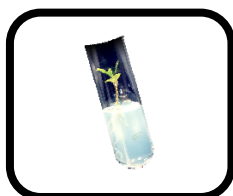


UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

HAYANA MILLENA DE ARRUDA AZEVEDO



**INDUÇÃO DE MUTAÇÃO EM FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.)
WALP.], CULTIVAR BR-14 MULATO, VISANDO À OBTENÇÃO DE
MUTANTES TOLERANTES À SALINIDADE**

RECIFE
2009

HAYANA MILLENA DE ARRUDA AZEVEDO

**“INDUÇÃO DE MUTAÇÃO EM FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.],
CULTIVAR BR-14 MULATO, VISANDO À OBTENÇÃO DE MUTANTES
TOLERANTES À SALINIDADE”**

Dissertação submetida como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Molecular e Celular, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Ana Maria Benko-Iseppon
Co-orientadora: Laureen M. Houllou-Kido

**RECIFE
2009**

Azevedo, Hayana Millena de Arruda

Indução de mutação em feijão-caupi [Vigna unguiculata (L.) Walp., cultivar BR-14 mulato, visando à obtenção de mutantes tolerantes à salinidade / Hayana Millena de Arruda Azevedo. – Recife: O Autor, 2009

83 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Departamento de Ciências Biológicas, 2009.

Inclui bibliografia e anexos

1. Mutagenênese in vitro. 2. Cultura de tecidos. 3. Leguminosas 4. Feijão-caupi 5. Raios gama I Título.

**582.739
582.74**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2009- 84**

COMISSÃO EXAMINADORA

"Indução de mutação em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], cultivar BR14-mulato, visando à obtenção de mutantes tolerantes à salinidade"

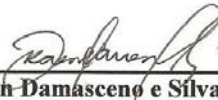
TITULARES



Prof.^a. Dr.^a Ana Maria Benko Iseppon - (Orientadora/UFPE)



Prof.^a. Dr.^a Ana Christina Brasileiro Vidal - (UFPE)



Prof. Dr. Kaesel Jackson Damasceno e Silva - (EMBRAPA/PIAUI)

SUPLENTES

Prof.^a. Dr.^a Maria Tereza dos Santos Correia – (UFPE)

Prof. Dr. Éderson Akio Kido – (UFPE)

DEDICATÓRIA

**À minha avó Auriete Arruda,
maior exemplo de vida sob
todos os aspectos.**

AGRADECIMENTOS

Como não haveria de ser diferente, agradeço aos meus pais pelo empenho em me levar à diante e amor incondicional.

À Claudete, não só pelo treinamento técnico na graduação, mas pela enorme amizade e carinho de mãe. Saudades.

À professora Ana Benko que leva o “cargo” de orientadora à risca, nunca me deixando sozinha. Pessoa em quem se espelhar.

À Laureen pelo apoio e prestatividade. Obrigada pelos meus pés no chão.

Aos professores Reginaldo e Ana Christina pelas sugestões e disponibilidade mesmo após a qualificação.

Ao Dr. Venézio pela atenção e tempo gastos.

As professoras Tereza e Suely, coordenadora e vice-coordenadora do PPGCB, pela estrutura e compreensão.

À Adenilda pela colaboração administrativa durante o curso.

Ao Departamento de Energia Nuclear (DEN) da UFPE por me cederem espaço para as irradiações.

Ao CNPq pelo apoio ao longo da última metade da pesquisa.

A Geoff pela revisão dos abstracts mesmo estando com o tempo apertado.

Aos meus irmãos e sobrinhas que fizeram a caminhada parecer mais leve com abraços e risadas, mesmo que à distância.

À Denise pela paciência, conselhos e ombro nas horas difíceis. Presença imprescindível.

À Talitha que me faz ver as situações por diferentes ângulos, tornando-as suportáveis.

A Kênia, Joana, Carla e Diogo pela amizade que guardarei como as mais raras.

A Giovani, meu braço direito e muitas vezes esquerdo também. Pessoa de bem pela qual sempre torcerei.

A Mário, Rodrigo e Pedranne que extrapolaram o coleguismo de trabalho e me fizeram amiga.

À D. Zizi pela comida gostosa na mesa e Romildo pela ajuda com a casa de vegetação.

Aos amigos do laboratório: Lidiane, Diego e Geyner que dividiram comigo as angústias da nossa vida acadêmica sincronizada; Alberto e Santelmo pela inspiração e ajuda nas artes gráficas; Kyria e Bené pelos abraços calorosos; Jailson pelas dicas; estagiários da citogenética pelas atividades extracurriculares; Vanessa, Valéria e Diego Valério pela ajuda técnica.

Aos Arruda e Aos Azevedo que torcem e acreditam em mim incontestavelmente.

A todos os outros amigos aqui não citados, mas que sabem de sua importância na minha vida.

To doubt everything or to believe everything are two equally convenient solutions; both dispense with the necessity of reflection [Henri Poincaré, 1952].

RESUMO

Dentre os feijões cultivados, o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] se destaca pelo alto conteúdo protéico e pela capacidade de crescer em condições adversas. Sendo assim, esta espécie se tornou uma das culturas de subsistência mais importantes para a população do agreste nordestino. No entanto, a salinização dos solos, devido à irrigação inadequada, tem provocado além de crescentes problemas ambientais, a redução da produtividade de várias espécies vegetais, inclusive a do feijão-caupi. Sendo assim, o uso de técnicas biotecnológicas, como a mutagênese *in vitro*, mostra-se como alternativa para o desenvolvimento de novas cultivares. Com a finalidade de produzir variedades de feijão-caupi tolerantes à salinidade, a indução de mutação *in vitro* com uso de raios gama foi aplicada no presente trabalho. Foi escolhida a cultivar BR14-Mulato por ter sido aquela que em estudos primários mostraram satisfatória capacidade regenerativa *in vitro* tratando-se de importante cultivar para a agricultura do Nordeste brasileiro. O segundo passo foi estabelecer um protocolo apropriado para pressão de seleção *in vitro* das sementes irradiadas através da determinação da concentração de NaCl que inibisse a regeneração, fazendo-se uso das concentrações de 172 mM (1% - Tratamento 1), 258 mM (1,5% - Tratamento 2), 344 mM (2% - Tratamento 3) e 0 mM (Tratamento Controle), chegando-se, então, à conclusão de que a concentração de 172 mM seria a mais apropriada. Por fim, sementes foram irradiadas com três doses de radiação gama (100 Gy, 150 Gy e 200 Gy), além do material controle (0 Gy), e seus tecidos foram isolados e inoculados *in vitro*, simultaneamente, em meios de cultura com e sem sal. Como resultado, foi obtido um possível variante somaclonal advindo de material não irradiado (0 Gy) e inoculado em meio não seletivo, sendo transferido, posteriormente, para meio contendo NaCl, sobrevivendo a este. Outro resultado de grande importância foi a obtenção de um provável mutante sólido provocado pela dose de 150 Gy que, inicialmente, formou calo embriogênico na ausência de NaCl, sendo posto sob pressão de seleção na etapa conseguinte e, após verificada a possível mutação, retirado da condição de salinidade e preparado, através da indução de enraizamento, para futuras análises em campo e molecular. Os resultados obtidos forneceram subsídio com o desenvolvimento de protocolos bem estabelecidos para estudos posteriores de regeneração e indução de mutação *in vitro*, com os prováveis mutantes (induzidos ou espontâneos) oferecendo possibilidade de geração de variedade tolerante à salinidade.

Palavras-chave: mutagênese *in vitro*; cultura de tecidos; raios gama; leguminosas.

ABSTRACT

Among cultivated bean varieties cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] stands out for its high protein content and its ability to grow under adverse conditions. As such, this species has become one of the most important subsistence crops for rural populations in Brazilian north-eastern region. However, aside from increasing environmental problems, soil salinity has caused crop productivity to decline due to inadequate irrigation. Biotechnological methods as *in vitro* mutagenesis provide an alternative for developing adapted cultivars. In this study *in vitro* mutation was induced using gamma rays, in order to generate salinity tolerant cowpea varieties. The BR14-Mulato cultivar was selected, having demonstrated satisfactory *in vitro* regenerative capacity in previous studies also recognized as an important cultivar for the Brazilian north-eastern region. The second step was to establish an appropriate protocol for *in vitro* cultivation of irradiated seeds under selection pressure by determining the maximum concentration of NaCl that would impair regeneration. The concentrations used were 172 mM (1% - Treatment 1), 258 mM (1.5% - Treatment 2), 344 mM (2% - Treatment 3) and 0 mM (Negative Control) the result being a concentration of 172 mM. Finally, the seeds were irradiated with three dosages of gamma radiation (100 Gy, 150 Gy e 200 Gy), and control material (0 Gy). Their tissues were simultaneously isolated and inoculated *in vitro* in media with and without salt. As a result, a somaclonal variant was generated from non-irradiated material (0 Gy) and inoculated in a non-selective medium, being transferred and surviving to a medium containing NaCl. The other significant result of this study was the generation of a mutant induced by a dosage of 150 Gy which initially formed an embryogenic callus in the absence of NaCl. In the next step, it was grown under selection pressure and verified for possible mutation and prepared through root induction for future field and molecular analysis. The results of this study add support to the development of well established protocols for further studies in the regeneration and induction of *in vitro* mutation, with the probable mutants (induced or spontaneously generated) offering the possibility of generating a variety able to tolerate salinity.

Key words: *in vitro* mutagenesis; tissue culture; salinity; gamma rays; legumes.

LISTA DE QUADROS

Revisão Bibliográfica

- Quadro 1.** Compilação de análises previamente reportadas para o gênero *Vigna*, envolvendo a técnica de regeneração e em alguns casos indução de variabilidade *in vitro*. Dados encontram-se apresentados em ordem cronológica, incluindo título do trabalho publicado, principais objetivos e resultados obtidos. 28
- Quadro 2.** Lista de cultivares mutantes de *V. unguiculata* lançadas e catalogadas no FAO/IAEA – *Mutant Varieties Database*. 35

LISTA DE TABELAS

Manuscrito

Tabela 1.	Diferentes tratamentos utilizados na etapa de análise do potencial regenerativo sob salinidade com suas respectivas concentrações de NaCl.	69
Tabela 2.	Resultados obtidos a partir das análises do potencial de regeneração <i>in vitro</i> sob condições salinas.	69
Tabela 3.	Principais respostas (em número e percentagem de explantes) observadas de ambos os tecidos em relação à radiação (diversas doses na ausência e presença de sal).	70

LISTA DE FIGURAS

Manuscrito

- | | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1. | Resposta de ambos os tecidos inoculados em meio de cultura sem salinidade (controle, 0% NaCl). | 71 |
| Figura 2. | Respostas dos tecidos inoculados nas diferentes doses de NaCl. Observações realizadas na primeira e quarta semanas do experimento. | 72 |
| Figura 3. | Mutantes-candidatos obtidos (possível variante somaclonal e possível mutante sólido). | 73 |
| Figura 4. | Representação gráfica da porcentagem de explantes regenerados nas diferentes doses de exposição à radiação, bem como na presença ou ausência de NaCl à concentração de 172 mM (ao lado das barras encontram-se os números absolutos dos explantes regenerados). | 74 |

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO	16
2.2. ASPECTOS MORFOLÓGICOS.....	17
2.3. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E PRODUTIVIDADE DO FEIJÃO-CAUPI	18
2.4. A CULTIVAR BR14-MULATO.....	19
2.5. SALINIDADE.....	20
2.5.1. Cenário mundial, nacional e regional	20
2.5.2. Efeitos da salinidade sobre as plantas	22
2.5.3. Tolerância à salinidade.....	23
2.6. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE TECIDOS VEGETAIS	24
2.6.1. Histórico	25
2.6.2. Aplicabilidade	26
2.6.3. Regeneração <i>in vitro</i> de feijão-caupi	27
2.7. MUTAGÊNESE <i>IN VITRO</i>	29
2.7.1. Impacto econômico	29
2.7.2. Tipos de mutagênicos	31
2.7.3. Interação com o material genético.....	32
2.7.4. Mutagênese <i>in vitro</i> de feijão-caupi.....	34
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
4. ARTIGO PUBLICADO E MANUSCRITO.....	43
4.1. ARTIGO PUBLICADO.....	43
4.2. MANUSCRITO.....	47
Resumo.....	49
Abstract.....	50
Materiais e Métodos.....	52
Resultados	56
Discussão	58

Agradecimentos	63
Referências Bibliográficas.....	64
Tabelas	69
Figuras	71
5. CONCLUSÕES	75
6. ANEXOS	76
6.1. INSTRUÇÕES PARA AUTORES (<i>Genetics and Molecular Biology</i>)	77

1. INTRODUÇÃO

O feijão-caupi é uma leguminosa utilizada na alimentação humana, mais cultivada nas áreas semi-áridas do Nordeste brasileiro. É uma espécie rústica bem adaptada às condições de clima e solo da região e ao mesmo tempo, possuidora de uma grande variabilidade genética, a qual a torna versátil, podendo ser usada em diferentes sistemas de produção, tradicionais ou modernos (FREIRE FILHO *et al.*, 1999).

Além de conter altos níveis de proteínas em sua composição, esta leguminosa também se destaca pelo alto teor de fibras alimentares, vitaminas e minerais, além de possuir baixa quantidade de lipídeos (EMBRAPA MEIO-NORTE, 2003). Devido a estas características nutricionais o feijão-caupi faz parte de um grupo de alimentos utilizado na biofortificação, devido ao seu potencial para propiciar melhorias na saúde da população carente, representando uma ferramenta adicional para combater a deficiência de micronutrientes, utilizando-se alimentos adequados como mecanismo de promoção da saúde. Desta forma, pode-se fornecer aos agricultores cultivares de plantas que naturalmente reduzem problemas como anemia, o atraso no desenvolvimento cognitivo e outras deficiências relacionadas à subnutrição (ROCHA, 2008). Apesar das características nutricionais vantajosas, a produção e a produtividade do feijão-caupi estão longe do seu potencial devido a um grande número de estresses bióticos (fungos, bactérias, nematóides, vírus e insetos) e abióticos, com destaque para a seca e a salinidade (SINGH, *et al.*, 2002).

Fatores de estresse como citados anteriormente têm afetado severamente a produção do feijão-caupi (DITA *et al.*, 2006). Aplicações de ferramentas biotecnológicas como o melhoramento genético não-convencional, em complemento ao melhoramento convencional, podem contribuir eficientemente para resolver ou reduzir estes problemas.

Uma aplicação biotecnológica de grande demanda é a 'mutagênese *in vitro*'. Essa técnica tem resultado em incrementos da variabilidade genética das espécies,

uma vez que utiliza doses muito baixas de radiação, as quais normalmente causam apenas mutações pontuais (substituições, inserções ou deleções). Sem gerar grandes alterações no genoma. A viabilidade da técnica é comprovada por dados fornecidos pela FAO/IAEA (*Food and Agriculture Organization, International Atomic Energy Agency*) onde atualmente estão registradas aproximadamente 2500 variedades obtidas por mutação (FAO/IAEA – *MUTANT VARIETIES DATABASE*, 2006).

O presente trabalho teve como objetivo gerar mutantes com características de tolerância a estresse salino, fazendo uso da mutagênese *in vitro* através de irradiação por raios gama sobre o desenvolvimento *in vitro* da cv. BR14-Mulato, a partir da determinação da concentração mínima de cloreto de sódio (NaCl) capaz de inibir a regeneração *in vitro* dos tecidos e posterior escolha do nível de radiação capaz de gerar variabilidade genética.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO

De acordo com Verdcourt (1970), Maréchal *et al.* (1978) e Padulosi e Ng (1997), o feijão-caupi [*V. unguiculata* (L.) Walp.] é classificado botanicamente da seguinte maneira:

- Classe: Dicotyledonea
- Ordem: Fabales
- Família: Fabaceae
- Subfamília: Faboideae
- Tribo: Phaseoleae
- Subtribo: Phaseolinae
- Gênero: *Vigna*
- Subgênero: *Vigna*
- Secção: *Catjang*
- Espécie: *Vigna unguiculata* (L.) Walp.
- Subespécie: *unguiculata*

Dentre os feijões pertencentes à subespécie *unguiculata*, de acordo com o banco de germoplasma do IITA (*International Institute for Tropical Agriculture*), existem mais de 15 mil acessos colecionados por 89 países, dentre os quais 12 mil foram caracterizados até o presente momento (MAHALAKSHMI *et al.*, 2007).

Em relação ao centro de origem e distribuição do feijão-caupi, recentemente, Simon *et al.* (2007) sugeriram que o gênero e a espécie tenham se originado no sudoeste da Ásia, enquanto o sul da África representa a região de diversificação da espécie. Ainda de acordo com os autores, tais observações reforçaram as observações de Vavilov (1926), que apontou esta mesma região como centro de

origem de diversas espécies de leguminosas. Este mesmo estudo também indicou a ocorrência de mais de um evento de introdução do feijão-caupi no Brasil por colonizadores e escravos de diferentes regiões, complementando a hipótese de Freire Filho (1988) que postulou a introdução deste feijão através de colonizadores europeus e escravos do oeste da África durante os séculos XVI e XVII.

O gênero *Vigna* inclui cerca de 170 espécies de distribuição pantropical, das quais 120 ocorrem na África (66 endêmicas), 22 na Índia e sudeste da Ásia (16 endêmicas) e umas poucas espécies nas Américas e na Austrália (GHAFOOR *et al.*, 2001). No Brasil, embora o feijão-caupi seja cultivado em todas as regiões, observa-se uma maior concentração de seu cultivo nas regiões Nordeste e Norte.

Devido à sua boa capacidade adaptativa e de se desenvolver bem e cumprir a mesma função alimentar do feijoeiro comum em uma ampla faixa de ambientes, em alguns dos quais este último não se desenvolve satisfatoriamente, o feijão-caupi deve ser considerado uma cultura complementar e não uma competidora do feijão comum (FREIRE FILHO *et al.*, 2005).

2.2. ASPECTOS MORFOLÓGICOS

O feijão-caupi apresenta flores completas com corola papilionácea, apresentando cinco pétalas de coloração branca, amarela ou violeta, contendo um estandarte, duas asas e a quilha ou carena, a qual envolve os órgãos sexuais masculinos e femininos. A quilha apresenta-se recurvada para baixo com a finalidade de proteger a parte reprodutiva (TEÓFILO *et al.*, 2001).

A morfologia floral do feijão-caupi indica que a espécie é bastante especializada, pois, embora seja preferencialmente autopolinizada, mantém a capacidade para polinização cruzada. Apesar de ter os órgãos reprodutivos bem protegidos pelas pétalas e fatores que favorecem a autogamia, o feijão-caupi apresenta uma pequena taxa de cruzamento natural que varia com o ambiente e com os genótipos. Talvez seja essa uma das causas da ocorrência de um grande

número de cultivares locais e da variabilidade constatada nessas cultivares (FREIRE FILHO *et al.*, 2005).

Seu sistema radicular é formado por uma raiz principal, da qual se desenvolvem, lateralmente, as raízes secundárias e terciárias. Possui um caule herbáceo (haste), constituído por um eixo principal, formado por uma sucessão de nós e entrenós. O primeiro nó constitui os cotilédones, o segundo corresponde à inserção das folhas primárias e o terceiro, das folhas trifolioladas. As folhas são simples e opostas nas folhas primárias; sendo compostas, constituídas de três folíolos (trifolioladas), com disposição alterna nas folhas definitivas. O fruto é um legume, indeiscente, sendo a semente constituída, externamente, de um tegumento, hilo, micrópila e rafe; apresentando internamente, um embrião formado pela plúmula, duas folhas primárias, hipocótilo, dois cotilédones e radícula (CIF - CENTRO DE INTELIGÊNCIA DO FEIJÃO, 2006).

2.3. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E PRODUTIVIDADE DO FEIJÃO-CAUPI

O feijão-caupi é uma importante leguminosa utilizada na alimentação humana, sendo um essencial componente em sistemas de produção em regiões secas dos trópicos, cobrindo parte da Ásia, Oceania, sudeste da Europa, África, sudeste dos Estados Unidos e Américas Central e do Sul (SINGH *et al.*, 2002).

Cultivado no Brasil desde a colonização ainda não é bem conhecido no país, a despeito de sua importância social e econômica e seu potencial estratégico para o Nordeste do Brasil. Há pouco tempo, o feijão-caupi era uma cultura explorada em padrões tradicionais e com mercado restrito. Nos últimos anos vem adquirindo maior expressão econômica. Seu cultivo é feito tanto por pequenos quanto por médios e grandes produtores, que utilizam alta tecnologia (FREIRE FILHO *et al.*, 2005).

A área colhida, a produção e a produtividade do feijão-caupi oscilam muito de ano para ano em virtude principalmente das variações climáticas. Entre 1998 e

2007, de acordo com estimativas da Embrapa Arroz e Feijão (2008), no Brasil, a média anual da área colhida foi de 1.260.003 ha, a produção foi de 457.933 t e a produtividade de 357.1 kg/ha. Com base nesses dados e considerando que cada hectare gera em média um emprego por ano, que o consumo per capita é de 18,6 kg e que o valor histórico da saca de feijão é de US\$ 33,84, estima-se que, nesse período, o feijão-caupi, tenha gerado, em média, por ano, 1,26 milhões de empregos, produzindo suprimento alimentar para 24,6 milhões de pessoas.

De acordo com dados da Embrapa Meio-Norte (2003), além de conter altos níveis de proteínas em sua composição, esta leguminosa também se destaca pelo alto teor de fibras alimentares, vitaminas e minerais, possuindo baixa quantidade de lipídeos. Devido a estas características nutricionais, o feijão-caupi tem sido indicado para biofortificação, com potencial para propiciar melhorias nutricionais essenciais para a saúde da população carente, representando uma ferramenta adicional no combate à deficiência de micronutrientes (ROCHA, 2008).

Adicionalmente à importância nutritiva, as leguminosas podem interagir simbioticamente com bactérias do gênero *Rhizobium*, permitindo uma eficiente fixação de nitrogênio da atmosfera, representando importante papel no ecossistema e na agricultura sustentável (DITA *et al.*, 2006). Embora tenha importância social e econômica, a produção e a produtividade do feijão-caupi ainda encontram-se aquém do seu potencial devido a vários tipos de estresses bióticos (fungos, bactérias, nematóides, vírus e insetos) e abióticos (seca, salinidade) (SINGH *et al.*, 2002).

2.4. A CULTIVAR BR14-MULATO

Com base na Portaria nº 85, particularmente no que se refere às classes de grãos, visando aprimorar classificações anteriores, procurou-se detalhar ainda mais a classificação dos diferentes grãos comerciais de feijão-caupi, de forma a obter uma nomenclatura que abarque o uso popular e a normatização oficial e que possa

se tornar de uso comum entre pesquisadores, profissionais das áreas de assistência técnica e fiscalização, produtores, industriais, comerciantes e consumidores (FREIRE FILHO *et al.*, 2005).

Seguindo essa classificação, a cultivar BR14-Mulato, obtida do cruzamento CNCx 249 (CNC 0434 X BR 1-Poti), foi lançada pela Embrapa Meio-Norte no ano de 1990, tratando-se de uma cultivar muito produtiva com grãos mulatos, excelente arquitetura de planta que, inclusive, possibilita a colheita mecanizada da lavoura. Apesar de bastante difundida, esta cultivar ainda deixa a desejar no que se refere à qualidade dos grãos. Sua cor marrom (Grupo II, Classe Cores, Subclasse Mulato) é considerada de tonalidade escura para o mercado (FREIRE FILHO *et al.*, 2000), característica compensada pela sua tolerância a fatores bióticos como viroses, por exemplo.

Por suas características favoráveis, a BR14-Mulato está enquadrada nas cultivares de preferência do mercado, uma vez que pertencem à Subclasse Mulato, apresentando anel do hilo marrom e sem halo, grãos de cocção rápida, caldo denso e com bom aspecto após cozimento, além de bom aroma e sabor (FREIRE FILHO *et al.*, 2005).

2.5. SALINIDADE

2.5.1. Cenário mundial, nacional e regional

A degradação de terras está acontecendo tão rapidamente no mundo que, a menos que as políticas e as abordagens sejam revistas, muitos países não serão capazes de alcançar ou manter uma agricultura sustentável em um futuro próximo. A salinização dos solos tem sido identificada como o maior processo de degradação de terras. Tem-se estimado que o mundo esteja perdendo, pelo menos, três

hectares de terra arável por minuto devido à salinidade do solo (FAO/AGL – *GLOBAL NETWORK ON INTEGRATED SOIL MANAGEMENT FOR SUSTAINABLE USE OF SALT-AFFECTED SOILS*, 2000).

Dados baseados no Mapa Mundial de Solos (*Soil Map of the World*) da FAO/UNESCO relatam que a área total de solos salinos é de 397 milhões de hectares e de solos sódicos é de 434 milhões de hectares, os quais não são necessariamente aráveis, mas cobrem toda a terra afetada pela salinidade no mundo. Dos 230 milhões de hectares de terras irrigadas, estima-se que 45 milhões sejam afetados pela salinidade (19,5%), acarretando prejuízos na produção mundial de plantas cultivadas (FAO/AGL – *GLOBAL NETWORK ON INTEGRATED SOIL MANAGEMENT FOR SUSTAINABLE USE OF SALT-AFFECTED SOILS*, 2000).

No Brasil, estima-se que 20-25% das áreas irrigadas próximas a rios e riachos sofram devido à salinidade e/ou a problemas de drenagem. Além dos solos salinos de áreas irrigadas, algumas áreas são afetadas pela salinidade decorrentes de causas naturais existentes em grandes áreas (2,4% do total de terras do Brasil). De acordo com um estudo sobre solos feito nos Estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará, as áreas afetadas foram estimadas em 9,1 milhões de hectares, ou seja, 9% da área estudada (FAO/AGL – *GLOBAL NETWORK ON INTEGRATED SOIL MANAGEMENT FOR SUSTAINABLE USE OF SALT-AFFECTED SOILS*, 2000).

A região Nordeste do Brasil abrange uma área de cerca de 1.600.000 km², dos quais 1.500.000 km² são caracterizados como de insuficiência hídrica, constituindo o “polígono das secas”. Nessa região, a irrigação passa a assumir papel fundamental no desenvolvimento da agricultura (DANTAS *et al.*, 2002). A prática da irrigação, entretanto, deve ser usada de maneira racional, uma vez que as condições de clima do nordeste e os elevados teores de sais na água de irrigação, associados à falta ou deficiência de drenagem, têm ocasionado crescentes problemas de salinidade dos solos reduzindo, de maneira acentuada, o crescimento e a produtividade das culturas desenvolvidas na região (DANTAS *et al.*, 2002).

2.5.2. Efeitos da salinidade sobre as plantas

A salinidade é um dos fatores mais importantes no que se refere à limitação do desenvolvimento das plantas. O estresse salino pode afetar a sobrevivência do vegetal, bem como sua biomassa, altura e forma; mudanças morfológicas que podem comprometer a capacidade de absorção de luz, água e nutrientes (LOCY *et al.*, 1996). Os sintomas do estresse salino são muito parecidos com os encontrados no estresse hídrico, pois em baixas concentrações promove o amarelamento e a queima da extremidade das folhas, as quais, em seguida, com maior tempo de exposição ao sal, apresentam coloração marrom e apodrecimento (RAI & RAI, 1999).

Segundo Pardossi *et al.* (1998), o estresse salino é composto por dois componentes: toxicidade salina e estresse hídrico, sendo este último considerado um dos primeiros e mais evidentes efeitos da salinidade, determinante das relações hídricas para qualquer estudo de tolerância à salinidade em plantas.

Estudos de tolerância à salinidade têm crescido consideravelmente, tornando-se um dos principais alvos para melhoria da produção. Condições salinas levam a estresses osmóticos, como fator de prevenção da perda de água. Entretanto, o acúmulo de Na^+ e Cl^- no citoplasma também tem efeitos diretos na toxicidade das plantas por inibir a síntese de proteínas, a fotossíntese e a ação de enzimas. Estratégias de tolerância à salinidade têm sido desenvolvidas pela comparação das respostas de estresse salino em plantas sensíveis (glicófitas) com plantas tolerantes a altos níveis de salinidade (halófitas). Como regra geral, as glicófitas respondem ao estresse salino com o acúmulo de osmorreguladores, enquanto que as halófitas empregam mecanismos específicos que previnem as plantas dos efeitos tóxicos de Na^+ e Cl^- (SLATER *et al.*, 2008).

Araújo (1994) afirma que com o aumento dos problemas de salinização dos solos no nordeste brasileiro, em virtude do aumento da área utilizada com culturas irrigadas, o sucesso da atividade agrícola pode ser alcançado através da adoção de práticas de manejo de solos, capazes de reduzir a salinidade, bem como da seleção

de genótipos tolerantes ao estresse salino. Como o primeiro procedimento é dispendioso, demorado e, às vezes, impraticável, a segunda opção apresenta-se como a mais promissora.

Em estudo recente sobre a resposta do feijão-caupi à salinidade da água de irrigação, Lima *et al.* (2007) observaram que essa condição influenciou linearmente no crescimento vegetativo, sendo que todas as características analisadas (área foliar, matéria seca da parte aérea e matéria seca das raízes) apresentaram desenvolvimento inferior com o aumento da salinidade. Entretanto, os resultados obtidos ainda não são conclusivos, pois em estudos sobre manejo de irrigação, os parâmetros analisados podem ser influenciados pelas cultivares e por condições edafoclimáticas (ANDRADE JUNIOR *et al.*, 2000).

Segundo Ayers e Westcot (1999) o feijão-caupi tolera a irrigação com água salina com condutividade elétrica de até 3,3 dS m⁻¹, sendo portanto considerada como uma espécie moderadamente tolerante à salinidade. No entanto, Dantas *et al.* (2002) afirmaram que o grau de tolerância do feijão-caupi a esse tipo de estresse varia entre genótipos, embora não existam muitas informações relacionadas à capacidade de suas células ajustarem-se osmoticamente (FREIRE FILHO *et al.*, 2005).

2.5.3. Tolerância à salinidade

Flowers e Yeo (1995) sugeriram cinco possíveis caminhos, apropriados para o desenvolvimento de indivíduos tolerantes à salinidade: (1) desenvolver genótipos e táxons halófitas alternativos; (2) usar hibridização interespecífica para elevar a tolerância de indivíduos já tolerantes; (3) usar variações já presentes em espécies existentes; (4) gerar variação dentro de plantas já tolerantes pelo uso de seleção recorrente, mutagênese ou cultura de tecidos e (5) direcionar o melhoramento visando preferencialmente à tolerância ao estresse citado.

Uma abordagem moderna para o aumento da tolerância à salinidade é a reprodução em laboratório de estratégias usadas pelas plantas halófitas no transporte de íons sódio para fora do citoplasma (SLATER *et al.*, 2008). O'Leary (1995 *apud* COSTA *et al.*, 2003) afirmou que as plantas halotolerantes podem se adaptar aos altos níveis de sais, restringindo a entrada dos íons nas raízes, ou impedindo seu acesso às folhas através do xilema, ou ainda seqüestrando os íons em vacúolos que chegam às folhas quando a absorção e o transporte destes não são impedidos. O objetivo final desses mecanismos de tolerância é manter a absorção de água em condições de estresse, baixando o potencial osmótico dos seus tecidos e acumulando solutos orgânicos no citosol e inorgânicos nos vacúolos, em um processo denominado "ajuste osmótico" (NIU *et al.*, 1995).

Outra abordagem para melhorar o transporte vacuolar é a super expressão de genes codificadores de bombas de prótons, as quais aumentam o potencial do mecanismo de tolerância e, por conseguinte, sua habilidade de transporte de sódio. Esta metodologia tem melhorado não só a tolerância dessas plantas aos sais em condições experimentais, mas também a tolerância à seca, uma vez que o balanço iônico alterado permite que as plantas retenham água (SLATER *et al.*, 2008).

Considerando-se que a intervenção da mutagênese e da cultura de tecidos podem facilitar a seleção e o isolamento de linhagens tolerantes (EL-SAYED *et al.*, 2007), estratégias atuais (incluindo indução de mutação e seleção *in vitro*) têm sido claramente bem sucedidas na incorporação de níveis de tolerância em diferentes espécies (NOVAK & BRUNNER, 1992).

2.6. CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDOS VEGETAIS

A maioria dos métodos de melhoramento não convencionais de plantas requer que toda a planta seja regenerada a partir de células ou tecidos vegetais. Essa regeneração é conduzida *in vitro* para que o ambiente e o meio de crescimento

possam ser manipulados a fim de garantir o aumento da frequência de regeneração. As células regeneráveis podem ser acessíveis à transferência de genes ou aos efeitos da mutagênese. A habilidade de regenerar plantas de células ou tecidos isolados *in vitro* tem servido, dessa forma, de base para a maioria dos trabalhos de melhoramento (SLATER *et al.*, 2008).

As técnicas de cultura de tecidos *in vitro* associadas à indução de mutação têm oferecido oportunidades ímpares de criação de variabilidade genética e rápido isolamento de clones com a característica desejada (KHAN *et al.*, 2000). Por essa razão, julga-se que o aumento da frequência de mutações mediante o uso de mutagênicos possa trazer resultados de interesse para os programas de melhoramento (TULMANN NETO *et al.*, 1994).

2.6.1. Histórico

Hannig (1904) foi o primeiro a cultivar *in vitro* embriões imaturos de crucíferas (*Raphanus sativus*, *R. landra*, *R. caudatus* e *Colchlearia danica*), observando a necessidade de suplementação do meio mineral com sacarose para germinação dos embriões. Entretanto, coube a White (1934) o mérito do estabelecimento do primeiro trabalho de cultura de tecidos, com a elaboração de um meio (líquido) capaz de manter o crescimento de ápices radiculares de tomate (*Lycopersicon esculentum*) por um período ilimitado.

Outra importante descoberta referiu-se à identificação do primeiro fitormônio, o ácido indolacético (auxina), por Kogh *et al.* ainda em 1934. Miller *et al.* (1955; 1956) também deram uma grande contribuição à área de cultura de tecidos e ao estudo da fisiologia do crescimento e do desenvolvimento de plantas com a descoberta da primeira citocinina. Esta descoberta favoreceu os estudos de Murashige e Skoog (1962) no estabelecimento do meio de cultura padrão utilizado desde então na maioria dos experimentos.

No Brasil, o pioneiro nos trabalhos sobre cultura de tecidos foi o Dr. Agesilau Bitancourt, na década de 50, seguido da Dra. Marico Merguro, em 1966, que estagiou durante dois meses com a equipe do Dr. Skoog nos EUA. Esta, por sua vez, repassou a técnica ao Dr. Kurt Hell e ao então aluno Gilberto Kerbauy, que começaram estudos dos efeitos de radiação ionizante sobre o crescimento de calos nos anos de 1969 e 1970. A primeira equipe de cultura de tecidos estabelecida no país pertencia à Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), na cidade de Piracicaba, no ano de 1971 (TORRES *et al.*, 1998).

2.6.2. Aplicabilidade

A regeneração *in vitro* pode ser empregada de diferentes maneiras dentro de um programa de melhoramento vegetal. Embora essas metodologias não estejam diretamente envolvidas no desenvolvimento de cultivares, muitas vezes oferecem soluções exclusivas nas diferentes fases desse processo (ANDRADE, 2002).

A cultura de tecidos pode ser empregada para a limpeza clonal, processo de grande importância em que é possível a produção de mudas livres de patógenos, inclusive vírus em algumas espécies. A citada técnica também tem sido usada para a multiplicação de espécies de difícil propagação como, por exemplo, algumas espécies nativas do Cerrado e para conservação da variabilidade genética em bancos de germoplasma *in vivo* (FERREIRA *et al.*, 1998).

Em experimentos bem sucedidos de cultura de tecidos, o requerimento primário tem compreendido uma avaliação do sistema de cultura (embriogênese ou organogênese) a ser aplicado à espécie de interesse. A escolha pode ser feita baseada nas características apresentadas em relação à conveniência ou eficiência, incluindo a disponibilidade dos explantes e o tempo mínimo para a realização do trabalho (BIRCH, 1997).

Em alguns casos, sobretudo em espécies propagadas vegetativamente, a manutenção *in vitro* é uma alternativa menos dispendiosa que o cultivo *in vivo*. Por outro lado, a cultura de tecidos também pode aumentar a variabilidade genética através da variação somaclonal ou dando suporte a outras técnicas, como a introgressão de genes e a mutagênese *in vitro*. Finalmente, a técnica também permite a multiplicação do material genético, auxiliando a permuta de germoplasma para avaliação em diversos ambientes como, por exemplo, a multiplicação de genótipos para análise em experimentos replicados (FERREIRA *et al.*, 1998).

2.6.3. Regeneração *in vitro* de feijão-caupi

Em geral, a regeneração de tecidos compreende o fator mais limitante na manipulação genética (PELLEGRINESCHI, 1997). Alguns autores relatam que o feijão-caupi, assim como outras leguminosas, é recalcitrante à regeneração *in vitro*, o que limita seu potencial no melhoramento via manipulação genética (RAMAKRISHNAN *et al.*, 2005; MAO *et al.*, 2006). Apesar dessas informações, diversos experimentos bem sucedidos visando estabelecer protocolos de regeneração *in vitro* de diversas espécies do gênero *Vigna* têm sido relatados como no caso de *V. umbellata* (BHADRA *et al.*, 1991), *V. angularis* (SATO *et al.*, 1993), *V. radiata* (AMUTHA *et al.*, 2003) e *V. unguiculata* (ODUTAYO *et al.*, 2005; AZEVEDO *et al.*, 2007) como compilado no Quadro 1.

Atualmente, algumas cultivares de feijão-caupi têm tido seu potencial de organogênese explorado em diversos estudos, indicando que as respostas à regeneração *in vitro* de feijão-caupi sejam genótipo-específicas (PELLEGRINESCHI, 1997; POPELKA *et al.*, 2004; MAO *et al.*, 2006). Essa especificidade necessita de determinação empírica sob condições adequadas para estimular a regeneração de plantas com genótipos de interesse (BRAR *et al.*, 1999).

Autor(es)	Título	Objetivos	Principais Resultados
Bhadra <i>et al.</i> (1991)	Tissue and protoplast culture of rice bean [<i>Vigna umbellata</i> (Thunb.) Ohwi & Ohashi]	Desenvolver técnicas de cultura de tecidos e cultura de protoplastos	1. Calos verdes foram obtidos a partir de epicótilos. 2. Explantes de folhas produziram calos amarelados, porém esse tecido não produziu material meristemático. 3. Paredes celulares foram regeneradas individualmente ao redor dos protoplastos, seguidas do alongamento das células. Ainda que um grande número de protoplastos tenha passado pela primeira e segunda divisão, alguns poucos desenvolveram micro calos.
Sato <i>et al.</i> (1993)	Plant Regeneration from protoplasts of Adzuki Bean (<i>Vigna angularis</i> Ohwi & Ohashi)	Descrever técnica de isolamento de protoplastos a partir de suspensão de células	O isolamento de protoplastos a partir da cultura de células resultou na formação de calos, os quais induziram o início da germinação, chegando à maturidade da planta.
Odeigah <i>et al.</i> (1998)	Induced Mutations in cowpea, <i>Vigna unguiculata</i> (Leguminosae)	Indução de mutação utilizando mutagênicos físicos (raios gama) e químicos (EMS) visando à obtenção de características qualitativas	A radiação gama produziu efeitos fisiológicos diferentes do material controle (200 Gy). Já no tratamento químico, a baixa dose (5 mM) induziu alta taxa de germinação, mas com pouca ou nenhuma variabilidade, enquanto que a alta dose (40 mM) induziu boas variações morfológicas, mas baixa taxa de sobrevivência ou germinação. Os dados gerais mostraram que a dose de 10 mM é a mais apropriada por ter mostrado boa taxa de germinação e variabilidade morfológica.
Amutha <i>et al.</i> (2003)	<i>In vitro</i> organogenesis and plant formation in <i>Vigna radiata</i> (L.) Wilczek	Desenvolver protocolo de regeneração utilizando eixos e cotilédones de sementes maduras	Calos foram obtidos a partir do hipocótilo e dos cotilédones. Ambos os explantes mostraram boa taxa de regeneração (hipocótilo - 62.6% e cotilédones - 72.6%).
Odutayo <i>et al.</i> (2005)	Multiple shoot induction from embryo derived callus culture of cowpea (<i>Vigna unguiculata</i> L.) Walp.	Desenvolver um método de propagação através da indução da formação de calos a partir de eixos embrionários	A propagação <i>in vitro</i> produziu maior quantidade de calos à medida que se foram aumentando as concentrações do fitormônio BAP nos diferentes meios de cultura confeccionados.
Sangsiri <i>et al.</i> (2005)	Gamma radiation induced mutations in Mungbean	Induzir mutações usando a radiação gama, observando as características mudadas e as purificando para possíveis usos.	As principais mutações obtidas foram nas folhas com mudança na coloração e forma. Também foram observadas mutações nas flores com o aparecimento de pólen estéril.
Azevedo <i>et al.</i> (2007)	Análise do potencial regenerativo <i>in vitro</i> de diferentes cultivares de feijão-caupi.	Desenvolver protocolo de regeneração <i>in vitro</i> utilizando cultivares distintas da espécie <i>V. unguiculata</i>	Foram constatadas diferenças no potencial regenerativo das distintas cultivares analisadas com respostas diversas para cada uma delas, indicando a necessidade da otimização do protocolo padrão de acordo com o genótipo a ser utilizado.
Chaudhury <i>et al.</i> (2007)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> - mediated high frequency genetic transformation for an Indian cowpea (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.) cultivar and transmission of transgenes into progeny	Desenvolvimento de protocolo de transformação via <i>A. tumefaciens</i> para eficiente produção de transgênicos férteis	Foram obtidos transgênicos férteis de feijão-caupi, os quais foram transmitidos para a progênie em uma taxa de 0.76%. Anteriormente a esse trabalho, apenas um transgênico via <i>A. tumefaciens</i> havia sido reportado com taxa de transmissão para a progênie de 0.05 - 0.15%.
Ivo <i>et al.</i> (2008)	Biolic-mediated genetic transformation of cowpea (<i>Vigna unguiculata</i>) and stable Mendelian inheritance of transgenes	Descrição de um sistema de transformação genética de caupi mediada por biobalística	Foi desenvolvido um protocolo para obtenção de plantas transgênicas de feijão-caupi, no qual se demonstra a viabilidade da transferência do transgene de forma estável para as gerações seguintes.

Quadro 1 – Compilação de análises previamente reportadas para o gênero *Vigna*, envolvendo a regeneração *in vitro* e em alguns casos indução de variabilidade *in vitro*. Os dados encontram-se apresentados em ordem cronológica, incluindo título do trabalho publicado, principais objetivos e resultados obtidos. FONTE: O autor (2009).

2.7. MUTAGÊNESE *IN VITRO*

Uma aplicação biotecnológica de grande demanda é a ‘mutagênese *in vitro*’. Essa técnica tem propiciado um aumento da variabilidade genética das espécies utilizando doses muito baixas de radiação, as quais são capazes de induzir mutações pontuais (substituições, inserções ou deleções). A aplicabilidade prática da técnica pode ser constatada no banco de mutantes anotados pela FAO/IAEA que inclui registros de mais de 2500 variedades obtidas por mutação (FAO/IAEA – *MUTANT VARIETIES DATABASE*, 2006).

2.7.1. Impacto econômico

Durante séculos, fazendeiros e produtores têm procurado melhorar as variedades das plantas. Desde a década de 1950, centros nacionais e internacionais de pesquisa têm centralizado esforços em trabalhos de melhoria da agricultura em países em desenvolvimento através da busca de novas variedades com alta produção ou do aumento da resistência a estresses como seca, salinidade, doenças e pragas. Milhares de novas variedades têm sido lançadas com resultados impressionantes (IAEA – *INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY*, 2004). O desenvolvimento de variedades de alta produção de trigo e arroz, durante os anos 60 do século passado, permitiu que vários países em desenvolvimento migrassem da condição de escassez de alimentos para a condição de exportadores desses cereais. Essa mudança na produção foi chamada de “Revolução Verde” (SLATER *et al.*, 2008).

Um dos principais métodos utilizados na Revolução Verde foi a indução de mutação por radiação seguida pela seleção de características desejadas. Mesmo que o papel desta metodologia nos resultados globais alcançados não tenha sido estimado, é óbvio que seu impacto foi significativo. Por exemplo, a percentagem de

áreas de arroz ocupadas por variedades produzidas com ajuda da irradiação, em 1998, foi de pelo menos, 28% na Tailândia, 19% em Laos e 14% no Vietnã (IAEA – *INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY*, 2004). Estima-se que no Japão, variedades de plantas produzidas por mutação induzida comandem o mercado com 804 milhões de dólares anualmente. No Paquistão, estima-se que a área de algodão mutante induzido por radiação gama seja de 25%. Também se calcula que este mutante contribua com mais de três bilhões de dólares na produção de algodão, tendo salvado a indústria têxtil do Paquistão quando esta estava ameaçada pela redução na produção do algodão devido a ataques de insetos (KUME, 2002).

A FAO (*Food and Agriculture Organization*) uniu-se à IAEA, formando um órgão fiscalizador, com o intuito de assistir programas de melhoramento vegetal que usam técnicas de mutação e biotecnologias modernas no desenvolvimento de variedades melhoradas, incluindo espécies pouco exploradas. Seu principal objetivo tem sido aumentar a segurança alimentar e a sustentabilidade da produção através da melhoria da safra, da qualidade do uso doméstico e do mercado de exportação, além de promover a biodiversidade (FAO/IAEA – *PROGRAM FOR NUCLEAR TECHNIQUES IN FOOD AND AGRICULTURE*, 2005). A partir desta junção foi criado um banco de dados público com informações sobre mutantes induzidos adequados a programas de produção e análises genéticas. O FAO/IAEA-MVD (FAO/IAEA – *Mutant Varieties Database*) coleciona informações sobre variedades mutantes, agentes mutagênicos usados e características melhoradas. Neste banco, encontram-se registradas atualmente aproximadamente 2500 variedades obtidas por mutação. O Brasil contribuiu, nos últimos anos, com 36 de um total de 298 novas cultivares lançadas no mundo (FAO/IAEA – *MUTANT VARIETIES DATABASE*, 2006).

2.7.2. Tipos de mutagênicos

A utilização de agentes mutagênicos químicos e físicos pode ser de fundamental importância para a criação e incorporação de novos genes de interesse agrônômico, podendo resultar em genótipos mais estáveis e mais adaptados às condições edafoclimáticas adversas (COIMBRA *et al.*, 2005). A mutação induzida tem sido mais utilizada para elevar as freqüências de mutações e variações que podem ser obtidas tanto por tratamento com mutagênicos químicos quanto por tratamentos físicos (PREDIERI, 2001).

A maioria dos agentes mutagênicos químicos utilizados na indução de mutação *in vitro* em plantas pertence à classe dos alquilantes. Já os tipos de radiações potencialmente utilizáveis para a mutagênese incluem a radiação ultravioleta (UV) e as radiações ionizantes como os raios-X, raios-gama, partículas alfa e beta, prótons e nêutrons (PREDIERI, 2001).

As radiações transferem sua energia, direta ou indiretamente, ao material genético por meio de vários processos físico-químicos, tais como colisão, excitação e ionização. Evidentemente, todos os componentes celulares sofrem esses efeitos. No caso do DNA, a maior parte dos danos é revertida pelo sistema de reparo da própria célula. No processo de reparo, poderá haver reposição errada de bases, causando alteração do código genético e conseqüentemente mutação (TULMANN NETO *et al.*, 1998).

Além da quantidade inicial de energia da radiação atravessando os tecidos das plantas, outra propriedade biológica de importância é o grau de sua penetração nos tecidos. O uso de mutagênicos químicos é relativamente pouco freqüente, ao contrário do que ocorre com os raios gama que foram empregados no desenvolvimento de 64% das variedades mutantes induzidas por radiação, seguidos pelos raios X (AHLOOWALIA *et al.*, 2004). As radiações corpusculares se propagam por partículas móveis, entretanto, o poder de penetração destas partículas é baixo, sendo portanto pouco usadas em experimentos de indução de mutação (HARTEN, 1998).

Atualmente, existe um grande número de substâncias químicas mutagênicas, também chamadas de cancerígenas, que atuam danificando ligações químicas, ou mesmo substituindo nucleotídeos normais por moléculas análogas. Radicais livres também atuam catalisando reações químicas danosas ao DNA. Contudo, os mutagênicos químicos apresentam diversas desvantagens como dificuldades na penetração em sistemas multicelulares, dificuldade na reprodutibilidade de resultados e necessidade de grande cuidado na manipulação, pois quase todos os mutagênicos químicos têm propriedades cancerígenas em células humanas (TULMANN NETO *et al.*, 1998).

2.7.3. Interação com o material genético

Todos os organismos sofrem certo número de mutações como resultado de operações celulares normais ou interações com o meio-ambiente. Uma mutação pontual pode ser causada por dois tipos de eventos: modificações químicas do DNA que mudam diretamente as bases, ou mau funcionamento durante a replicação do DNA causando inserção incorreta de bases. A frequência de mutações varia entre organismos, entre diferentes locos gênicos de um organismo em particular e entre diferentes regiões de um mesmo gene. Cálculos da taxa de mutação são usualmente baseados nas perdas e ganhos de função de um determinado gene (KOVALCHUK *et al.*, 2000).

Em experimentos de mutagênese induzida, independente do agente indutor, é necessário avançar o material tratado por algumas gerações de sementes ou propagações vegetativas. No caso de plantas propagadas por sementes, mutantes recessivos são normalmente selecionados na segunda ou terceira geração após o tratamento. Plantas propagadas vegetativamente necessitam de vários ciclos de propagação para que se obtenham organismos mutados uniformemente (*homohistonts*) ou para reduzir quimeras propiciando, então, a obtenção de mutantes sólidos (AHLOOWALIA & MALUSZYSNKI, 2001).

O fator chave na irradiação de materiais vegetais é a dose a ser utilizada no experimento, a qual é a quantidade de energia absorvida pela planta. A unidade de medida da radiação é o Gray (Gy). Um Gray equivale a um Joule de energia por quilo do produto irradiado. Doses de radiação são divididas em três categorias principais: alta (> 10 kGy), média (de 1 a 10 kGy) e baixa (< 1 kGy) (AHLOOWALIA & MALUSZYNSKI, 2001). Em plantas irradiadas a baixas doses de raios gama, há o aparecimento de um grande número de quimeras, observando-se que em tecidos quiméricos células mutadas estão presentes em áreas circunvizinhas às células normais. Durante subseqüentes divisões celulares, as células mutadas competem com as normais pela sobrevivência (seleção diplôntica). Caso as células mutadas sobrevivam à seleção diplôntica, as mesmas serão expressas pelas plantas (DATTA *et al.*, 2005).

Outro fenômeno freqüentemente encontrado em estudos de cultura de tecidos *in vitro* é o aparecimento de variações espontâneas entre subclones de uma linhagem celular parental (LARKIN & SCOWCROFT, 1981). Os fatores responsáveis por essa variabilidade produzida *in vitro* ainda não estão bem esclarecidos, porém, sabe-se que tal variação é a soma de variações genéticas (mutações cromossômicas e gênicas) que são incorporadas nas plantas regeneradas. Embora existam condições que favoreçam o aumento da variação somaclonal, o que interessa aos melhoristas não é um simples aumento na variabilidade genética, mas se essa maior variabilidade pode auxiliar na obtenção de novas cultivares mais produtivas ou melhor adaptadas (TULMANN NETO *et al.*, 1998).

Eventos mutagênicos são de particular importância para as plantas, já que qualquer mutação pode ser potencialmente transmitida para as gerações seguintes. Ao contrário dos animais, os vegetais não podem evitar a influência ambiental devido à sua característica sésil (fixada ao solo), necessitando de sistemas dedicados à manutenção da estabilidade genômica (KOVALCHUK *et al.*, 2000).

2.7.4. Mutagênese *in vitro* de feijão-caupi

Em leguminosas, a maioria dos esforços dos trabalhos de mutagênese *in vitro* relaciona-se à fixação biológica de nitrogênio (SAGAN *et al.*, 1994), enquanto a obtenção de mutantes com resistência ou tolerância aos diversos tipos de estresses tem sido relatada com menor frequência (DITA *et al.*, 2006).

Os estudos nessa área têm sido prejudicados devido à recalcitrância à regeneração e à baixa eficiência em encontrar os fenótipos desejados. Todavia, o aprimoramento dos protocolos de regeneração para muitas leguminosas e o desempenho de cultivares produzidas pela indução de mutação indicam que a mutagênese *in vitro* tem desempenhado importante papel no melhoramento destas plantas. A maior dificuldade em técnicas aplicadas à obtenção de mutantes é a grande quantidade de indivíduos necessários para se chegar ao objetivo desejado. Apesar disso, o uso de metodologias de seleção *in vitro* pode minimizar essas desvantagens (DITA *et al.*, 2006).

De acordo com dados fornecidos pelo banco de dados FAO/IAEA – *Mutant Varieties Database* (2006), em todo o mundo, foram lançadas apenas 11 cultivares mutantes de *V. unguiculata*, sendo a grande maioria produzida na década de 1980 e com resultados voltados à produtividade da cultura. Outras ocorrências que diferem destas respostas são duas únicas cultivares, uma indiana (Co 5) e outra queniana (ICV 11), com melhoria do valor nutricional e mudança no porte, respectivamente (Quadro 2).

VARIEDADE	PAÍS	ANO	CARACTERÍSTICA
V16 (Amba)	Índia	1981	Produção
V37 (Shreshtha)	Índia	1981	Produção
V38 (Swarna)	Índia	1984	Produção
Gujarat cowpea-1	Índia	1984	Produção
V240	Índia	1984	Produção
ICV 11	Quênia	1985	Porte
ICV 12	Quênia	1985	Produção
Co 5	Índia	1986	Valor nutricional
Uneca-Gama	Costa Rica	1986	Produção
Cowpea-88	Índia	1990	Produção
TRC77-4 (Kallehwari)	Índia	2007	Produção

Quadro 2 – Lista de cultivares mutantes de *V. unguiculata* lançadas e catalogadas no FAO/IAEA – *Mutant Varieties Database*, FONTE: FAO/IAEA – *Mutant Varieties Database* (2009).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLOOWALIA, B. S.; MALUSZYNSKI, M. Induced mutations – A new paradigm in plant breeding. **Euphytica**, v. 118, p. 167-173, 2001.
- AHLOOWALIA, B. S.; MALUSZYNSKI, M.; NICTERLEIN, K. Global impact of mutation-derived varieties. **Euphytica**, v. 135, p. 187-204, 2004.
- AMUTHA, S.; GANAPATHI, A.; MURUGANANTHAM, M. *In vitro* organogenesis and plant formation in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 203-207, 2003.
- ANDRADE JUNIOR, A. S.; RODRIGUES, B. H. N.; BASTOS, E. A. Irrigação. In: CARDOSO, M. J. (Ed.) **A cultura do feijão caupi no meio-norte do Brasil**. Teresina: EMBRAPA Meio-Norte, 2000. cap. 7, p. 127-154.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2002. 14 p. ISSN 1517 -5111.
- ARAÚJO, C. A. S. **Avaliação de feijoeiros quanto a tolerância à salinidade em solução nutritiva**. 1994. 87 f. Dissertação – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. A. **A qualidade da água na agricultura**. Campina Grande: UFPB, 1999. 153 p.
- AZEVEDO, H.; HOULLOU-KIDO, L.; BENKO-ISEPPON, A. M. Análise do potencial regenerativo *in vitro* de diferentes cultivares de feijão-caupi. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 528-530, 2007.
- BHADRA, S. K.; HAMMATT, N.; DAVEY, M. R. Tissue and protoplast culture of rice bean [*Vigna umbellate* (Thunb.) Ohwi & Ohashi]. **Tropical Agriculture**, v. 68, n. 4, p. 344-348, 1991.
- BIRCH, R. G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 297-326, 1997.
- BRAR, M. S.; AL-KHAYRI, J. M.; MORELOCK, T. E.; ANDERSON, E. J. Genotypic response of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) to *in vitro* regeneration from cotyledon explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 35, p. 8-12, 1999.

- CHAUDHURY, D.; MADANPOTRA, S.; JAIWAL, R.; SAINI, R.; JUMAR, P. A.; JAIWAL, P. K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated frequency genetic transformation of an Indian cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivar and transmission of transgene into progeny. **Plant Science**, v. 172, n. 4, p. 692-700, 2007.
- CIF. Centro de Inteligência do Feijão. Desenvolvido pelo Governo do Estado de Minas Gerais e pela Universidade Federal de Viçosa, 2006. Disponível em: http://www.cifeijao.com.br/index.php?p=aspectos_botanicos. Acesso em: 10/11/2008.
- COIMBRA, J. L. M.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; SILVA, J. A. G.; LORENCETTI, C. Comparação entre mutagênicos químico e físico em populações de aveia. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 46-55, 2005.
- COSTA, P. H. A.; SILVA, J. V.; BEZERRA, M. A.; ENÉAS FILHO, J.; PRISCO, J. T.; GOMES FILHO, E. Crescimentos e níveis de solutos orgânicos e inorgânicos em cultivares de *Vigna unguiculata* submetidas à salinidade. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 3, p. 289-297, 2003.
- DANTAS, J. P.; MARINHO, F. J. L.; FERREIRA, M. M. M.; AMORIM, M. S. N.; ANDRADE, S. I. O.; SALES, A. L. Avaliação de genótipos de caupi sob salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, n. 3, p. 425-430, 2002.
- DATTA, S. K.; MISRA, P.; MANDAL, A. K. A. *In vitro* mutagenesis – a quick method for establishment of solid mutant in chrysanthemum. **Current Science**, v. 88, n. 1, p. 155-158, 2005.
- DITA, M. A.; RISPAIL, N.; PRATS, E.; RUBIALES, D.; SINGH, K. B. Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. **Euphytica**, v. 147, p. 1-24, 2006.
- EL-SAYED, O. E.; RIZKALLA, A. A.; SABRI, S. R. S. *In vitro* mutagenesis for genetic improvement of salinity tolerance in wheat. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 4, n. 5, p. 377-383, 2007.
- EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Dados conjunturais do feijão (área, produção e rendimento). **Embrapa Arroz e Feijão**, Santo Antônio de Goiás, 2008. Seção Sócio economia. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/apps/socioeconomia/index.htm>. Acesso em: 17/03/2009.
- EMBRAPA MEIO-NORTE. Cultivo do feijão-caupi. **Embrapa Meio-Norte**, Teresina, 2003. Seção Importância Econômica. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/importancia.htm>. Acesso em: 20/11/2008.

- FAO/AGL – *Global Network on Integrated Soil Management for Sustainable Use of Salt-affected Soils*. Desenvolvido pela FAO/AGL, 2000. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush/>. Acesso em: 31/10/2008.
- FAO/IAEA – *Mutant Varieties Database*. Desenvolvido pela FAO/IAEA, 2006. Disponível em: <http://www-mvd.iaea.org/MVD/default.htm>. Acesso em: 07/11/2008.
- FAO/IAEA – *Programme Nuclear Techniques in Food and Agriculture*. Desenvolvido pela FAO/IAEA, 2005. Disponível em: <http://www.iaea.org/nafa/d2/index.html>. Acesso em: 07/11/2008.
- FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa – SPI/ Embrapa – CNPH, 1998. cap. 2, p. 21-43.
- FLOWERS, T.J.; YEO, A. R. Breeding for salinity resistance in crop plants – where next? **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 22, p. 875-884, 1995.
- FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). In: ARAÚJO, J. P. P. de; WATT, E. E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Goiânia: Embrapa – CNPAF / Ibadan: IITA, 1988. p. 25-46.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, C. A. F. Melhoramento genético do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região nordeste. In: QUEIRÓS, M. A. de, GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Eds.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido/ Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br>. Acesso em: 10/11/2008.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; SANTOS, A. A. dos. Cultivares de caupi para a região meio-norte do Brasil. In: CARDOSO, M. J. (Ed.) **A cultura do feijão caupi no meio-norte do Brasil**. Teresina: EMBRAPA Meio-Norte, 2000. cap. 3, p. 67-88.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, A. A. dos. Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.) **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2005. cap. 1, p. 29-92.
- GHAFOOR, A.; SHARIF, A.; AHMAD, Z.; ZAHID, M. A.; RABBANI, M. A. Genetic diversity in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper). **Field Crops Research**, v. 69, p. 183-190, 2001.

- HANNIG, E. Zur physiologie pflanzlicher embryonen. I. Ueber die kultur von cruciferen embryonen ausserhalb des embryosacks. **Botanische Zeitung**, v. 62, p. 45-80, 1904.
- HARTEN, A. M. van. **Mutation breeding: theory and practical applications**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 367 p. ISBN 0-521-47074-9.
- IAEA – *International Atomic Energy Agency*. The social-economics of nuclear applications: a perspective. **Nuclear Technology Review**, 2004. p. 85-94.
- IVO, N. L.; NASCIMENTO, C. P.; VIEIRA, L. S.; CAMPOS, F. A. P.; ARAGÃO, F. J. L. Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 9, p. 1475-1483, 2008.
- KHAN, S. J.; KHAN, H. U.; KHAN, R. D.; IQBAL, M. M.; ZAFAR, Y. Development of sugarcane mutants through *in vitro* mutagenesis. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 7, p. 1123-1125, 2000.
- KOGH, F.; HAAGEN-SMIT, A. J.; ERXLEBEN, H. Über ein neues auxin (hetero-auxin) aus harn. **Zeitschrift fuer Physiologische Chemie**, v. 228, p. 90-103, 1934.
- KOVALCHUK, I.; KOVALCHUK, O.; HOHN, B. Genome wide-variation of the somatic mutation frequency in transgenic plants. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 17, p. 4431:4438, 2000.
- KUME, T. Current status of food irradiation in the world – trends in Asia. **Radioisotopes**, v. 51, n. 11, p. 522-532, 2002.
- LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, p. 197-214, 1981.
- LIMA, C. J. G. S.; OLIVEIRA, S. A.; MEDEIROS, J. F.; OLIVEIRA, M. K. T.; ALMEIDA-JUNIOR, A. B. Resposta do feijão caupi a salinidade da água de irrigação. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 2, n. 2, p. 79-86, 2007.
- LOCY, R. D.; CHANG, C. C.; NIELSEN, B. L.; SINGH, N. K. Photosynthesis in salt-adapted heterotrophic tobacco cells and regenerated plants. **Plant Physiology**, v. 110, p. 321-328, 1996.
- MAHALAKSHMI, V.; NG, Q.; LAWSON, M.; ORTIZ, R. Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] core collection defined by geographical, agronomical and botanical descriptors. **Plant Genetic Resource: Characterization and Utilization**, v. 5, n. 3, p. 113-119, 2007.

- MAO, J. Q.; ZAIDI, M. A.; ARNASON, J. T.; ALTOSAAR, I. *In vitro* regeneration of *Vigna unguiculata* L. Walp. cv. Blackeye cowpea via shoot organogenesis. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 87, p. 121-125, 2006.
- MARÉCHAL, R.; MASCHERPA, J. M.; STAINIER, F. Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. **Boissiera**, v. 28, p. 1-273, 1978.
- MILLER, C. O.; SKOOG, F.; SALTZA, M.; STRONG, F. M. Kinetin a cell division factor from desoxyribonucleic acid. **Journal American Chemical Society**, v. 77, p. 1392, 1955.
- MILLER, C. O.; SKOOG, F.; OKAMURA, F. S.; VON SALTZA, M. H.; STRONG, F. M. Isolation, structure and synthesis of kinetin: a substance promoting cell division. **Journal American Chemical Society**, v. 78, p. 1375-1380, 1956.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NIU, X.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; PARDO, J. M. Ion homeostasis in NaCl stress environments. **Plant Physiology**, v. 109, p. 735-742, 1995.
- NOVAK, F. J.; BRUNNER, H. Plant breeding: induced mutation technology for crop improvement. **IAEA Bulletin**, v. 4, p. 25-33, 1992.
- ODEIGAH, P. G. C.; OSANYINPEJU, A. O.; MYERS, G. O. Induced mutations in cowpea, *Vigna unguiculata* (Leguminosae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 46, n. 3, p. 579-586, 1998.
- ODUTAYO, O. I.; AKINRIMISI, F. B.; OGUNBOSOYE, I.; OSO, R. T. Multiple shoot induction from embryo derived callus cultures of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 11, p. 1214-1216, 2005.
- PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin taxonomy and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B. B.; MOHAN, R.; DASHIELL, K. E.; JACKAI, L. E. N. (Ed.). **Advances in cowpea research**. Tsukuba: IITA, 1997. p. 1-12.
- PARDOSI, A.; MALORGIO, F.; ORIOLO, D.; GUCCI, R.; SERRA, G.; TOGNONI, F. Water relations and osmotic adjustment in *Apium graveolens* during long-term NaCl stress and subsequent relief. **Physiologia Plantarum**, v. 102, p. 369-376, 1998.
- PELLEGRINESCHI, A. *In vitro* plant regeneration via organogenesis of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 89-95, 1997.

- POPELKA, J. C.; TERRY, N.; HIGGINS, T. J. V. Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries? **Plant Science**, v. 167, p. 195-206, 2004.
- PREDIERI, S. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 185-210, 2001.
- RAI, V.; RAI, A. K. Growth behavior of *Azolla pinnata* at various salinity levels and induction of high salt tolerance. **Plant and Soil**, v. 206, p. 79-84, 1999.
- 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.
- ROCHA, M. M. O feijão caupi combatendo à desnutrição. **Jornal Agrosoft**, 24 jul. 2008. Disponível em: <http://www.agrosoft.org.br/agropag/101722.htm>. Acesso em: 07/11/2008.
- SAGAN, M.; HUGUET, T.; DUC, G. Phenotypic characterization and classification of nodulation mutants of pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Science**, v. 100, p. 59-70, 1994.
- SANGSIRI, C.; SORAJJAPINUN, W.; SRINIVES, P. Gamma radiation induced mutations in Mungbean. **Science Asia**, v. 31, p. 251-255, 2005.
- SATO, T.; ASAKA, D.; HARADA, T.; MATSUKAWA, I. Plant regeneration from protoplasts of adzuki bean (*Vigna angularis* OHWI & OHASHI). **Japanese Journal of Breeding**, v. 43, p. 183-191, 1993.
- SIMON, M. V.; BENKO-ISEPPON, A. M.; RESENDE, L. V.; WINTER, P.; KAHL, G. Genetic diversity and phylogenetic relationships in *Vigna* Savi germplasm revealed by DNA amplification fingerprinting. **Genome**, v. 50, p. 538-547, 2007.
- SINGH, B. B.; EHLERS, J. D.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F. R. Recent Progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C. A.; TARAWALI, S. A.; SINGH, B. B.; KORMAWA, P. M.; TAMÒ, M. (Eds.) **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan: IITA, 2002. p. 22-40.
- SLATER, A.; SCOTT, N. W.; FOWLER, M. R. **Plant Biotechnology: the genetic manipulation of plants**. Nova York: Oxford University Press Inc., 2008. 376 p. ISBN 978-0-19-928261-6.
- TEÓFILO, E. M.; PAIVA, J. B.; MEDEIROS FILHO, S. Polinização artificial em feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 220-223, 2001.

- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: SPI/Embrapa, CNPH (Centro Nacional de Pesquisas de Hortaliças), 1998. cap. 1, p. 11-20.
- TULMANN NETO, A.; CRISTOFANI, M.; MENDE, B. M. J.; ANDO, A. Uso de mutagênese *in vitro* no melhoramento de citros: sensibilidade a raios gama de explantes do cultivar Pêra. **Bragantia**, v. 53, n. 2, p. 167-176, 1994.
- TULMANN NETO, A.; MENDES, B. M. J.; ANDO, A. Progresso na indução e uso de mutações *in vitro*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: SPI/Embrapa – CNPH (Centro Nacional de Pesquisas de Hortaliças), 1998. cap. 17, p. 459-506.
- VERDCOURT, B. Studies in the Leguminosae – Papilionoidea for the flora of tropical East Africa. **Kew Bulletin**, v. 24, p. 507-569, 1970.
- WHITE, P. R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. **Plant Physiology**, v. 9, n. 3, p. 585-600, 1934.

4. ARTIGO PUBLICADO E MANUSCRITO

4.1. ARTIGO PUBLICADO

Análise do potencial regenerativo *in vitro* de diferentes cultivares de feijão-caupi

Artigo publicado na *Revista Brasileira de Biociências*, 2007.

Análise do Potencial Regenerativo *in vitro* de Diferentes Cultivares de Feijão-Caupi

Hayana Azevedo¹, Laureen Houllou-Kido² e Ana Maria Benko-Iseppon³

Introdução

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa de alto conteúdo protéico, sendo bem adaptada às condições brasileiras de clima e de solo [1]. Dentre as várias espécies pertencentes a esta família, o feijão-caupi se destaca nas regiões semi-áridas do Nordeste Brasileiro, onde o feijão comum não cresce adequadamente. O feijão-caupi representa 73% de todos os tipos de feijão consumidos nesta região e em torno de 10% do valor total da produção agrônômica [2].

Apesar das vantagens já apresentadas pelo feijão-caupi em relação ao feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), o mesmo mostra-se altamente susceptível a pragas (especialmente viroses), tornando a cultura pouco viável devido às perdas, especialmente na estação chuvosa.

Entre as grandes dificuldades na administração de ensaios *in vitro* com *Vigna*, destaca-se a contaminação endógena por fungos e bactérias e a capacidade de regeneração, pelo fato de serem sementes recalcitrantes. Contudo, estudos anteriores mostraram que apesar da característica de recalcitrância comum aos feijões, algumas cultivares respondem positivamente a experimentos de análise de potencial regenerativo sob condições de cultura de tecidos *in vitro*. Tais resultados demonstram a necessidade de estudos avaliando as condições ideais de regeneração das cultivares mais importantes agrônômica e economicamente.

O estabelecimento de condições apropriadas para o cultivo *in vitro* de espécies pertencentes ao gênero *Vigna* pode possibilitar a utilização da transformação genética como ferramenta auxiliar ao melhoramento desta cultura [3].

O presente trabalho teve como objetivo comparar a capacidade de regeneração de diferentes cultivares de *Vigna unguiculata* e tipos de explantes (cotilédones e eixo embrionário) germinadas sob condições *in vitro*.

Material e Métodos

Para os experimentos utilizou-se as cultivares TE-96, BR-14 Mulato, Pitiúba, Canapu Amarelo, IT-85F e IPA 206, da espécie *Vigna unguiculata*. inicialmente foi adotada a seguinte metodologia de desinfestação: três lavagens com água destilada (5 min cada); imersão em solução de álcool 70% (1 min), seguida pela imersão em solução composta por água sanitária a 15% (20 min), seguida de três lavagens com água esterilizada, adicionando-se na terceira água o bactericida e fungicida

sistêmico Kasumin diluído em água destilada na proporção 2:1 permanecendo no antibiótico por 24 h. A seguir, as sementes foram inoculadas em placas de Petri contendo papel filtro embebido em água com antibiótico (mesma proporção), para início da germinação. Foram utilizadas 20 sementes de cada cultivar, sendo escolhidas as 15 que mostraram melhor vigor na germinação. Em seguida foram isolados cotilédones e eixo embrionário para inoculação em meio para indução de regeneração otimizado para *Vigna* [saís e vitaminas de MS [4], acrescidos de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de ágar e 2 mg.L⁻¹ BAP (6-benzilaminopurina).

Os explantes foram cultivados em sala de crescimento com fotoperíodo e temperatura controlada por 30 dias, possibilitando a identificação de diferenças no potencial de regeneração nas distintas cultivares e seus tecidos.

Uma importante observação a ser feita na metodologia utilizada é que no decorrer da fase de intumescimento até a inoculação, todas as sementes de BR-14 Mulato contaminaram, fazendo-se necessária a repetição dos passos anteriores com novas sementes recém-colhidas em casa de vegetação.

Resultados e Discussão

O potencial regenerativo *in vitro* da espécie *Vigna unguiculata* é pouco conhecido, assim sendo, a cultivar IPA 206 foi escolhida como material controle, uma vez que análises anteriores de nosso grupo revelaram uma resposta positiva sob condições *in vitro*.

Durante o experimento constataram-se diferenças no potencial regenerativo das distintas cultivares com respostas diversas para cada uma delas. Observou-se também que a contaminação endógena foi o principal problema observado durante os testes de regeneração *in vitro*.

Na semana inicial todas as sementes de Canapu Amarelo e TE-96 apresentaram contaminação endógena por bactérias e fungos (Fig. 1), enquanto que na IT-85F 93,3% da amostra encontrava-se contaminada. Nas cultivares restantes, o primeiro indicio de regeneração correspondeu ao intumescimento dos tecidos, acompanhado pela alteração da coloração. Contudo, nem todos os cotilédones e eixos embrionários responderam positivamente, ocorrendo necrose total ou parcial.

Ao fim da quarta semana, 66,7% dos cotilédones de BR-14 Mulato necrosaram, 6,7% apresentaram

1. Aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rago, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE. CEP: 50670-901. E-mail: arudala@gmail.com

2. Pesquisadora no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Biologia Molecular da Empresa Pernambucana de Agropecuária (IPA), Av. General San Martin, 1371, Bonfim, Recife - PE - CEP 50761-000. E-mail: laureenkido@ipa.br

3. Professora Adjunta do Departamento de Genética na Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rago, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE. CEP: 50670-901. E-mail: celisepp@hotimk.com.br

coloração esverdeada e 26,7% indicaram início de formação de calos. Dentre os quinze eixos inoculados desta cultivar, 26,7% necrosaram e outros 26,7% mostraram regeneração direta e indireta via calo, enquanto que 46,6% apenas indicaram a formação de calo (Fig. 2). Dentre os tecidos de Pitiúba, 53,3% dos cotilédones apresentaram necrose e os 46,7% remanescentes formaram calo. 40% dos seus eixos embrionários apresentaram necrose, 33,3% mostraram regeneração direta e indireta e outros 26,7% apenas a formação de calo (Fig.3). A única semente não contaminada de IT-85F apresentou formação de calo em ambos os tecidos (Fig. 4). Já a cultivar IPA 206, para a qual já se conhecem trabalhos com resposta positiva, não respondeu como esperado. Todos os seus cotilédones necrosaram e entre os eixos embrionários, apenas um iniciou a regeneração indireta (Fig. 5).

Foi observado que as cultivares apresentaram respostas diferenciadas tanto entre si, quanto entre seus tecidos. Este resultado indica que a metodologia utilizada deve ser aprimorada de forma específica para cada cultivar trabalhada, não sendo o método padrão o ideal para todos os experimentos de cultivo *in vitro* de *Vigna*. Também foi constatado, que em todos os acessos analisados, os resultados indicam um maior potencial regenerativo dos eixos embrionários, que apresentaram tanto a regeneração direta e indireta simultaneamente, como apenas a regeneração indireta pela formação de calos.

Conclusões

A metodologia utilizada para todas as cultivares, necessita de adequações específicas para cada material a ser analisado. Isso indica que em *V. unguiculata* a adaptação às condições *in vitro* é genótipo-dependente. A

julgar pelo observado em todas as cultivares analisadas, o eixo embrionário constitui-se no melhor explante para indução de regeneração em feijão-caupi.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do programa RENORBIO (Rede Nordeste de Biotecnologia), da Fundação Volkswagen (Bonn, Alemanha), do BNB (banco Nordeste do Brasil), da FACEPE (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco) e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) por apoio financeiro e bolsas de pesquisa. Agradecemos à Embrapa/CPQMN (Centro de Pesquisas do Meio Norte) e ao IPA (Empresa Pernambucana de pesquisa Agropecuária) pela concessão de sementes de seu banco de germoplasma para a realização dos ensaios *in vitro*.

Referências

- [1] LEITE, M.L.; FILHO J.S.V. & RODRIGUES J.D. 1999. Produção e componentes de produção de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), em Bonfante - SP. Revista da Faculdade de Agronomia, Botucatu.
- [2] FREIRE-FILHO, F.R.; RIBEIRO V.Q.; BARRETO P.D. & SANTOS C.A.F. 1999. Melhoramento genético do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região nordeste. In: QUEIRÓS, M.A. de, GÖEDERT, C.O. & RAMOS, S.R.R., (Eds.). Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro. EMBRAPA, CPATSA, Petrolina.
- [3] AVENIDO, R.A. & HATTORI, K. 1999. Differences in regeneration response from cotyledonary node explants in asiatic *Vigna* species support genomic grouping within subgenus *Ceratolopia* (Piper) Venc. Plant cell tissue organ culture. 58: 99-110.
- [4] MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. v.15, p.473-497.



Figura 1 – A, Contaminação por bactérias em Canapu Amarelo (*Vigna unguiculata*). B, Contaminação por fungos em TE-96 (*Vigna unguiculata*).

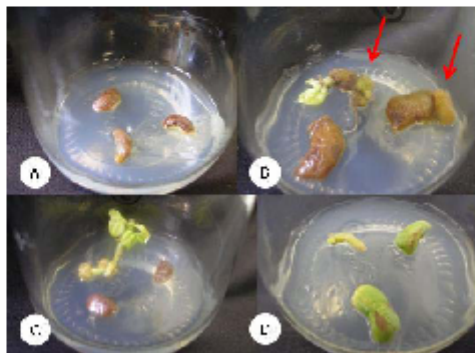


Figura 2 – A, Tecidos necrosados de BR-14 Mulato (*Vigna unguiculata*). B, Ambos os tecidos apresentando formação de calo (no detalhe). C, Eixo embrionário apresentando regeneração direta e indireta. D, Cotilédones esverdeados.

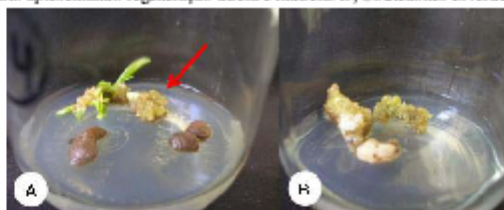


Figura 3 – A, Cotilédones necrosados e Eixo embrionário apresentando regeneração direta e indireta via calo (detalhe) em Pitiúba (*Vigna unguiculata*). B, Formação de calo em todos os tecidos.



Figura 4. Tecidos indicando formação de calo em IT-85F (*Vigna unguiculata*)



Figura 5. Cotilédones necrosados e eixo indicando regeneração indireta via calo em IPA 206 (*Vigna unguiculata*).

4.2. MANUSCRITO

Indução de mutação em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.],
cultivar BR14-Mulato, visando à obtenção de mutantes tolerantes à
salinidade

Indução de mutação em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], cultivar BR14-Mulato, visando à obtenção de mutantes tolerantes à salinidade

Hayana Millena de Arruda Azevedo¹, Laureen Michelle Houllou-Kido² and Ana Maria Benko-Iseppon^{1,3}

¹ Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), CCB, Genética, Av. Prof. Moraes Rego, s/nº. 520732-970, Recife – PE, Brasil.

² Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), Laboratório de Genoma e Cultura de Tecidos, Recife – PE, Brasil.

Palavras-Chave: mutagênese *in vitro*; cultura de tecidos; raios gama; leguminosas.

Key words: *in vitro* mutagenesis; tissue culture; salinity; gamma rays; legumes.

³Autor para Correspondência: Universidade Federal de Pernambuco, UFPE/CCB, Depto. de Genética, Av. Prof. Moraes Rego, 1235; 50.670-420, Recife, PE, Brasil. E-mail: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br

Resumo

O feijão-caupi compreende uma das mais importantes fontes de proteína vegetal para as populações rurais em áreas de clima tropical seco, embora sua produtividade sob condições de salinidade e seca seja ainda limitada. No presente estudo foram realizados ensaios de indução de mutação *in vitro* em feijão-caupi com uso de raios gama, usando-se a cultivar BR14-Mulato, previamente selecionada por sua eficiente capacidade regenerativa *in vitro*. Para o sucesso do experimento, foram testados protocolos visando ao estabelecimento dos níveis de pressão de seleção das sementes irradiadas, através da determinação da concentração de NaCl capaz de inibir a regeneração *in vitro*. Foram avaliadas as concentrações de NaCl de 1% (172 mM – Tratamento 1), 1,5% (258 mM – Tratamento 2) e 2% (344 mM – Tratamento 3), com um lote adicional sem sal (0% - Controle Negativo), estabelecendo-se como mais apropriada a concentração de 172 mM. Para indução de mutantes, as sementes foram irradiadas com três doses de radiação gama (100, 150 e 200 Gy), com subsequente inoculação *in vitro* usando-se meios de cultura com e sem sal. Um provável mutante sólido foi obtido a partir de ensaios usando-se a dose de 150 Gy formando calo embriogênico na ausência de NaCl, sendo transferido para meio seletivo salino *in vitro*, no qual sobreviveu. Um segundo mutante não irradiado sobreviveu ao meio salino seletivo. Clones de ambos mutantes foram regenerados, estando disponíveis para análises moleculares e em casa de vegetação e também disponíveis para análises fenotípicas, fisiológicas e moleculares. O estudo realizado permitiu o estabelecimento de protocolos mais adequados para este tipo de estudo no futuro, enquanto os mutantes obtidos representam importantes candidatos para a obtenção de variedades resistentes à salinidade de feijão-caupi.

Abstract

Cowpea is one of the most important protein sources for the rural populations in the dry tropical regions, despite of its limited productivity under conditions of soil salinity and drought. In the course of this study, attempts were made to induce *in vitro* mutation in cowpea using gamma rays, specifically in the BR14-Mulato elite cultivar that in previous experiments showed increased regenerative potential. For this purpose, adequate protocols were tested to establish the level of NaCl concentration capable of impairing *in vitro* regeneration, using the NaCl concentrations of 1% (172 mM – Treatment 1), 1,5% (258 mM – Treatment 2) and 2% (344 mM – Treatment 3) and an additional medium without salt (0% - Control Treatment), indicating the concentration of 172 mM as the most appropriated. For mutation induction, seeds were irradiated with three gamma radiation dosages (100, 150 e 200 Gy), which were then inoculated simultaneously *in vitro* in culture media with and without salt. A putative solid mutant was obtained after 150 Gy irradiation, forming an embryogenic callus in the absence of NaCl. After transferring to a saline selective medium, the mutant survived the saline conditions and was subsequently regenerated. A second non irradiated mutant survived the saline selective medium. Both mutants are currently available for molecular analysis and greenhouse experiments. This study allowed the establishment of adequate protocols for this kind of approach in the future, while the generated mutants represent important possibilities for the development of saline resistant cowpea varieties.

Introdução

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] está entre as leguminosas de maior conteúdo protéico, sendo bem adaptada às condições brasileiras de clima e de solo (Leite *et al.*, 1999). Dentre as várias espécies cultivadas pertencentes às leguminosas, o feijão-caupi se destaca nas regiões semi-áridas do Nordeste brasileiro, onde o feijão comum e outras leguminosas não crescem adequadamente. Contudo, nas áreas irrigadas da zona semi-árida do Nordeste, os teores de sais na água de irrigação, a intensa evaporação e a falta de eficiência na drenagem têm provocado crescentes problemas de salinidade nos solos, reduzindo o desenvolvimento destas plantas (Dantas *et al.*, 2002).

Ferramentas modernas da biotecnologia têm apresentado um potencial quase inesgotável para a obtenção de características altamente desejáveis. Uma alternativa adicional ao melhoramento não-convencional é a 'mutagênese *in vitro*', que tem como objetivo a obtenção de novas características agronômicas de interesse. Os mutagênicos mais comumente utilizados são as radiações ionizantes do tipo raios-X ou raios gama em doses muito baixas, as quais normalmente causam apenas mutações pontuais como substituições, inserções ou deleções (Ahloowalia & Maluszynski, 2001). A viabilidade da técnica tem sido comprovada por dados fornecidos pela FAO/IAEA – *Program for Nuclear Techniques in Food and Agriculture* (2005), onde atualmente estão registradas aproximadamente 2500 variedades obtidas por mutação de mais de 160 espécies de plantas em todo o mundo.

Explantos de várias espécies de angiospermas têm sido cultivados *in vitro* com sucesso, indicando o potencial da técnica para a obtenção de plântulas inteiras

a partir de células, tecidos ou órgãos vegetais, entretanto, em leguminosas, a regeneração *in vitro* tem sido indicada pelos pesquisadores como uma limitação freqüente, devido à recalcitrância das espécies deste grupo, fato sugerido como o principal gargalo dos avanços em biotecnologia do grupo (Christou, 1997; Popelka *et al.*, 2004). Apesar das dificuldades relatadas, exemplos recentes de sucesso têm sido reportados, incluindo regeneração de plantas estáveis a partir de feijão-caupi transformado via *Agrobacterium tumefaciens* (Popelka *et al.* 2006; Chaudhury *et al.*, 2007) ou via biobalística (Ivo *et al.*, 2008).

O presente estudo teve como objetivo gerar um mutante de feijão-caupi tolerante à salinidade, incluindo as seguintes etapas: (I) estabelecimento da concentração mínima de NaCl capaz de inibir o desenvolvimento das sementes para determinação dos níveis de pressão de seleção; (II) a indução de mutação *in vitro* por radiação gama, com uma avaliação prévia dos níveis de radiação eficientes para este fim e (III) acompanhamento do processo de regeneração de plantas induzidas e não induzidas sob as condições de estresse salino *in vitro* pré-determinadas.

Materiais e Métodos

Material Vegetal e Obtenção de Explantes

A cultivar BR14-Mulato foi selecionada por ter mostrado satisfatório potencial regenerativo *in vitro* em avaliações anteriores (Azevedo *et al.*, 2007), bem como por tratar-se de material com características interessantes para cultivo no nordeste brasileiro. As sementes foram cedidas pela Embrapa Meio-Norte (Centro de

Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte – CPAMN, Teresina, Piauí, Brasil), responsável pelo BAG (Banco Ativo de Germoplasma) de feijão-caupi no Brasil.

Sementes maduras e frescas foram obtidas a partir de plantas cultivadas em casa de vegetação, sob fotoperíodo de 14 horas e proteção de tela anti-afídica em condições de temperatura ambiente.

A desinfestação das sementes e a preparação das soluções foram feitas em câmara de fluxo laminar estéril. Inicialmente foi feita uma lavagem com água destilada antes da imersão das sementes em solução de álcool 70%, por um minuto, seguida de imersão por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,2 %. As sementes foram, então, lavadas três vezes com água esterilizada, adicionando-se, na terceira, o antibiótico Cefalexina 500 mg ($2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) da marca CEFAGEL[®]. As sementes permaneceram nesta solução em placa de Petri por 24 h para germinação.

Após a germinação inicial, foram isolados cotilédones e eixos embrionários para inoculação em meio de indução de regeneração otimizado para feijão-caupi [sais e vitaminas de Murashige e Skoog (1962), acrescidos de 30 g.L^{-1} de sacarose, $6,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar e BAP (6-benzilaminopurina) na concentração de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$]. Os explantes foram cultivados em sala de crescimento com fotoperíodo de 14 horas e temperatura de $19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 30 dias, sob constante monitoramento.

Potencial Regenerativo sob Salinidade

O teste de sensibilidade ao NaCl foi realizado para determinar a dose mínima que proporcionasse a inibição do desenvolvimento *in vitro*. Para inoculação das sementes após isolamento dos tecidos foram feitos quatro tipos de meios de cultura,

tendo como base o meio otimizado para feijão-caupi, acrescido de cloreto de sódio (NaCl) nas concentrações indicadas na Tabela 1.

Ainda foram elaborados mais dois meios de cultura contendo as concentrações de 0,6% (103 mM) e 0,3% (51,5 mM) para que os tecidos regenerados sob pressão de seleção fossem retirados do meio seletivo de forma gradativa, sem modificações bruscas nas condições de salinidade, até que estivessem aptos à transferência para meio de cultura na ausência completa de NaCl.

Seleção 'in vitro' de Sementes Irradiadas

As sementes irradiadas com as doses 100, 150 e 200 Gy tiveram seus tecidos isolados, sendo metade de cada lote inoculado *in vitro* em meio de cultura padrão (MS) otimizado para o feijão-caupi acrescido de 1% de NaCl (concentração selecionada na etapa anterior), visando selecionar possíveis materiais tolerantes à salinidade, enquanto a outra metade foi inoculada em meio sem acréscimo de sal para, depois de 20 dias, serem transferidas para o meio seletivo. Novas irradiações foram realizadas utilizando-se as doses de 25, 50 e 75 Gy para análises paralelas de diferenças do potencial regenerativo *in vitro* seguindo os mesmos parâmetros usados nas irradiações anteriores.

Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido a partir de delineamento inteiramente casualizado, perfazendo um total de oito tratamentos em arranjo fatorial 4 x 2 (4

doses de radiação e 2 níveis de NaCl, ou seja, ausência ou presença do sal), sendo trabalhados em cinco repetições, totalizando 40 tratamentos trabalhados.

Após coleta e desinfestação do material vegetal, o experimento foi conduzido em duas etapas principais: análise do potencial regenerativo sob salinidade e seleção *in vitro* de materiais irradiados.

Na primeira etapa, em cada frasco de vidro foram inoculados os dois cotilédones e o eixo embrionário separados a uma distância mínima de 2,0 cm, de modo que não houvesse competição entre os tecidos. Ambos os tecidos (eixo embrionário e cotilédones) foram inoculados em meios de cultura padrão (MS) com diferentes concentrações de NaCl (172, 258 e 344 mM), somando um total de quatro tratamentos (incluindo o meio controle sem sal). No total, foram utilizadas 40 frascos (cada um contendo uma semente), sendo 10 para cada um dos tratamentos. O material foi analisado semanalmente de acordo com suas características fenotípicas pelo período total de quatro semanas, adotando-se como principais características analisadas o intumescimento, o índice de necrose (incluindo avaliação da cor, aspecto, possível necrose, etc. dos tecidos) e a formação de calos (regeneração indireta) e/ou desenvolvimento da planta (regeneração direta).

Na segunda etapa, 1.600 sementes foram separadas em quatro lotes contendo 400 sementes cada um. Do total, 800 sementes não foram irradiadas (0 Gy) para serem utilizadas como material controle e 1.200 foram submetidas a dosagens específicas de radiação gama (100, 150 e 200 Gy), através da bomba irradiadora Gammacell 220 Excel[®] (Co⁶⁰), disponível no laboratório GAMALAB do Departamento de Energia Nuclear (DEN) da Universidade Federal de Pernambuco. Posteriormente, mais três lotes, cada um contendo 100 sementes, foram submetidos a dosagens menores de radiação gama (25, 50 e 75 Gy). Os tecidos isolados de

sementes irradiadas com diferentes doses de radiação gama foram inoculados em meios de cultura com ausência e presença de NaCl, totalizando oito tratamentos e cinco repetições para cada um destes. A avaliação fenotípica do material inoculado foi realizada a cada sete dias durante quatro semanas, principalmente, as taxas de organogênese direta e/ou indireta, além dos índices de necrose e intumescimento.

Resultados

Durante o experimento foram observadas diferentes respostas do potencial regenerativo da cultivar de acordo com o meio de cultura em que se encontrava em relação à salinidade.

Uma semana após a inoculação verificou-se contaminação endógena por bactéria em 20% dos frascos do material controle e em 40%, 40% e 10% dos materiais contendo 1%, 1,5% e 2% de NaCl, respectivamente. Dentre os explantes restantes que se encontravam no meio de cultura sem sal (controle negativo), apenas 10% apresentaram necrose nos cotilédones, observando-se total esverdeamento (intumescimento) dos demais, apontando início de regeneração direta e indireta (Figura 1).

Quanto aos explantes submetidos aos diversos tratamentos, as respostas, após quatro semanas de observações, encontram-se expostas na Tabela 2 e ilustradas na Figura 2. Os resultados mostram que a concentração de 172 mM de NaCl foi escolhida como seletiva uma vez que se apresentou como a dose salina mínima capaz de inibir a regeneração dos explantes.

Como resultado da avaliação das respostas dos tecidos à radiação gama em relação à tolerância à salinidade, considerou-se que a dose ideal para obtenção de prováveis mutantes tolerantes a solos salinos seria aquela que fosse suficiente para induzir mutações sem inibir severamente o desenvolvimento, uma vez que não seria possível distinguir se a letalidade teria sido provocada pela salinidade ou pela alta dose de radiação. As três doses escolhidas para este fim (100, 150 e 200 Gy) e o controle negativo (0 Gy) foram avaliadas a partir da contagem dos diferentes fenótipos nos dois tipos de tecidos após quatro semanas, encontrando-se suas respectivas respostas compiladas na Tabela 3, tanto para explantes cultivados na presença como na ausência de sal.

Paralelamente ao experimento utilizando as doses de radiação supracitadas, foi montado outro trabalho com doses inferiores (25 Gy, 50 Gy e 75 Gy), porém os resultados não se mostraram muito distintos dos apresentados pelo controle (0 Gy), chegando-se à conclusão que estas não teriam influência significativa nas respostas à regeneração sendo, portanto, desconsideradas em experimentos futuros.

Os explantes inoculados em meio não seletivo apresentaram como resposta a regeneração direta e/ou indireta, sendo transferidos para meio seletivo com o objetivo de constatar a presença de possíveis mutações espontâneas provocadas pela manipulação *in vitro* (variação somaclonal), no caso de explantes não irradiados, confirmando a condição de tolerância no caso de indivíduos irradiados. Dentre estes, apenas um eixo embrionário do material controle (0 Gy) sobreviveu à seleção (Figura 3A), sendo clonado e transferido para novos tubos, visando validar a possível variação somaclonal. Outro eixo irradiado a 150 Gy apresentou formação de calo sendo, portanto, transferido duas vezes consecutivas para meio de cultura com presença de sal, reduzindo-se a concentração do agente seletivo nas

transferências seguintes (0,6% e 0,3%) até que o material fosse retirado completamente desta situação. Ao ser avaliado nestas condições, o explante iniciou o desenvolvimento de folhas (Figura 3B).

Explantos oriundos de meio não seletivo e que mostraram como resposta a formação de calos (regeneração indireta) ou intumescimento foram transferidos apenas para manutenção, continuando, assim, na mesma forma de cultivo. Posteriormente, os que se desenvolveram satisfatoriamente, foram selecionados sob pressão. Contudo, nenhum explante resistiu ao tratamento. Aqueles que iniciaram qualquer tipo de resposta em meio seletivo, foram transferidos para novo meio seletivo apenas para manutenção, observando-se mortandade progressiva até que fossem totalmente descartados.

As Figuras 4A-C ilustram graficamente como eixos embrionários e cotilédones responderam às diferentes doses de radiação no que diz respeito à regeneração direta, regeneração indireta e ambas as características concomitantemente.

Discussão

No teste do potencial regenerativo sob condições de salinidade, o Tratamento 1 (172 mM) demonstrou ser apropriado para a seleção *in vitro* da cultivar BR14-Mulato por ser aquele que nos resultados mostrou-se como a dose mínima capaz de inibir a regeneração dos tecidos, mesmo que em alguns casos tenha apenas se iniciado o processo, porém tendo como resposta final a necrose.

Em *Vigna radiata* e *Solanum lycopersicum*, Hassan *et al.* (2007) concluíram que 100 e 150 mM de NaCl eram as concentrações adequadas para seus

experimentos de seleção *in vitro* indicando que, provavelmente, os genótipos testados apresentam sensibilidade ao sal próxima ao observado para a cultivar de feijão-caupi aqui testada. Testes de germinação na presença de diferentes concentrações de NaCl têm sido freqüentemente usados para identificação de genótipos tolerantes, incluindo leguminosas, como a alfafa (Robinson *et al.*, 1986).

Os resultados da presente análise indicaram que a cultivar BR14-Mulato é sensível à salinidade uma vez que apresentou inibição da taxa de regeneração em dose menor (172 mM) que aquelas suportadas por outras cultivares de *V. unguiculata*. Estudos prévios demonstraram que sob dose de NaCl considerada semi-letal para muitas espécies de glicófitas (200 mM), o feijão-caupi é capaz de sobreviver durante mais de 20 dias sem exibir nenhum sintoma de injúria por toxicidade. Portanto, no critério de capacidade de sobrevivência, o feijão-caupi pode ser considerado uma espécie resistente (Silveira *et al.*, 1999) , embora algumas cultivares, como a BR14-Mulato, nem sempre apresentem o mesmo desempenho fisiológico que aquelas selecionadas para estudos como os realizados pelos citados autores. Essas diferenças nas respostas também se justificam uma vez que a formação de embriões somáticos e a regeneração de plantas também são genótipo-dependentes sob condições de salinidade (Zair *et al.*, 2003).

O fato de alguns genótipos classificados como tolerantes à salinidade na germinação, florescimento ou estágio inicial do crescimento vegetativo evidencia que a sensibilidade do feijão-caupi à salinidade muda durante seu crescimento e desenvolvimento, podendo tais diferenças também serem devidas a fatores ambientais como temperatura, composição do solo e outras variáveis como concentração de oxigênio, luz e temperatura do solo (Murillo-Amador *et al.*, 2006). Os resultados da etapa de seleção *in vitro* de sementes irradiadas mostraram que a

radiação nas doses de 100 e 150 Gy, inoculadas em meio na ausência de NaCl, potencializaram a organogênese direta em eixos embrionários, superando, inclusive a taxa de regeneração do material usado como controle do experimento. Na dose de 200 Gy houve redução nesse percentual, porém ainda com resposta satisfatória. O mesmo ocorreu com a organogênese indireta de eixos irradiados a 100 Gy e cotilédones irradiados na mesma dose, onde, neste último caso, a taxa apresentou-se próxima à observada no tratamento controle.

Resposta semelhante foi relatada por Gazzaneo (2007) em estudo utilizando a cv. IPA 206 (*V. unguiculata*), onde foi apresentada uma taxa de organogênese direta acima de 60%, diferenciando do presente estudo quanto ao tecido regenerado, uma vez que tais efeitos apresentaram-se em cotilédones. O citado autor também destacou o efeito de diferentes doses de radiação gama na frequência da organogênese indireta em eixos embrionários com menor regeneração em tecidos submetidos a dosagens mais altas.

Esses resultados comprovam os efeitos deletérios de dosagens altas de raios gama, indicando sua menor eficiência na obtenção de mutantes para fins de melhoramento. Altas doses de radiação vem sendo utilizadas na esterilização de plantas para armazenamento e consumo na alimentação, enquanto doses menores vem sendo aplicadas na indução de mutação de material obtido a partir de sementes, onde as doses variam, em média, entre 60 e 700 Gy em algumas espécies como trigo, milho e feijões (Ahloowalia & Maluszynski, 2001).

Em estudos de mutagênese *in vitro* com mandioca (*Manihot esculenta*) Joseph *et al.* (2004) reportaram que nenhum dos tecidos expostos à radiação gama sobreviveu a doses maiores que 100 Gy, destacando que a dose de 50 Gy gerou suficiente variabilidade para a seleção de mutantes. Em estudo sobre os efeitos da

radiação gama em cultivares de *V. radiata*, Yaqoob e Rashid (2001) também avaliaram diversas características sob doses que variaram de 100 a 500 Gy, observando que os efeitos da radiação sobre as cultivares aumentaram significativamente sua variabilidade em todas as características analisadas, com exceção apenas da altura das plantas. Além disso, diferentes cultivares apresentaram respostas distintas às diferentes dosagens com taxas de mutação genótipo-específicas para diferentes características.

No presente trabalho, durante a seleção *in vitro*, variabilidade genética foi constatada pelo aparecimento de variação somaclonal em um dos indivíduos não irradiados e inoculados em meio seletivo. Ao lado dos sistemas de mutagênese química e física, a variação somaclonal pode ser considerada como um terceiro sistema de mutagênese, sendo chamada de *Mutagênese Biológica* (Amano, 2006). Chatterjee e Das Gupta (1998), por exemplo, detectaram, em análise citogenética de arroz (*Oryza sativa*) que mutações espontâneas e duplicações cromossômicas ocorriam durante a cultura de calos, ratificando as ocorrências aqui observadas.

A variação somaclonal não é encontrada somente em espécies propagadas assexuadamente, mas também naquelas propagadas através de sementes e que se autofecundam. Embora a maioria dos exemplos deste tipo de ocorrência seja em poliplóides, essa situação também tem sido observada em espécies diplóides. O espectro de características afetadas, portanto, pode ser diverso e a frequência de variantes é comparativamente alta (Larkin & Scowcroft, 1981).

Outra parte dos resultados demonstrou que o indivíduo irradiado a 150 Gy, regenerado e sobrevivente à pressão de seleção pode ser um provável mutante sólido, uma vez que parte do explante apresentou, inicialmente, pontos de necrose e parte não, característica indicativa de quimerismo. Os mutantes sólidos são assim

considerados por possuírem todas as células de uma camada histológica com o mesmo genótipo mutado. A mutação compreende um evento unicelular e, quando estruturas multicelulares são tratadas com mutagênicos, se a mutação é induzida, há existência na mesma planta de dois ou mais tecidos somáticos geneticamente distintos, fenômeno indicado como quimerismo. Mutantes sólidos são obtidos através da redução da formação de quimeras, aumentando, assim, as frequências de mutação e tornando mais fácil seu reconhecimento. Isto pode ocorrer mesmo em materiais multicelulares, como no caso dos calos embriogênicos, pois embriões somáticos podem ter se originado de uma única célula, sendo esta a situação ideal para a mutagênese *in vitro* (Tulmann Neto *et al.*, 1998).

O isolamento de quimeras apenas é possível através de técnicas convencionais quando partes inteiras da plantas forem mutadas e praticamente impossível quando são mutados apenas setores da planta. Contudo, Datta *et al.* (2005) conseguiram, em crisântemo, flores completamente mutadas apresentando a mesma cor e forma, indicando a não formação de quimeras a partir de indução de mutação via raios gama de tecidos meristemáticos. Essa resposta foi possível devido ao fato de que células mutadas podem se regenerar diretamente através da cultura de tecidos *in vitro* levando ao desenvolvimento do mutante sólido (Yamaguchi *et al.*, 2003).

Considerando os resultados promissores observados em outras culturas vegetais, buscou-se obter no presente estudo mutantes que apresentassem maior tolerância à salinidade, observando também que, para a cultivar trabalhada, os eixos embrionários responderam melhor à indução de mutação *in vitro* que os cotilédones. Deve-se ressaltar que o menor número de candidatos a mutantes aqui obtido está diretamente relacionado à inclusão da etapa de seleção para o citado fator, tratando-

se do primeiro estudo deste tipo no gênero *Vigna*. Os testes aqui realizados também se constituem em importantes parâmetros para este tipo de estudo no futuro em outros genótipos de feijão-caupi ou em outras espécies do gênero *Vigna*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao programa RENORBIO (Rede Nordeste de Biotecnologia), ao MCT/FINEP (Ministério de Ciência e Tecnologia/Financiadora de Estudos e Projetos), BNB (Banco Nordeste do Brasil), FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo apoio financeiro, bem como ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) por bolsas de estudos. Também agradecem à Embrapa Meio-Norte (Centro de Pesquisa Agropecuário do Meio-Norte, Teresina, Brasil) por cederem as sementes utilizadas no projeto.

Referências Bibliográficas

- Ahloowalia BS and Maluszynski M (2001) Induced mutations – A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, 118:167-173.
- Amano, E (2006) Use of induced mutants in rice breeding in Japan. *Plant Mutation Reports*, 1(1):21-24.
- Azevedo H; Houllou-Kido L and Benko-Iseppon AM (2007) Análise do potencial regenerativo *in vitro* de diferentes cultivares de feijão-caupi. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(2):528-530.
- Chatterjee B and Das Gupta P (1998) Induction of somaclonal variation by tissue culture and cytogenetic analysis in *Oryza sativa* L. *Biologia Plantarum*, 40(1):25-32.
- Chaudhury D; Madanpotra S; Jaiwal R; Saini R; Jumar PA and Jaiwal PK (2007) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated frequency genetic transformation of an Indian cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivar and transmission of transgene into progeny. *Plant Science*, 172(4):692-700.
- Christou P (1997) Rice transformation: bombardment. *Plant Molecular Biology*, 35:197-203.

Dantas JP; Marinho FJL; Ferreira MMM; Amorim MSN; Andrade SIO and Sales AL (2002) Avaliação de genótipos de caupi sob salinidade. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 6(3):425-430.

Datta SK; Misra P and Mandal AKA (2005) *In vitro* mutagenesis – a quick method for establishment of solid mutant in chrysanthemum. Current Science, 88(1):155-158.

FAO/IAEA – Program for Nuclear Techniques in Food and Agriculture (2005) Disponível em: <http://www.iaea.org/nafa/d2/index.html>. Acesso em: 07/11/2008.

Gazzaneo LRS (2007) Indução de mutação e seleção em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] visando tolerância à salinidade. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 100 pp

Hassan NM; Serag MS; El-Feky FM and Nemat Alla MM (2007) *In vitro* selection of mung bean and tomato for improving tolerance to NaCl. Annals of Applied Biology, 152:319-330.

Ivo NL; Nascimento CP; Vieira LS; Campos FAP and Aragão FJL (2008) Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. Plant Cell Reports, 27(9):1475-1483.

Joseph R; Yeoh HH and Loh CS (2004) Induced mutations in cassava using somatic embryos and the identification of mutant plants with altered starch yield and composition. *Plant Cell Reports*, 23:91-98.

Larkin PJ and Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60:197-214.

Leite ML; Filho JSV and Rodrigues JD (1999) Produção e componentes de produção de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), em Botucatu – SP. *Revista de La Facultad de Agronomía Universidad Central de Venezuela, Caracas - Venezuela*, 25(2):127-138.

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.

Murillo-Amador B; Troyó-Diéguéz E; García-Hernández JL; López-Aguilar R; Ávila-Serrano NY; Zamora-Salgado S; Rueda-Puente EO and Kaya C (2006) Effect of NaCl salinity in the genotypic variation of cowpea (*Vigna unguiculata*) during early vegetative growth. *Scientia Horticulturae*, 108:423-431.

Popelka JC; Gollasch S; Moore A; Molvig L and Higgins TJV (2006) Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny. *Plant Cell Report*, 25:304–312.

Popelka JC; Terryn N and Higgins THV (2004) Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries? *Plant Science*, 167:195–206.

Robinson DL; Dobrenz AK and Smith SE (1986) Evaluation of the genetic gains for germination salt tolerance in alfafa using NaCl gradient. *Agron. Journal*, 78:1099-1103.

Silveira JAG; Cardoso BB; Melo ARB and Viégas RA (1999) Salt-induced decrease in Nitrate uptake and assimilation in cowpea plants. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11(2):77-82.

Tulmann Neto A; Mendes BMJ and Ando A (1998) Progresso na indução e uso de mutações *in vitro*. In: Torres AC; Caldas LS and Buso JA (Eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Embrapa – SPI/ Embrapa – CNPH, Brasília, pp 459-506.

Yamaguchi H; Nagatomi S; Morishita T; Degi K; Tanaka A; Shikazono N and Hase Y (2003) Mutation induced with ion beam irradiation in rose. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 206:561-564.

Yaqoob M and Rashid A (2001) Induced mutation studies in some Mungbean (*Vigna radiata* L.) Wilczek cultivars. *Journal of Biological Sciences*, 1(9):805-808.

Zair I; Chlyah I; Sabounji K; Tittahsen M and Chlyah H (2003) Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of *in vitro* selection pressure. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73:237-244.

Tabelas

Tabela 1: Diferentes tratamentos utilizados na etapa de análise do potencial regenerativo sob salinidade com suas respectivas concentrações de NaCl.

Tratamento	Concentração de NaCl
T ₀	0 mM (Material Controle)
T ₁	172 mM (1%)
T ₂	258 mM (1,5%)
T ₃	344 mM (2%)

Tabela 2: Resultados obtidos a partir das análises do potencial de regeneração *in vitro* sob condições salinas.

Concentração de Sal	Nº de Explantes (100%)		Nº e % de Explantes Contaminados		Nº e % de Explantes Necrosados		Nº e % de Explantes Intumescidos		Nº e % de Regenerantes Indiretos		Nº e % de Regenerantes Diretos	
	Cot ¹	Emb ²	Cot ¹	Emb ²	Cot ¹	Emb ²	Cot ¹	Emb ²	Cot ¹	Emb ²	Cot ¹	Emb ²
0 mM	20	10	4 (20%)	2 (20%)	2 (10%)	0	0	0	13 (65%)	7 (70%)	1 (5%)	1 (10%)
172 mM	20	10	8 (40%)	4 (40%)	12 (60%)	2 (20%)	0	4 (40%)	0	0	0	0
258 mM	20	10	8 (40%)	4 (40%)	12 (60%)	6 (60%)	0	0	0	0	0	0
344 mM	20	10	2 (10%)	1 (10%)	18 (90%)	9 (90%)	0	0	0	0	0	0

Tabela 3: Principais respostas (em número e percentagem de explantes) observadas de ambos os tecidos em relação à radiação (diversas doses na ausência e presença de sal).

Dose de Radiação (Gy) / Presença ou Ausência de Sal	Nº de Explantes (100%)		Nº e % de Explantes Contaminados		Nº e % de Regenerantes Diretos		Nº e % de Regenerantes Indiretos		Nº e % de Regenerantes Diretos e Indiretos (concomitantemente)	
	Cot ¹	Emb ²	Cot ¹	Emb ²	Cot ¹	Emb ²	Cot ¹	Emb ²	Cot ¹	Emb ²
0 sem NaCl	200	100	32 (16%)	16 (16%)	36 (18%)	20 (20%)	28 (14%)	20 (20%)	12 (6%)	12 (12%)
0 com NaCl	200	100	8 (4%)	4 (4%)	0	0	0	10 (10%)	0	0
100 sem NaCl	200	100	28 (14%)	14 (14%)	0	26 (26%)	28 (14%)	36 (36%)	0	4 (4%)
100 com NaCl	200	100	28 (14%)	14 (14%)	0	4 (4%)	0	4 (4%)	0	0
150 sem NaCl	200	100	28 (14%)	14 (14%)	0	26 (26%)	8 (4%)	14 (14%)	8 (4%)	16 (16%)
150 com NaCl	200	100	24 (12%)	12 (12%)	0	0	0	0	0	0
200 sem NaCl	200	100	24 (12%)	12 (12%)	0	14 (14%)	12 (6%)	14 (14%)	0	14 (14%)
200 com NaCl	200	100	12 (6%)	6 (6%)	0	0	0	0	0	0

Figuras

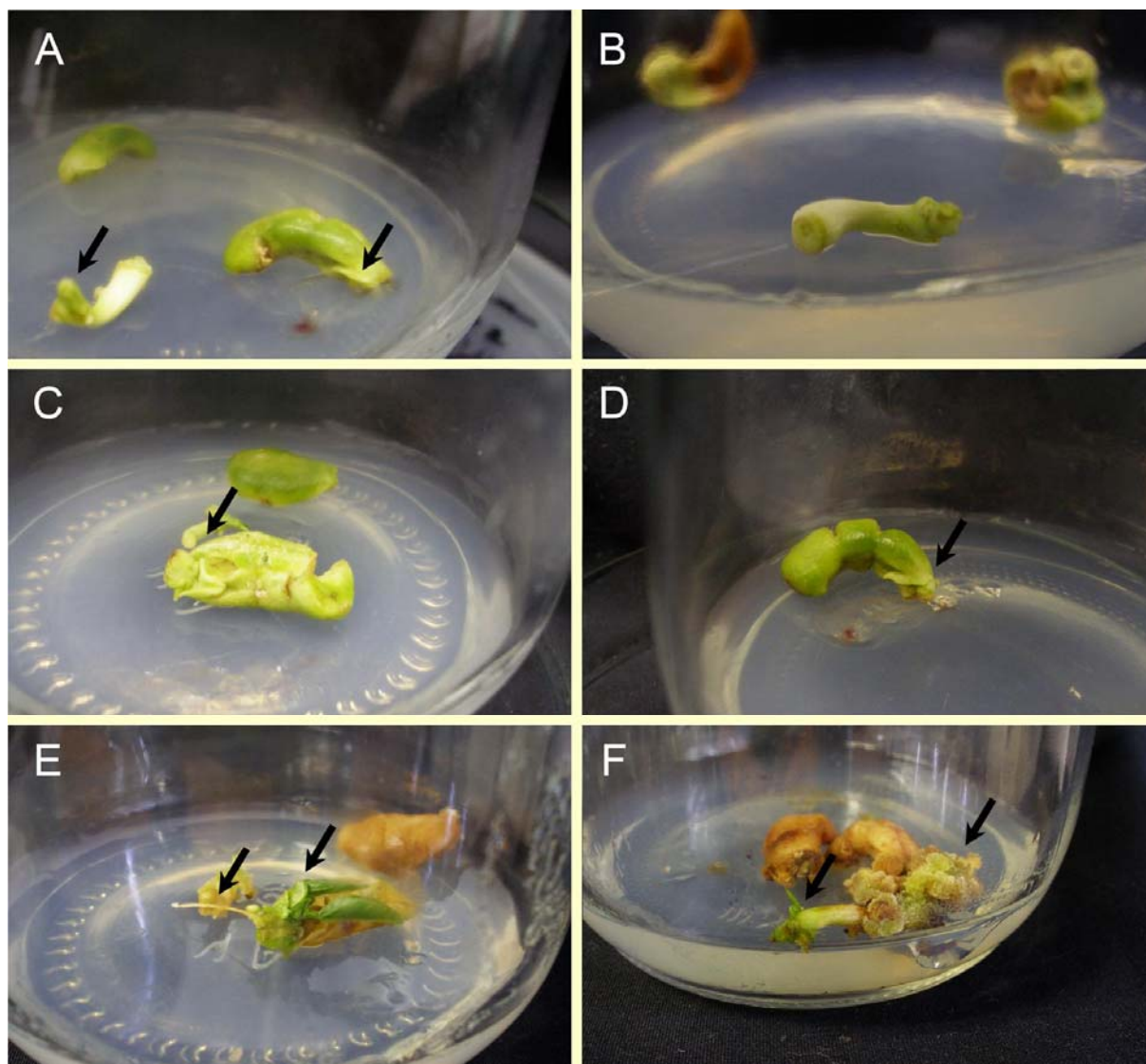


Figura 1. Resposta de ambos os tecidos inoculados em meio de cultura sem salinidade (controle, 0% NaCl). **A.** Tecidos isolados esverdeados indicando início de regeneração (setas). **B.** Eixo embrionário intumescido. **C e D.** Cotilédone mostrando início de formação de calos (setas). **E.** Resposta do mesmo material visto em C quatro semanas após a inoculação, indicando início de regeneração direta de um cotilédone, com formação direta de raízes (setas). **F.** Eixo embrionário, após quatro semanas, apresentando início de regeneração direta e formação de calos em ambos os tecidos (setas).

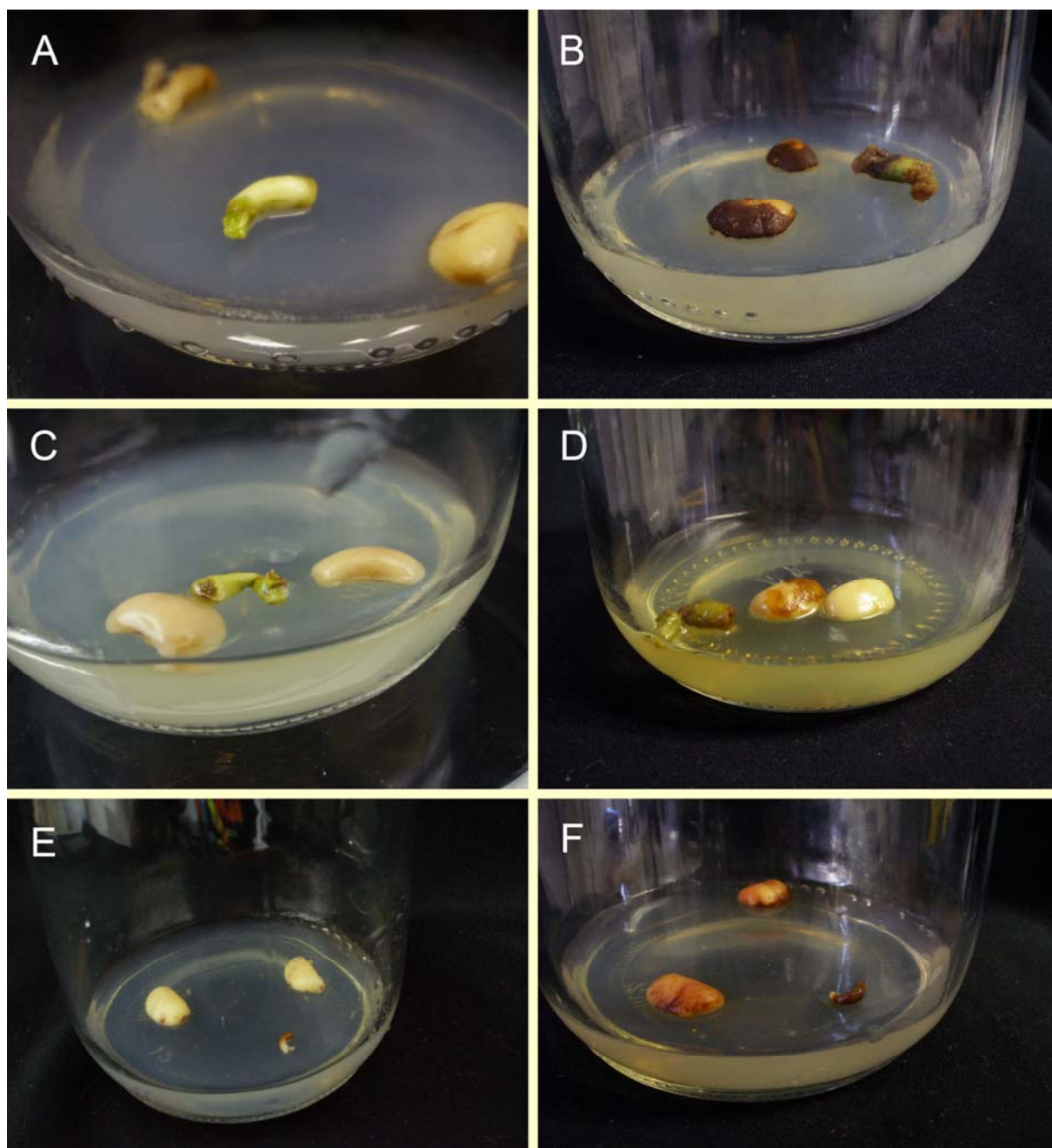


Figura 2. Respostas dos tecidos inoculados nas diferentes doses de NaCl. Observações realizadas na primeira e quarta semanas do experimento. **A.** Tecidos inoculados a 1% de sal, mostrando cotilédone sem reposta e eixo intumescido. **B.** Ainda em 1% de sal, todos os tecidos necrosados após quatro semanas da inoculação. **C.** Em 1,5% de NaCl, cotilédones sem resposta e eixo esverdeado. **D.** Tecidos em início de necrose passadas quatro semanas de inoculação em meio de cultura contendo 1,5% de NaCl. **E.** Ausência de resposta regenerativa em ambos os tecidos em meio de cultura com 2% de sal. **F.** Tecidos necrosados depois de quatro semanas em meio a 2% de sal.

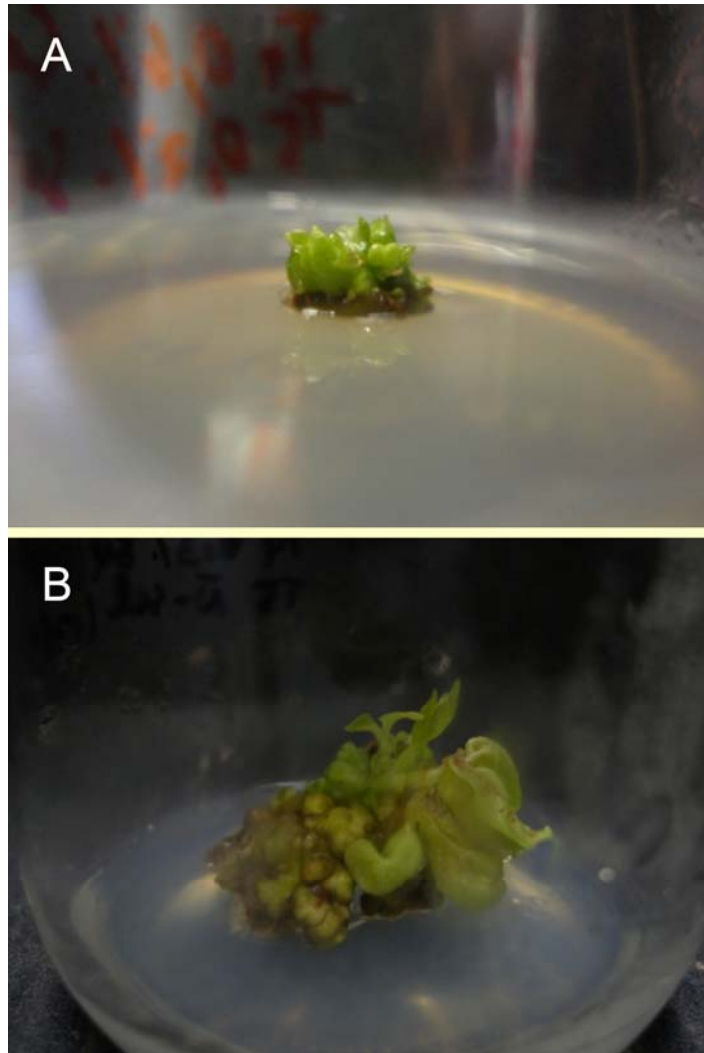
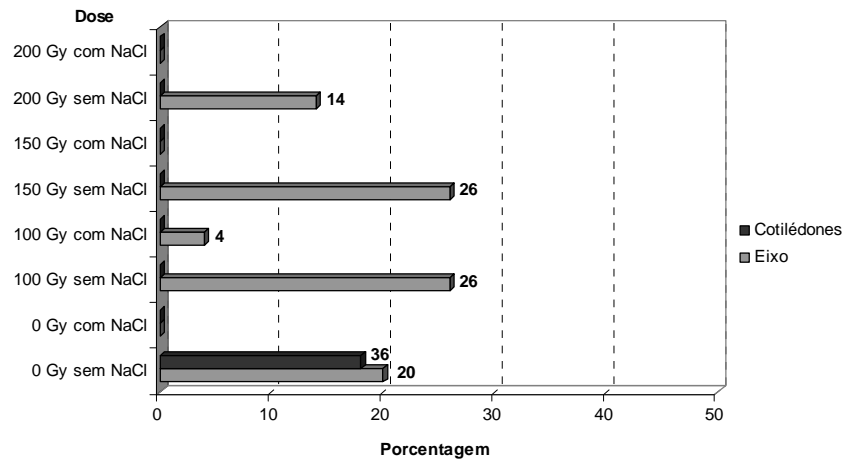
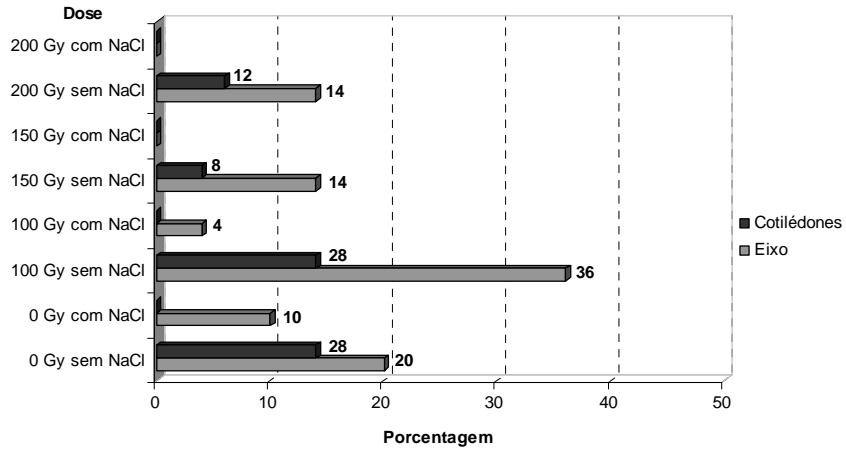


Figura 3. Mutantes-candidatos obtidos. **A.** Possível variante somaclonal. Material não irradiado (0 Gy), inoculado em meio não seletivo e, posteriormente, transferido para meio seletivo. **B.** Possível mutante sólido irradiado a 150 Gy, inoculado em meio não seletivo e, posteriormente, transferido para meio seletivo.

A



B



C

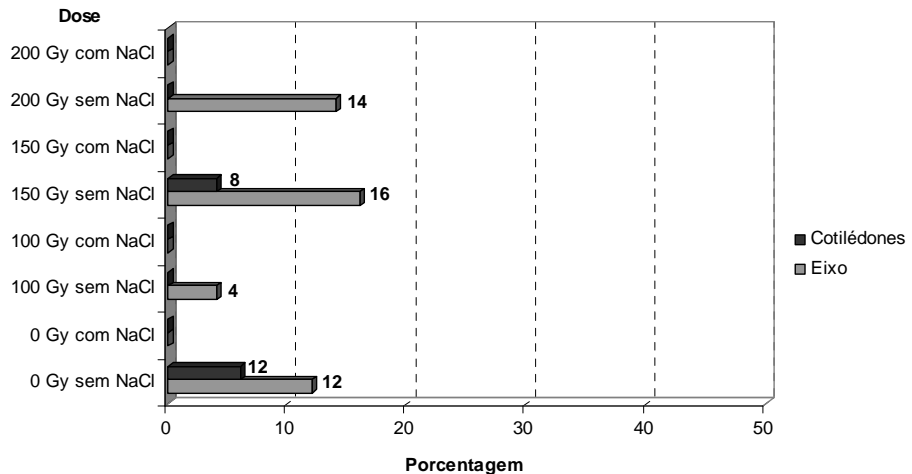


Figura 4. Representação gráfica da porcentagem de explantes regenerados nas diferentes doses de exposição à radiação, bem como na presença ou ausência de NaCl à concentração de 172 mM (ao lado das barras encontram-se os números absolutos dos explantes regenerados). **A.** Resposta à regeneração *in vitro*, em relação à organogênese direta. **B.** Explantes que apresentaram como resposta a organogênese indireta. **C.** Explantes que tiveram como resultado a organogênese direta associada à indireta, concomitantemente.

5. CONCLUSÕES

- A dose de 1% (172 mM) de NaCl mostrou-se como a mais indicada para inibição da regeneração da cultivar.
- A cultivar BR14-Mulato é sensível à salinidade, comparativamente a outras cultivares de *V. unguiculata* anteriormente testadas.
- Considerando-se os resultados obtidos no presente estudo e baseando-se em experimento anterior, considera-se que regeneração *in vitro* sob salinidade também seja genótipo-dependente.
- A radiação gama, nas doses de 100 e 150 Gy, potencializam as respostas regenerativas na cultivar BR14-Mulato.
- Eixos embrionários responderam melhor à indução de mutação *in vitro* que os cotilédones na cultivar BR14-Mulato.

6. ANEXOS

6.1. INSTRUÇÕES PARA AUTORES (*Genetics and Molecular Biology*)

ISSN 1415-4757
Ribeirão Preto, Brasil

Scope and Policy

Genetics and Molecular Biology (formerly named Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics - ISSN 0100-8455) is published by the Sociedade Brasileira de Genética ([Brazilian Society of Genetics](#)). The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines. Although Genetics and Molecular Biology is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society. It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries. Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal, judged by the Editor in conjunction with the Editorial Board, are reviewed by the Associate Editor and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

Submission of papers

1. Manuscripts should be submitted to:

Angela M. Vianna-Morgante, Editor-in-Chief
Genetics and Molecular Biology

By Postal Address:

Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736
14025-670 Ribeirão Preto, SP – Brazil

Or by Electronic Address:

editor@gmb.org.br

2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:

- a) The manuscript that must be submitted by the Corresponding Author, this being the person who will also check the page proofs, and arranges for the payment of color illustrations and author's alteration charges.
- b) An accompanying cover letter stating that the data have not being published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. It must also inform the e-mail addresses of all other authors so that they can be contacted by the Editorial Office for confirmation of the submission. Possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must be disclosed.
- c) An electronic copy of the text, tables and figures, including supplementary material to be published online only. Formats for text are Word or RTF in Windows platform. Images in TIFF or JPEG formats should be sent in

separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.h). Mailed CD-ROMs must be labeled with the first author's last name, platform and software.

- d) Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; formatted to A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

- a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, arranging for the payment of color illustrations and author's alteration charges.
- b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.
- c) **The text** must be as succinct as possible. *Text citations:* articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use *et al.* List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al.* should not be used). *Numbers:* In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. *Binomial Names:* Latin names of

The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) The Acknowledgments must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: references must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by *et al.* Use standard abbreviations for journal titles as suggested by ISI Web of Knowledge or PubMed.

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) Genetics and Origin of Species. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) The Principles of Clinical Cytogenetics. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample electronic article citation:

Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff RD and Van Dyke T (2004) pRb inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia. Plos Biol 2:194-205. <http://www.plosbiology.org>.

- f) Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

Sample Internet resource citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2005) LEM Software, http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm

- g) Tables:** must be inserted at the end of the main text file, each table starting on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers.
- h) Figures** must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a new page that immediately follows the tables. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale resolution yielding 300 dpi, color figures should be at 600 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations can be accepted, but authors may be asked to defray the cost.

Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600-1200 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Scanned figures should not be submitted. Identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure. Color illustration can be accepted, but authors may be asked to defray the cost.

- i) **Nomenclature** should adhere to current international standards.
- j) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.
- k) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.
- l) **Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.
- m) **Supplementary Material:** Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the published version, can be submitted as Supplementary Material. This material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures, they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. For online access, Supplementary material should be in PDF, JPEG or GIFF formats. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement:

Supplementary material - the following online material is available for this article:

- Table S1

.....

This material is available as part of the online article from <http://www.scielo.br/gmb>

3.2 Short Communications

Present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited. They should include an Abstract no longer than five percent of the paper's length and no further subdivision with introduction, material and methods, results and discussion in a single section. Up to two tables and two figures may be submitted. The title page and reference section format is that of full-length article.

3.3 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles

Review Articles are welcome.

3.5 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories

Accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Proofs and Copyright Transfer

Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval. A form of consent to publish and transfer of copyright will have to be signed by the corresponding author, also on behalf of any co-authors.

5. Reprints

Reprints are free of charge and provided as a pdf-file.