MS com NAA (10,8 μ M) e 6-BA (4,4 μ M) para a indução de calos. A regeneração de gemas adventícias foi obtida em meio de MS contendo IAA (1,1 μ M) e 6-BA (22 μ M). A região basal das gemas desenvolvidas foi imersa por 10 seg. em solução de NAA (5,4 μ M) e em seguida transplantada para o meio basal de MS. Os plântules enraizados foram levados para solo estéril para posterior desenvolvimento. Entre as 16 linhas genéticas testadas, seis apresentaram regeneração de gemas adventícias em calos de 2 meses de idade. A subcultura periódica dos calos destas seis linhas genéticas permitiu ainda a regeneração de gemas aos quatro meses (quatro linhas genéticas) e aos seis meses (duas linhas genéticas). Portanto, a capacidade regenerativa dos calos destes seis genótipos foi decrescendo com as subculturas sucessivas. O autor sugeriu a utilização de bancos de germoplasma para explorar a variabilidade genética nas espécies onde a regeneração de plantas a partir de calos não tem sido encontrada com facilidade, como por exemplo as leguminosas de sementes. Pelo uso de várias linhas genéticas dentro da espécie, alelos responsáveis pela regeneração de plantas poderiam ser encontrados, considerando que a capacidade regenerativa tenha uma base genética.

O isolamento de protoplastos de ervilha foi obtido a partir de células de mesófilo (CONSTABEL *et al.*

1973), tecidos de raiz (LANDGREN & TORREY 1973) e ápices meristemáticos (GAMBORG *et al.* 1975). Em todos os casos houve a regeneração da parede celular com posterior divisão, levando à formação de calos. Porém, desenvolvimento de plântulas não foi descrito.

2.12. *Psophocarpus tetragonolobus*

O feijão alado, *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC (anual ou perene), tem sido cultivado na região tropical onde a soja não tem se estabelecido. O conteúdo proteico e a qualidade do óleo desta leguminosa são comparáveis aos da soja. Todas as partes da planta são comestíveis. Os tubérculos produzidos contêm alto teor proteico. Ocorre normalmente nodulação extensiva sem a inoculação de *Rhizobium* (GREGORY *et al.* 1980).

VENKETESWARAN & HUTHINEN (1978) relataram a regeneração de plantas de feijão alado através da cultura de segmentos de hipocótilo ou cotilédone. Calos foram induzidos na presença de NAA (5,4 - 26,9 μM) e KIN (0,5 μM). Após 2-3 subculturas destes calos em meio sem RCs, houve a indução de gemas as quais desenvolveram raízes na presença de NAA (0,5 μM) e KIN (0,05 μM).

Posteriormente, BOTTINO *et al.* (1979) apresentaram uma metodologia para a indução e proliferação de calos, estabelecimento de suspensões celulares e organogênese de raiz em *P. tetragonolobus*. Porém, apesar de terem sido testados vários meios de cultura em material de calos e células em suspensão plaqueadas, não foi possível a regeneração de

plantas. Os autores sugeriram que diferenças varietais poderiam explicar a discrepância entre os resultados presentes e aqueles relatados por VENKETESWARAN & HUTHINEN (1978).

A regeneração de plântuletes em culturas de calos derivados de explantes foliares de feijão alado foi apresentada por GREGORY *et al.* (1980). Calos foram induzidos em meio de MS suplementado com NAA (1,1 μ M) e 6-BA (8,8 ou 22 μ M). Após 48-50 dias de cultura, os calos foram transferidos para meio secundário com a mesma composição daquele utilizado para a indução de calos, exceto que NAA foi substituído por IAA (1,1 ou 11 μ M) e a concentração de 6-BA alterada. Entre várias combinações de RCs testadas IAA (1,1 μ M) e 6-BA (8,8 ou 44 μ M) ou IAA (11 μ M) e 6-BA (4,4; 8,8 ou 22 μ M) foram as mais efetivas na formação de gemas. Após o desenvolvimento posterior destas gemas o enraizamento foi obtido em meio de MS suplementado com NAA (0.2 μ M). Em muitos casos a formação de gemas ocorreu diretamente no explante foliar durante cultura primária. Nestes casos a cultura secundária serviu apenas para desenvolver as gemas induzidas no meio primário.

HANH *et al.* (1981) descreveram a formação de gemas adventícias sem a intermediária formação de calos, em cultura de *P. tetragonolobus* var. Tpt₆. As gemas derivadas de células epidérmicas foram obtidas a partir de diferentes órgãos de plantas em estado juvenil e de fragmentos de inter-nós e camadas celulares finas de tecidos da planta adulta. Os explantes foram primeiramente incubados por uma

semana em meio de MS suplementado com IAA (1 μ M) e 6-BA (10 μ M) e então transferidos para meio basal, sem RCs. A maior frequência regenerativa ocorreu a partir de camadas celulares finas extraídas de epicótilos. Nestes tecidos 15-20 gemas/explante se formaram em 100% das culturas, após 20 dias em meio sem RC.

2.13. Stylosanthes hamata

A regeneração de plantas de *Stylosanthes hamata* Taub., leguminosa perene utilizada em pastagem, foi descrita por SCOWCROFT & ADAMSON (1976). Calos foram induzidos em segmentos de radículas e cotilédones em meio básico denominado CS-5, acrescido de 2,4-D (9 μ M) e KIN (0,2 μ M). Para regeneração mais consistente de plantas, os calos indiferenciados foram subcultivados em meio CS-5, sem RCs, até que raízes com 1-2 cm de comprimento se desenvolvessem. Estes calos com raízes foram então transferidos para o mesmo meio CS-5, contendo KIN (14 μ M) para induzir a formação de gemas. Os plântletes obtidos continuaram a se desenvolver neste meio, porém a taxa de crescimento dos plântletes pôde ser aumentada quando os calos com gemas e raízes voltaram para o meio CS-5, sem RC. Por este método 5-10 plântletes por explante foram recuperados. As plantas regeneradas eram robustas, sobrevivendo facilmente o transplante para vasos em estufa. Todos os plântletes originaram plantas normais e férteis. Os calos puderam ser mantidos em estado indiferenciado por um longo período (pelo menos 15 meses) sem perderem o potencial regenerativo. Cultura líquida foi também estabelecida

a partir dos calos. Os agregados celulares da cultura líquida, quando transferidos para meio sólido com KIN (14 μM), originaram primórdio de gemas.

2.14. Trifolium alexandrinum

A regeneração de plantas da forragem anual "berseem clover" (*Trifolium alexandrinum* L.) foi descrita por MOKHTARZADEH & CONSTANTIN (1973). Esta espécie é de considerável importância econômica em regiões úmidas e quentes. Condições culturais foram relatadas para a indução e proliferação de calos, estabelecimento de suspensões celulares e subsequente regeneração de plantas, a partir de células esporofíticas e gametofíticas de "berseem clover". O meio básico de MS foi utilizado em todos os experimentos. As condições de cultura mais eficientes para a produção de plantas, utilizando-se hipocótilos como fonte de explante, consistiram de: indução de calos na presença de NAA (5,4 μM) e KIN (6,9 μM); proliferação de calos com NAA (10,8 μM) e 2ip (0,5 μM); indução de gemas no meio regenerativo contendo NAA (2,7 μM) e KIN (2,3 μM) e indução de raízes com IAA (5,7 μM) e 6-BA (0,4 μM). Suspensões celulares estabelecidas em meio líquido contendo NAA (10,8 μM) e 2ip (1 μM) apresentaram 45% de células viáveis, 4% das quais originaram colônias, quando plaqueadas em meio sólido. O desenvolvimento de gemas foi observado quando calos das colônias foram cultivados em meio regenerativo. Anteras de uma única planta, cultivadas em meio contendo NAA (5,4 μM), 2,4-D (0,5 μM) e 2ip (0,05 μM) produziram calos a partir dos quais plantas puderam ser obtidas.

la subcultura no meio regenerativo. Observações citológicas indicaram que células de pontas de raízes, presentes em calos derivados de hipocótilo e anteras, tinham os números cromossômicos diplóides e haplóides esperados.

2.15. Trifolium incarnatum

BEACH & SMITH (1979) relataram a regeneração de plantas de "crimson clover" (*Trifolium incarnatum* L. cv. Auburn) utilizando hipocótilo como fonte de explante. Calos foram induzidos em meio básico B5 acrescido de NAA (11 μ M), 2,4-D (10 μ M) e KIN (10 μ M). Após 28-35 dias, os calos foram transferidos para meio secundário para posterior diferenciação. A combinação mais efetiva para o desenvolvimento de gemas e raízes foi o meio B5 com tiamina (59,3 μ M), NAA (10 μ M) e Ad (15 μ M). Como fontes de citocinina KIN, 2ip e 6-BA foram testadas, mas falharam em produzir gemas. Os sais inorgânicos de SH foram tão efetivos quanto aos de B5, em todas as etapas do processo. As plantas diferenciadas foram transplantadas para solo estéril e mantidas em uma câmara úmida e fria (18°C) por 10-14 dias e então transferidas para estufa.

2.16. Trifolium pratense

PHILLIPS & COLLINS (1979a) desenvolveram um meio de cultura quimicamente definido (PC-L2), capaz de sustentar o crescimento de células em meio sólido e líquido, de trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.). A regeneração de gemas em alta frequência (30-80% dos genótipos) ocorreu em

calos derivados de sub-meristemas cultivados no meio básico PC-L2 contendo picloram ($0,025 \mu\text{M}$), em combinação com 6-BA ($0,4 - 44 \mu\text{M}$). mantidos em cultura por 2-3 meses. NAA ($5,4 - 10,8 \mu\text{M}$) usado no lugar de picloram produziu resultados similares, enquanto que 2,4-D não foi efetivo para regeneração em calos derivados de sub-meristemas, mesmo em combinação com outras auxinas. As frequências de regeneração em calos derivados de tecidos não meristemáticos (cotilédone, pecíolo, folha, etc) foram muito menores do que a de calos derivados de sub-meristemas. Calos obtidos a partir de anteras exibiram um alto potencial morfogenético, obtendo-se um total de 35 plantas diplóides, a partir da cultura de duas anteras. O enraizamento das gemas obtidas foi feito no meio básico PC-L2 na metade da concentração normal, sem RCs, acrescido de ácido nicotínico ($8,1 \mu\text{M}$) e 3-AP ($21,2 \mu\text{M}$). O desenvolvimento vigoroso de raízes ocorreu em 85% das gemas, dentro de 2-5 semanas. A regeneração de plantas inteiras, a partir de calos derivados de sub-meristemas, foi obtida em cinco diferentes cultivares, porém eles não responderam igualmente ao meio de cultura. Os cultivares Altaswede, Arlington e Redman regeneraram em maior frequência do que os outros cultivares. 'Kenstar' não regenerou tão bem e 'Tensas' regenerou muito pouco. A diferença entre cultivares foi assim vista como uma variável importante na regeneração de plantas de trevo vermelho, a partir da cultura de calos. As plantas regeneradas foram cultivadas até a maturidade produzindo flôres normais.

As técnicas desenvolvidas por PHILLIPS &

COLLINS (1979a) permitiram a obtenção de plantas sadias de *T. pratense* cv. Kenstar, a partir da cultura de meristemas de plantas infectadas com vírus (PHILLIPS & COLLINS 1979b). O meio de cultura basal PC-L2, acrescido de picloram (0,17 μM) e 6-BA (4,4 μM) permitiu a recuperação de plantas de trevo vermelho. Maiores níveis de picloram resultou na proliferação de calos e indução de gemas adventícias múltiplas. Cerca de 90% das gemas foram enraizadas em meio contendo IAA (0,3 μM). Meristemas menores (0,1 mm) originaram plantas sem sintomas em maior proporção do que os meristemas de 0,4 mm. Testes biológicos com *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn demonstraram que 2/3 das plantas derivadas das culturas de meristema estavam "livres de vírus".

A possibilidade de aplicação de seleção genética a nível celular, para trevo vermelho, foi ampliada pela regeneração de plantas a partir da cultura de células em suspensão (PHILLIPS & COLLINS 1980). Através do plaqueamento de células em suspensão (meio PC-L2), derivadas de hipocótilo ou epicótilo do cultivar Arlington, foram obtidos embriões somáticos. A fonte e a concentração de auxina utilizada no meio regenerativo teve um efeito significativo na indução da embriogênese somática. Embriões foram formados em mais de 40% das culturas plaqueadas em meio basal PC-L2, suplementado com 2,4-D (0,045 μM) e Ad (14,8 μM). Plântules foram obtidos no mesmo meio ou após subcultura em meio contendo picloram (0,004 μM) e 6-BA (0,9 μM). A propagação e multiplicação de gemas pôde ser feita na presença de picloram

(0,012 μM) e 6-BA (2,2 μM). Estas gemas foram enraizadas em meio contendo 3-AP (26 μM) e IAA (1,1 μM). Das plantas regeneradas, 64% eram diplóides normais e se apresentaram férteis quando cruzadas com plantas do cultivar 'Ranstar'. Cruzamentos feitos entre as plantas regeneradas não produziram sementes sugerindo que elas tenham sido derivadas de uma única plântula ou genótipo, (provavelmente devido ao sistema de incompatibilidade gametofítica).

BEACH & SMITH (1979) descreveram um método diferente de PHILLIPS & COLLINS (1979a,b) para a obtenção de plantas de trevo vermelho (*T. pratense* cv. Arlington e cv. Lakeland) utilizando meio basal B5. A indução de calos ocorreu em meio contendo tiamina (29,6 μM), NAA (11 μM), 2,4-D (10 μM) e KIN (10 μM). Depois de aproximadamente 4 semanas, os calos foram subcultivados em meio secundário contendo tiamina (59,3 μM), NAA (11 μM) e Ad (15 μM). Após a regeneração de gemas, raízes foram induzidas em meio contendo NAA (1,1 μM). Como fonte de explante utilizou-se hipocótilo e ovários, sendo que tecidos de hipocótilo produziram calos em maior quantidade. As plantas cresceram até a maturidade e pareceram ser morfológicamente similares às plantas doadoras. As plantas regeneradas se mostraram incompatíveis com as plantas doadoras.

2.17. Trifolium repens

A regeneração de plantas de trevo branco (*Trifolium repens* L. var. S-100) a partir de culturas de cotilédones foi primeiramente demonstrada por PELLETIER & PEL

LETIER (1971). O meio de cultura básico para o estabelecimento das culturas conteve os macronutrientes de MS e os micronutrientes de Heller. A indução de calos foi feita na presença de 2,4-D (0,9 μ M) e KIN (0,5 μ M). Após duas subculturas, a cada 6 semanas, os calos foram transferidos para meio contendendo NAA (0,5 μ M), KIN (0,5 μ M) e AC (10%). Neste meio ocorreu a diferenciação de gemas e raízes e após várias subculturas obteve-se um total de 70 plântletes. Um meio contendo NAA (0,05 μ M) foi utilizado para desenvolver o sistema radicular dos plântletes regenerados, transferindo-se posteriormente as plantas para meio de serragem. A diferenciação de plântletes foi sempre precedida pela formação de uma folha simples, e a partir desta, folhas trifolioladas surgiram. A diferenciação de raízes ocorreu mais tarde, ou seja, no estádio de 3-4 folhas trifolioladas. O número de cromossomas foi analisado em 42 das 70 plantas recuperadas encontrando-se 76% com 31 cromossomas; 9,5% com o número normal de cromossomas ($2n = 32$); 9,5% com 30 cromossomas e finalmente 5% tetraplóides (62 cromossomas). As 70 plantas regeneradas foram derivadas de um único explante (cotilédone nº 126). Este resultado se deveria a um estado heterozigótico mais acentuado da planta doadora deste explante. Foi sugerido que a grande frequência de plantas com 31 cromossomas se deveria ao número cromossômico da planta original, ou seja, um aneuplóide de 31 cromossomas. A presença de tetraplóides com 62 cromossomas também reforçou esta hipótese.

A regeneração de plantas de *T. repens* cv. Ladino a partir da cultura de embriões, provenientes de seg

mentes com 2 dias de germinação, foi descrita por OSWALD *et al.* (1977). Um meio básico próprio foi desenvolvido para o estabelecimento das culturas. A indução de calos foi feita na presença de 2,4,5-T (19,6 μM) e KIN (0,5 μM). Após 10-14 dias os calos obtidos foram transferidos para meio líquido contendo 2,4-D (2,3 μM) e KIN (0,5 μM). A regeneração de gemas e plântules ocorreu após o plaqueamento em meio sólido de células desenvolvidas em suspensão por três semanas. O meio indutor continha 2,4-D (2,3 μM) e KIN. O nível de KIN do meio indutor foi determinante na frequência e velocidade de regeneração. Apenas duas entre 50 culturas regeneraram após três semanas em meio com KIN (0,46 μM). Em meio contendo KIN num nível 10 vezes mais elevado (4,6 μM), 37 entre 50 culturas regeneraram gemas visíveis dentro de uma semana. Após duas semanas os plântules se apresentavam com 5 mm de comprimento e em três semanas as folhas primárias começaram a desenvolver.

GRESSHOFF (1980) descreveu uma metodologia complexa para a regeneração de plantas de *T. repens* (NZ-5683). A partir da cultura de sementes, em meio composto pelos sais B5, KIN (0,5 μM), 2,4-D (4 μM) e CH (0,1%) foram obtidos calos friáveis, brancos, com ocasional rizogênese espontânea nas primeiras culturas. A transferência destes calos para meio contendo sais de MS, 2ip (2 μM) e IAA (0,5 μM) resultou no aparecimento de regiões compactas e verdes, após 23 dias de cultura (na presença de luz) e de estruturas semelhantes a folhas em 40 dias. A redução dos sais do MS para a metade da concentração normal, juntamente com a retirada de

IAA do meio de cultura resultou no desenvolvimento de gemas a partir das estruturas semelhantes a folhas, aos 60 dias de cultura. Aos 70 dias obteve-se múltiplas gemas. A rizogênese foi induzida aos 85 dias de cultura na presença dos sais de MS, 2ip ($1\ \mu\text{M}$) e IAA ($15\ \mu\text{M}$), em regime de fotoperíodo de 14 horas. As plantas foram transferidas para meio contendo os sais B5 na metade da concentração, 2ip ($0,1\ \mu\text{M}$) e IAA ($0,5\ \mu\text{M}$), para revigoramento. Aos 92 dias de cultura, as plantas foram transferidas para o solo. Esta sequência foi essencial para a recuperação de plantas. Houve grande variação no tamanho e forma das folhas. Similar variabilidade de plantas de trevo branco regeneradas *in vitro* foi reportada por PELLETIER & PELLETIER (1971). Estes autores encontraram grande variabilidade no número cromossômico, o que não foi detectado nas plantas regeneradas por GRESSHOF (1980). Suspensões celulares também foram estabelecidas a partir de calos inoculados em meio líquido B5 com KIN ($0,25\ \mu\text{M}$), 2,4-D ($2\ \mu\text{M}$) e CH ($0,1\%$) ou com KIN ($0,05\ \mu\text{M}$), 2,4-D ($4\ \mu\text{M}$) e CH ($0,05\%$). A partir dos agregados celulares das culturas em suspensão, protoplastos foram isolados enzimaticamente. A cultura de protoplastos ou de células isoladas na sequência metodológica estabelecida, resultou na recuperação de plantas. Foi sugerido que os centros morfogênéticos surgiriam *de novo* e não necessariamente representariam material derivado de semente.

2.18. Trigonella spp.

Trigonella corniculata L. (Piring) e *T. foenum-graecum* L. (Methi) são duas leguminosas de grande im

portância econômica na Índia, onde são usadas extensivamente como condimento.

A cultura de tecidos *in vitro* de *T. foenum-graecum* foi primeiramente apresentada por SUBRAMANIAM *et al.* (1968). A indução de calos em segmentos de hipocótilos foi feita em meio de MS, acrescido de AC. Um outro meio de cultura utilizando os sais de White modificado, suplementado com AC, IAA e KIN foi capaz de induzir a proliferação de calos em meristemas de raiz. A cultura destes explantes somente produziram calos, sem qualquer diferenciação posterior.

Explantes foliares de *T. corniculata* e *T. foenum-graecum* formaram calos, dentro de 5 semanas, quando cultivados em meio basal de MS ou White suplementado com NAA (2,7 μ M) e 15% de AC (SEN & GUPTA 1979). Entretanto, a indução de calos em *T. foenum-graecum* foi mais intensa no meio basal de MS, enquanto que explantes de *T. corniculata* formaram melhores calos no meio basal de White. Embora estas duas espécies tenham diferido quanto à solução salina básica para a indução de calos, a manutenção destes foi possível em solução nutritiva de MS. O meio completo de MS permitiu a regeneração de gemas em calos de ambas as espécies, porém em tempos e frequência diferentes. A ocorrência de folhas isoladas e estruturas semelhantes a gemas foi mais comum em *T. corniculata* do que em *T. foenum-graecum*. A diferenciação de raízes também foi observada em calos de ambas as espécies. A omissão de AC com subsequente adição de CH (500 mg/l) aumentou o número de gemas e raízes diferenciadas por calo. Maior

frequência de diferenciação foi observada para ambos os materiais, em condição de baixa irradiação (9000 lux), quando comparada à condição de alta irradiação (13000 lux) ou escuro. Estudos citológicos mostraram que inicialmente as células eram diplóides, mas após 5 subculturas os calos se tornaram mixaplóides, com populações celulares diplóides predominantes. Os órgãos diferenciados eram diplóides.

2.19. Vicia faba

A cultura de tecidos de *Vicia faba* L. foi inicialmente estabelecida por VENKETESWARAN (1962). Calos foram produzidos utilizando-se hipocótilos como fonte de explante. Posteriormente tecidos de raiz desta espécie foram testados para a produção de calos. Calos friáveis, proliferando-se ativamente foram induzidos na presença de 2,4-D (1 μ M) e EL (5 g/l). Estes calos quando inoculados em cultura líquida contendo 2,4-D (1 μ M) e AC (1%) formaram densa suspensão celular (GRANT & FULLER 1968). MITCHELL & GILDOW (1975) e JELASKA *et al.* (1981) também demonstraram a possibilidade de estabelecer culturas *in vitro* de tecidos de *Vicia faba*.

Técnica para propagação vegetativa de *Vicia faba* foi primeiramente descrita por AUBRY *et al.* (1975). Apíces meristemáticos e segmentos nodais foram cultivados em meio contendo os macronutrientes de MS, micronutrientes de Heller, IAA (0,01 - 1 μ M) ou NAA (0,01 - 1 μ M). Após quatro a cinco semanas de cultura observou-se o desenvolvimento de

raízes e gemas. As plântulas obtidas foram transferidas para estufa.

A possibilidade de multiplicação vegetativa de *Vicia faba*, visando atenuar o problema da instabilidade da esterilidade macho-citoplasmática, foi também demonstrada por MARTIN *et al.* (1979). A diferenciação de gemas ocorreu a partir de meristemas cultivados em meio de MS, suplementado com GA₃ (0,1 µM) e 6-BA (1 µM). Subculturas na presença de GA₃ (0,5 µM) permitiu o desenvolvimento das gemas diferenciadas pelo alongamento dos internós. Após 4-5 subculturas mensais numerosas gemas foram obtidas na base das plântulas desenvolvidas. Fragmentos de internós cultivados em meio de MS acrescido de KIN (0,5 µM) e NAA (1 µM) formaram calos com diferenciação de raízes. A adição de carbono ativo (20 g/l) melhorou o crescimento de calos. Tentativas de regenerar plantas a partir dos calos obtidos não levaram a resultados positivos.

Plantas de *Vicia faba* "minor" cultivadas *in vitro* foram utilizadas como fonte de ápices meristemáticos para estudar o processo regenerativo nesta espécie (GALZY & HAMOUI 1981). Várias combinações e diferentes fontes de auxinas e citocininas foram testadas em meio básico de MS, visando a proliferação de calos e a regeneração de plantas. A melhor proliferação de calos ocorreu na presença de NAA (5,4 µM) e 6-BA (22 µM) em culturas mantidas por 22 dias sob a luz. A transferência destes calos para meios secundários com níveis reduzidos dos RCs, permitiu o desenvolvimento

to de gemas pré-existentes no explante. A melhor resposta foi obtida na presença de NAA (0,5 μ M) e 6-BA (2,2 μ M). Neste meio, 25% das culturas mantidas na luz e 30% das culturas mantidas no escuro desenvolveram gemas. A subcultura mensal, em meio secundário, aumentou a frequência de obtenção de plântulas até a terceira passagem (100 dias). Para enraizamento das gemas, utilizou-se NAA (0,5 μ M). O desenvolvimento posterior das plântulas foi obtido no meio básico acrescido de carvão ativo (3 g/l).

2.20. Outras leguminosas

COLLINS *et al.* (1978) utilizaram tecidos de "jack bean" (*Canavalia ensiformis* DC.) entre outros, para comparar o efeito de picloram com o de outras auxinas, na indução e crescimento de calos. As condições para o estabelecimento e a manutenção de cultura de calos e células em suspensão de "sweet clover" (*Melilotus alba* Desr.) foram descritas por TAIRA *et al.* (1977). Tanto a indução de calos como o estabelecimento de células em suspensão foram dependentes da adição de 2,4-D (9 μ M) ao meio de cultura. O crescimento dos calos foi aumentado na presença de CH (0,9 g/l). Suspensões celulares foram melhor estabelecidas na presença de 2,4-D (0,9 μ M). Abundante formação de raízes ocorreu em alguns dos meios testados, porém regeneração de plantas não foi descrita. Cultura de calos e células em suspensão foram descritas para *Trifolium hybridum* L. - "alsike clover" (SCHENK & HILDEBRANDT 1972) e *Trifolium subterraneum* L. - "subterranean clover" (GRAHAM 1968).

Tentativas de produzir raízes em folhas trifolioladas destacadas de "cowpea" (*Vigna sinensis* Endl.) resultaram na formação de calos, raízes e gemas na região de corte dos pecíolos (INDIRA & RAMADASAN 1967). O desenvolvimento de gemas ocorreu quando os pecíolos foram submersos em solução nutritiva contendo IAA (0,1; 1,0 ou 10 μM). Este foi o primeiro relato de ocorrência de organogênese em "cowpea", porém sem a utilização de métodos de cultura *in vitro*.

SUBRAMANIAM *et al.* (1968) observaram que enquanto culturas de pontas de raízes de *V. unguiculata* (L.) Walp. desenvolviam apenas raízes, calos obtidos de meristemas de raiz e apical apresentavam desenvolvimento de algumas plântulas. Calos regenerados de protoplastos de folhas de "cowpea" (DAVEY *et al.* 1974) se mantiveram em estado indiferenciado quando em meio de SH ou MS acrescido de 2,4-D (4,5 μM). Várias interações auxina/citocinina foram testadas para induzir gemas e raízes nestes calos. Ocasionalmente, estruturas globulares semelhantes a gemas, se desenvolveram em meio de NT (sem manitol), suplementado com IAA (2,8 μM) e 6-BA (2,2 μM). Estas estruturas globulares, na sua maioria, não se desenvolveram além deste estágio. Algumas destas estruturas produziram raízes quando em meio de Blaydes, acrescido de 2 g/l de EL (meios sólido e líquido). A diferenciação de raízes nos calos foi prolífica na maioria dos meios testados, especialmente na presença de NAA ou IAA (0,5 - 5,0 μM), combinado com uma citocinina (6-BA, 2ip ou KIN) na faixa de concentração entre 0 - 25 μM .

IX BIBLIOGRAFIA

- ABO EL-NIL, M.M. - 1977. Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Sci. Lett.* 9: 259-264.
- ABO EL-NIL, M.M. & A.C. HILDEBRANDT - 1971. Differentiation of virus-symptomless geranium plants from anther callus. *Plant Dis. Rep.* 55: 1017-1020.
- ARNISON, P.G. & W.G. BOLL - 1974. Isoenzymes in cell cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Contender): isoenzymatic changes during the callus culture cycle and differences between stock cultures. *Can. J. Bot.* 52(12): 2621-2629.
- ARNISON, P.G. & W.G. BOLL - 1975. Isoenzymes in cell cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Contender): isoenzymatic differences between stock suspension cultures derived from a single seedling. *Can. J. Bot.* 53: 261-271.
- ARNISON, P.G. & W.G. BOLL - 1976. The effect of 2,4-D and kinetin on the morphology, growth, and cytochemistry of peroxidase of catyledon cell suspension cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Contender). *Can. J. Bot.* 54: 1847-1856.

- ARNISON, P.G. & W.G. BOLL - 1978. The effect of 2,4-D and kinetin on the activity and isoenzyme pattern of various enzymes in cotyledon cell suspension cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Contender). *Can. J. Bot.* 56: 2185-2195.
- ARNOLD, S.V. & T. ERIKSSON - 1976. Factors influencing the growth and division of pea mesophyll protoplasts. *Physiol. Plant.* 36: 193-196.
- AUBRY, A.M.; P. DUTUIT; H. THIELLEMENT; A. BERVILLE - 1975 . Propagation végétative de la féverole (*Vicia faba*) à partir de fragments de tiges. *Ann. Amélior. Plantes* 25: 225-229.
- BAJAJ, Y.P.S. - 1970. Effect of gamma-irradiation on growth, RNA, protein and nitrogen contents of bean callus cultures. *Ann. Bot.* 34: 1089-1096.
- BAJAJ, Y.P. & M.S. DHANJU - 1979. Regeneration of plants from apical meristem tips of some legumes. *Curr. Sci.* 48: (20): 906-907.
- BAJAJ, Y.P.S.; A.K. RAM; K.S. LABANA; H. SINGH - 1981. Regeneration of genetically variable plants from the anther-derived callus of *Arachis hypogaea* and *Arachis villosa*. *Plant Sci. Lett.* 23: 35-39.

- BAJAJ, Y.P.S. & A.W. SAETTLER - 1970. Effect of halotoxin - containing filtrates of *Pseudomonas phaseolicola* on the growth of bean callus tissue. *Phytopathol.* 60: 1065-1067.
- BAJAJ, Y.P.S.; A.W. SAETTLER; M.W. ADANS - 1970. Gamma irradiation studies on seeds, seedlings and callus tissue cultures of *Phaseolus vulgaris* L.. *Radiat. Bot.* 10: 119- 124 (citado por CROCOMO *et al.* 1975).
- BAJAJ, Y.P.S.; H. SINGH; S.S. GOSAL - 1980. Haploid embryogenesis in anther cultures of pigeon-pea (*Cajanus cajan*). *Theoret. Appl. Genet.* 58: 157.
- BAKER, C.J.; J.R. AIST; D.F. BATEMAN - 1980. Ultrastructural and biochemical effects of endopeptidase lyase on cell walls from cell suspension cultures of bean and rice. *Can. J. Bot.* 58: 867-880.
- BAKER, R. & D.J. PHILLIPS - 1962. Obtaining pathogen free stock by shoot tip culture. *Phytopathol.* 52: 1242-1244.
- BARONCELLI, S.; M.BUIATTI; A. BENNICI - 1973. Genetics of growth and differentiation *in vitro* of *Brassica oleracea* var. *botrytis*. *Z. Pflanzenzuchtg.* 70: 99-107 (citado por EVANS *et al.* 1981).
- BASSIRI, A. & P.S. CARLSON - 1978. Isozyme patterns and differences in plant parts and their callus cultures in com-

mon Bean. *Crop Sci.* 18: 955-958.

BEACH, K.H. & R.R. SMITH - 1979. Plant regeneration from callus of red and crimson clover. *Plant Sci. Lett.* 16: 231-237.

BERGMANN, L. - 1960. Growth and division of single cells of higher plants *in vitro*. *J. Gen. Physiol.* 43: 841-851.

BEVERSDORF, W.D. & E.T. BINGHAM - 1977. Degrees of differentiation obtained in tissue cultures of *Glycine* species. *Crop Sci.* 17(2): 307-311.

BHARAL, S. & A. RASHID - 1979a. Hypocotyl, stem, callus and leaves of the legume *Vigna sinensis* as systems for isolation of protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* 92: 465-468.

BHARAL, S. & A. RASHID - 1979b. Regeneration of plants from tissue cultures of the legume, *Indigofera enneaphylla* Linn.. *Z. Pflanzenphysiol.* 92: 443-447.

BINDING, H. & R. NEHLS - 1978. Regeneration of isolated protoplasts of *Vicia faba* L.. *Z. Pflanzenphysiol.* 88: 327-332.

BINGHAM E.T.; L.V. HURLEY; D.M. KAATZ; J.W. SAUNDERS - 1975. Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. *Crop Sci.* 15: 719-721.

- BLAYDES, D.F. - 1966. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue. *Physiol. Plant.* 19: 748-753.
- BONNER, J. & P.S. DEVIRIAN - 1939. Growth factor requirements of four species of isolated roots. *Amer. J. Bot.* 26: 661-665.
- BOTTINO, P.J.; C.E. MAIRE; L.M. GOFF - 1979. Tissue culture and organogenesis in the winged bean. *Can. J. Bot.* 57: 1773-1776.
- BRAAK, J.P. & E. KOOISTRA - 1975. A successful cross between *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus ritensis* Jones with the aid of embryo culture. *Euphytica* 24: 669-679.
- BUI DANG HA, D.; B. NORREEL; A. MASSET - 1975. Regeneration of *Asparagus officinalis* L. through callus cultures derived from protoplasts. *J. Exp. Bot.* 26: 263-270.
- CHENG, T.Y. - 1977. Factors effecting adventitious bud formation of cotyledon culture of douglas fir. *Plant Sci. Lett.* 9: 179-187.
- CHENG, T.Y.; H. SAKA; T.H. VOQUI-DINH - 1980. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. *Plant Sci. Lett.* 19: 91-99.

COLLINS, G.B.; W.E. VIAN; G.C. PHILLIPS - 1978. Use of 4-amino - 3,5,6 - trichloropicolinic acid as an auxin source in plant tissue cultures. *Crop Sci.* 18: 286-288.

CONSTABEL, F.C. - 1973. Development of protoplast fusion products, heterokaryocytes and hybrid cells. In: T.A. THORPE (ed.) *Frontiers of plant tissue culture*. Calgary, University of Calgary Press, p. 141-150.

CONSTABEL, F.; J.W. KIRKPATRICK; O.L. GAMBORG - 1973. Callus formation from mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. *Can. J. Bot.* 51: 2105-2106.

CONSTABEL, F.; G. WEBER; J.W. KIRKPATRICK; K. PAHL - 1976. Cell division of intergeneric protoplast fusion products. *Z. Pflanzenphysiol.* 79: 1-7.

CROCOMO, O.J.; L.A. GALLO; G.S. TONIN; N. SACCHI - 1979. Developmental control of *Phaseolus vulgaris* using embryo axis culture. *Energ. Nucl. Agric., Piracicaba*, 1(1): 55-58.

CROCOMO, O.J.; J.E. PETERS; W.R. SHARP - 1975. A literature review and the requirements for growth of *Phaseolus vulgaris* in tissue culture. *Arq. Biol. Tecnol.* 18: 25-31.

CROCOMO, O.J.; W.R. SHARP; J.E. PETERS - 1976a. Plantlet

morphogenesis and the control of callus growth and root induction of *Phaseolus vulgaris* with the addition of a bean seed extract. *Z. Pflanzenphysiol.* 78(5): 456-460.

CROCOMO, O.J.; J.E. PETERS; W.R. SHARP - 1976b. Interactions of phytohormones on the control of growth and root morphogenesis in cultured *Phaseolus vulgaris* leaf explants. *Turrialba* 26(3): 232-236.

DAVEY, M.R.; E. BUSH; J.B. POWER - 1974. Cultural studies of a dividing legume leaf protoplast system. *Plant Sci. Lett.* 3: 127-133.

DAVIS, D.G. & R.H. SHIMABUKURO - 1980. Studies of herbicide toxicity and mode of action using isolated mesophyll cells and callus - derived cell suspensions. *Can. J. Bot.* 58: 1482-1489.

DE VILLIERS, O.T. & F.M. ASHTON - 1976. Effects of IAA, GA e ethrel on biochemical processes in isolated mesophyll cells. *Agroplantae* 8: 87-90.

DIXON, R.A. & K.W. FULLER - 1976. Effects of synthetic auxin levels on phaseollin production and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in tissue cultures of *Phaseolus vulgaris* L.. *Physiol. Plant Pathol.* 9: 299-312 (citado por DIXON & FULLER 1977).

- DIXON, R.A. & K.W. FULLER - 1977. Characterization of components from culture filtrates of *Botrytis cinerea* which stimulate phaseollin biosynthesis in *Phaseolus vulgaris* cell suspension cultures. *Physiol. Plant Pathol.* 11: 287-296.
- DIXON, R.A. & K.W. FULLER - 1978. Effects of growth substances on non-induced and *Botrytis cinerea* culture filtrate-induced phaseollin production in *Phaseolus vulgaris* cell suspension cultures. *Physiol. Plant Pathol.* 12: 279-288.
- DONN, G. - 1978. Cell division and callus regeneration from leaf protoplasts of *Vicia narbonensis*. *Z. Pflanzenphysiol.* 86: 65-75.
- DOUGALL, D.K. - 1964. A method of plant tissue culture giving high growth rates. *Exp. Cell Res.* 33: 438-444 (citado por CROCOMO *et al.* 1975).
- EVANS, D.A.; W.R. SHARP; C.E. FLICK - 1981. Plant regeneration from cell cultures. In: J. JANICK (ed.) *Horticultural Reviews*, vol. 3. Conn., AVI Publishing Westport, p. 214-314.
- EVANS, D.A.; W.R. SHARP; E.F. PADDOCK - 1976. Variation in callus proliferation and root morphogenesis in leaf tissue cultures of *Glycine max*, Strain T219. *Phytomorphol.*

26: 379-384.

- FOSKET, D.E. & J.G. TORREY - 1969. Hormonal control of cell proliferation and xylem differentiation in cultured tissues of *Glycine max* var. Biloxi. *Plant Physiol.* 44: 871-880.
- FOWKE, L.C. - 1977. Fine structure of fusion products from soybean cell culture and pea leaf protoplasts. *Planta* 135: 257-266.
- FOWKE, L.C.; P.J. RENNIE; J.W. KIRKPATRICK - 1976. Ultrastructure of fusion products from soybean cell culture and sweet clover leaf protoplasts. *Planta* 130: 39-46.
- FRAME, R.; C.T. WHEELER; B.G. BOWES; D.E.S. STEWART-TULL - 1976. The distribution of the protein phaseolin in the intact plant and cultured tissues of *Phaseolus vulgaris* L.. *New Phytol.* 77: 25-28.
- FRIDBORG, G. - 1971. Growth and organogenesis in tissue cultures of *Allium cepa* var. *proliferum*. *Physiol. Plant.* 25: 436-460.
- GALE, J. & W.G. BOLL - 1979. Growth of bean cells in suspension culture in the presence of NaCl and protein - stabilizing factors. *Can. J. Bot.* 57: 777-782.

- GALZY, R. & M. HAMOUI - 1981. Induction de l'organogénèse sur des cals de *Vicia faba* minor provenant d'apex. *Can. J. Bot.* 59: 203-207.
- GAMBORG, O.L. - 1966. Aromatic metabolism in plants. II. Enzymes of the shikimate pathway in suspension cultures of plant cells. *Can. J. Biochem.* 44: 791-799.
- GAMBORG, O.L. - 1970. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. *Plant Physiol.* 45: 372-375.
- GAMBORG, O.L. - 1977 - Somatic cell hybridization by protoplast fusion and morphogenesis. In: W. BARZ; E. REINHARD; M.H. ZENK (eds.) *Plant tissue culture and its biotechnological application*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 287-301.
- GAMBORG, O.L.; F. CONSTABEL; L. FOWKE; K.N. KAO; K. OHYAMA; K. KARTHA; L.E. PELCHER - 1974b. Protoplast and cell culture methods in somatic hybridization in higher plants. *Can. J. Genet. Cytol.* 16: 737-750.
- GAMBORG, O.L.; F. CONSTABEL; J.P. SHYLUK - 1974a. Organogenesis in callus from shoot apices of *Pisum sativum*. *Physiol. Plant.* 30: 125-128.

- GAMBORG, O.L. & D.E. EVELEIGH - 1968. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.* 46: 417-421.
- GAMBORG, O.L. & A.J. FINLAYSON - 1969. The amino acid composition of TCA-precipitated proteins and of total residues of plant cells grown in suspension culture. *Can. J. Bot.* 47: 1857-1863.
- GAMBORG, O.L.; R.A. MILLER; K. OJIMA - 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- GAMBORG, O.L.; J. SHYLUK; K.K. KARTHA - 1975. Factors affecting the isolation and callus formation in protoplasts from the shoot apices of *Pisum sativum* L.. *Plant Sci. Lett.* 4: 285-292.
- GAUTHRET, R.J. - 1939. Sur la possibilite de realiser la culture indefinie des tissus de tubercules de carotte. *C. R. Acad. Sci., Paris* 208: 118-121 (citado por EVANS *et al.* 1981).
- GAUTHERET, R.J. 1959. La culture des tissus vegetaux. Masson et Cie, Paris (citado por EVANS *et al.* 1981).
- GHARYAL, P.K. & S.C. MAHESHWARI - 1980. Plantlet formation

- from callus cultures of a legume *Lathyrus sativus* cv. L. S.D. - 3. Z. Pflanzenphysiol. 100: 359-362.
- GRAHAM, P.H. - 1968. Growth of *Medicago sativa* L. and *Trifolium subterraneum* L. in callus and suspension culture. *Phyton*. 25: 159-162.
- GRANT, M.E. & K.W. FULLER - 1968. Tissue culture of root cells of *Vicia faba*. *J. Exp. Bot.* 19: 667-680.
- GREEN, C.E. & R.L. PHILLIPS - 1975. Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Sci.* 15: 417-421.
- GREGORY, H.M.; N. HAQ; P.K. EVANS - 1980. Regeneration of plantlets from leaf callus of the winged bean *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. *Plant Sci. Lett.* 18(4): 395-400.
- GRESSHOFF, P.M. - 1980. In vitro culture of white clover : callus, suspension, protoplast culture, and plant regeneration. *Bot. Gaz.* 141(2): 157-164.
- HABERLANDT, G. - 1902. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungser. Math-Naturwiss. Kl. Kaiser Akad. Wiss. Wien III*: 69-92 (citado por VASIL et al. 1979).
- HACCIUS, B. & K.K. LAKSHMANAN - 1965. Adventive embryony in

- callus culture of *Nicotiana* under high light intensity. *Planta (Berl.)* 65: 102-104.
- HADDON, L. & D.H. NORTHCOTE - 1976. The effect of growth conditions and origin of tissue on the ploidy and morphogenetic potential of tissue cultures of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Exp. Bot.* 27(100): 1031-1051.
- HALPERIN, W. - 1966. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. *Amer. J. Bot.* 53: 443-453.
- HALPERIN, W. & W.A. JENSEN - 1967. Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. *J. Ultrastruct. Res.* 18: 428-443.
- HANH, T.T.; H. LIE-SCHRICKE; K. TRAN THANH VAN - 1981. Direct *in vitro* bud formation from fragments and thin cell layers of different organs of the winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L. DC). *Z. Pflanzenphysiol.* 102: 127-139.
- HARGREAVES, J.A. & C. SELBEY - 1978. Phytoalexin formation in cell suspensions of *Phaseolus vulgaris* in response to an extract of bean hypocotyls. In: *Resúmenes analíticos sobre Fríjol. III* (1978): 27 Centro de Información sobre fríjol. CIAT (Resúmenes).

- HELLER, R. - 1953. Recherches sur la nutrition minerale des tissue végétaux cultivés *in vitro*. Thèses, Faculté des Sciences, L'Universite de Paris, 233pp.
- HILDEBRANDT, A.C.; J.C. WILMAR; H. JOHNS; A.J. RIKER - 1963. Growth of edible chlorophyllous plant tissues *in vitro*. *Amer. J. Bot.* 50: 248-254.
- HOLSTEN, R.D.; R.C. BURNS; R.W.F. HARDY; R.R. HEBERT - 1971. Establishment of symbiosis between *Rhizobium* and plant cells *in vitro*. *Nature* 232: 173-176.
- INDIRA, P. & A. RAMADASAN - 1967. Shoot formation from the callus tissue of hormone treated cowpea leaves. *Curr. Sci.* 36(22): 616-617.
- JACOBY, B. & J. DAGAN - 1967. A comparison of two methods of investigating sodium uptake by bean-leaf cells and the vitality of isolated leaf-cells. *Protoplasma* 64: 325-329.
- JAIN, S.C. & P. KHANNA - 1974. Quercetin from *Crotalaria juncea* Linn. tissue cultures. *Indian J. Exp. Biol.* 12: 466 (citado por RAJ BHANSALI *et al.* 1978b).
- JEFFS, R.A. & D.H. NORTHCOTE - 1967. The influence of indol-3 yl acetic acid and sugar on the pattern of induced differentiation in plant tissue culture. *J. Cell Sci.* 2:77-

73.

- JELASKA, S. - 1974. Embriogenesis and organogenesis in pumpkin explants. *Physiol. Plant.* 31: 257-261.
- JELASKA, S.; B. PEVALEK; D. PAPES[✓]; Z. DEVIDĚ - 1981. Developmental aspects of long-term callus cultures of *Vicia faba* L.. *Protoplasma* 105: 285-292.
- JONES, L.H. - 1974. Factors influencing embryogenesis in carrot cultures (*Daucus carota* L.). *Ann. Bot.* 38: 1077-1083.
- KAMEYA, T. & J. WIDHOLM - 1981. Plant regeneration from hypocotyl sections of *Glycine* species. *Plant Sci. Lett.* 21: 289-294.
- KANT, U. & A.C. HILDEBRANDT - 1969. Morphology of edible plant cells and tissues *in vitro*. *Can. J. Bot.* 47: 849 - 852.
- KAO, K.N. - 1977. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean-*Nicotiana glauca*. *Molec. gen. Genet.* 150: 225-230.
- KAO, K.N.; W.A. KELLER and R.A. MILLER - 1970. *Exp. Cell Res.* 62: 338 (citado por SANTOS *et al.* 1980).

- KAO, K.N. & M.R. MICHAYLUK - 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* 126: 105-110.
- KAO, K.N. & M.R. MICHAYLUK - 1980. Plant Regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. *Z. Pflanzenphysiol.* 96: 135-141.
- KAO, K.N. & M.R. MICHAYLUK - 1981. Embryoid formation in alfalfa cell suspension cultures from different plants. *In Vitro* 17: 645-648.
- KARTHA, K.K. & O.L. GAMBORG - 1975. Elimination of cassava mosaic disease by meristem culture. *Phytopathol.* 65: 826-828.
- KARTHA, K.K.; O.L. GAMBORG; F. CONSTABEL - 1974. Regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) plants from shoot apical meristems. *Z. Pflanzenphysiol.* 72: 172-176.
- KARTHA, K.K.; N.L. LEUNG; O.L. GAMBORG - 1979. Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration *Plant Sci. Lett.* 15: 7-15.
- KELLER, H.; H. WANNER; T.W. BAUMANN - 1972. Caffeine synthesis in fruits and tissue cultures of *Coffea arabica*. *Plan*

ta 108: 339-350.

KESSEL, R.H.J. & A.H. CARR - 1972. The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*) tissue. *J. Exp. Bot.* 23: 996-1007.

KIMBALL, S.L. & E.T. BINGHAM - 1973. Adventitious bud development of soybean hypocotyl sections in culture. *Crop. Sci.* 13: 758-760.

KOHLLENBACH, H.W. - 1973. Comparative somatic embryogenesis. In: T.A. THORPE (ed.) *Frontiers of plant tissue culture*. Calgary, Univ. Calgary Offset Printing Services, p. 59 - 66.

KOTTE, W. - 1922. Wurzelmeristem in Gewebekultur. *Ber. dt. Bot. Ges.* 40: 269-272.

KUBEK, D.J. & M.L. SHULER - 1978a. On the generality of methods to obtain single-cell plant suspension cultures. *Can. J. Bot.* 56: 2521-2527.

KUBEK, D.J. & M.L. SHULER - 1978b. A rapid quantitative method to measure growth of plant cell suspension cultures. *Can. J. Bot.* 56: 2340-2343.

LAMPORT, D.T.A. - 1964. Cell suspension cultures of higher

- plants: isolation and growth energetics. *Exp. Cell Res.* 33: 195-206 (citado por CROCOMO *et al.* 1975).
- LANDGREN, C.R. & J.G. TORREY - 1973. The culture of protoplasts derived from explants of seedling pea roots. In: J. TEMPE (ed.) *Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales*. Coll. Int. C.N.R.S. (Paris), n° 212. 281-285 (citado por CONSTABEL *et al.* 1973).
- LIAU, D.F. & W.G. BOLL - 1970. Callus and cell suspension culture of bush bean (*Phaseolus vulgaris*). *Can. J. Bot.* 48: 1119-1130.
- LIAU, D.F. & W.G. BOLL - 1971. Growth and patterns of growth and division of cell suspension cultures of bush beans (*P. vulgaris* cv. Contender). *Can. J. Bot.* 49: 1131-1139.
- LIAU, D.F. & W.G. BOLL - 1972. Extracellular polysaccharide from cell suspension cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Contender). *Can. J. Bot.* 50: 2031-2037.
- LINDSEY, D.L. - 1967. Growth of beans, tomatoes and corn under gnotobiotic conditions. *Phytopathol.* 57: 960-964.
- LINSMAIER, E.M. & F. SKOOG - 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*

18: 100-127.

MALMBERG, R.L. - 1979. Regeneration of whole plants from callus cultures of diverse genetic lines of *Pisum sativum* L.. *Planta* 146: 243-244.

MANETTI, J.M. - 1981. Tolerância de tecidos de cenoura (*Daucus carota* L.) a níveis elevados de Manganês. Indução e Seleção. Tese de Mestrado. UNICAMP, SP.

MANTE, S. & W.G. BOLL - 1975. Comparison of growth and extracellular polysaccharide of cotyledon cell suspension cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Contender) grown in coconut - milk medium and synthetic medium. *Can. J. Bot.* 53: 1542-1548.

MANTE, S. & W.G. BOLL - 1976. Changes in the amount and composition of fractions from extracellular polysaccharide during the culture cycle of cotyledon cell suspension culture of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Contender) *Can. J. Bot.* 54: 198-201.

MARTIN, C.; M. CARRÉ; G. DUC - 1979. Note sur les cultures de tissus de féverole (*Vicia faba* L.) Bouturage, culture de cals, culture de méristèmes. *Ann. Amélior. Plantes.* 29 (3): 277-287.

- MATSUOKA, H. & K. HINATA - 1979. NAA-induced organogenesis and embryogenesis in hypocotyl callus of *Solanum melongena* L.. *J. Exp. Bot.* 30: 363-370.
- MATTHEWS, B.F. & J.M. WIDHOLM - 1979. Enzyme expression in soybean cotyledon, callus and cell suspension culture. *Can. J. Bot.* 57: 299-304.
- MCCOY, T.J. & E.T. BINGHAM - 1977. Regeneration of diploid alfalfa plants from cells grown in suspension culture. *Plant. Sci. Lett.* 10: 59-66.
- MEER, A.W.O.; R.L.M. PIERIK; S. ROEST - 1971. Effects of sugar, auxin and light on adventitious root formation in isolated stem explants of *Phaseolus* and *Rhododendron*. *Meded. Fac. Landbouwwet Rijksuniv Gent* 36: 511-518 (citado por CROCOMO et al. 1975).
- MEHTA, A.R. 1966. *In vitro* initiation and growth of root callus of *Phaseolus vulgaris* L. *Indian J. Exp. Bio.* 4: 187-188 (citado por CROCOMO et al. 1975).
- MEHTA, A.R.; G.G. HENSHAW; H.E. STREET - 1967. Aspects of growth in suspension cultures of *Phaseolus vulgaris* L. and *Linum usitatissimum* L. *Indian J. Plant Physiol.* 10: 44-53 (citado por CROCOMO et al. 1975).

- MIFLIN, B.J. - 1969. A technique for the sterile culture of germinating barley embryos. *J. Exp. Bot.* 20: 805-809.
- MILLER, C.O. - 1965. Evidence for the natural occurrence of zeatin and derivatives: compounds from maize which promote cell division. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 54: 1052-1058.
- MILLER, R.A.; J.P. SHYLUK; O.L. GAMBORG; J.W. KIRKPATRICK - 1968. Phytostat for continuous culture and automatic sampling of plant-cell suspensions. *Science* 159: 540-542.
- MITCHELL, J.P. & F.E. GILDOW - 1975. The initiation and maintenance of *Vicia faba* tissue cultures. *Physiol. Plant.* 34: 250-253.
- MOK, M.C. & D.W.S. MOK - 1977. Genotypic responses to auxins in tissue cultures of *Phaseolus*. *Physiol. Plant.* 40: 261-264.
- MOK, M.C.; D.W.S. MOK; D.J. ARMSTRONG - 1978a. Differential cytokinin structure-activity relationships in *Phaseolus*. *Plant Physiol.* 61: 72-75.
- MOK, D.W.S.; M.C. MOK; A. RABAKOARIHANTA - 1978b. Interspecific hybridization of *Phaseolus vulgaris* with *P. lunatus* and *P. acutifolius*. *Theoret. Appl. Genet.* 52: 209-215.

- MOKHTARZADEH, A. & M.J. CONSTANTIN - 1978. Plant regeneration from hypocotyl - and anther - derived callus of Berseem Clover. *Crop Sci.* 18: 567-572.
- MONACO, L.C.; M.R. SONDAHL; A. CARVALHO; O.J. CROCOMO; W.R. SHARP - 1977. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: J. REINERT; Y.P.S. BAJAJ (eds.) *Applied and fundamental aspects of plant cell tissue, and organ culture*. New York, Springer - Verlag Berlin Heidelberg, p. 109-129.
- MOREL, G. & J.F. MILLER - 1964. La culture *in vitro* du méristème apical de la pomme de terre. *Compt. Rend.* 258: 5250-5252 (citado por QUAK 1977).
- MUKHOPADHYAY, A. & S.S. BHOJWANI - 1978. Shoot-bud differentiation in tissue cultures of leguminous plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 88: 263-268.
- MURASHIGE, T. - 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25: 135-166.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG - 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- NAGATA, T. & I. TAKEBE - 1971. Plating of isolated tobacco

- mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99: 12-20.
- NARAYANASWAMY, S. - 1977. Regeneration of plants from tissue cultures. In: J. REINERT; Y.P.S. BAJAJ (eds.) *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture*. New York, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 179-206.
- NICKELL, L.G. - 1956. The continuous submerged cultivation of plant tissue as single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 42: 848-850.
- NIIZEKI, M. & W.F. GRANT - 1971. Callus, plantlet formation, and polyploidy from cultured anthers of *Lotus* and *Nicotiana*. *Can. J. Bot.* 49: 2041-2051.
- NOVAK, F.J. - 1977. *In vitro* techniques in garlic (*Allium sativum* L.) breeding. In: *Use of tissue cultures in plant breeding*. Proc. Intern. Symp., Czechoslovak Acad. Sci., Prague.
- OPPENORTH, J.M. - 1976. Experiments on root formation. II. The effects of IAA and kinetin on the anatomy of the petiole of *Phaseolus vulgaris*. In: *Resúmenes analíticos sobre Frijol*. II(1978): 5. Centro de Información sobre frijol. CIAT (Resúmenes).

- OSWALD, T.H.; A.E. SMITH; D.V. PHILLIPS - 1977. Callus and plantlet regeneration from cell cultures of Ladino Clover and Soybean. *Physiol. Plant.*, 39: 129-134.
- PADMANABHAN, V.; E.F. PADDOCK; W.R. SHARP - 1974. Plantlet formation from *Lycopersicon esculentum* leaf callus. *Can. J. Bot.* 52: 1429-1432.
- PAREEK, L.K. & N. CHANDRA - 1978. Somatic embryogenesis in leaf callus from cauliflower (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*). *Plant Sci. Lett.* 11: 311-316.
- PELCHER, L.E.; O.L. GAMBORG; K.N. KAO - 1974. Bean mesophyll protoplasts: production, culture and callus formation. *Plant Sci. Lett.* 3: 107-111.
- PELLETIER, G. & A. PELLETIER - 1971. White clover (*Trifolium repens*) tissue culture, *in vitro* variability of regenerated plants. *Ann. Amélior. Plant.* 21: 221-233.
- PETERS, J.E.; O.T. CROCOMO; W.R. SHARP - 1976. Effect of caffeine and nicotine on the callus growth and root morphogenesis of *Phaseolus vulgaris* tissue cultures. *Turrialba* 26(4): 337-341.
- PETERS, J.E.; O.J. CROCOMO; W.R. SHARP; E.F. PADDOCK; I. TEGENKAMP; T. TEGENKAMP. - 1977. Development of haploid

callus cells from pollen of *Phaseolus vulgaris*. *Phytomorphol.* 27: 79-85.

PHILLIPS, D.A. - 1974a. Factors affecting the reduction of acetylene by *Rhizobium* -soybean cell associations *in vitro*. *Plant Physiol.* 53: 67-72.

PHILLIPS, D.A. - 1974b. Promotion of acetylene reduction by *Rhizobium* -soybean cell associations *in vitro*. *Plant Physiol.* 54: 654-655.

PHILLIPS, G.C. & G.B. COLLINS - 1979a. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Sci.* 19: 59-64.

PHILLIPS, G.C. & G.B. COLLINS - 1979b. Virus symptom-free plants of red clover using meristem culture. *Crop Sci.* 19: 213-216.

PHILLIPS, G.C. & G.B. COLLINS - 1980. Somatic embryogenesis from cell suspension cultures of Red Clover. *Crop Sci.* 20: 323-326.

PIERIK, R.L.M. 1979. *In vitro* culture of higher plants. Ponsen en Looijen, Wageningen.

QUAK, F. - 1977. Meristem culture and virus - free plants .

In: J. REINERT & Y.P.S. BAJAJ (eds.) *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture*. New York, Springer - Verlag, p. 598-615.

RAJ BHANSALI, R.; A. KUMAR; H.C. ARYA - 1978a. Morphogenesis in somatic callus culture of *Crotalaria* spp. p. 34. *Proc. 4th Intern. Congr. Plant Tissue and Cell Culture*. Aug. 20-25, 1978. Univ. of Calgary Press, Calgary, Canada (citado por EVANS *et al.* 1981).

RAJ BHANSALI, R.; K.G. RAMAWAT; A. KUMAR; H.C. ARYA - 1978b. Callus initiation and organogenesis in *in vitro* cultures of *Crotalaria burhia*. *Phytomorphol.* 28: 98-102.

RAMAWAT, K.G.; R.R. BHANSALI; H.C. ARYA - 1977. Differentiation in *Crotalaria* callus cultures. *Phytomorphol.* 27: 303-307.

RAO, P.S.; W. HANDRO; H. HARADA - 1973. Hormonal control of differentiation of shoots, roots and embryos in leaf and stem cultures of *Petunia inflata* and *Petunia hybrida*. *Physiol. Plant.* 28: 458-463.

RAO, P.G.; R.S. SAWHANEY; C.K. ATAL - 1975. Genus *Crotalaria*. Part XXIII. Croburhine a novel pyrrolizidine alkaloid from *Crotalaria burhia* Buch-Ham. *Indian J. Chem.* 13: 835-836 (citado por RAJ BHANSALI *et al.* 1978b).

- RAZDAN, M.K.; E.C. COCKING; J.B. POWER - 1980. Callus regeneration from mesophyll protoplasts of sweet pea (*Lathyrus odoratus* L.). *Z. Pflanzenphysiol.* 96: 181-183.
- REINERT, H.J. - 1958a. Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen. *Ber. dt. Bot. Ges.* 71(15).
- REINERT, J. - 1958b. Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Karotten. *Naturwissenschaften* 45: 244- 245 (citado por VASIL *et al.* 1979).
- REINERT, J. - 1959. Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta* 53: 318-333.
- REINERT, J. 1973 - Aspects of organization - organogenesis and embryogenesis. In: H.E. STREET (ed.) *Plant tissue and cell culture*. Berkeley and Los Angeles, University of California Press, p. 338-355.
- ROBBINS, W.J. - 1922. Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. *Bot. Gaz.* 73: 376-390.
- ROEPER, W.; W.O. ABEL; S. ROEPER - 1980. Influence of the culture medium and different culture conditions on the viability and budding of isolated mesophyll protoplasts

- of *Vicia faba*. Mitt. Inst. All. Bot. Hamb. 17(0): 125-134 (in Biol. Abstr. 71(5) 1981).
- ROSS, M.S.F. *et al.* - 1978. Epoxidase/epoxide hydrase activity in cell cultures of *Phaseolus vulgaris*. In: *Resúmenes analíticos sobre Frijol*. III (1978):43. Centro de informacion sobre frijol. CIAT (Resúmenes).
- SAKA, H.; T.H. VOQUI-DINH; T.Y. CHENG - 1980. Stimulation of multiple shoot formation on soybean stem nodes in culture. *Plant Sci. Lett.* 19: 193-201.
- SANTOS, A.V.P.; D.E. OUTKA; E. C. COCKING; M.R. DAVEY - 1980. Organogenesis and somatic embryogenesis in tissues derived from leaf protoplasts and leaf explants of *Medicago sativa*. *Z. Pflanzenphysiol.* 99: 261-270.
- SATYAVATI, G.V.; M.K. RAINA; M. SHARMA - 1976. Medicinal Plants of India. Vol. I New Delhi, India (citado por RAJ BHANSALI *et al.* 1978b).
- SAUNDERS, J.W. & E.T. BINGHAM - 1972. Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Sci.* 12: 804-808.
- SAUNDERS, J.W. & E.T. BINGHAM - 1975. Growth regulator effects on bud initiation in callus cultures of *Medicago sativa*. *Am. J. Bot.* 62: 850-855.

- SCHENK, R.U. & A.C. HILDEBRANDT - 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.
- SCHEURICH, P. & U. ZIMMERMANN - 1981. Electrically stimulated fusion of different plant cell protoplasts. *Plant Physiol.* 67: 849-853.
- SCHLEIDEN, M.J. - 1838. Beitrage zur Phytogenesis. *Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med.*, p. 137-176 (citado por VASIL *et al.* 1979).
- SCHWANN, T. - 1839. "Mikroskopische Untersuchungen uber die Ubereinstimmung in der Struktur und dem Wachstume der Tiere und Pflanzen", Nº 176 ("Ostwalds Klassiker der exakten Wissenschaften". Engelmann, Leipzig, 1910) (citado por VASIL *et al.* 1979).
- SCHWENK, F.W. - 1980. Callus formation from mechanically isolated soybean cotyledonary cells. *Plant Sci. Lett.* 17 (4): 437-442.
- SCOWCROFT, W.R. & J.A. ADAMSON - 1976. Organogenesis from callus cultures of the legume, *Stylosanthes hamata*. *Plant Sci. Lett.* 7: 39-42.

- SEN, B. & S. GUPTA - 1979. Differentiation in callus cultures of leaf of two species of *Trigonella*. *Physiol. Plant.* 45: 425-428.
- SHAMA RAO, H.K. & S. NARAYANASWAMY - 1975. Effect of gamma irradiation on cell proliferation and regeneration in explanted tissues of pigeon pea, *Cajanus cajan* (L.) Mills. *P. Radiat. Bot.* 15: 301-305 (citado por EVANS *et al.* 1981).
- SHARP, W.R.; D.A. EVANS - 1981. Patterns of plant regeneration: opportunities for cloning or production of genetic variability. *News Letter* (I.A.P.T.C.), nº 3. p. 2-8.
- SHARP, W.R.; M.R. SONDAHL; L.S. CALDAS; S.B. MARAFFA - 1980. The physiology of asexual embryogenesis. In: J. JANICK (ed.) *Horticultural Reviews*, Vol. 2. Conn, AVI Publishing Wesport, p. 268-310.
- SHIMADA, T.; T. SASAKUMA; K. TSUNEWAKI - 1969. *In vitro* culture of wheat tissues. I. Callus formation, organ redifferentiation and single cell culture. *Can. J. Genet. Cytol.* 11: 294-304.
- SKOLMEN, R.G. & M.O. MAPES - 1976. *Acacia koa* Gray plantlets from somatic callus tissue. *J. Hered.* 67: 114-115.

- SKOOG, F.; H.Q. HAMZI; A.M. SZWEYKOWSKA; N.J. LEONARD; K. L. CARAWAY; T. FUJII; J.P. HELGESON; R.N. LOEPPKY - 1967. Cytokinins: Structure/activity relationships. *Phytochemistry* 6: 1169-1192.
- SKOOG, F. & C.O. MILLER - 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In: *Biological Action of Growth substances*. Symp. Soc. Exptl. Biol. 11: 118-131.
- SONDAHL, M.R. & W.R. SHARP - 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L.. *Z. Pflanzenphysiol.* 81: 395-408.
- SONDAHL, M.R. & W.R. SHARP - 1979. Research in *Coffea* spp. and applications of tissue culture methods. In: W.R. SHARP; P.O. LARSEN; E.F. PADDOCK; V. RAGHAVAN (eds.) *Plant cell and tissue culture. Principles and applications*. Columbus, Ohio State University Press, p. 527 - 584.
- STAVAREK, S.J.; T.P. CROUGHAN; D.W. RAINS - 1980. Regeneration of plants from long-term cultures of alfalfa cells. *Plant Sci. Lett.* 19: 253-261.
- STEPHAN, D. & R.B. VAN HUUSTEE - 1981. Some aspects of peroxidase synthesis by cultured peanut cells. *Z. Pflanzenphysiologie*

siol. 101: 313-321.

STEWART, F.C.; P.V. AMMIRATO; M.O. MAPES - 1970. Growth and development of totipotent cells. Some problems, procedures, and perspectives. *Ann. Bot.* 34: 761-737.

STEWART, F.C.; M.O. MAPES; K. MEARS - 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.* 45(10): 705-708.

STREET, H.E. - 1976. Cell cultures: a tool in plant biology. In: D. DUDITS; G.L. FARKAS; P. MALIGA (eds.) *Cell genetics in higher plants*. Budapest, Publ. House Hungarian Academy of Sciences, p. 7-38.

STREET, H.E.- 1977a. Differentiation in cell and tissue cultures - Regulation at the molecular level. In: H.R. SCHUTTE and D. GROSS (eds.) *Regulation of developmental processes in plants*. Jena, Veb G.F. Verlag, p. 192-218.

STREET, H.E. - 1977b. Embryogenesis and chemically induced organogenesis. In: W.R. SHARP, P.O. LARSEN, E.F. PADDOCK and V. RAGHAVAN (eds.) *Plant cell and tissue culture. Principles and applications*. Columbus, Ohio State University Press, p. 123-153.

STREET, H.E. - 1973. Differentiation in cell and tissue cultures - regulation at the molecular level. In: H.R. SCHUTTE; D. GROSS (eds.) *Regulation of developmental processes in plants*. Oberlungwitz, Veb Kongress - und werbedruck , p. 192-218.

STREET, H.E. - 1979. Embryogenesis and chemically induced organogenesis. In: W.R. SHARP; P.O. LARSEN; E.F. PADDOCK; V. RAGHAVAN (eds.) *Plant cell and tissue culture*. Columbus, Ohio State Univ. Press, p. 123-154.

STREET, H.E. & L.A. WITHERS - 1974. The anatomy of embryogenesis in culture. In: H.E. STREET (ed.) *Tissue culture and plant science*. New York, Academic Press, p. 71-100.

SWEET, H.C. & W.E. BOLTON - 1979. The surface decontamination of seeds to produce axenic seedlings. *Amer. J. Bot.* 66(6): 692-698.

SUBRAMANIAM, M.K.; S. ROYAN-SUBRAMANIAM; P.M. GOPINATH; K. C. GUPTA; S. VASANTHA - 1968. Histogenesis, organogenesis and morphogenesis in callus cultures of *Trigonella foenum - graecum* Linn. and *Vigna unguiculata* (L.) walp. *Curr. Sci.* 37: 398-399.

SWANSON, E.B. & D.T. TOMES - 1980. Plant regeneration from cell cultures of *Lotus corniculatus* and the selection and

- characterization of 2,4-D tolerant cell lines. *Can. J. Bot.* 58: 1205-1209.
- SYONO, K. - 1965. Changes in organ forming capacity of carrot root calluses during subcultures. *Plant Cell Physiol.* 6: 403-419.
- TAIRA, T.; F.A. HASKINS; H.J. GORZ - 1977. Callus and suspension cultures of *Melilotus alba* tissues and cells. *Crop Sci.* 17: 407-411.
- THOMAS, E. & H.E. STREET - 1970. Organogenesis in cell suspension cultures of *Atropa belladonna* L. and *Atropa belladonna* Cultivar *lutea* Doll. *Ann. Bot.* 34: 657-669.
- TISSERAT, B.; E.B. ESAN; T. MURASHIGE - 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. In: J. JANICK (ed.) *Horticultural reviews*, Vol. I. AVI Publishing, Westport, Conn., p. 1-78.
- TOMES, D.T. - 1979. A tissue culture procedure for propagation and maintenance of *Lotus corniculatus* genotypes. *Can. J. Bot.* 57: 137-140.
- TORREY, J.G. - 1967. Morphogenesis in relation to chromosomal constitution in long-term plant tissue cultures. *Physiol. Plant.* 20: 265-275.

- TORREY, J.G. & D.E. FOSKET - 1970. Cell division in relation to cytodifferentiation in cultured pea root segments. *Am. J. Bot.* 57(9): 1072-1080.
- TOWNSLEY, P.M. - 1974. Production of coffee from plant cell suspension cultures. *J. Inst. Can. Food Sci. Technol. Aliment.* 7: 79-81.
- TRAN THANH VAN, M.; H. CHYLAH; A. CHYLAH - 1974. Regulation of organogenesis in thin layers of epidermal and sub-epidermal cells. In: H.E. STREET (ed.) *Tissue culture and plant science*. London, Academic Press, p. 101-139.
- TRAN THANH VAN, K. & H. TRINH - 1978. Morphogenesis in thin cell layers: concept, methodology and results. In: T. A. THORPE (ed.) *Frontiers of plant tissue culture*. Calgary, University of Calgary Press, p. 37-48.
- UCHIMIYA, H. & T. MURASHIGE - 1974. Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 54: 936-944.
- VASIL, I.K.; M.R. AHUJA; V. VASIL - 1979. Plant tissue cultures in genetics and plant breeding. *Adv. Genet.* 20: 127-215.
- VASIL, V. & A.C. HILDEBRANDT - 1965a. Growth and tissue for

mation from single isolated cells in microculture. *Science* 147: 1454-1455.

VASIL, V. & A.C. HILDEBRANDT - 1965b. Differentiation of tobacco plants from single isolated cells in microcultures. *Science* 150: 889-892.

VASIL, V. & A.C. HILDEBRANDT - 1967. Further studies on the growth and differentiation of single, isolated cells of tobacco *in vitro*. *Planta* 75: 139-151.

VASIL, I.K. & V. VASIL - 1972. Totipotency and embryogenesis in plant tissue cultures. *In Vitro* 8: 117-127.

VELIKY, I.A. - 1972. Synthesis of carboline alkaloids by plant cell cultures. *Phytochemistry* 11: 1405-1406.

VELIKY, I.A. & S.M. MARTIN - 1970. A fermenter for plant cell suspension cultures. *Can J. Microbiol.* 16: 223-226.

VENKETESWARAN, S. - 1962. Tissue culture studies on *Vicia faba* L. I. Establishment of cultures. *Phytomorphol.* 12: 300-306.

VENKETESWARAN, S. & O. HUHTINEN - 1978. *In vitro* root and shoot differentiation from callus cultures of a legume, winged bean, *Psophocarpus tetragonolobus*. *In Vitro* 14:355

(citado por EVANS *et al.* 1981).

VIEIRA, C. - 1978. Cultura do Feijão. Imprensa Universitária da U. F. V., Viçosa, Minas Gerais. 146 pp.

VIRCHOW, R. - 1858. "Die Cellular - pathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre". Hirschwald, Berlin (citado por VASIL *et al.* 1979).

WALKER, K.A.; M.L. WENDELN; E.G. JAWORSKI - 1979. Organogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*. The temporal separation of induction process from differentiation processes. *Plant Sci. Lett.* 16: 23-30.

WALKER, K.A.; P.C. YU; S.J. SATO; E.G. JAWORSKI - 1978. The hormonal control of organ formation in callus of *Medicago sativa* L. cultured *in vitro*. *Am. J. Bot.* 65(6): 654 - 659.

WHITE, P.R. - 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.* 9: 585-600.

WHITE, P.R. - 1937. Vitam B₁ in the nutrition of excised tomato roots. *Plant Physiol.* 12: 803-811.

- WHITE, P.R. - 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Am. J. Bot.* 26: 59-64.
- WHITE, P.R. - 1943. A handbook of Plant Tissue Culture. Lancaster, Jaques Cattell.
- WHITE, P.R. - 1963. The Cultivation of Animal and Plant Cells. New York, Ronald Press.
- WILMAR, C. & M. HELLENDORF - 1963. Growth and morphogenesis of asparagus cells cultured *in vitro*. *Nature* 217: 369-370.
- WITHAM, F.H. - 1968. Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on the cytokinin requirement of soybean cotyledon and tobacco stem pith callus tissues. *Plant Physiol.* 43: 1455-1457.
- WITON, L.L. - 1970. Initiation of firm white aspen callus under different light environments. *Phyton* 27: 11-14.
- ZIEG, R.G. & D.E. OUTKA - 1980. The isolation, culture and callus formation of soybean pod protoplasts. *Plant Sci. Lett.* 18(2): 105-114.