



UFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL

CAMPUS DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CECA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL - PPGA



CECA

ALLANA CAROLINE IDALINO ALENCAR

**MULTIPLICAÇÃO CLONAL E CALOGÊNESE EM TECIDOS EMBRIONÁRIOS
DE FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.) VAR. BRANCA.**

RIO LARGO – ALAGOAS

2021

ALLANA CAROLINE IDALINO ALENCAR

**MULTIPLICAÇÃO CLONAL E CALOGÊNESE EM TECIDOS EMBRIONÁRIOS
DE FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.) VAR. BRANCA.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Campus Engenharias e Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, para obtenção do título de Mestra em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos

Co-orientadora: Dra. Cibele Merched Gallo

RIO LARGO – ALAGOAS

Catálogo na fonte Universidade
Federal de Alagoas
Campus de Engenharias e Ciências Agrárias – CECA Bibliotecário
Responsável: Erisson Rodrigues de Santana

S237m Santos, Allana Caroline Idalino dos.

Multiplicação clonal e calogênese em tecidos embrionários de feijão-fava (*phaseolus lunatos* L.) var. branca. / Allana Caroline Idalino dos Santos. – 2021.

56 f.: il.

Orientador: Eurico Eduardo Pinto de Lemos.

Co-orientadora: Cibele Merched Gallo

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós - graduação em Agronomia, Área de concentração em produção vegetal, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, 2021.

Inclui Bibliografia

1. Fabaceae. 2. Cultura de tecidos. 3. Cultura de embriões. 4. Auxinas. 5. Feijão-fava

CDU:633.35



Universidade Federal de Alagoas

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CAMPUS DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - PRODUÇÃO
VEGETAL CÓDIGO-CAPEs – 2601012010P9

TERMO DE APROVAÇÃO

ALLANA CAROLINE IDALINO DOS SANTOS
(Matrícula 2019105501)

“MULTIPLICAÇÃO CLONAL E CALOGÊNESE EM TECIDOS EMBRIONÁRIOS DE
FEIJÃO-FAVA
(*Phaseolus lunatus* L.) VAR. BRANCA”

Dissertação apresentada e avaliada pela banca examinadora em 30 de março de 2021, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal do Programa de Pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal) do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias da UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS.

Prof. Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos

Presidente

Prof.ª Dr.ª Leila de Paula Rezende

Prof.ª Dr.ª Cibele Merched Gallo

Membro Externo

Rio Largo ,AL
Março de
2021

A minha filha, aos meus pais, aos meus irmãos e ao meu querido esposo, aqueles que sempre são minha fortaleza e refúgio, que compartilham alegrias e tristezas, e especialmente, me incentivam a lutar.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as bênçãos e lições concedidas no decorrer desses dois anos. “Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem sucedidos” Provérbios 16:3.

Aos meus pais, Maria Rosilene Idalino dos Santos e Claudionor Idalino dos Santos, primeiramente por todo amor a mim atribuído, por sempre lutarem por mim e por meus sonhos, mesmo quando esses parecem inalcançáveis.

Aos meus irmãos Andressa e Ayrton, pela compreensão, carinho e todo amor compartilhado.

A minha filha Maria Cláudia, que apesar de seus dois anos, desde seu nascimento me ensinou a ser mais forte e que desistir não era uma opção.

Ao meu esposo, pelo amor, sabedoria e cuidados, por ser o melhor presente a mim concedido, obrigada por conhecer meu caos, me aceitar, me amar e acima de tudo o maior motivador dos meus sonhos.

A todos os meus familiares e amigos que torceram por mim e contribuíram durante minha formação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos, pela paciência, compreensão e conhecimentos transmitidos.

Aos colegas que obtive no decorrer da pós-graduação, em especial ao Everton que me ajudou principalmente na fase final de minha dissertação, contribuindo muito para minha formação pessoal e acadêmica.

A Universidade Federal de Alagoas – UFAL, por me proporcionar obter título de mestre e contribuir para minha formação profissional.

Aos estagiários e colegas de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – BIOVEG, em especial à técnica de laboratório Delma Almeida, que contribuiu diretamente para a realização deste trabalho, e que não sei se conseguiria terminar meus experimentos sem sua ajuda, que não foram poucas.

A banca examinadora pelas relevantes contribuições.

A minha amiga Profa. Dra. Cibele Merched Gallo, por todo carinho, amizade e acima de tudo ajuda que sempre me presenteou, sei que em qualquer situação sempre poderei contar com ela.

A todos os professores que conheci no decorrer de minha trajetória como estudante, além de fontes de conhecimento e inspiração, foram grandes incentivadores, em especial aos professores que compõe o curso de pós-graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas – UFAL.

MUITO OBRIGADO!!!

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos.”

(Provérbios, 16:3).

LISTA DE TABELAS

Tabela1- Tratamento com diferentes concentrações de com BAP (6-benzilaminopurina) e AIB (ácido-3-indolbutírico), e o controle (meio sem os reguladores de crescimento).....26

Tabela 2 - Número de explantes vivos limpos (NEL), Número de explantes contaminados (NEC), Número de explantes oxidados (NEO), Número de explantes brotados (NEB), Comprimento do broto apical (CBA), Número de raízes adventícias com comprimento superior a 2 mm (NRA), Número de brotações laterais com comprimento superior a 2 mm (NBL) após 60 dias no estabelecimento in vitro de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) cv. branca, em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e auxina ácido-3-indolbutírico (AIB). Total 60 explantes em cada tratamento.....34

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Sementes de fava desinfestadas em câmara de fluxo laminar no momento da introdução em meio de cultura com diferentes concentrações de citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e auxina ácido-3-indolbutírico (AIB). CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Allana Caroline Idalino Alencar.....26
- Figura 2** - Extração de embriões nas sementes de Feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) variedade branca. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Allana Caroline Idalino Alencar.....27
- Figura 3** - Embrião germinado após 60 dias em meio MS para estabelecimento (a). Explante dissecado em câmara de fluxo laminar para seleção de explantes com gema apical e axilares (b). CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Allana Caroline Idalino Alencar.....28
- Figura 4** - Explantes de fava branca em meios de multiplicação em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2 °C sob irradiância de $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e fotoperíodo de 16 horas. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Allana Caroline Idalino Alencar.....29
- Figura 5**- Esquema de tratamentos com diferentes concentrações de 2,4 D acrescidos ao meio MS. $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, 20 mg L^{-1} , 30 mg L^{-1} , 40 mg L^{-1} e 50 mg L^{-1} 35
- Figura 6** - Explantes *Phaseolus lunatus* L.fava branca durante a repicagem após 20 dias em meio de cultura MS com $0,5 \text{ mg. L}^{-1}$ BAP. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Allana Caroline Idalino Alencar.....36
- Figura 7** - Aspecto geral do experimento de multiplicação de explantes de *Phaseolus lunatus* L.fava branca em câmara de crescimento. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Allana Caroline Idalino Alencar.....36
- Figura 8** – Evolução do crescimento dos calos morfogênicos em embriões zigóticos de fava branca submetidos a condições de luz e escuro em meio MS com 10 mg L^{-1} de 2,4 D durante 20 dias de avaliação.....39
- Figura 9** – Evolução do crescimento dos calos morfogênicos em embriões zigóticos de fava branca submetidos a condições de luz e escuro em meio MS com 20 mg L^{-1} de 2,4 D durante 20 dias de avaliação.....39

Figura 10 - Evolução do crescimento dos calos morfogênicos em embriões zigóticos de fava branca submetidos a condições de luz e escuro em meio MS com 30 mg L ⁻¹ de 2,4 D durante 20 dias de avaliação.....	40
Figura 11 – Evolução do crescimento dos calos morfogênicos em embriões zigóticos de fava branca submetidos a condições de luz e escuro em meio MS com 40 mg L ⁻¹ de 2,4 D durante 20 dias de avaliação.....	41
Figura 12 - Evolução do crescimento dos calos morfogênicos em embriões zigóticos de fava branca submetidos a condições de luz e escuro em meio MS com 50 mg L ⁻¹ de 2,4 D durante 20 dias de avaliação.....	42
Figura 13 - Diferentes concentrações de 2,4 D em micropropagação de Feijão-Fava (<i>Phaseolus lunatus</i> L.) em exposição à luz e ao escuro. (A) Concentração de 20 mg.L ⁻¹ de 2,4 D exposto a luz (frasco direito) e totalmente no escuro (frasco esquerdo). (B) Concentração de 10 mg.L ⁻¹ de 2,4 D exposto a luz (frasco direito) e totalmente no escuro (frasco esquerdo). (C) Concentração de 40 mg.L ⁻¹ de 2,4 D exposto a luz (frasco direito) e totalmente no escuro (frasco esquerdo), CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Allana Caroline Idalino Alencar.....	43
Figura 14 - Formação de calo embriogênico 20 dias após inoculação in vitro. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Allana Caroline Idalino Alencar.....	44

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1.0 INTRODUÇÃO.....	13
2.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 A Família Fabaceae e do Gênero <i>Phaseolus</i>	16
2.2 Aspectos Gerias de <i>Phaseolus lunatus</i> L. (feijão-fava).....	17
2.3 Diversidade Genética.....	19
2.4 Melhoramento do feijão-fava (<i>P. lunatus</i> L.).....	21
2.5 Cultura de Tecidos, Reguladores de Crescimento e Embriogênese Somática.....	22
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Local de execução e coleta do material vegetal.....	25
3.2 Preparo e inoculação do material vegetal.....	25
3.3 Crescimento e multiplicação dos explantes.....	27
3.4 Experimento 2 - Indução de calos em tecidos embrionários de fava branca.....	28
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.0 CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

RESUMO

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é uma planta trepadeira da família Fabaceae, considerada a segunda espécie mais importante do seu gênero. Tem sido considerada uma fonte de renda e alternativa alimentar para parte da população da região Nordeste do Brasil, onde é muito consumida. No entanto, existem poucos estudos sobre a cultura de tecidos vegetais nesta espécie visando auxiliar programas de melhoramento genético sobretudo visando a resistência de cultivares a doenças provocadas por vírus. O objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolos iniciais de multiplicação clonal in vitro de fava branca e induzir calos em tecidos embrionários com vistas a futuros estudos de organogênese e embriogênese somática da espécie. O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (BIOVEG) do CECA/UFAL. Sementes de feijão-fava variedade Branca foram obtidas diretamente do produtor rural na feira livre do município de São Miguel dos Campos – Alagoas. Após a classificação, limpeza e desinfestação das sementes, os embriões foram extraídos das sementes em câmara de fluxo laminar com auxílio de pinças e bisturis. Os embriões excisados foram transferidos para meio de cultura MS com diferentes combinações de benzilaminopurina (BAP) e ácido indolbutírico (AIB). Avaliou-se o crescimento e a multiplicação dos explantes nas diferentes combinações propostas durante 60 dias em cultivo. Em um segundo experimento avaliou-se a indução de calos em embriões zigóticos submetidos a diferentes concentrações de 2,4 D em condições de claro e escuro. Os resultados obtidos mostraram que as maiores concentrações de BAP (1,0 e 2,0 mg L⁻¹) foram capazes de multiplicar em até mais de 10 vezes o número de brotos da testemunha (sem BAP), mas não induziu a formação de raízes. O uso de 0,5 mg L⁻¹ de AIB foi capaz de induzir raízes adventícias apenas nos explantes com 0,5 mg L⁻¹ ou nenhum BAP, sinalizando para a possibilidade de se estabelecer um sistema de micropropagação em duas etapas distintas – multiplicação e enraizamento separadamente. Todas as concentrações de 2,4 D utilizadas (10, 20, 30, 40 e 50 mg L⁻¹) induziram rapidamente uma boa massa de calos nos explantes que ficaram no escuro, mas não nos explantes em ambiente iluminado.

Termos para indexação: Fabaceae; cultura de tecidos; cultura de embriões; auxinas; citocininas.

ABSTRACT

Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is a climbing plant in the Fabaceae family, considered a second most important species of its genus. It has been considered a source of income and alternative food for part of the population of the Northeast Brazil, where it is widely consumed. However, there are few studies on tissue culture of lima beans as a tool to assist genetic transformation to obtain new varieties with virus resistance. The objective of this work was to establish initial protocols for the introduction and in vitro multiplication of lima beans cv. Branca and to induce calluses in embryonic tissues with a view to future studies of organogenesis and somatic embryogenesis of the species. The work was carried out at the Plant Biotechnology Laboratory (BIOVEG) of CECA / UFAL. Seeds of lima beans cv. Branca were obtained from rural producers in an open market in the municipality of São Miguel dos Campos - Alagoas. After sorting, cleaning and disinfesting seeds, the embryos were extracted in a laminar flow chamber with the aid of tweezers and scalpels. The excised embryos were transferred to MS culture medium with different concentrations of benzylaminopurine (BAP) and indole butyric acid (AIB). Growth and multiplication of the explants were evaluated during 60 days in cultivation. In a second experiment, callus induction in zygotic embryos was evaluated for different 2,4 D concentrations in light and dark conditions. The results showed that the highest concentrations of BAP (1.0 and 2.0 mg L⁻¹) were able to multiply up to more than 10 times the number of shoots of the control (without BAP) but no adventitious roots were induced. The use of 0.5 mgL⁻¹ of IBA was able to induce adventitious roots only in explants with little (0.5 mg L⁻¹) or no BAP, indicating for a micropropagation system in two distinct stages - multiplication and rooting. All of the 2,4 D concentrations used (10, 20, 30, 40 and 50 mg L⁻¹) readily induced a good mass of callus only in explants that were kept in the dark, but not in explants kept in a lighted environment. This work showed that micropropagation and callogenesis lima bean cv. Branca will serve as important tools in the genetic improvement and transformation of the species.

Index terms: Fabaceae; tissue culture; culture of embryos; auxins; cytokinin.

1 INTRODUÇÃO

A família Fabaceae (Leguminosae) compreende a terceira maior família botânica no grupo das dicotiledôneas, com cerca de 640 gêneros, reunindo aproximadamente 18.000 espécies de plantas, de ampla distribuição geográfica, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (ANWAR et al., 2011). Dentre os gêneros pertencentes a esta família destaca-se o *Phaseolus lunatus*, também denominado de feijão-de-lima, feijão-espadinho, fava-de-lima ou simplesmente fava. No Brasil, ela é cultivada em todo território nacional, devido principalmente a sua elevada diversidade, adaptabilidade e rusticidade (ADVÍNCULA et al., 2015; SILVA et al., 2015). Na região Nordeste brasileiro o feijão-fava desempenha importante papel socioeconômico, tanto como fonte de renda, quanto como alimento para a população desta região, principalmente para as famílias da região semiárida nordestina, que a consome na forma de grãos maduros, verdes e secos, cozidos, fazendo parte de diversos pratos típicos da região (SOUZA et al., 2019; SILVA et al., 2015).

Destaca-se que as muitas variedades de fava tradicionalmente cultivadas no Brasil são mantidas e multiplicadas geralmente por pequenos produtores rurais, não havendo um sistema de grande porte organizado para a produção e distribuição comercial de sementes de fava como os que existem para o feijão comum, o milho, a soja, etc. As sementes de fava disponíveis para o plantio são adquiridas diretamente com os próprios produtores rurais ou em mercados e feiras livres na forma de grãos, sendo muitas vezes de baixa qualidade e, frequentemente, carreadoras de vários problemas fitossanitários para a lavoura (GUIMARÃES et al., 2007; SANTOS et al., 2002).

O cultivo *in vitro* de órgãos, tecidos e células e de transferência de genes das espécies desse gênero ainda são incipientes na literatura, sendo necessários estudos que viabilizem a obtenção de matrizes com características de qualidade genética comprovada, bem como que acelerem o processo de melhoramento genético destas espécies. A primeira etapa para o estabelecimento de cultivos *in vitro* é o desenvolvimento de protocolos de multiplicação clonal e micropropagação a partir de órgãos de plantas jovens ou maduras. A capacidade de totipotência das células e tecidos vegetais permite fazer uso das ferramentas de culturas de tecidos para micropropagar plantas de elite geneticamente iguais (clones) a partir de tecidos diferenciados por meio de organogênese e/ou embriogênese somática, possibilitando desta forma o estudo de suas células e transformações (KRISHNA et al., 2011; SANTOS et al., 2002).

A capacidade de induzir as células de plantas a formarem órgãos e plantas inteiras, é uma ferramenta de extrema importância no melhoramento genético de qualquer espécie vegetal, viabilizando o acesso a técnicas como mutagenese *in vitro*, seleção *in vitro*, uso de variantes somaclonais, rápida micropropagação, e principalmente a transformação genética manipulando introduzindo genes de resistência ou inativando genes não interessantes (SOARES, 2010).

Nesse sentido, vários entraves precisam ser elucidados para a aplicabilidade dessa tecnologia na cultura da feijão, que vão desde a multiplicação clonal, a introdução de genes em células *in vitro* até a regeneração de plantas. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho, foi estabelecer protocolos iniciais de estabelecimento e multiplicação *in vitro* de feijão (*Phaseolus lunatus* L.) var. Branco e induzir calos em tecidos embrionários com vistas a futuros estudos de organogênese indireta e embriogênese somática da espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Família Fabaceae e do Gênero *Phaseolus*

A família Fabaceae ou Leguminosae, é uma das maiores e mais importantes famílias botânicas no grupo das Angiospermas, de ocorrência em diversas formações vegetais do mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, estando distribuída em três subfamílias: Faboideae, Mimosoideae e Caesalpinioideae. Ela pertence à ordem Fabales, a classe Magnoliopsida e a divisão Magnoliophyta. Ela é de distribuição cosmopolita, apresentando cerca de 695 gêneros e 19.000 espécies de plantas. É uma família que tem como característica principal a presença de frutos do tipo vagem (existem exceções), composta por árvores, arbustos, lianas, ervas, até espécies herbáceas anuais, de grande importância econômica e alimentar, a exemplo da soja e do feijão (CARVALHO & GAIAD, 2020; PEREIRA et al., 2019).

No Brasil esta família ocorre em todos os Estados, sob os domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal, onde já foram descritos em torno de 200 gêneros e catalogadas cerca 2.8827 espécies, dentre as quais 1.524 espécies e 16 gêneros são nativos do Brasil (PEREIRA et al., 2019; COSTA et., 2018). É uma família de grande importância econômica e ecológica para o Brasil, tendo em vista que suas espécies são utilizadas no forrageamento, como combustível, pesticida, corante, goma, óleo, ornamental e como medicinal, além do mais, são plantas bem adaptadas aos diversos ecossistemas brasileiros, em virtude da sua capacidade de associação com bactérias fixadoras de nitrogênio ou com ectomicorrizas (GOMES et al., 2017).

Dentre os gêneros pertencentes à família Fabaceae, destaca-se o *Phaseolus* que pertence à ordem *Rosales*, inserido na subtribo *Phaseolinae*, na tribo *Phaseoleae*, e na subfamília *Faboideae*. Seus representantes apresentam ampla distribuição geográfica, sendo cultivados nos trópicos e subtropicais, bem como em zonas temperadas dos hemisférios Norte e Sul. Dentro deste gênero já foram descritas mais de 400 espécies desde 1700, contudo, o número de espécies de *Phaseolus* atualmente aceitas não é conhecido, e uma estimativa aproximada indica que pode variar de 50 a 60 espécies de plantas, todas originárias do Continente Americano, sendo que

apenas cinco foram domesticadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray e *P. polyanthus* Greeman (ARAGÃO et al., 2011; SILVA, 2015).

Em relação à classificação do gênero baseado na morfologia floral, foram primeiramente reconhecidas por Maréchal et al. (1978) três seções: *Phaseolus*, *Alepidocalyx* e *Minkeliersia*. Mais tarde, Delgado Salinas (1985), sugeriu quatro seções: *Chiapasana*, *Phaseolus*, com maior número de indivíduos, *Minkeliersia* e *Xanthotricha*. Posteriormente, estes agrupamentos foram confirmados por meios de estudos baseados no polimorfismo do DNA cloroplastídico e genômico (DIEGUES, 2014; SILVA, 2015).

O gênero apresenta origem monofilética, ou seja, incluindo todas as espécies derivadas de um único ancestral, restringida ao continente americano. Afirmção comprovada por meio diversos estudos morfológicos e moleculares, como também devido à grande diversidade genética de espécies cultivadas e silvestres presentes na região, além do mais, achados arqueológicos evidenciam a antiguidade de seu cultivo no continente (DIEGUES, 2014).

Alguns biomas brasileiros são considerados como centro de diversidade genética de plantas pertencentes a este gênero, representando um material riquíssimo a ser explorado em futuros trabalhos de melhoramento genético de espécies de valor econômico potencial do gênero *Phaseolus* ainda pouco exploradas, a exemplo do feijão-fava. Sendo os trabalhos iniciais de propagação e cultivo *in vitro* destas espécies essenciais para o uso destes recursos genéticos ainda pouco explorados.

2.2 *Phaseolus lunatus* L. (feijão-fava)

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus*) é uma planta trepadeira da família Fabaceae, subfamília Faboideae, gênero *Phaseolus*, sendo considerada a segunda espécie mais importante do seu gênero. Tem sido considerada uma fonte de renda e alternativa alimentar para parte da população da região Nordeste do Brasil, onde é muito consumida. O Estado da Paraíba vem-se destacando como um dos maiores produtores nacionais, tendo o feijão-fava cultivado em praticamente todas as microrregiões. No Brasil a fava vem sendo cultivada em consórcio com outras culturas temporárias tais como, o milho, mamona e mandioca, que lhes servem como suporte ou tutor. Seus grãos têm teores de proteína superiores aos relatados para os feijões comuns, fornecendo todos os aminoácidos essenciais à dieta alimentar humana (CAVALHEIRO, 2012).

A extensa área da Mesoamérica e a região Andina são consideradas como os centros primários de origem da espécie, onde ocorrem às populações selvagens, que consiste em dos pilares que permitiram o surgimento de diversas raças locais, embora também seja um dos fatores da dificuldade de localizar exatamente as regiões de domesticação desta cultura (FREITAS et al., 2006).

Quanto às características que identificam à espécie, o tipo de germinação, a coloração das folhas, tamanho e formato das bractéolas e vagens, é as principais. Ela apresenta germinação epígea, com hábito de crescimento indeterminado ou trepador, com o desenvolvimento da gema terminal em uma guia, seus cotilédones são brancos ou verdes, e suas raízes desenvolvem-se mais que as do feijão-comum, tendendo a ser tuberosas. Quando o hábito de crescimento da planta é determinado, o desenvolvimento completo da gema apical termina em uma inflorescência. Suas folhas apresentam coloração escura, bractéolas pequenas e pontiagudas. As vagens são compridas e achatadas, geralmente oblongas e recurvadas, apresentado de duas a quatro sementes por vagem, com grande variação de tamanho e coloração do tegumento. Ela é uma espécie autógama de dias curtos, e as formas cultivadas são anuais, bianuais ou perenes (CAVALHEIRO, 2012; SANTOS et al., 2002; MOSCONE et al., 1999)

O feijão-fava é uma leguminosa que se adapta bem a condições ambientais diversas, sendo considerado mais tolerante à seca, ao excesso de umidade e ao calor do que ao feijão comum (*P. vulgaris* L.). Neste aspecto, a fava pode ser considerada um feijão de grande interesse quando se considera que as mudanças climáticas irão afetar o desenvolvimento e a produtividade de muitas lavouras. Tais mudanças irão exigir culturas mais adaptadas em um cenário de aquecimento global e alteração dos padrões de precipitação pluviométrica, além de um possível aumento populacional e, conseqüentemente, da demanda por alimentos (CAVALHEIRO,2012).

No geral, ela se adapta bem em solos areno-argilosos, bem drenados, com pH variando de 5,6 a 6,8. Seu cultivo geralmente de forma muito rústica, em hortas ou em consorcio com milho, mandioca, mamona ou gramíneas tropicais, utilizando-as como tutores (suporte). Em virtude de suas características genéticas de rusticidade é possível o prolongamento do período de colheita na época seca (CAVALHEIRO, 2012; SOTO et al. 2005; AZEVEDO et al. 2003).

P. lunatus L. está entre as quatro espécies mais exploradas mundialmente gênero do gênero *Phaseolus*, reduzindo a preferência do uso exclusivo dos feijões do tipo carioca. Ela é utilizada tanto na alimentação humana como no animal no fornecimento de proteína vegetal,

podendo ainda ser utilizada como adubo verde ou cultura de cobertura para proteção do solo, se tornando, portanto, uma importante fonte de renda e de alimento (PEGADO et al. 2008).

O feijão fava é uma fonte de renda e alternativa alimentar para a população da região Nordeste do Brasil, que o consome sob a forma de grãos maduros ou verdes. Ainda segundo os mesmos autores, o Estado da Paraíba, onde é cultivado em quase todas as microrregiões, vem-se destacando como um dos maiores produtores nacionais (OLIVEIRA, 2004).

As regiões com maior consumo e produtividade no Brasil de *Phaseolus spp.*, são Nordeste (20,8 kg/ano) e Sudeste (18,2 kg/ano). Os estados com maior destaque de produção são Paraíba, Ceará e Pernambuco, sendo Alagoas um dos estados com menor produção na região Nordeste (GUIMARÃES et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011; IBGE, 2018).

Mesmo sendo cultivada em vários Estados e com capacidade maior de adaptação do que o feijão-comum (*P. vulgaris* L.), o cultivo do feijão-fava ainda tem uma relevância pequena. Acredita-se que os motivos para um consumo ainda reduzido, sejam: a maior tradição de consumo do feijão-comum, o paladar peculiar do feijão-fava e o seu tempo de cocção mais longo (GUIMARÃES et al., 2007).

A menor produtividade em relação a outras cultivares, pode ser atribuída ao fato de parte da produção ser oriunda de pequenos produtores que o plantam em consórcios com outras culturas, sem a adoção de tecnologia que vise o aumento da sua produtividade. A ocorrência de doenças é um dos fatores de redução da produtividade e da qualidade da fava produzida. Ademais, acredita-se que o sabor amargo do feijão-fava, verificado pela presença de toxinas (HCN), desestimula o seu consumo mais massivamente (GUIMARÃES et al., 2007; SANTOS et al., 2002).

2.3 Diversidade Genética

Os recursos genéticos compreendem a variabilidade existente entre plantas ou populações de plantas, de importância socioeconômica atual e potencial, consistindo numa ferramenta de extrema importância para os programas de melhoramento genético, biotecnologia e áreas afins. Podendo ser mantidos dentro ou fora do ambiente natural, ou se adaptando as duas formas, os bancos e coleções de germoplasma podem ser conservados “*ex situ*”, “*in situ*” ou “*on farm*” (SANTOS, 2018)

Existe uma grande variabilidade genética entre espécies cultivadas e silvestres de *Phaseolus*, caracterizada por variações no hábito de crescimento, no porte, tipo de grão, dentre outras características de interesse agrônomo. A caracterização e o conhecimento destas características podem tornar-se interessante para os programas de melhoramento genético da espécie, principalmente como fonte de resistência ou tolerância a doenças, pragas e estresses abióticos (CAVALHEIRO, 2012).

Os recursos genéticos de espécies inclusas neste gênero, devem ser devidamente caracterizados, para viabilizar ganhos genéticos promissores nos programas de melhoramento, potencializando desta forma, o uso destes recursos pelos agricultores. Ainda segundo os mesmos autores, por se tratar de culturas exploradas em pequenas e médias propriedades, o uso de sementes melhoradas não ultrapassa de 20%, sendo que os 80% restantes é preenchido com sementes locais (crioulas), selecionadas pelos próprios agricultores, em função das condições ambientais e socioeconômicas da região de cultivo (COELHO et al, 2007)

A diversidade genética de feijão-fava (*P. lunatus* L). mantidas em bancos de gemplasma é verificada principalmente nos Estados Unidos da América (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA), México (Instituto Nacional de Pesquisa Florestal, Agrícola e Pecuária - INIFAP) e na Colômbia (Centro Internacional de Agricultura Tropical- CIAT), tendo como objetivo a coleta de germoplasma como ferramenta de resgate do material tradicional cultivado em vários locais do tropico americano, onde a extinção destes materiais tem sido mais acelerada. Em relação ao Brasil, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, mantém uma coleção de acessos com cerca de 980 amostras, coletadas no Brasil, desde os anos 80, que apresentam uma grande variabilidade morfológica (SILVA, 2009).

A Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Minas Gerais, mantém uma coleção de 401 variedades de feijão-fava procedentes do Brasil. Na Universidade Federal Rural de Pernambuco, em Recife, e na Universidade Federal do Piauí, em Teresina, mantém amostras obtidas da região Meio Norte do Brasil e por meio de intercâmbio com outras instituições. Ainda segundo o mesmo autor, a Universidade Federal do Piauí vem realizando diversos estudos de caracterização morfológica destes materiais, que tem apresentando uma variabilidade genética considerável entre os acessos (SILVA, 2011).

Neste contexto, os programas de melhoramento genético de feijão-fava adotam como estratégias a utilização direta dos recursos genéticos, a seleção clonal, explorando a variabilidade intravarietal existente, e a realização de hibridações diretas entre progenitores.

Estes programas, atualmente buscam principalmente por variedades resistentes a doenças, pragas e estresse abióticos, mas os primeiros trabalhos visavam principalmente à obtenção de cultivares mais produtivas. (CABRAL et al., 2009; CABRAL et al. 1999). Sendo assim, a adequação dos protocolos de estabelecimento *in vitro* de feijão-fava irá contribuir na adoção de técnicas adequadas de melhoramento em curto prazo em busca dos caracteres agrônômicos de interesse.

2.4 Melhoramento do Feijão-fava (*P. lunatus* L.)

Nas etapas de um programa de melhoramento genético de plantas, o conhecimento com relação à frequência de polinização cruzada que ocorre na espécie em estudo é de fundamental importância. Aquelas cuja taxa de fecundação cruzada é inferior a 5%, são consideradas espécies autógamas, por exemplo (ALLARD, 1971). Várias espécies cultivadas de importância econômica pertencem a esse grupo, tais como cereais (trigo, arroz, cevada e aveia) e leguminosas (soja, feijoeiro comum, feijão caupi, ervilha e amendoim). As taxas de cruzamentos naturais das espécies autógamas varia com as condições ambientais e variedades, sendo relatada ocorrência de variações nas quantidades relativas de polinização cruzada dentro da mesma espécie. Um exemplo disso são as altas taxas de cruzamento natural em feijão comum, registradas por Antunes et al. (1973), que observaram valores de 6,2 a 10,6% em Pelotas, RS.

Embora haja diferenças em suas taxas de fecundação, o feijão-fava é uma espécie predominantemente autógama (SERRANO-SERRANO et al., 2010). Os métodos de melhoramento aplicáveis às espécies autógamas são viáveis para o feijão-fava, apesar de variações em seu comportamento quanto à taxa de cruzamento natural e de terem sido relatados em alguns casos valores de aproximadamente 10% (HARDY, et al., 1997).

Para as espécies autógamas, há métodos de melhoramento que exploram a variabilidade genética existente, tais como introdução de plantas, seleção massal e seleção individual com teste de progênie, e aqueles que utilizam a variabilidade gerada existente através das hibridações, como, por exemplo, o método genealógico, o método da população e o “Single Seed Descent” (SSD) (FEHR, 1987).

Nos últimos anos os programas de melhoramento genético de espécies cultivadas vêm buscando tecnologias apropriadas que reduzam o tempo para a obtenção de novas variedades. Dentre as ferramentas com capacidade de antecipar o desenvolvimento de plantas com características agronômicas desejáveis estão às técnicas de cultura *in vitro* e a transformação genética. A otimização de condições adequadas para o cultivo *in vitro* da espécie *Phaseolus lunatus* pode contribuir como ferramenta auxiliar no melhoramento genético dessa cultura (SOARES et al., 2010).

2.5 Cultura de Tecidos Vegetais

Através das técnicas do cultivo de células, tecidos e órgãos *in vitro* é possível propagar de forma rápida espécies e/ou variedades de interesse e, ainda, podem servir como ferramenta auxiliar na eliminação de patógenos, obtendo assim matrizes com qualidade genética e sanitária comprovada. Todavia, para o uso prático da micropropagação é preciso antes de tudo se estabelecer e otimizar as condições do meio de cultura para cada espécie e/ou variedade. Este é, dentre os campos da biotecnologia, aquele que tem dado mais resultados práticos. Na cultura de tecidos se utiliza, como princípio, da totipotência celular, ou seja, a capacidade que uma célula possui de regenerar o fenótipo do organismo completo e diferenciado do qual ela é derivada. (ROGALSKI, GUERRA, SILVA, 2003).

A fase inicial da cultura de tecidos vegetais é o estabelecimento *in vitro* do explante, podendo este ser qualquer parte de uma planta, desde uma célula até um órgão, como uma folha, uma flor, caule ou raiz (SANTANA et al, 2003). A primeira etapa da introdução de um explante *in vitro* é a sua assepsia ou desinfestação para remover possíveis contaminantes. Existem três principais fontes de contaminação na cultura de tecidos vegetais: o meio de cultura, o próprio explante e o ambiente do laboratório onde a manipulação é feita. As práticas de assepsia antes da introdução do explante no meio nutritivo são para que se possa reduzir ao máximo a propagação de microrganismos contaminantes. Dessa forma, é necessário a esterilização do meio de cultura em autoclave a 121 °C e a 1 atm; a desinfestação superficial do explante por imersão em álcool 70 % e hipoclorito de sódio; e higienização periódica do laboratório, dentre outras medidas de segurança (PASQUAL, 2001).

O cultivo *in vitro* é considerado uma alternativa bastante viável de clonagem de espécies vegetais, com produção comercial em larga escala (GUTIERREZ et al., 2011). As suas principais vantagens são permitir a multiplicação de plantas livres de doenças, a produção de um elevado número de plantas em um curto espaço de tempo, utilização de pouco material genético e emprego de uma área física bastante reduzida, podendo ser realizado em qualquer época do ano (SOUZA et al., 2006; VIAGANÒ et al., 2007).

Um dos atributos da cultura de tecidos vegetais é a contingência quase absoluta de controle do crescimento e desenvolvimento das plantas. Isso não seria possível sem a participação dos reguladores de crescimento no meio de cultura, pois são estes componentes que direcionam o metabolismo do explante *in vitro* para o processo almejado. Os reguladores de crescimento têm atuação sobre o ciclo celular e, assim, contribuem para a variação somaclonal. O cultivo em frascos fechados onde a troca gasosa pode ser inadequada e intensa, o acúmulo de reguladores de crescimento como o etileno pode resultar em modificações epigenéticas (GEORGE et al 2008; MORAIS et al. 2006).

As auxinas e as citocininas são os hormônios mais relevantes para a regulação do crescimento e da morfogênese de tecidos e órgãos, são fatores determinantes para o desenvolvimento das plantas em geral, na cultura de tecidos a adição de fitoreguladores no meio nutritivo são indispensáveis para obter sucesso no estabelecimento dos explantes, as citocininas são responsáveis pela indução de brotações axilares e superação da dominância apical (RADMANN et al., 2009).

Das citocininas disponíveis no mercado, o BAP (6-benzilaminopurina) é a que, em geral, apresenta melhores resultados *in vitro* para promover a multiplicação de diversas espécies, além de se destacar das demais por ser a citocinina de menor custo, mais ativa e mais utilizada na multiplicação de diversas espécies (GEORGE et al 2008). Processos metabólicos podem ser estimulados ou inibidos pelas citocininas, assim como processos físicos e químicos de plantas superiores. As citocininas estão envolvidas na regulação do crescimento e diferenciação, incluindo a dominância apical, formação de órgãos, divisão celular, retardamento da quebra da clorofila, desenvolvimento dos cloroplastos, senescência das folhas, desenvolvimento das gemas e brotações, abertura e fechamento dos estômatos, reguladores da expressão dos genes, e metabolismo dos nutrientes. (VIEIRA; MONTEIRO 2002).

O alongamento celular, geotropismo, fototropismo, dominância apical, iniciação radicular, diferenciação dos tecidos vasculares, embriogênese, produção de etileno, produção dos frutos, partenocarpia, abscisão de expressão sexual são processos regulados pelas auxinas. (ARTECA, 1996). Na planta, as auxinas são produzidas nas regiões de crescimento celular

localizadas nos ápices das plantas (nas regiões meristemáticas), e em menor quantidade, nas raízes, e seu transporte ocorre do topo da planta em direção à base (SOUZA et al., 2018).

Segundo Souza et al. (2018), dois reguladores são produzidos em locais diferentes e possuem funções antagônicas. Se existir um equilíbrio entre as concentrações de ambos no meio de cultivo, ocorrerá o desenvolvimento de uma massa celular indiferenciada comumente chamada de callus ou calo.

No ambiente as plantas podem produzir calos (calogênese) em respostas a diversos tipos de estresse, a exemplo de ferimentos e infecção patogênica. Ela também pode ser induzida *in vitro*, por meio da adição de concentrações elevadas de reguladores de crescimento ao meio de cultivo, ocorrendo a desdiferenciação das células, induzindo-as a retornarem ao estado inicial meristemático (SOUZA et al., 2018).

O estabelecimento da cultura de calos a partir de explantes é dividido em três etapas: indução, divisão celular e desdiferenciação dos tecidos celulares (STAFFORD, 1991; AITCHISON et al., 1977). Na biotecnologia a formação de calos é de extrema importância, sendo utilizada na obtenção de clones saudáveis de determinada espécie vegetal, na incorporação de genes por biobalística, na embriogênese somática e para a produção de suspensões celulares, tendo em vista a produção de metabólitos secundários (WERNER et al., 2010).

Caráter embriogênico pode ser adquirido, após passarem por um processo de desdiferenciação celular, em condições *in vitro*, células presentes em explantes provenientes de diferentes tecidos são tratadas com uma combinação de auxinas e citocininas ou, em outros casos, apenas por auxinas. São um excelente alvo para a transformação genética, células embriogenicamente competentes, pois uma vez transformadas, elas podem ser induzidas a se diferenciar em embriões, permitindo então a obtenção de plantas transgênicas. A capacidade de indução da desdiferenciação celular é uma das mais importantes características exploradas no cultivo *in vitro* das plantas e encontra-se associada às principais técnicas de melhoramento não convencional (FEHÉR et al., 2002).

A seleção *in vitro* de mutantes induzidos provenientes da variação somaclonal e a produção de transgênicos, uma das técnicas mais usadas, destacam-se no desenvolvimento de novas cultivares, contudo, faz-se necessário o prévio estabelecimento das condições necessárias para a regeneração de plantas via calos (principal tipo de explante utilizado para obtenção de

variação somaclonal e de transgênicos). Para que esta metodologia seja utilizada (RMAKRISHNAN et al. 2005).

Nesse sentido, a cultura de tecidos em feijão-fava representa uma técnica de grande importância para o desenvolvimento dessa cultura, tendo-se em vista a possibilidade dessa ferramenta biotecnológica servir como auxiliar em programas de melhoramento, tornando mais rápido o processo de obtenção de novas cultivares e, se for o caso, incorporar outros genes, para ganhos genéticos mais promissores.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de execução e coleta do material vegetal

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Engenharias e Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (BIOVEG – CECA/UFAL), localizado no município de Rio Largo – Alagoas (latitude 9° 29'45'' S, longitude 35° 45' 54'' W, altitude de 120 metros). As sementes de feijão-fava (*P. lunatus* L.) variedade Branca foram obtidas diretamente de um produtor rural que as comercializam em feira livre no município de São Miguel dos Campos – Alagoas (latitude 9° 48' 24'' S, longitude 36° 6' 55'' W, altitude de 97 metros) em outubro de 2020. Conforme relato do produtor, as sementes foram oriundas de plantios familiares realizados na região de Igaci – Alagoas, sendo produzidas no primeiro semestre de 2020.

3.2 Preparo, inoculação e estabelecimento dos explantes

As sementes de feijão-fava obtidas foram transportadas para o Laboratório de Biotecnologia Vegetal (BIOVEG), onde passaram por um processo de seleção e padronização. Elas foram selecionadas por tipo, tamanho e aparência uniforme, sem sinais de defeitos ou ataque de pragas e doenças. Posteriormente, elas foram lavadas em recipiente com água e detergente neutro por um período de cinco minutos, e lavadas em água corrente. Em seguida, submersas em álcool à 70% por 1 minuto. As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio, na proporção de 30 ml de água sanitária da marca Dragão (2,5 % cloro ativo), para cada 100 ml de água, sob agitação constante em frascos estéreis por 20 minutos. Após a sanitização, as sementes passaram por tríplice lavagem em água estéril em câmara de fluxo laminar para a completa remoção do agente sanitizante. Ao final do processo de limpeza as sementes foram mantidas em frascos de vidro, submersas em água estéril para hidratação por 72 horas, para facilitar a remoção do tegumento e a abertura cotiledonar para a extração dos embriões zigótico (Figuras 1 e 2).

Após a excisão, os embriões foram inoculados em frascos com volume de 150 ml, contendo o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), enriquecido com 30 g L⁻¹ de sacarose, geleificado com 11 g L⁻¹ de Ágar e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos. Foram introduzidos dois embriões por frasco sendo estabelecidos por 16 dias no meio de cultura, em câmara de crescimento com temperatura de 25°C ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 30 µmol/m²/s.

Figura 1 – Sementes de fava desinfestadas em câmara de fluxo laminar no momento da introdução em meio de cultura com diferentes concentrações de citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e auxina ácido-3-indolbutírico (AIB). CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Allana Caroline Idalino Alencar.



Figura 2 - Extração de embriões nas sementes de Feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) variedade branca. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Allana Caroline Idalino Alencar.



3.3 Experimento 1 – Crescimento e multiplicação dos explantes

Após o estabelecimento em meio MS por 16 dias, os embriões germinados de feijão-fava livres de contaminantes com cerca de 2 cm de comprimento e apresentando o primeiro par de folhas foram retirados dos frascos em câmara de fluxo laminar e dissecados em várias partes. Os explantes utilizados neste experimento foram as partes vegetativas contendo o eixo central com o ápice caulinar e as gemas axilares das folhas (Figuras 3 a e 3 b).

Os explantes excisados foram inoculados em frascos contendo meio MS enriquecido com BAP (6-benzilaminopurina) e AIB (ácido-3-indolbutírico) nos seguintes tratamentos:

Tabela1- Tratamento com diferentes concentrações de com BAP (6-benzilaminopurina) e AIB (ácido-3-indolbutírico), e o controle (meio sem os reguladores de crescimento).

Tratamento	BAP (mg L ⁻¹)	AIB (mg L ⁻¹)
1 controle	0,0	0,0
2	0,5	0,0
3	1,0	0,0
4	2,0	0,0
5	0,0	0,5
6	0,5	0,5
7	1,0	0,5
8	2,0	0,5

Cada tratamento foi composto por dez frascos e em cada frasco foram inoculados dois explantes, perfazendo um total de 20 explantes em cada tratamento. Após a inoculação os frascos foram mantidos em sala de crescimento, conforme as características descritas anteriormente, por um período de 60 dias sendo repicados para meio fresco de mesma composição a cada 20 dias (Figura 4).

Figura 3 – Embrião germinado após 60 dias em meio MS para estabelecimento (a). Explante dissecado em câmara de fluxo laminar para seleção de explantes com gema apical e axilares (b). CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Allana Caroline Idalino Alencar.

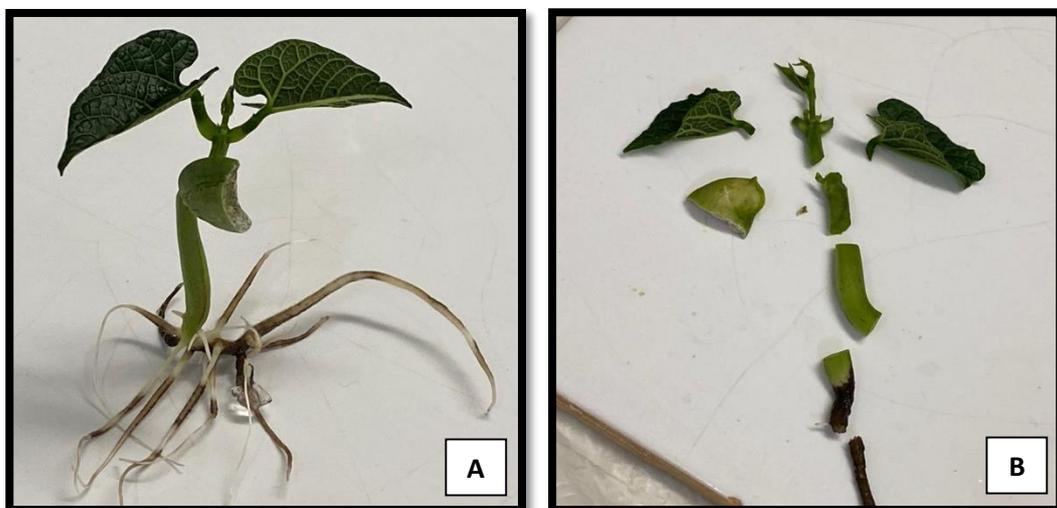


Figura 4 – Explantes de fava branca em meios de multiplicação em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2 °C sob irradiância de $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e fotoperíodo de 16 horas. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Allana Caroline Idalino Alencar.



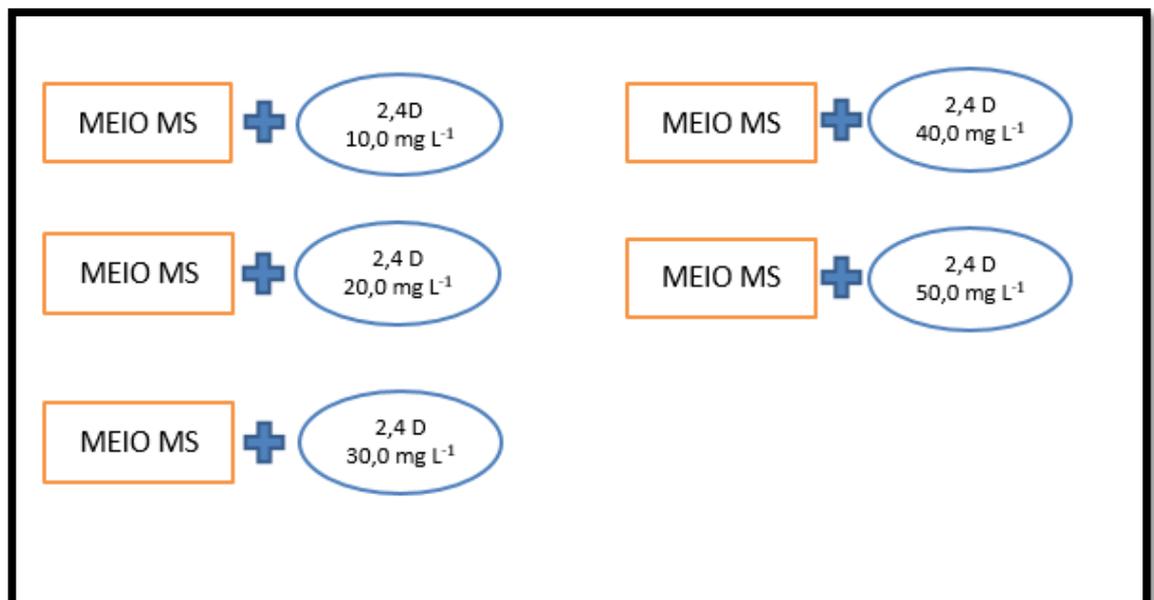
Após a transferência para o experimento de multiplicação os explantes foram avaliados individualmente a cada semana, quanto às seguintes variáveis: número de explantes vivos limpos, número de explantes contaminados (bactérias e fungos), número de explantes oxidados, número de explantes brotados, comprimento do broto apical, número de raízes adventícias com comprimento superior a 2 mm, número de brotações laterais com comprimento superior a 2 mm.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso com oito tratamentos (meios de cultura) e 20 repetições (frascos contendo 2 explantes cada) perfazendo um total de 60 explantes para cada tratamento. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANAVA), e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2011).

3.4 Experimento 2 - Indução de calos em tecidos embrionários de fava branca

Para a obtenção de calos, os embriões zigóticos de fava branca obtidos de acordo com a metodologia anteriormente descrita na seção 3.2 foram introduzidos em frascos de vidro contendo 50 mL de meio de cultura (MS), composto de sais e vitaminas (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 2,4 D (2,4 ácido diclorofenoxiacético), nas seguintes concentrações: 10,0 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 30 mg L⁻¹, 40 mg L⁻¹ e 50 mg L⁻¹. (Figura 5). Todos os meios de cultura foram enriquecidos 30 g L⁻¹ de sacarose, geleificado com 11 g L⁻¹ de Ágar e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos.

Figura 5- Esquema de tratamentos com diferentes concentrações de 2,4 D acrescidos ao meio MS. 10,0 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 30 mg L⁻¹, 40 mg L⁻¹ e 50 mg L⁻¹.



Após a inoculação dos embriões em meio de cultura contendo diferentes concentrações de 2,4 D, os frascos foram levados para a sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, conforme anteriormente descrito. Neste experimento a metade dos frascos (10) contendo todos os tratamentos foi posta no escuro dentro de caixas opacas de papelão; a outra metade dos frascos (10) contendo também todos os tratamentos foi mantida no claro expostos à luminosidade das lâmpadas da sala.

Semanalmente foi avaliado a qualidade dos calos produzidos nas situações de claro e escuro utilizando-se uma escala de notas variando de 0 a 6, onde 0: não houve formação de

calos; 1: calo 1x maior que o explante original; 2: calo 2x maior que o explante original; 3: calo 3x maior que o explante original; 4: calo 4x maior que o explante original; 5: calo 5x maior que o explante original; e 6: calo 6x maior que o explante original. De acordo com modelo proposto por Silva (2012).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso com cinco tratamentos (meios de cultura), duas condições (claro e escuro) e 10 repetições (frascos contendo dois embriões em cada). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e a análise de regressão, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1 – Crescimento e multiplicação dos explantes

Os resultados obtidos após 60 dias de observação dos explantes nos tratamentos in vitro mostraram que o número de explantes vivos foi satisfatório (Tabela 2). O aumento da concentração de BAP ou a presença de AIB no meio não influenciou significativamente a oxidação dos explantes e o escurecimento do meio de cultura (Tabela 1). Os explantes de feijão-fava mantidos nos diferentes meios de cultura para a indução de brotações apresentaram baixos efeitos oxidativos, com valores variando de 4 a 12 brotos oxidados. O efeito negativo de substâncias fenólicas em meio de cultura é bem conhecido e é considerado indesejável quando se quer acelerar a multiplicação de plantas in vitro (GEORGE, 1994). Neste experimento, nos casos em que ocorreram escurecimento na base do explante foi realizado o reposicionamento dos mesmos dentro dos frascos, impedindo que a área do tecido oxidado se espalhasse para todo o meio de cultura, e os explantes permanecessem em áreas limpas do meio.

Tabela 2 – Número de explantes vivos limpos (NEL), Número de explantes contaminados (NEC), Número de explantes oxidados (NEO), Número de explantes brotados (NEB), Comprimento do broto apical (CBA), Número de raízes adventícias com comprimento superior a 2 mm (NRA), Número de brotações laterais com comprimento superior a 2 mm (NBL) após 60 dias no estabelecimento in vitro de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) cv. branca, em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e auxina ácido-3-indolbutírico (AIB). Total 60 explantes em cada tratamento.

Concentrações	NEL	NEC	NEO	NEB	CBA	NBL	NRA
	**	**	**	**	(mm)	(>2 mm)	(>2 mm)
MS	46	14	10	50	25 a	0,2 c	0,8 b
0,5 BAP	50	10	12	55	20 a	2,0 c	0,52 b
1,0 BAP	55	5	8	57	14 ab	8,4 a	0,0 c
2,0 BAP	54	6	6	55	12 b	14,3 a	0,0 b
0,0 BAP + 0,5 AIB	56	4	5	55	22 a	0,3 c	4,3 a
0,5 BAP + 0,5 AIB	59	1	4	53	18 a	2,5 c	2,7 b
1,0 BAP + 0,5 AIB	50	10	12	50	15 ab	5,6 b	0,3 c
2,0 BAP + 0,5 AIB	52	8	8	49	10 b	12,4 a	0,0 c

*Médias seguidas letras iguais não diferiram estatisticamente no teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. ** Não houve diferença significativa.

A brotação e o alongamento das gemas pré-existentes nos explantes têm sido associados ao efeito estimulante de nutrientes e reguladores de crescimento presentes no meio de cultura. De uma maneira geral, os meios de cultura possuem uma fonte de carbono disponível às plantas para a produção de novos tecidos uma vez que a fotossíntese *in vitro* não é, na maioria das vezes, suficiente para tal. Além da fonte de carbono são adicionados também aos meios de cultura macro e micro nutrientes, vitaminas e aminoácidos como componentes básicos necessários ao crescimento vegetal. Todavia, em muitos casos, é necessário ainda a adição de reguladores de crescimento geralmente citocinina e auxinas para estimular a brotação de gemas e raízes, respectivamente (TORRES et al, 1998).

Neste trabalho, cujos explantes utilizados foram provenientes de meio MS sem reguladores de crescimento e estavam com o vigor juvenil dos embriões 16 dias recém germinados (Figura 6), o número de explantes brotados não apresentou diferenças significativas (Tabela 1). Todavia, o alongamento das gemas apicais foi influenciado diretamente pela presença de BAP ou AIB. De uma maneira geral, o aumento da concentração de BAP reduziu o comprimento das gemas apicais (CGA) mais do que em explantes sem BAP ou com apenas 0,5 mg L⁻¹ de BAP com ou sem a presença de AIB. O efeito de BAP e outras citocininas (cinetina, 2ip e TDZ) sobre diversos tipos de explantes é sempre no sentido de estimular a brotação de gemas, mas em muitos casos, provoca também a redução no comprimento das mesmas à medida que aumenta o número de gemas brotadas (GEORGE et al., 2008).

Um estudo com vagens e explantes de feijão-fava de oito variedades locais do Estado da Paraíba, em cultura de tecidos com meio de cultivo acrescidos de reguladores de crescimento de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido-3-indolbutírico (AIB), observaram valores inferiores aos constados neste estudo para a altura de explantes, com valores oscilando de 1,80 mm a 2,75 mm (SANTOS, 2002).

Esse efeito sobre o estímulo à brotação de gemas laterais pode ser observado nos tratamentos que apresentavam BAP na sua composição. Quanto maior foi a concentração de BAP utilizada, maior o número de brotações laterais (NBL) observadas (Tabela 1). No tratamento sem BAP (MS) com ou sem AIB, praticamente apenas a gema apical foi capaz de brotar e alongar. Já nos tratamentos com BAP entre 0,5 e 2,0 mg L⁻¹ o aumento do número de gemas laterais foi consideravelmente aumentado chegando a ser até mais de 10 vezes na concentração máxima. Todavia, a maioria desse número elevado de gemas não alongou o suficiente no período observado (60 dias) para que pudessem ser repicados em novos frascos (Figura 7). Na maioria dos casos observou-se que apenas duas ou três dessas múltiplas gemas conseguiram um alongamento equivalente à gema apical no período do experimento. A

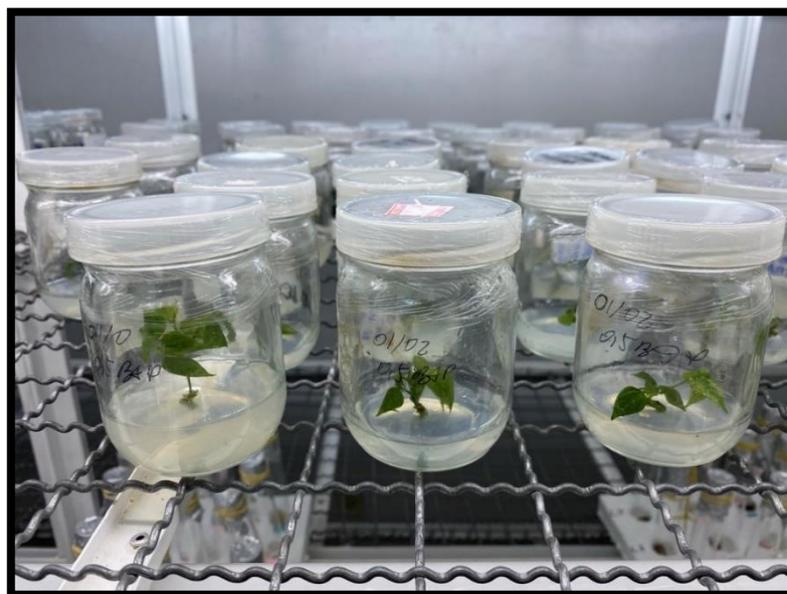
presença de AIB associado ao BAP reduziu ligeiramente o número de gemas com mais de 2 mm observadas nos explantes. Esse fato pode estar associado ao estímulo ao crescimento de raízes adventícias (NRA) observado nos tratamentos com AIB (Tabela 2).

A presença do BAP além de estimular o surgimento de brotações laterais axilares também inibiu o crescimento de raízes adventícias, pois somente no tratamento em que o AIB estava presente sem o BAP observou-se o maior número de raízes (média de 4,3 raízes/explante). Por outro lado, nos tratamentos apenas com BAP sem AIB o número de raízes adventícias foi baixo (0,5 mg L⁻¹ de BAP) ou nenhuma raiz foi observada (1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP). No tratamento controle, sem BAP ou AIB houve a formação de raízes adventícias em vários explantes mostrando que foi a presença do BAP em outros tratamentos o responsável pela sua inibição. Diversos fatores influenciam o comportamento de explantes quando cultivados em meio de cultura, sendo um dos principais o balanço hormonal entre auxinas e citocininas (PREECE, 2008). A vitalidade de explantes em meio de cultivo está relacionada com o potencial que as citocininas apresentam de controlar a expressão de genes envolvidos na senescência de tecidos e órgãos vegetais, podendo inibir ou retardar os efeitos fisiológicos degenerativos, e como consequência, aumenta a longevidade celular, corroborando com os resultados observados neste estudo. Além disso, destaca-se que o efeito das citocininas em culturas de tecido ou órgãos pode variar de acordo com a substância utilizada, o tipo de cultura, a variedade da planta, de onde ela foi derivada e da idade do tecido que deu origem ao explante (SILVA, 2010).

Figura 6 - Explantes *Phaseolus lunatus* L.fava branca durante a repicagem após 20 dias em meio de cultura MS com 2,0 mgL⁻¹ BAP (esq.), 0,5 mg L⁻¹ BAP (centro) e 0,5 mg L⁻¹ IBA (dir.). CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Allana Caroline Idalino Alencar.



Figura 7 – Aspecto geral do experimento de multiplicação de explantes de *Phaseolus lunatus* L.fava branca em câmara de crescimento. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Allana Caroline Idalino Alencar.



Diversos estudos justificam as respostas observadas no presente trabalho quanto a emissão de brotações na presença de citocininas, muitos pesquisadores atribuem essa resposta ao modelo proposto previamente por Nielsen et al. (1995). De acordo com esse modelo, o BAP (citocinina) pode se ligar a um receptor, uma “proteína receptora de citocinina” (CBP, “*Cytokinin-binding protein*”), a qual possui dois sítios de ligação. Em um sítio se liga as citocininas derivadas de adeninas, e o outro sítio se liga as citocininas feniluréia. Por esta razão, a adição de BAP, proporciona a formação de brotações, devido à ativação de um dos sítios da CBP.

Experimento 2 - Indução de calos em tecidos embrionários de fava branca

Ao final de 30 dias de cultivo foi possível observar elevados percentuais (85% ou mais) de calejamento nas extremidades proximal e distal dos explantes mantidos em meio com a adição de diferentes concentrações de 2,4 D (2,4 ácido diclorofenoxiacético) em ambos os ambientes testados (claro e escuro). Morre *et al.* (1998), ao detalharem um procedimento de regeneração *in vitro* de algodão a partir de eixos embrionários, observaram a formação de calos em todas as extremidades proximal na maioria dos explantes, quando estes foram em meio de cultura suplementadas com altas concentrações de 2,4 D ao final de 20 dias de cultivo.

Nas figuras de 8 a 12 são apresentados os resultados obtidos por meio da escala de notas desenvolvida para avaliar a qualidade dos calos de feijão-fava (*P. lunatus* L.). Em todas as concentrações avaliadas (10 a 50 mgL⁻¹ 2,4D) observou-se um aumento no tamanho do volume dos explantes expostos a auxina independentemente de estarem no claro ou no escuro.

Figura 8 – Evolução do crescimento dos calos morfogênicos em embriões zigóticos de fava branca submetidos a condições de luz e escuro em meio MS com 10 mgL⁻¹ de 2,4 D durante 20 dias de avaliação.

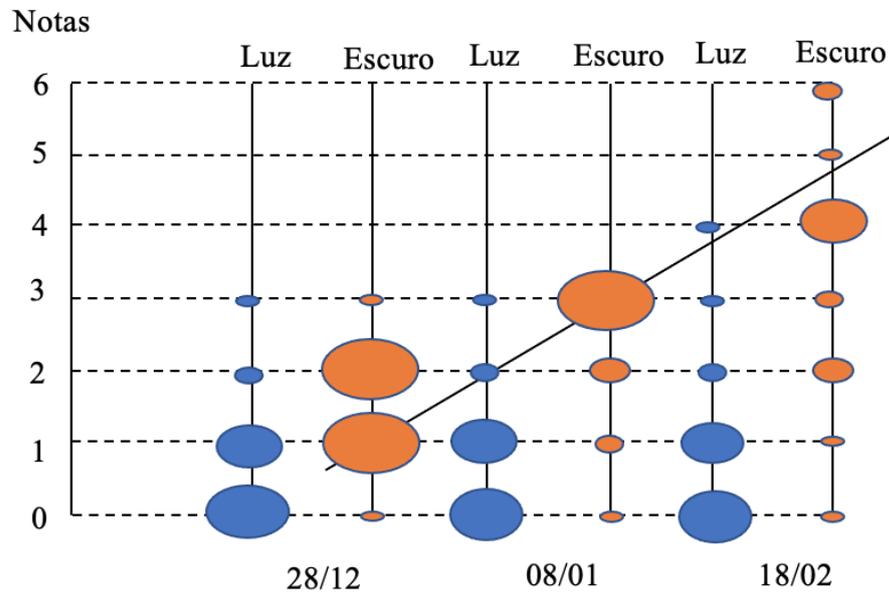


Figura 9 – Evolução do crescimento dos calos morfogênicos em embriões zigóticos de fava branca submetidos a condições de luz e escuro em meio MS com 20 mgL⁻¹ de 2,4 D durante 20 dias de avaliação.

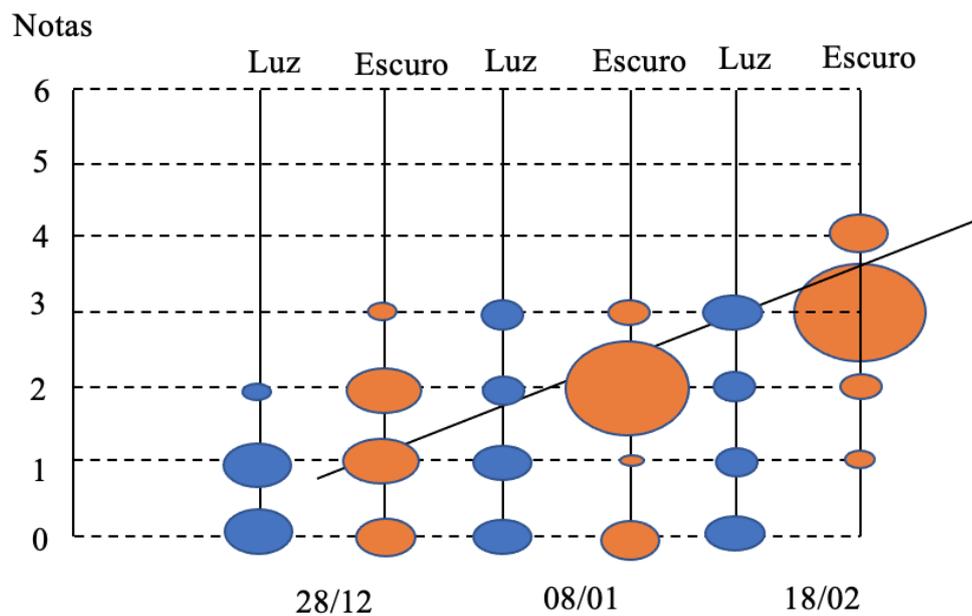


Figura 10– Evolução do crescimento dos calos morfogênicos em embriões zigóticos de fava branca submetidos a condições de luz e escuro em meio MS com 30 mgL⁻¹ de 2,4 D durante 20 dias de avaliação.

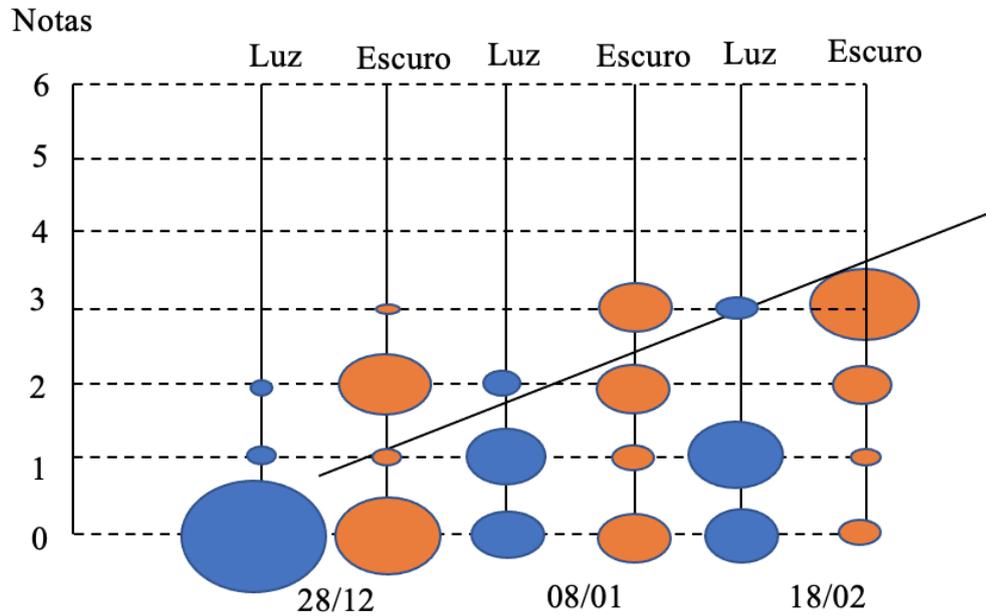


Figura 11 – Evolução do crescimento dos calos morfogênicos em embriões zigóticos de fava branca submetidos a condições de luz e escuro em meio MS com 40 mgL⁻¹ de 2,4 D durante 20 dias de avaliação.

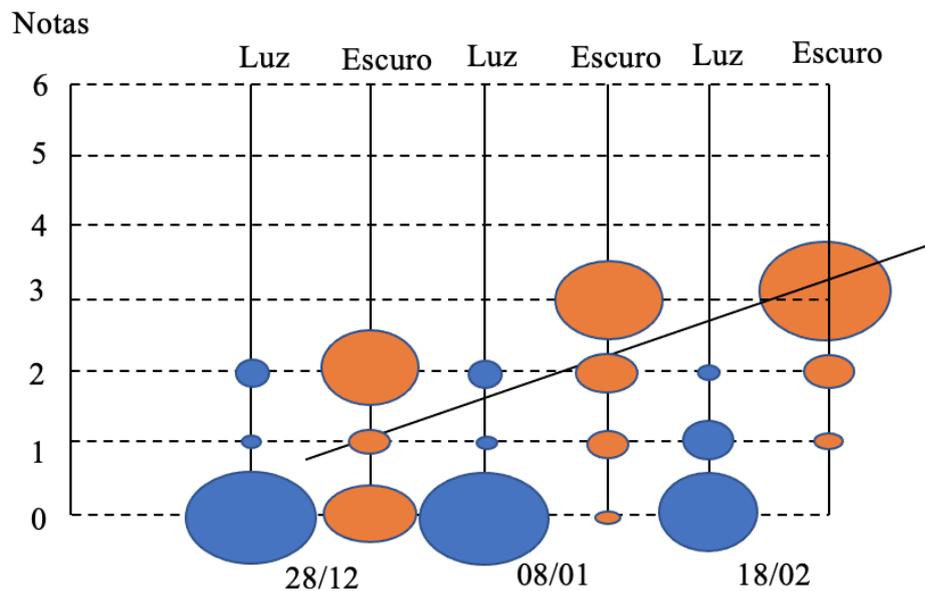
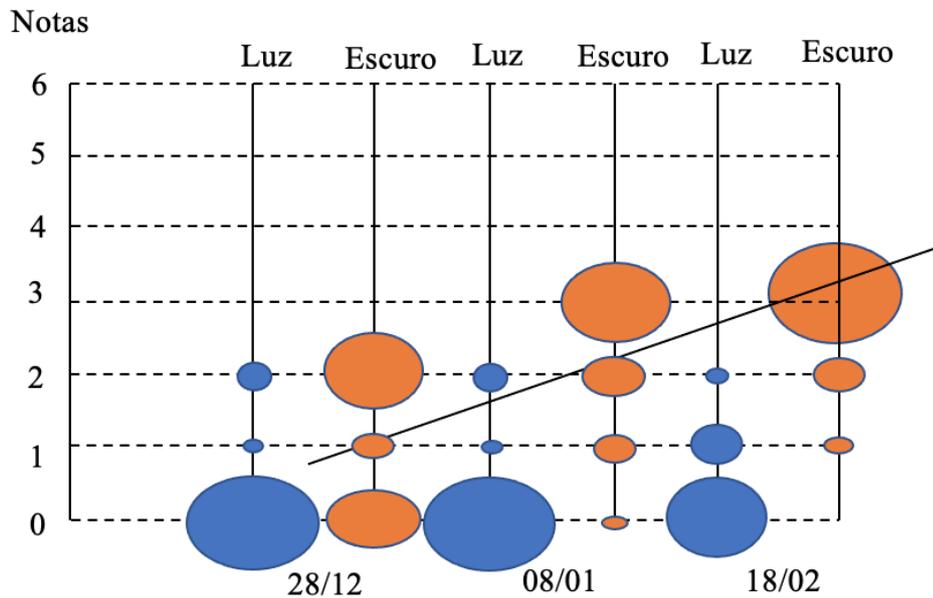


Figura 12 – Evolução do crescimento dos calos morfogênicos em embriões zigóticos de fava branca submetidos a condições de luz e escuro em meio MS com 50 mgL⁻¹ de 2,4 D durante 20 dias de avaliação.



Vários fatores influenciam neste processo, como a absorção de água e o efeito das auxinas, tendo em vista que a água e outros solutos são absorvidos através da membrana plasmática. Desta forma, se quantidade de água no interior da célula for menor que no meio externo, o gradiente de potencial hídrico acelera a taxa de absorção, equilibrando a concentração de sais entre o interior e o exterior da célula vegetal.

Como no presente caso, as condições não propiciam a saída de sais, há a entrada de água. O resultado dessa absorção gera ainda o potencial de turgescência que atua sobre a membrana e a parede celular, resultando no aumento da pressão interna e inchaço da célula. Há ainda um possível aumento no potencial de extensibilidade por conta do efeito da presença de 2,4-D (ácido diclorofenoacético). A hipótese do crescimento ácido estabelece que, um aumento no fluxo de H⁺ e consequente queda do pH no apoplasto faz com que várias enzimas possam vir à entrar em atividade (expansivas, hidrolases, pectinases, celulases, hemicelulases) clivando uma série de ligações químicas (pontes de hidrogênio, ligações cruzadas entre as microfibrilas de celulose e as hemiceluloses) contribuindo para o afrouxamento da parede

celular, resultando no aumento da taxa de extensibilidade da célula (ALBERTS, BRUCE et al., 2017; TAIZ & ZEIGER, 2013).

A formação de calos em elevados percentuais em meios contendo citocininas, explica que o balanço hormonal exógeno interagiu de forma significativa com os níveis endógenos, desencadeando essa resposta morfogênica. A relação citocinina/auxina, provavelmente, endógena ocorreu nessa região do explante (região da extremidade proximal), que em contato com o meio de cultura enriquecido de reguladores de crescimento, veio a se estabelecer em proporções que favoreceram o processo para a formação de calogênese.

Em um estudo similar, observou-se, que ao fim de 54 dias, a última fase da cultura em suspensão foi finalizada, e durante estes procedimentos uma série de estruturas morfológicamente distintas apresentaram-se, estruturas globulares foram encontradas nas concentrações 0,125; 0,25 e 0,37 mgL⁻¹ de 2,4-D, se destacando a concentração 0.125 mgL⁻¹ de 2,4-D, que apesar de possuir uma alta quantidade de estruturas globulares, sofreu grandes percas por conta da oxidação (RAMAKRISMAN et al, 2005).

Não houve indícios visuais de formação de alguma estrutura organizada o suficiente para se estabelecer uma definição de um caminho organogênico ou embriogênico. Embora alguns tratamentos, principalmente no escuro tenham produzido massas de calos friáveis bastante consideráveis, tais estruturas tenderam a se manter desdiferenciado possivelmente pelas elevadas concentrações de 2,4 D utilizadas neste estudo.

De acordo com as notas dadas aos calos formados nos explantes nos diferentes tratamentos de concentrações de 2,4 D no claro e escuro em três diferentes datas foi possível definir as tendências dos tamanhos e qualidade dos calos formados. Na sequência de figuras de 7 a 11 estão expressas as notas estabelecidas para cada tratamento nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 mgL⁻¹ de 2,4D.

Nas figuras (Figuras de 8 a 12) é possível identificar a tendência dos explantes que permaneceram no escuro de formar mais e melhores calos já na primeira data observada e mantendo a tendência nas datas seguintes, o que significa dizer que o tamanho e, portanto, a massa de calos organogênicos foi aumentando a cada observação(Figura 13). De uma maneira geral, explantes que permaneceram no claro formaram sempre uma massa de calos bem menor do que aqueles de mesma concentração de 2,4 D que permaneceram no escuro.

O efeito oxidativo da luz sobre as auxinas é bastante conhecido em plantas e em muitos casos o efeito destas fica completamente comprometido (TAIZ et al., 2008). Neste experimento, não obstante as altas concentrações de 2,4D (uma auxina sintética forte) utilizadas, a sua exposição à luz diminuiu e atrasou a calogênese em embriões de fava branca.

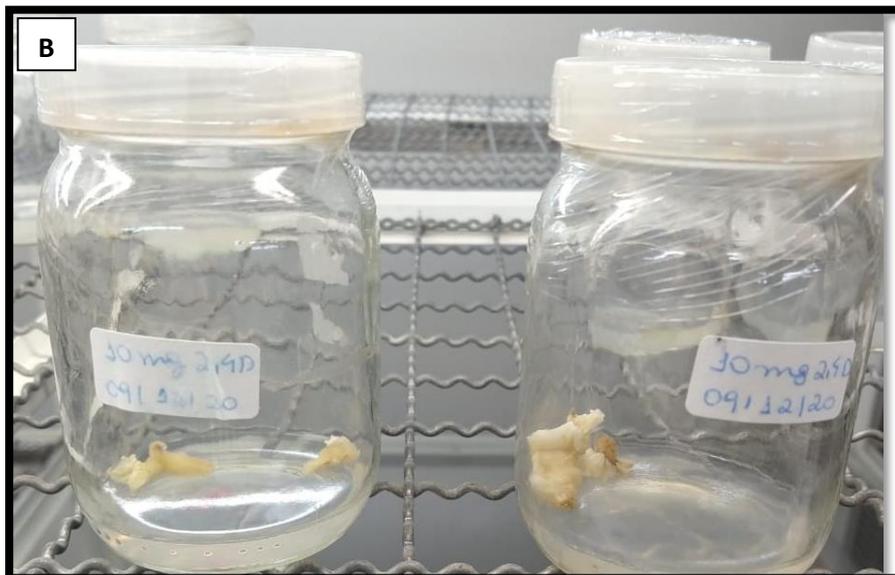
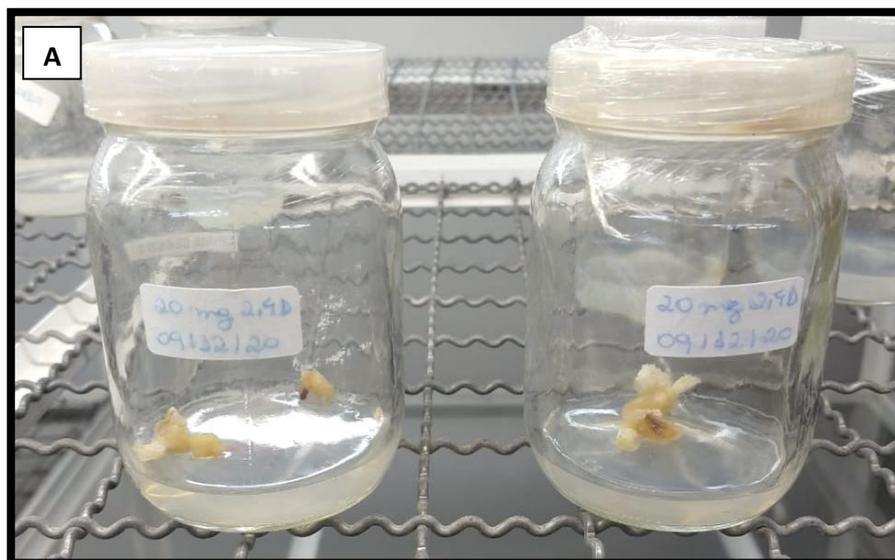
No claro, a maior parte dos explantes permaneceu sem calos ou calos pequenos em alguns explantes. Algumas dessas massas calosas eventualmente chegaram a atingir uma nota melhor (até nota 4) na concentração de 10 mgL⁻¹ (Figura 7). Nas demais concentrações os calos obtidos no claro atingiram, no máximo, a nota 3 e assim mesmo em poucos explantes (Figuras 8, 9 10 e 11). Como é possível observar nestas mesmas figuras (7 a 11), a grande maioria dos explantes no claro permaneceram com notas 0 ou 1 indicando a ausência de calos ou apenas uma discreta massa calosa nas extremidades.

Por outro lado, alguns explantes que foram mantidos no escuro na concentração de 10 mgL⁻¹ de 2,4 D, produziram consideráveis massas calosas chegando a aumentar o tamanho total do explante em cerca de seis vezes mais do que o explante original (Figura 8). Os explantes mantidos no escuro nas diferentes concentrações de 2,4 D, tiveram suas notas aumentadas a cada intervalo de 10 dias. Esse fato é representado por círculos maiores nas figuras de 8 a 12 que foram subindo na escala a cada nova observação. Alguns explantes mantidos na concentração de 10 mgL⁻¹ de 2,4 D apresentaram as notas mais altas (4, 5 e 6), mas mantiveram alguns explantes também com notas mais baixas (1, 2, e 3) e até mesmo 1 explante sem apresentar calo (nota 0) (Figura 8). Essa resposta variável entre explantes de um mesmo tratamento parece indicar variações genéticas existentes entre as sementes de uma mesma variedade. Respostas mais homogêneas possivelmente seriam possíveis entre explantes de uma mesma linhagem selecionada.

Os resultados apresentados neste trabalho evidenciam a capacidade do feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) var branca de produzir massas calosas possivelmente organogênicas a partir de embriões zigóticos nas várias concentrações utilizadas neste experimento (Figura 14). A concentração de 10 mgL⁻¹ de 2,4 D apresentou o maior potencial para calogênese desde que os explantes sejam mantidos em condições de escuro. Todavia, mais pesquisas devem ser conduzidas no sentido de se estudar a capacidade de tais calos serem capazes de produzir plantas inteiras quer seja por organogênese, quer seja por embriogênese indireta. Além disso, o uso desses calos em suspensões celulares poderia acelerar a capacidade regenerativa dos mesmos e

auxiliar nos programas de melhoramento genético da espécie e auxiliar na compreensão de sua fisiologia.

Figura 13 - Diferentes concentrações de 2,4 D em micropropagação de Feijão-Fava (*Phaseolus lunatus* L.) em exposição à luz e ao escuro. (A) Concentração de 20 mg.L⁻¹ de 2,4 D exposto a luz (frasco direito) e totalmente no escuro (frasco esquerdo). (B) Concentração de 10 mg.L⁻¹ de 2,4 D exposto a luz (frasco direito) e totalmente no escuro (frasco esquerdo). (C) Concentração de 40 mg.L⁻¹ de 2,4 D exposto a luz (frasco direito) e totalmente no escuro (frasco esquerdo), CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Allana Caroline Idalino Alencar.



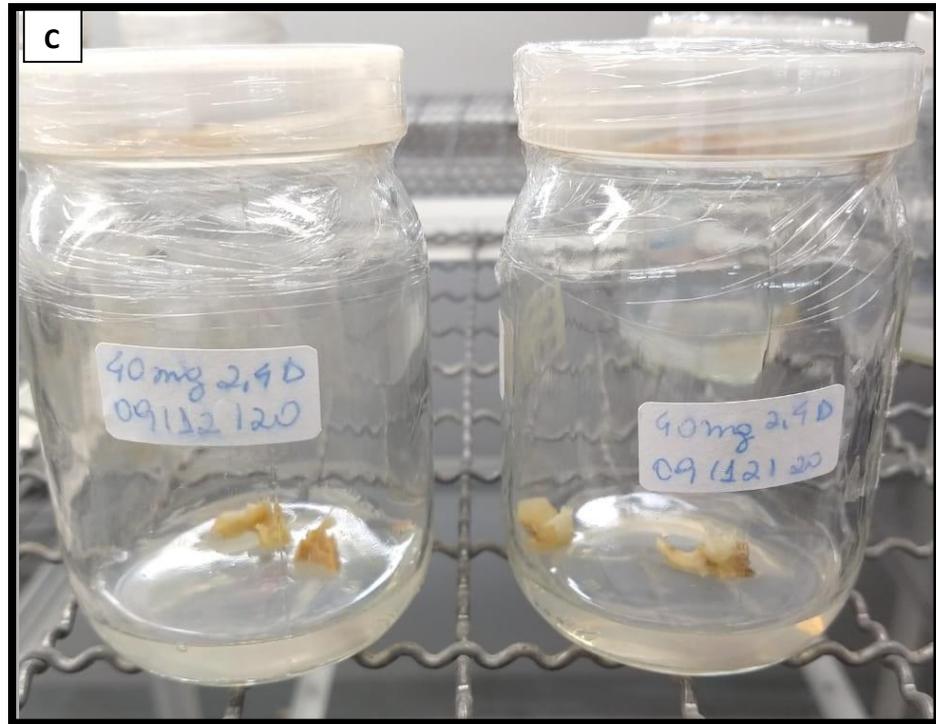
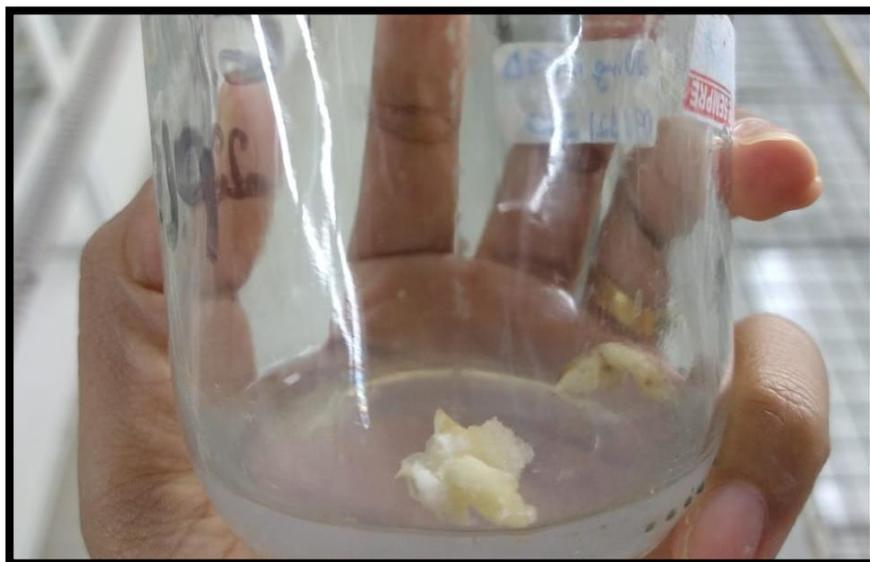


Figura 14- Formação de calo embriogênico 20 dias após inoculação in vitro. CECA-UFAL, Rio Largo, AL. Fonte: Allana Caroline Idalino Alencar.



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

5 CONCLUSÕES

- 1 – BAP adicionado ao meio de cultura induziu a brotação de gemas apicais e múltiplas gemas axilares em explantes de feijão-fava;
- 2 – A presença de AIB na concentração de $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ foi suficiente para induzir enraizamento *in vitro* de *Phaseolus lunatus* L;
- 3 – O uso de 2,4 e a ausência de luz, induziu uma alta taxa de calejamento nos explantes oriundos de embriões zigóticos de fava branca;
- 4 – Explantes oriundos de embriões zigóticos de fava branca expostos à luz com as mesmas concentrações de 2,4 D não formaram calos vigorosos.

REFERÊNCIAS

- ADVÍNCULA, T. L.; BARUFALDI, N.; NOBRE, D. A. C.; FERREIRA, E. N. B.; BRANDÃO-JÚNIOR, D. S.; COSTA, C. A. Qualidade física e fisiológica de sementes de *Phaseolus lunatus* L. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 3, p. 341-346, 2015.
- AITCHISON, PA, MACLEOD AJ, YEOMAN MM. **Growth patterns in tissue (callus) cultures**. In: Street HE., editor. Plant tiss. and cell cult. 2^a ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1977, p.267-306. ISBN: 0- 520-02411-7.
- ALBERTS, BRUCE., et al., **Biologia molecular da célula.**, 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ALLARD, R.W. Princípios do melhoramento genético de plantas. São Paulo: Edgard Blucher, 381p, 1971.
- ANWAR, F.; ALGHAMDI, S. S.; AMMAR, M. H.; SIDDIQUE, K. H. M. An efficient in vitro regeneration protocol for faba bean (*Vicia faba* L.). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 28, p. 6460-6467, 2011.
- ANTUNES, I.F.; DA COSTA, J.G.C.; OLIVEIRA, E.A. Natural hybridization in *Phaseolus vulgaris* L. In Pelotas (Brasil). **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 16, n. 4, p. 61–62, 1973.
- ARAGÃO, F. J. L.; BRONDANI, R. P. V.; BURLE, M. L. **Phaseolus**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF, 14 p., 2011.
- ARTECA, R.N. **Plant growth substances: principles and applications**. New York: Chapman e Hall, 1996. 332p.
- AZEVEDO, J.N., FRANCO, L.J.D., ARAÚJO, R.O. da Composição química de sete variedades de feijão-fava. In: Resultados de pesquisa de feijão-fava. Teresina: EMBRAPA MEIO-NORTE. 4 p. (Comunicado Técnico, 152), 2003.

BAJAJ, Y.P.S., **Automated micropropagation for en masse production of plants**. In: Y.P.S. BAJAJ (Ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 17. High-Tech and Micropropagation I. Springer, Berlin, pp. 3-16, 1991.

BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. 3. ed. ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2014. 325 p.

CABRAL, J. R. S.; LEDO, C. A. da S.; CALDAS, R. C.; JUNGHANS, D. T.. Variação de caracteres em híbridos de abacaxizeiro obtidos de diferentes cruzamentos. **Revista Brasileira de Fruticultura**. vol.31, n.4, p. 1129-1134, 2009.

CABRAL, J. R. S.; SOUZA J. da S.; FERREIRA, F. R. Variabilidade genética e melhoramento do abacaxi. In: **RECURSOS GENÉTICOS E MELHORAMENTO DE PLANTAS PARA O NORDESTE BRASILEIRO**, 1999, Petrolina, PE. Anais... Petrolina: Embrapa Semi-Árido, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Brasília-DF, 1999. V.1, 9p. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo>. Acesso em: 15 de fevereiro 2021.

CAMARENA, F. **Magnitud e impacto potencial de la liberación de los organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales**. Caso: Leguminosas de 32 grano. p. 19-40. En: O. Hidalgo; W. Roca; E.N. Fernández Northcote (eds.). *Magnitud e impacto potencial de la liberación de organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales: Casos Algodón, Leguminosas de grano, Maíz y Papa*. Consejo Nacional del Ambiente. Lima, Perú, 2005.

CARVALHO, P. E. R.; GAIAD, S. **A família Fabaceae**. Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore/CONT00fu17wvyo02wyiv807nyi6s9ggg9il.html>. Acesso: 18 de março de 2021.

CAVALHEIRO, V. B. D. **Caracterização de genótipos de feijão-lima (*Phaseolus lunatus* L.) na região de Pelotas – Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Universidade Federal de Pelotas, 78 p., 2012.

COSTA, R. N.; SANTOS, W. J.; LIMA, J. L.; ACCHILE, S.; SANTOS-NETO, A. L.; SILVA, J. V. Avaliação de diferentes métodos pré-germinativos para três espécies arbóreas da

- família Fabaceae em diferentes ambientes. **Scientific Electronic Archives**, v. 11, n. 1, 11 p., 2018.
- COELHO, C. M. D.; COIMBRA, J. L. M.; SOUZA, C. A.; BOGO, A.; GUIDOLIN, A. F. Diversidade genética em acessos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1241-1247, 2007.
- DELGADO-SALINAS, A.; TURLEY, T.; RICHIMAN, A.; LAVIN, M. Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). **Systematic Botany**, v. 24, n. 3, p. 438-460, 1999.
- DIEGUES, I. P. **Diversidade genética entre acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) mensurada via caracteres morfoagronômicos e marcadores ISSR**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do rio de Janeiro, 61 p., 2014.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação do estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 3, p. 221-227, 2003.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; DUDITS, D. Activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived alfalfa cells: the role of auxin and stress. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 46, p.13-14, 2002.
- FEHR, W.R. **Principles of cultivar development**. New York: Macmillan. 525p, 1987.
- FREITAS, F. O. Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.41, n.7, p.1199-1203, 2006.
- FERREIRA, P. V. **Estatística experimental aplicada à agronomia. Edição 3**; Edufal: Maceió, AL, 2000; 422p.
- GOMES, G. S.; SILVA, G. S.; CONCEIÇÃO, G. M. Diversidade de Leguminosas no Cerrado do Município de São João do Sóter, Maranhão, Brasil. **Centro Científico Conhecer**, v. 4, n. 7, p. 166-176, 2017.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A. e DE KLERK, G. J. **Plant Tissue Culture 3rd Edition**, vol. 1, Springer, Netherlands, 2008.

GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; LANZA, M. A.; SCHUSLER, I. **Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.30, n.253, p.86–95, 2009.

GUIMARÃES, W. N. R.; MARTINS, L. S. S.; SILVA, E. F.; FERRAZ, G. M. G.; OLIVEIRA, F. J. Caracterização Morfológica e Molecular de Acessos de Feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 37-45, 2007.

GUTIÉRREZ, I.E.M.; NEPOMUCENO, C.F.; LEDO, C.A.S.; SANTANA, J.R.F. Micropropagation and acclimatization of *Bauhinia cheilantha* (an important medicinal plant). **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v.10, n.8, p.1353-1358, 2011.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR., F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: PrenticeHall 915p, 2011.

HARDY O.; DUBOIS, S.; ZORO BI, I.; BAUDOIN, J.P. Gene dispersal and its consequences on the genetic structure of wild populations of Lima bean (*Phaseolus lunatus*) in Costa Rica. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n.109, p.1-6, 1997.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2018. Produção Agrícola Municipal. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_\[anual\]/2018/pam2013.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_[anual]/2018/pam2013.pdf)>. Acesso em: 09 fev. 2021.

JORDAN, M.; ITURRIAGA, L.; ROVEMRO, C.; GOREUX, A., 1991. Promotion of *Annona cherimola* in vitro shoot morphogenesis as influenced by antioxidants. **Gartenbauwissenschaft**, 56, v.5 : 224-227, 1991.

KRISHNA, G.; REDDY, P. S.; RAMTEKE, P. W.; RAMBABU, P.; SOHRAB, S. S.; RANA, D.; BHATTACHARYA, P. In vitro regeneration through organogenesis and somatic embryogenesis in pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] cv. JKR 105. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, n. 4, p. 375-385, 2011.

MARIANO, E. F. **Atributos químicos do solo, trocas gasosas e produção de fava (*Phaseolus lunatus* L.) submetida à inoculação e a diferentes fontes de adubação.**

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal da Paraíba. 62 f. 2019.

MARÉCHAL, R.; MASCHERPA, J. M.; STAINIER, F. Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques traitées par l'analyse informatique. **Boissiera**, v. 28, p. 1-273, 1978.

MEDEIROS, V. S. S.; ALMEIDA, L. S.; PAULA, A. C.; MARINI, F. S.; ARRIEL, N. H. C. Caracterização morfoagronômica de fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Cadernos de Agroecologia**, v. 10, n. 3, 5p., 2015.

MORRE, J. L.; PERMINGEAT, H. R.; ROMAGNOLI, M. V.; HEISTERBORG, C. M.; VALLEJOS, R. H. Multiple shoot induction and plant regeneration from embryonic axes of cotton. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 54: 131-136, 1998.

MONACO, L.C.; SONDAHL, M.R; CARVALHO, A. **Application of tissue culture in the improvement of coffee.** In.: REINERT, J.; BAJAY, Y.P.S.(Eds) Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture. Berlin: Springer Verlag, p. 109-129, 1997.

MORAIS, L.S. **Transformação genética de bananeira visando resistência a doenças bacterianas.** In: XIX Congresso Brasileiro de Fruticultura Tropical, v.1, Cabo Frio: SBF/UENF/UFRuralRJ, v.19, p.385, 2006.

MOSCONI, E. A., KLEIN, F., LAMBROU, M., FUCHS, J., SCHWEIZER, D.. Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). **Genome** 42: 1224-1233, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, K. S.; FREIRE, F. A. M.; ALOUFA, M. A. I. Influência de reguladores de crescimento e tipo de explante na morfogênese *in vitro* de *Hanconia speciosa* Gomes. **Revista Desafios**, v. 6, n. 4, 15 p., 2019.

OLIVEIRA, F. N.; BARROS, S. T.; PEREIRA, C. B. Caracterização botânica e agrônômica de acessos de feijão-fava, em Mossoró, RN. **Revista Caatinga**, v.24, n.1, p.143-148, 2011.

- OLIVEIRA, A. P. DE; ALVES, E. U.; ALVES, A. U.; DORNELAS, C. S. M.; SILVA, J. A.; PORTO, M. L.; ALVES, A. V. Produção de feijão-fava em função do uso de doses de fósforo em um Neossolo Regolítico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.543-546, 2004.
- PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras-MG: UFLA/FAEPE, 130 p, 2001.
- PEREIRA, R.; SOUZA, E. B.; FONTENELLE, R. O. S.; VASCONCELOS, M. A.; SANTOS, H. S.; TEIXEIRA, E. H. Diversidade estrutural e potencial biológico dos metabólitos secundários de *Myroxylon* L. f. (Fabaceae): uma revisão de literatura. **Hoehnea**, v. 46. N. 1, 11 p., 2019.
- PEGADO, C .M. A., BARBOSA, L. J. N., MENDES, J. E. M. F., SOUTO, P. C. & SOUTO, J. S. Decomposição superficial e subsuperficial de folhas de fava (*Phaseolus lunatus* L.) na região do brejo da Paraíba, Brasil. *Revista Caatinga*, v. 21, n. 1m p. 218-223, 2008.
- PREECE, J. Stock plant physiological factors affecting growth and morphogenesis. In: GEORGE, F. E.; HALL, M. A., de KLERK, J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture – The Background**. 3. ed. Springer, v.1, p. 403-422, 2008.
- RADMANN, E. B.; BIANCHI, V.J.; OLIVEIRA, R.P.; FACHINELLO, J.C. Multiplicação *in vitro* e alongamento das brotações micropropagadas do porta-enxerto ‘Tsukuba 1’ (*Prunus pérsica* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 31, n.3, p. 656-663, 2009.
- RAMAKRISHNAN, K.; GNANAM, R.; SIVAKUMAR, P.; MANICKAM, A. *In vitro* somatic embryogenesis from cell suspension cultures of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. **Plant Cell Reports**. v.24, p.449-461, 2005.
- ROGALSKI, M., GUERRA, M.P., SILVA, A.L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira ‘santa rosa’: efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v.25, n.2, p.365-367, 2003.
- SANTOS, E. F. **Caracterização Morfológica e Fenológica de Plantas e Qualidade Pós-colheita de Frutos de Acessos de Cambuizeiro (*Myrciaria floribunda* O. Berg) do Banco Ativo de Germoplasma do CECA/UFAL**. 2018, 121 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) – Centro de Ciências Agrárias/Universidade Federal de Alagoas – CECA/UFAL, Rio Largo – Al, 2018.

SANTOS, D.; CORLETT, F.M.F.; MENDES, J.E.M.F.; WANDERLEY-JÚNIOR, J.S.A. Produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de fava no Estado da Paraíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.10, p.1407-1412, 2012.

SANTANA, J.R.F. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de Annonaceae**. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, p. 237, 2003.

SANTOS, A. R. B.; SIMEÃO, M.; BARROS, P. S.; CAVALCANTE, G. R. S.; SANTOS, D.; CORLETT, F. M. F.; MENDES, J. E. M. F.; WANDERLEY JÚNIOR, J. S. A. Produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de fava no estado da Paraíba. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.37, n.10, p. 1407-1412, 2002.

SERRANO-SERRANO, M.L.; HERNÁNDEZ-TORRES, J.; CASTILLO-VILLAMIZAR, G.; DEBOUCK, D.G.; SÁNCHEZ, M.I. Gene pools in wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the americas: evidences for an Andean origin and past migrations. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.54, p.76-87, 2010.

SILVA, A. G.; CAVALCANTE, A. C. P.; OLIVEIRA, D. S.; SILVA, M. J. R. Crescimento inicial de *Phaseolus lunatus* L., submetidos a diferentes substratos orgânicos e aplicação foliar de urina de vaca. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, n. 1, p. 131-135, 2015.

SILVA, M. I. **Embriogênese somática indireta de duas variedades RB de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Alagoas, p. 86, 2012.

SILVA, R. N. O. **Diversidade genética em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) por marcadores morfoagronômicos e moleculares**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Piauí, 176 p., 2011.

SILVA, I.M.C. **Multiplicação e regeneração *in vitro* de marmeleiro, cv. Adams e MC**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

SILVA, L.G.; PÁDUA, J.G.; BURLE, M.L. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA (BAG) DE FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.) DO CENARGEN (Morphological evaluation of the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) gene bank

of CENARGEN). Resumo publicado nos Anais do XIV Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 2009.

SILVA, C. A.; ABREU, A. F. B.; RAMALHO, M. A. P. Associação entre arquitetura de planta e produtividade de grãos em progênies de feijoeiro de porte ereto e prostado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 12, p. 1647-1652, 2009.

SILVA, H. T.; COSTA, A. O. **Caracterização botânica das espécies silvestres de gênero *Phaseolus* L. (Leguminosae)**. Santo Antônio de Goáis: Embrapa, (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 156) 40 p. 2003.

STAFFORD, A. Warren G. **Plant cell and tissue culture**. Melksham: RedWood Press, 251p. ISSN: 1573- 5044. 1991.

SOARES, C. P.; MENESES, C. H. S. G.; HENRIQUES, A. B.; ARAÚJO, J. L. S.; VIDAL, M. S. **Um panorama sobre a regeneração *in vitro* e transformação genética de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia – (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 269), 28 p., 2010.

SOUZA, J. C.; RESCAROLLI, C. L. S.; NUNES, C. V. Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. **Revista Fitos**, v. 12, n. 3, p. 269-280, 2018.

SOUZA, T. P.; ABBOUD, A. C. S.; DIAS, A.; SILVA, B. S. Seleção de acessos promissores de feijão-fava na Baixada Fluminense, RJ, por meio de descritores morfoagronômicos. **Magistra**, v. 30, p. 211-224, 2019.

SOUZA, F.V.D.; COSTA, M.A.P.C; NETO, H.P. da S. Aclimatização. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 131-140, 2006.

SOTO, J.L.L., CORRAL, J.A.R., GONZÁLEZ, J.J.S. & ILDEFONSO, R.L. Adaptación Climática de 25 Especies de Frijol Silvestre (*Phaseolus* spp.) en la República Mexicana. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 28, n. 3, p. 211-230, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3rd ed Sinauer Associates Inc Publishers. Sunderland, MA. 690 p, 2013.

VIAGANÓ, C.R.; BIANCHI, V.J.; ROCHA, P.S.G.; SCHUCH, M.W.; FACHINELLO, J.C. **Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* cv. Mr. S. 1/8: concentrações de IBA**

em meio de cultura acrescido de ágar ou vermiculita. Bioscience Journal, Uberlândia, v.23, n.3, p.60-65, 2007.

TORRES, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa/CNPH/CBAB, 1998. v.1, p.261-296.

WERNER, E. T.; MILANEZ C. R. D.; MENGARDA, L. H. G.; VENDRAME, W. A.; CUZZUOL, G. R. F. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). Acta Botanica Brasileira. 2010 Dec; v. 24, n. 4, p. 1046–1051m 2010.