OBTENÇÃO DE HÍBRIDO INTERESPECÍFICO DE FEIJÃO (*Phaseolus*) "IN VITRO"

JOSÉ BARBOSA CABRAL

Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro - 1985

À memória de minha filha

MINHA HOMENAGEM

A meus pais,

Antenor e Josefa,

DEDICO.

À minha esposa, Ana Maria, pelo

apoio e incentivo a investigação

científica, aos meus filhos Yuri

e Raquel pelo carinho,

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

- . Ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo, pela orientação, amizade, estímulo e apoio constantes.
- . Ao Pesquisador, Paulo Miranda, pelos ensinamentos, amizade e incentivo para a realização deste trabalho.
- . Ao Prof. Rivaldo Chagas Mafra, pelos ensinamentos, amizade e incentivo ao conhecimento das limitações agrícolas da região Semi-Árida do Nordeste brasileiro.
- . À Direção da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA, pela liberação e apoio.
- . À Direção do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA, pela possibilidade da realização deste trabalho, nas instalações dessa Instituição.
- . À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA, pelo apoio durante a realização deste curso.
- . À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ - USP, em especial à Coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, pela oportunidade na realização deste curso.
- . À Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

- . Ao Técnico da Seção de Bioquímica de Plantas do CENA, Ênio Tiago de Oliveira, pela inestimável colaboração.
- . Ao Pesquisador e colega de Pós-Graduação, Irajá Ferreira Antunes, pelas sugestões e concessão de algumas cultivares utilizadas neste trabalho.
- . À Pesquisadora, Dra. Tara Mohan, pelo incentivo na realização deste trabalho.
- . À Profª Dra. Aline P. Kleiner do Departamento de Genética da ESALQ, pela colaboração.
- . Ao Pesquisador e colega de Pós-Graduação, Hermes Alves de Almeida, pelas sugestões, amizade e incentivo a pesquisa.
- . Ao Prof., Waldir Mantovani do Departamento de Botânica da ESALQ, pelas sugestões.
- . Ao Pesquisador da Seção de Fertilidade do Solo do CENA, Dr. Takashi Muraoka, pela colaboração.
- . Aos técnicos da Seção de Fertilidade do Solo do CENA, João Odemir Salvador e Darci Bortoleto, pela colaboração.
- . Aos colegas de Pós-Graduação, Clodoaldo J.A. Filho, Carlos A. Ventura, José Ubirajara G. Fontoura, Leonardo A. Carneiro, Eloy A. Pauletto, Marina Y. Murayama, Helaine Carrer, Gothardo Marcon e Otávio M. Matsumoto, pelo incentivo.

.v.

- . À todos os colegas de trabalho do IPA, em especial ao Fernando Jacques, Edvaldo C. de Araujo, Maria Cristina L. da Silva Portela e ao Dr. Clovis Silva Fernandes, que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trbalho.
- . À SONAR - Serviços de Datilografia S/C. Ltda. pelos serviços de datilografia e impressão.

ÍNDICE

	<u>página</u>
RESUMO	vii
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. A importância do feijão (<i>Phaseolus</i> spp)	3
2.2. Cruzamentos interespecíficos	6
2.3. Cultura <i>in vitro</i>	17
2.4. Caracterização da hibridez	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Material vegetal	23
3.2. Cruzamentos interespecíficos	24
3.2.1. Multiplicação de sementes em campo ..	24
3.2.2. Condução das plantas	25
3.2.3. Polinizações	28
3.3. Cultivo <i>in vitro</i>	30
3.3.1. Protocolo	30
3.3.2. Explantes	30
3.3.3. Meios de cultura	30
3.3.4. Inoculação de explantes	33
3.3.5. Transplante das plântulas híbridas pa ra vasos	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5. CONCLUSÃO	54
6. LITERATURA CITADA	55

OBTENÇÃO DE HÍBRIDO INTERESPECÍFICO DE FEIJÃO
(*Phaseolus*) "IN VITRO"

Autor: JOSE BARBOSA CABRAL

Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

RESUMO

Sendo a região Semi-Árida do Nordeste brasileiro atingida pela adversidade nas condições climáticas, principalmente na distribuição de chuvas, tornam-se necessários esforços para se obter genótipos tolerantes ao estresse hídrico, a sais e altas temperaturas. A cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) tem sua importância alimentar e econômica nessa região, embora seu cultivo seja limitado, principalmente pela adversidade do clima. Outras espécies cultivadas na região e em outras regiões Semi-Áridas (dos Estados Unidos da América do Norte e do México), como a fava (*Phaseolus lunatus* L.) e o feijão-tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray), podem ser utilizadas como fonte de resistência às tais condições climáticas, através da hibridação interespecífica. A fertilização entre *P. vulgaris* (♀) x *P. acutifolius* (♂) e *P. vulgaris* (♀) x *P. lunatus* (♂) pode ser

induzida através da hibridação artificial, porém, devido à incompatibilidade existente entre as necessidades nutritivas do embrião híbrido e o endosperma; o embrião aborta e a vagem formada cai. Esses cruzamentos podem ser viabilizados com auxílio da cultura *in vitro*.

Dentre as cultivares da espécie *P. vulgaris* utilizadas neste trabalho destacam-se Gordo, Goiano Precoce, Carioca Precoce e California pela obtenção de embriões híbridos. Com relação a espécie *P. lunatus*, destacam-se a cultivar G-25143 e a linha da geração F_2 , esta última tanto pela obtenção de embriões híbridos como pela diferenciação de um destes embriões levando à regeneração de planta híbrida intacta. Entre as cultivares da espécie *P. acutifolius* destacam-se G-40035 e G-40002 como boa fonte de pólen. O maior número de embriões híbridos foi obtido com a cultivar G-40035, embora ambas possibilitassem a regeneração de plantas híbridas intactas.

Não se observou aumento de fertilidade quando do uso da solução nutritiva de White antes das polinizações.

Muitos embriões híbridos proveniente de cruzamentos entre as espécies *P. vulgaris* (♀) x *P. acutifolius* (♂) atingiram estágio de desenvolvimento cotiledonar (cotiledones assimétricos) sem que a semente chegasse à maturidade. Por outro lado, os embriões advindos de cruzamentos entre *P.*

vulgaris (♀) x *P. lunatus* (♂) apresentaram menor desenvolvimento, tiveram um maior índice de anormalidade e não atingiram o estágio de desenvolvimento cotiledonar. Para o cultivo dos embriões *in vitro* foram utilizados dois meios de cultura: o meio de cultura de MOK *et alii* (1978), tomado como referência, e outro estabelecido no presente trabalho. Neste último meio foram inoculados 44 embriões híbridos, dos quais, 8 se diferenciaram levando à formação de plantas. Esses embriões provenientes de cruzamentos entre as cultivares Carioca Precoce (♀) x G-40035 (♂), California (♀) x G-40002 (♂), California (♀) x G-40035 (♂), Goiano Precoce (♀) x Linha F₂ (♂) e Gordo (♀) x G-40002 (♂). Destes, apenas 3 formaram plântulas intactas e resultaram dos cruzamentos entre Carioca Precoce (♀) x G-40035 (♂), Goiano Precoce (♀) x Linha F₂ (♂) e Gordo (♀) x G-40002 (♂). Os demais tiveram mal formação de plântulas e não sobreviveram ao transplante para o substrato sólido. Das 3 plântulas intactas, 2 foram transplantadas para o substrato sólido, advindas dos cruzamentos Carioca Precoce (♀) x G-40035 (♂) e Goiano Precoce (♀) x Linha F₂ (♂), tiveram a formação de novas folhas durante a fase de aclimação mas o substrato não foi adequado ao desenvolvimento subsequente. A outra plântula proveniente do cruzamento entre as cultivares Gordo (♀) x G-40002 (♂) foi transplantada para solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950) diluída a 50% com aeração, e atingiu a maturidade. Essa planta foi estéril.

"IN VITRO" RESCUE OF INTERSPECIFIC HYBRIDS OF *Phaseolus*

Author: JOSE BARBOSA CABRAL

Adviser: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

SUMMARY

In the Semi-Arid region of the Brazilian Northeast, precipitations are not common and sometimes they take place on very short periods, and this contributes to the variability in crop production. For this reason, efforts should be made to obtain genotypes adapted to water stress, high temperature, salinity and resistance to diseases. Common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) play an important economic role as staple food for that region besides the fact that its production is limited due to the adverse climate conditions. Other bean species being cultivated in the Brazilian Northeast Semi-Arid regions (United States of America and Mexico), such as lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) can be utilized as a source of resistance to the above mentioned climatic conditions in interspecific hybridizations. Crossing between *P. vulgaris* (♀) × *P. acutifolius* (♂) and *P. vulgaris* (♀) × *P. lunatus* (♂) can occur, but due to incompatibility between the nutritional needs of the hybrid

embryo and the endosperm, the embryo aborts and the pod drops. Such condition can be overcome by *in vitro* culture of rescued immature embryos.

Among the *P. vulgaris* cultivars the best ones to produce hybrid embryos were cvs. Gordo, Goiano Precoce, Carioca Precoce and California. Concerning *P. lunatus*, the cultivar G-25143 and the line F₂ were the best; from line F₂ was also obtained an intact hybrid plant. The best cultivars of *P. acutifolius* were G-40035 and G-40002 as good pollen sources. Cultivar G-40035 gave the highest number of hybrid embryos; both cultivars produced intact hybrid plants.

No enhancement of fertility has been observed using White solution before pollination.

Many of the hybrid embryos from the crosses *P. vulgaris* (♀) × *P. acutifolius* (♂) were malformed with one cotyledon much smaller than the other, and the seed failed to mature. On the other hand, hybrid embryos from *P. vulgaris* (♀) × *P. lunatus* (♂) were less developed, with abnormal appearance, not having reached the stage of cotyledon development.

Hybrid embryos were cultured *in vitro* using two culture media: MOK *et alii* (1978) medium, as reference, and the one developed in the present work. In the latter 44 hybrid embryos were inoculated, out of which eight

differentiated and regenerated plants. These embryos came from the following crosses: Carioca Precoce (♀) x G-40035 (♂), California (♀) x G-40002 (♂), California (♀) x G-40035 (♂), Goiano Precoce (♀) x Linha F₂ (♂) and Gordo (♀) x G-40002 (♂).

From these, only 3 embryos regenerated intact plants were from the following crosses: Carioca Precoce (♀) x G-40035 (♂), Goiano Precoce (♀) x Linha F₂ (♂) and Gordo (♀) x G-40002 (♂).

The plants regenerated from the other embryos were not normal and did not survive when transplanted to solid substract.

From three intact plants of the crosses: two were transplanted to solid substract.

These plants developed new leaves during the adaptation phase, but there was no further development due to the nature of the used substrate. Another regenerate plant, from the cross Gordo (♀) x G-40002 (♂), was transplanted to HOAGLAND & ARNON (1950) nutrient solution, diluted to 50%, with continuous aeration and reached maturity. However, this plant was sterile.

1. INTRODUÇÃO

A região Semi-Árida do Nordeste do Brasil é atingida pela adversidade nas condições climáticas, principalmente pela irregularidade na distribuição na precipitação pluvial, solos de baixa profundidade efetiva e baixa capacidade de retenção de umidade. Por isto, tornam-se necessários esforços para se desenvolver tecnologia para cultura agrícola de valor alimentar e econômico a fim de obter genótipos tolerantes às condições climáticas adversas. Entre estas, está a cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) sensível ao estresse hídrico, a sais e altas temperaturas. Nessa região, o cultivo de outras espécies entre os pequenos agricultores é notório. A fava (*Phaseolus lunatus* L.) é um exemplo; além da maior tolerância às condições adversas, representa uma importante fonte de proteína e de renda. Entre outras espécies de feijão (*Phaseolus*), como o feijão-tepari

(*Phaseolus acutifolius* A. Gray) originário de regiões Semi-Áridas dos Estados Unidos da América do Norte e do México, apesar de não ser cultivada no Nordeste é uma importante fonte de tolerância às condições acima referidas.

A utilização destas espécies (*P. lunatus* e *P. acutifolius*) como fonte de tolerância a tais condições para a espécie *P. vulgaris*, só é possível através da hibridação interespecífica. Essa hibridação em feijão (*Phaseolus*) já despertava interesse desde o século passado, porém, a sua maior limitação, ainda hoje, está na obtenção de plantas entre algumas espécies devido ao abortamento do embrião em torno de 20 dias após a polinização. A vagem formada cai. O problema pode ser contornado através da técnica biotecnológica da cultura de embrião *in vitro*. Sob condições assépticas, destacam-se embriões de sementes híbridas e inoculam-se em meios de cultura contendo sais minerais, açúcar, vitaminas e aminoácidos para obtenção de plantas intactas, férteis ou não, dependendo das interações genotípicas entre os progenitores nas hibridações interespecíficas.

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de plantas híbridas de feijão entre as espécies *P. vulgaris* x *P. acutifolius* e *P. vulgaris* x *P. lunatus* através da inoculação de embriões híbridos em meio de cultura após a hibridação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A importância do feijão (*Phaseolus* spp.)

Aproximadamente 180 espécies do gênero *Phaseolus* podem ser encontradas nas regiões quentes de ambos hemisférios, com predominância nas Américas (BURKART, 1952; VIEIRA, 1967). As espécies cultivadas têm duas origens diferentes: América e Ásia e as características morfológicas são de acordo com as origens. As espécies cultivadas na Ásia são: *Phaseolus acutifolius* Jacq., *P. calcaratus* Roxb., *P. angularis* (Wild) Wight., *P. mungo* L., *P. aureus* (*P. radiata* L.). As espécies cultivadas na América são: *P. coccineus* L., *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. acutifolius* A. Gray var. *latifolius* Freem., *P. speciosus* HBK., *P. candidus* Vell., *P. caracalla* L.. As três últimas são espécies ornamentais e as outras alimentares e/ou forrageiras.

Segundo Verdcourt (1970) citado por GUNN (1973), as espécies *P. aconitifolius* Jacq., *P. calcaratus* Roxb., *P. angularis* (Wild) W.F. Wight, *P. mungo* L., *P. radiata* var. *radiata* e *P. caracalla* L. foram transferidas para o gênero *Vigna* anteriormente referidas como do gênero *Phaseolus*. Ainda segundo Verdcourt (1970), *V. radiata* var. *radiata* e *V. mungo* são uma só espécie.

NABHAN e FELGER (1978) mencionaram que na população de feijão-tepari selvagem existem duas variedades botânicas: *P. acutifolius* var. *tenuifolius* A. Gray, caracterizada por possuir folhas lanceoladas e *P. acutifolius* var. *latifolius* Freeman, com folhas mais largas e ligeiramente ovadas que originaram os tipos domésticos. O feijão-tepari doméstico é classificado como *P. acutifolius* var. *latifolius* Freeman. O tipo doméstico difere do selvagem principalmente em relação às características da semente.

O feijão é uma importante fonte de proteína (CROCOMO *et alii*, 1976) e nesse particular, como faz parte da dieta básica do povo brasileiro, pode suprir parcialmente as suas necessidades proteicas.

A região Semi-Árida do Nordeste brasileiro apresenta limitações ao cultivo de culturas agrícolas sensíveis ao estresse hídrico. Essa situação é devido principalmente à má distribuição das chuvas, levando a uma maior concentração em curtos períodos, o que contribui muito para a

instabilidade na produção agrícola. Além disso, deve-se somar a elevada evaporação dos rios, açudes, da própria vegetação e do solo. Há nessa região algumas limitações de ordem pedológica, em termos principalmente de características físicas da maioria dos seus solos, quais sejam, pouca profundidade efetiva, presença na superfície de material de origem em certos tipos de solos, acrescidas de mudanças texturais em seus horizontes. Essas condições, determinam restrições para acúmulo de água e bom desenvolvimento dos sistemas radiculares das plantas (MAFRA, 1981).

Essa situação faz com que se deva conhecer as condições climáticas, a disponibilidade de água e a seleção de genótipos de feijão (*Phaseolus* spp) que se mostrem resistentes, ou pelo menos tolerantes ao estresse hídrico, a altas temperaturas, a saiz, combinado à resistência a doenças. As espécies *P. acutifolius* e *P. lunatus* tem sua importância como fonte de tolerância ao estresse hídrico e temperaturas elevadas (CROCOMO e CABRAL, 1985). A espécie *P. acutifolius* tem sido relatada como fonte de resistência a tais condições climáticas (COYNE, 1964; VIEIRA, 1967; NABHAN e FELGER, 1978; THOMAS e WAINES, 1980; THOMAS, 1983; THOMAS *et alii*, 1983; THOMAS e WAINES, 1984). Assim, genótipos adaptados as condições de clima adverso acompanhado do manuseio adequado da cultura, podem determinar aumento da produtividade, melhoria alimentar e maior renda familiar da população rural dessa região.

2.2. Cruzamentos interespecíficos

MENDEL (1866) foi o primeiro a relatar a hibridação interespecífica no gênero *Phaseolus*. Ele também descreveu o híbrido *P. vulgaris* (♀) × *P. coccineus* (♂) e a segregação na geração F₂. Híbridos espontâneos entre essas duas espécies também foram observados por TSCHERMARK-SEYSENEGG (1942). Esses cruzamentos foram estudados com detalhes por LAMPRECHT (1941, 1948a, b).

Os cruzamentos interespecíficos são valiosos instrumentos na tecnologia de melhoramento de plantas (VIEIRA, 1967). Eles podem ser utilizados para transferir caracteres genéticos desejáveis de uma espécie nativa para uma espécie comercial. Assim, o cruzamento interespecífico entre *Phaseolus acutifolius* e *P. coccineus* e de ambos com *P. vulgaris*, permitirá ao melhorista combinar resistência à seca com resistência a doenças, sejam devido a bactérias, fungos ou vírus (COYNE, 1964). *P. coccineus* pode ser utilizado para transferir resistências aos vírus do mosaico comum do feijoeiro ou do mosaico amarelo do feijoeiro, juntamente com tolerância a baixas temperaturas (HUBBELING, 1957). Esses cruzamentos permitirão o estabelecimento de um novo banco de germoplasma de feijão.

Na região Semi-Árida do Nordeste brasileiro, tem-se constatado que algumas cultivares da espécie *Phaseo-*

lus vulgaris são sensíveis às condições de estresse híbrido (MAGALHÃES e MILLAR, 1978; MIRANDA *et alii*, 1982, 1983). Por outro lado, a espécie *P. lunatus* é naturalmente adaptada ao regime de baixa disponibilidade de água; entre os agricultores da região é muito comum o seu cultivo e o seu consumo. Dessa forma, destaca-se o potencial que representa essa espécie para a exploração através da hibridação interespecífica visando a transferência do caráter de resistência ao estresse híbrido para as cultivares comerciais da espécie *P. vulgaris* cultivadas na região.

THOMAS e WAINES (1980), THOMAS (1983), THOMAS *et alii* (1983) e THOMAS e WAINE (1984) destacam a importância da espécie *P. acutifolius* em hibridação interespecífica com *P. vulgaris*, como fonte de tolerância ao estresse híbrido e a altas temperaturas. Essa espécie apesar de não ser cultivada na região Semi-Árida do Nordeste do Brasil, como a espécie *P. lunatus*, é originária de regiões Semi-Áridas do Sudoeste dos Estados Unidos da América do Norte e do Oeste do México (NABHAN e FELGER, 1978). THOMAS *et alii* (1983) mencionam *P. acutifolius* como fonte de tolerância a altas concentrações de boro. Marcarian (1981), citado por THOMAS *et alii* (1983), ressalta a espécie *P. acutifolius* como tolerante a concentrações elevadas de sais.

Os cruzamentos interespecíficos podem permitir, como enfatizado acima, a transferência de caracteres de

sejáveis. Entretanto, como regra geral, não se tem obtido muito sucesso com esses cruzamentos e de um modo especial, com espécies de feijão.

As plantas dos híbridos inviáveis possuem sementes que não germinam em condições normais, levando como consequência ao aborto do embrião. Em tais cruzamentos a fertilização ocorre e de início o embrião desenvolve-se relativamente bem. Entretanto, subsequentemente uma série de irregularidades fisiológicas se estabelecem e eventualmente o embrião morre e a semente aborta (RAGHAVAN, 1977).

É bem conhecido o fato de que o embrião de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em vários estádios de desenvolvimento pode ser retirado do tecido maternal e cultivado *in vitro*, em condições assépticas, dando nascimento a plantas intactas e férteis (CROCOMO *et alii*, 1979). Os fatores que influenciam a nutrição, o crescimento e a diferenciação do embrião *in vitro* são vários e devem ser bem conhecidos se a técnica for utilizada para cultivá-lo fora do meio natural que é o óvulo (CROCOMO e CABRAL, 1985).

LORZ (1952), estudando cruzamento entre *P. polystachys* x *P. lunatus*, após várias tentativas sem êxito, obteve, através do cruzamento recíproco, 7 plantas híbridas F₁, constatando serem todas genuinamente híbridos, embora nenhuma produziu flores e sementes. Por outro lado, todos os

híbridos expressaram completamente ou quase a germinação hipógea, hábito da espécie selvagem de elevada importância para ser transmitida à espécie *lunatus*, pelo alto índice de mortalidade em plantas jovens atribuído à quebra do hipocótilo após o esforço para a saída dos cotilédones do solo. Essas espécies selvagens, além de representarem resistência a doenças e pragas, apresentam outros atributos fisiológicos de elevado valor.

HONMA e HEECKT (1959) realizaram numerosos cruzamentos utilizando a heterozigose dos pais, entre *P. vulgaris* x *P. lunatus*, que possibilitaram a obtenção de 10 plantas híbridas. Das plantas obtidas, 8 foram similar ao *P. vulgaris* e as outras não se assimilaram aos pais e apareceram com folhas inclinadas. As últimas duas foram estéreis. A fertilidade das outras plantas foram abaixo do normal. O retrocruzamento em ambos os pais foram realizados com pouca dificuldade. A segregação do tipo de folha, de vagem foi notada na F_2 e F_3 . A variação de caracteres sugeriu uma herança quantitativa.

WALL e YORK (1960) utilizaram a heterozigose dos pais em cruzamentos interespecíficos, *P. vulgaris* x *P. coccíneus*. Da espécie *P. vulgaris* foram utilizadas 3 linhas: a progênie de 6 combinações entre as linhas, com exceção de 1, e 1 cultivar da espécie *P. coccíneus*, perfazendo um total de 8 combinações usando a espécie *P. coccíneus* como macho.

Os seus resultados demonstraram que o número de sementes variou amplamente de 0,5 a 2,6 sementes por polinização entre as combinações utilizadas. Observaram também que na produção de sementes da geração F_1 entre as combinações realizadas, principalmente com as linhas puras, houve diferença significativa entre as mesmas a nível de 0,01%, havendo também diferença entre as linhas com as demais combinações, o que não foi observado nas gerações F_2 e F_3 . Na geração F_1 de todas as combinações, também foi constatada a presença de plantas anãs e estéreis, sendo que a frequência dessas plantas variou entre as combinações, havendo uma frequência de 3% em uma e de 34,5% em outra.

Trabalhos de HONMA (1956) e AL-YASIRI e COYNE (1964) mostraram que reguladores de crescimento influenciam o desenvolvimento de vagens e o abortamento de híbridos interespecíficos entre *P. vulgaris* x *P. acutifolius*. AL-YASIRI e COYNE (1964) usaram os reguladores de crescimento naftaleno acetamida e giberelato de potássio nos seguintes tratamentos: 1. lanolina + 1% de naftaleno acetamida; 2. lanolina + 2% de giberelato de potássio; 3. lanolina + 1% de naftaleno acetamida + 2% giberelato de potássio; 4. controle (lanolina). A mistura, sob forma de pasta, foi aplicada na base da flor após a polinização, seguindo-se nas 3 aplicações sucessivas, em intervalos de 5 dias. Duas semanas mais tarde foi observado aumento do tamanho da vagem em resposta à aplica-

ção dos reguladores de crescimento. O melhor resultado foi conseguido com a mistura de naftaleno acetamida + giberelato de potássio. A época em que houve maior crescimento das vagens em todos os tratamentos foi no período de 15 a 20 dias após a polinização, muito mais intenso do que no tratamento controle. O tratamento constituído por naftaleno ou quando misturado com giberelato determinou um retardamento na queda da vagem. As sementes coletadas das vagens remanescentes apresentavam pequenos embriões e tegumento. Os embriões obtidos foram inoculados em meio de cultura.

AL-YASIRI e COYNE (1966), estudando sete espécies de *Phaseolus* (*P. calcaratus*, *P. mungo*, *P. angularis*, *P. lunatus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius* e *P. vulgaris*) realizaram polinizações em todas as combinações possíveis, e, utilizando critério de avaliação em função do desenvolvimento das vagens, classificaram os cruzamentos interespecíficos entre as espécies, citadas em três tipos:

1. O cruzamento é compatível quando o híbrido produz sementes maduras;
2. O cruzamento é parcialmente compatível quando ocorre a formação de vagens e as mesmas são abortadas no início do desenvolvimento;
3. O cruzamento é incompatível quando não chega a desenvolver vagens.

Os autores encontraram entre os cruzamentos realizados os seguintes resultados: o cruzamento foi compatível entre as espécies *P. vulgaris* x *P. coccineus*; parcialmente compatível entre *P. vulgaris* x *P. acutifolius*, *P. acutifolius* x *P. coccineus*, *P. coccineus* x *P. acutifolius*, *P. vulgaris* x *P. mungo*, *P. mungo* x *P. calcaratus*, *P. vulgaris* x *P. lunatus*, *P. angularis* x *P. acutifolius*, *P. angularis* x *P. vulgaris*, *P. mungo* x *P. vulgaris*, *P. angularis* x *P. calcaratus*, *P. vulgaris* x *P. calcaratus*, *P. angularis* x *P. mungo* e as outras combinações foram incompatíveis. Os autores relacionaram o número de dias entre a polinização e a queda das vagens nos cruzamentos realizados. Admitiram que o sucesso em cruzamentos interespecíficos parece depender das variedades ou linhas utilizadas como pais, heterozigose dos pais, o ambiente e o tempo de polinização.

A incompatibilidade natural entre certas cultivares de *P. vulgaris* e *P. coccineus* pode ser relatada pelo desenvolvimento anormal das plantas (KEDAR e BEMIS, 1960). *P. coccineus* cv. "scarlet runner" é caracterizada pelo tipo de germinação hipógea; é completamente autopolinizada (ou quase) e representa uma fonte de resistência a doenças. Por outro lado, *P. vulgaris* cv. "blue lake", apresenta germinação epígea e é autofecundada. Ambas espécies têm o mesmo número de cromossomos ($2n = 22$). As duas espécies podem sofrer polinização cruzada e a barreira interespecífica entre essas duas cultivares foi observada. Os cruzamentos entre

essas cultivares produziram uma população uniforme de plantas anormais que foram designadas como "B-dwarfs" e "T-dwarfs". A recombinação genética, a F_1 de *P. vulgaris* quando cruzada com *P. coccineus* chegou a produzir uma população a qual segregou em 4 classes iguais: "B-dwarfs", "T-dwarfs", "Bt-dwarfs" e "normal". Em outro trabalho, BEMIS e KEDAR (1961) discutiram a herdabilidade do desenvolvimento de plantas anormais. Os resultados desse trabalho mostram a possibilidade de aumentar a viabilidade dos cruzamentos interespecíficos com essas espécies quando se utilizam progenies de *P. vulgaris* como um dos progenitores nos cruzamentos intraespecíficos.

IBRAHIM e COYNE (1975) constataram que o *P. coccineus* é de polinização cruzada devido aos estigmas "estrorse", aos pelos ao redor dos estigmas e descência do próprio pólen nos pelos estilares abaixo dos estigmas. Uma maneira indireta de aumentar a fertilização em alguns cruzamentos é superar tais obstáculos que diminuem o crescimento do tubo polínico. A aplicação da solução nutritiva de White na superfície do estigma de *P. coccineus* antes da polinização com pólen de *P. vulgaris* superou o obstáculo à fertilização e ocorreu o desenvolvimento precoce da semente. Isto sugere que a deficiência de nutrientes no pólen diminui o crescimento do tubo polínico, reduzindo então a fertilização. O aborto do embrião em feijão é considerado ser devido à distúrbios na nutrição do mesmo. A aplicação de solução nutritiva

de White resultou na fertilização e desenvolvimento precoce do embrião, mas ela não previniu o aborto depois de 3 semanas. Isto sugere que substâncias inibidoras translocadas das folhas de *P. coccíneus* para as vagens podem também ter causado o aborto tardio do embrião.

Segundo MOHAN (1982), realizando cruzamentos entre as cultivares "Carioca e Iguaçu" (*P. vulgaris*) com *P. coccíneus*, a primeira geração (F_1) deste híbrido apresentou baixa fertilidade (30-35%). Foram efetuados retrocruzamentos com as cultivares comerciais de *P. vulgaris* e algumas progênies apresentaram resistência à cretamento bacteriano comum (inoculação artificial) e virose que ocorrem no campo. Além disso os híbridos apresentaram ampla variabilidade para as diversas características morfológicas: comprimento e número de nós, rácimo, germinação hipógea ou epígea com posição dos cotilédones variável em relação à superfície do solo, tamanho das folhas, ramificação, arquitetura da planta, etc.

Foram realizados cruzamentos entre as cvs. *P. vulgaris* "Carioca" e "Porriillo Sintético" com a cultivar *P. acutifolius* (G0-1222), visando a transferência de genes de resistência a cretamento bacteriano comum do *P. acutifolius* para as cultivares da espécie *P. vulgaris*. Nestes cruzamentos ocorrem a formação de vagens, estas caíram 2 semanas após a polinização. Também foi realizado o cruzamento *P. vulgaris* x *P. lunatus* e não foi obtido sucesso. Segundo o refe

rido autor, visando contornar o problema do abortamento, será utilizado nesse programa de pesquisa a técnica *in vitro* de cultura de embrião.

RABAKOARIHANTA *et alii* (1979), estudando a fertilidade, o desenvolvimento de embrião e do endosperma de híbridos provenientes de cruzamentos interespecíficos entre *P. vulgaris* x *P. acutifolius*, *P. vulgaris* x *P. lunatus* e nos respectivos cruzamentos recíprocos, observaram que quanto ao número e ao comprimento do tubo polínico não houve diferença entre autofecundação e nos cruzamentos interespecíficos. A grande diferença encontrada nos cruzamentos recíprocos foi com relação ao tempo do início da divisão do endosperma e do embrião em relação à fertilização. Quando *P. vulgaris* foi utilizado como fêmea e *P. acutifolius* como macho, a divisão do endosperma ocorria ao mesmo tempo que na autofecundação em *P. vulgaris*. Nos cruzamentos entre *P. vulgaris* x *P. lunatus*, o tempo da divisão do endosperma foi intermediário quando comparado com os pais. Nos cruzamentos entre *P. acutifolius* x *P. vulgaris*, a diferença do tempo entre a fertilização, a divisão do endosperma e do embrião foi maior do que na autofecundação dos pais. Em *P. lunatus* x *P. vulgaris*, o intervalo entre a fertilização e a divisão do endosperma é muito grande, só ocorrendo após 72 horas da polinização. O severo atraso na divisão do embrião e do endosperma, segundo esses autores, pode ser a causa principal da queda precoce das vagens provenientes de cruzamentos entre *P. lunatus* x *P.*

vulgaris.

Cruzamentos interespecíficos entre as espécies *P. vulgaris*, *P. acutifolius* e *P. lunatus* também foram realizados por SMARTT (1970). Esses cruzamentos indicaram existir uma estreita relação gênica entre *P. vulgaris* e *P. coccineus*, um pouco menos com *P. acutifolius*, e que *P. lunatus* é separada geneticamente das demais espécies. Híbridos viáveis com fertilidade variável podem ser obtidos reciprocamente entre *P. vulgaris* e *P. coccineus*.

Os resultados de SMARTT (1970) são comparáveis aos encontrados por KLOZ *et alii* (1966) em estudos taxonômicos com *P. vulgaris*, *P. acutifolius* e *P. lunatus* através de testes sorológicos. Antígeno contra a fração proteica de sementes de *P. vulgaris* foi obtido com *P. coccineus*; essa reação foi menos intensa com *P. acutifolius* e mais fraca com *P. lunatus*. Essas afinidades corroboram o comportamento das hibridações interespecíficas entre essas espécies.

Os resultados de SMARTT (1970) têm como suporte as conclusões de LAMPRECHT (1941, 1948a, b, 1966) em relação a influência citoplasmática na segregação entre híbridos interespecíficos. A influência citoplasmática afeta a fertilidade e a viabilidade na geração F_2 e as progenies dos retrocruzamentos dos híbridos de *P. vulgaris* (♀) × *P. coccineus* (♂). Igualmente tem efeito na viabilidade em *P. vulgaris* (♀) × *P. acutifolius* (♂). Nos híbridos ligeiramente férteis en-

tre *P. vulgaris* (♀) × *P. coccineus* (♂) as deformações na segregação na geração F_2 foram devidos a perda diferencial de genes na esporogênese do *P. coccineus* e no plasmon do *P. vulgaris* durante a embriogênese.

2.3. Cultura *in vitro*

Os fatores que governam as modificações do processo normal de desenvolvimento do óvulo levando ao aborto do embrião são discutidos por RAGHAVAN (1977). Esses fatores incluem:

1. **O desenvolvimento do embrião** - Nos estádios iniciais da formação do embrião ocorreriam anomalias; a sobrevivência é geralmente irregular. Os híbridos pouco desenvolvidos estão cercados por um grupo de células necrosadas as vezes altamente vacuoladas; como resultado, tem-se sementes abortadas, murchas.
2. **Desenvolvimento do endosperma** - O embrião mostra dependência nutritiva das reservas do endosperma; insucesso do cruzamento começa com a desintegração do endosperma após a fertilização, o embrião fica desprovido de fonte alimentar para o seu desenvolvimento normal. As causas da má-formação do endosperma são várias e não serão discutidas.

Esses problemas podem ser superados através do cultivo *in vitro* de embrião. Utilizando essa técnica, HONMA (1955) conseguiu "salvar" embriões considerados "não viáveis", provenientes de cruzamentos entre *P. vulgaris* x *P. acutifolius*; obteve 4 plantas intactas que completaram o seu ciclo biológico.

Com o objetivo de transferir tolerância a baixa temperatura da espécie *P. nitensis* para a espécie *P. vulgaris*, utilizando a hibridação interespecífica, foi criado na Holanda um programa de pesquisa envolvendo ambas as espécies (BRAAK e KOOISTRA, 1975). Plantas híbridas somente foram obtidas quando se utilizou a espécie *P. vulgaris* como fêmea. As sementes foram coletadas prematuramente e os embriões retirados e inoculados em meio de cultura. Alguns parâmetros foram avaliados e comparados com o comportamento da espécie *P. vulgaris* sob condições *in vitro*. Um dos parâmetros foi o comprimento do embrião. A porcentagem de plantas transplantadas aumentou com o aumento do tamanho do embrião, porém essa porcentagem foi menor para embriões híbridos do que para embriões provenientes de *P. vulgaris*. Nos híbridos o máximo tamanho alcançado foi restringido pelo aborto prematuro da semente, o que determinou somente uma pequena porcentagem de plantas geradas. Na realidade, cerca de 10% de plantas puderam ser obtidas, sendo essa taxa considerada satisfatória. Porém, somente 3 plantas desenvolveram-se e completaram o ciclo biológico.

SHIL *et alii* (1982) obtiveram plantas intactas provenientes de embriões inviáveis, anormais, de cruzamentos recíprocos entre *P. vulgaris* e *P. coccineus*. Destacaram que a principal barreira quando se utiliza *P. coccineus* como fêmea é a formação de embriões anormais. Nos cruzamentos interespecíficos entre *P. vulgaris* x *P. coccineus* apesar de terem produzido sementes normais, os híbridos resultantes apresentaram uma fertilidade mais baixa (27%), comparadas aos híbridos provenientes de cruzamentos recíprocos (81%).

A utilização da técnica de cultura *in vitro* é possível pela retirada do embrião na semente e posteriormente à sua inoculação em um meio de cultura adequado (CROCOMO e CABRAL, 1985). O processo é descrito a seguir: 1. **Coleta do embrião**: sob condições assépticas, o embrião é retirado da sementes madura ou imatura. Em ambos os casos o embrião é removido intacto sem danos; com pequenos embriões torna-se necessária a utilização de estereomicroscópio; 2. **Meio de cultura**: a seleção do meio de cultura para garantir a continuidade do crescimento do embrião sob condições *in vitro* é o mais importante. A constituição em nutrientes varia com a espécie vegetal, sendo que os embriões mais prematuros são mais exigentes. Embriões provenientes de sementes maduras podem crescer em meio de cultura constituído por sais minerais suplementado com sacarose. Portanto, embriões prematuros requerem também vitaminas, reguladoras do crescimento, a

minoácidos e extratos naturais (ex.: leite de coco). Manitol, como regulador osmótico do meio em que o embrião é embebido, é também exigido para simular a pressão osmótica do succo ovular (RAGHAVAN, 1977).

Embriões imaturos provenientes de cruzamentos interespecíficos entre as espécies *P. vulgaris*, *P. lunatus* e *P. acutifolius* foram cultivados em meio de cultura constituído de sais minerais de Murashige e Skoog (MS), sacarose, vitaminas e o efeito do aminoácido glutamina e ácido giberelico também foram estudados (MOK *et alii*, 1978). A glutamina efetivamente aumentou a sobrevivência e a ação do ácido giberelico não foi evidenciada. Plantas derivadas de *P. vulgaris* x *P. lunatus*, *P. vulgaris* x *P. acutifolius* e *P. acutifolius* x *P. vulgaris* foram obtidas. A influência dos genótipos dos progenitores na taxa de crescimento e no tamanho dos embriões também foram observados. Todos os embriões obtidos dos cruzamentos *P. vulgaris* x *P. lunatus* foram menos desenvolvidos, chegando somente ao estágio de desenvolvimento comparável ao globular ("pre-heart-shape") de embriões autofecundados. Embriões obtidos de cruzamentos entre *P. vulgaris* x *P. acutifolius* e *P. acutifolius* x *P. vulgaris* atingiram estádios de desenvolvimento cotiledonares embora as sementes formadas não chegassem à maturidade. A distinta característica desses embriões foi que nem sempre desenvolveu dois cotiledones. Resultados encontrados por THOMAS e WAINES (1984)

nos cruzamentos entre *P. vulgaris* x *P. acutifolius* mostraram que muitos dos embriões híbridos foram deformados, com cotilédones assimétricos ou inexistentes ou com três cotilédones enrolados ou sobrepostos uns aos outros. Esses resultados confirmam as formas irregulares dos embriões híbridos observados por MOK *et alii* (1978). Também o endosperma de muitos óvulos híbridos foram degenerados (THOMAS e WAINES, 1984).

2.4. Caracterização da hibridez

MOK *et alii* (1978) relataram que a morfologia atípica dos embriões híbridos facilita a caracterização dos híbridos. THOMAS e WAINES (1984) utilizaram como principal critério para caracterizar híbridos provenientes de cruzamentos entre *P. vulgaris* x *P. acutifolius*, o tamanho e a forma dos embriões. Além desse critério, também utilizaram: a. tipo de folha; b. hábito de crescimento dos progenitores; c. cor da flor; d. tamanho do cálice da flor; e e. esterilidade. Tipo de folha lanceolada e o hábito de crescimento indeterminado foram dominantes na geração F₁.

ALVAREZ *et alii* (1981) observaram que híbridos entre *P. coccineus* x *P. acutifolius*, *P. coccineus* x *P. vul*garis, *P. vulgaris* x *P. acutifolius* e F₂ (*P. vulgaris* x *P. coccineus*) x *P. acutifolius* tendem a apresentar características vegetativa e floral intermediárias entre os progenito-

res. A exceção é a presença de plantas anormais, anãs, folhas enrugadas aparentando sintomas de virose, ocorrendo muitas vezes entre híbridos provenientes de cruzamentos *P. vulgaris* x *P. coccineus* e *P. vulgaris* x *P. acutifolius* como progenitores. Essas plantas também foram descritas por SMARTT (1970), embora ocasionalmente sobrevivessem ao transplanta, não floresciam. Outros trabalhos têm relatado anormalidade entre híbridos interespecíficos de feijão (KOOIMAN, 1931; KEDAR e BEMIS, 1960; WALL e YORK, 1960; THOMAS, 1964; IBRAHIM e COYNE, 1975 e MOK *et alii*, 1978).

PRENDOTA *et alii* (1982) observaram duas classes de plantas entre os híbridos provenientes das espécies *P. acutifolius* x *P. vulgaris*. A primeira inclui genótipos vigorosos não balanceados, com crescimento atrofiado, internódios curtos e folhas enrugadas; a segunda classe inclui plantas muito vigorosas e satisfatoriamente balanceadas, algumas vezes com sintomas semelhantes a de viroses. Neste último grupo de plantas a morfologia das gerações F₁ retrocruzadas foi similar e intermediária aos dois pais. Notou-se que nos híbridos obtidos dos cruzamentos *P. acutifolius* (♀) x *P. vulgaris* (♂), o pecíolo das folhas primárias era longo e dividido em 3 partes como o do genótipo que é utilizado como macho (♂). As características das folhas foram próximas às da espécie *P. vulgaris* embora a inflorescência às de *P. acutifolius*. Cálices e flores foram pequenas como em *P. acutifolius*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Neste trabalho foram utilizadas, da espécie *Phaseolus vulgaris*, 5 cultivares (Gordo, Goiano Precoce, Canário 101, Oax-62 e California "small white") e 1 linha Carioca Precoce (mutante Carioca determinado precoce 1070), obtida através do tratamento de sementes com raios-gama, selecionada na geração M_2 pela Secção de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA, Piracicaba-SP. As sementes das cultivares foram provenientes da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA, Recife-PE, Instituto Agronômico de Campinas - IAC, Campinas-SP e do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão - EMBRAPA, Goiânia-GO. Da espécie *Phaseolus lunatus*, foram utilizadas 2 cultivares (IPA-1 e G-25143) e uma linha de geração F_2 obtida através da hibridação entre Fava Pintada x Fava Branca, ambas culti-

vadas em região Semi-Árida no Estado do Rio Grande do Norte, no Nordeste brasileiro. As sementes da espécie *P. lunatus* foram obtidas na Empresa-IPA, Recife-PE e no Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT, Cali-Colômbia. As cultivares da espécie *Phaseolus acutifolius* (G-40018, G-40035, G-40064, G-40002, Tepari Branco e Tepari Roxo) foram provenientes do CIAT, Cali-Colômbia e da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte - EMPARN.

3.2. Cruzamentos interespecíficos

3.2.1. Multiplicação de sementes em campo

Para multiplicação de sementes foi utilizada uma área de 30 m², solo tipo terra roxa estruturada, descrito e classificado por RANZANI *et alii* (1966), série Luiz de Queiroz, localizada na sede do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA, Seção de Fertilidade do Solo, em Piracicaba-SP, a uma latitude de 22°42'30" Sul, longitude de 47°38'00" Oeste e altitude de 576 m. O clima da região é Cwa, pela classificação climática de Köppen, ou seja, sub-tropical úmido com estiagem no inverno, com a temperatura média do mês mais frio inferior a 18°C e a do mês mais quente superior a 22°C (CAMARGO *et alii*, 1974).

Foram multiplicadas sementes das cultivares

da espécie *Phaseolus acutifolius* e das cultivares (IPA-1 e G-25143) da espécie *Phaseolus lunatus*. A área foi delimitada em 2 parcelas, com 5 linhas por parcela, com um espaçamento de 0,5 m entre linhas e 0,4 m entre plantas para todas as cultivares. A adubação e os tratos culturais dispensados foram os necessários para a boa condução da cultura.

3.2.2. Condução das plantas

Os cruzamentos interespecíficos foram realizados em casa-de-vegetação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA, em Piracicaba, SP. As sementes foram semeadas em vasos de barro com capacidade para 8,00 kg de solo. O solo utilizado foi do tipo Latossolo Vermelho Escuro, textura média (comunicação pessoal - Engº Agrº HÉlio Prado, Instituto Agronômico de Campinas - IAC, SP), proveniente da Fazenda Experimental Sertãozinho, pertencente à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ-USP, em Piracicaba, SP. A análise de fertilidade do referido solo apresenta os seguintes resultados:

pH	Carbono	Teor trocável em miliequivalentes/100 g de terra					
Valor	%	Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio	Alumínio	Hidrogênio
		PO_4^{3-}	K^+	Ca^{++}	Mg^{++}	Al^{+++}	H^+
5,3	0,54	0,10	0,10	1,35	0,28	0,56	2,40

Para correção deste solo, foi utilizado 1,5 t/ha de calcário (Minercal Agrícola), apresentando $\text{CaO} = 45,00\%$, $\text{MgO} = 15,00\%$ e o PRNT = 118,00%. Para se calcular a quantidade de adubo e/ou corretivo a ser misturado na terra no vaso, considerou-se o equivalente em peso a 1 hectare de solo (camada até 20 cm de profundidade) cerca de $2,8 \times 10^6$ kg de solo. A adubação foi realizada utilizando-se uma formulação 100 kg de N: 200 kg de P_2O_5 : 100 kg de K_2O (sulfato de amônio: superfosfato simples: cloreto de potássio) e acrescentada de 30 t/ha de matéria orgânica (esterco de curral). O calcário, o superfosfato simples e o esterco foram incorporados ao solo na mesma ocasião. O sulfato de amônio e o cloreto de potássio foram incorporados juntos, parcelados, cerca de 10 e 30 dias após o plantio. O solo, após a incorporação do calcário, do superfosfato simples e do esterco de curral, foi irrigado e deixado na capacidade do vaso. Para deixar o solo na capacidade de vaso, foi utilizado o método do Torrão Separado pela Frente de Molhamento (TSFM) (COSTA, 1983). Após 15 dias, mantendo o solo úmido (capacidade de vaso), iniciou-se o plantio na segunda quinzena do mês de agosto de 1984. As cultivares foram semeadas de acordo com a época de floração. Após a emergência, na fase de floração, foi necessário manter o ambiente na casa-de-vegetação com elevada umidade para se evitar queda de flores. Os tratamentos culturais dispensados ao bom desenvolvimento da cultura foram realizados com auxílio de acaricida (TEMIK 10; 0,15 g/vaso), com aplica

ção direta no solo após a emergência, para o controle de ácaro branco e rajado (*Polyphagotarsonemus latus* Banks e *Tetranychus urticae* Koch), da vaguinha (*Diabrotica speciosa* Germar) e do minador (*Agromyza* sp.). Para o controle de Oídio (*Erysiphe polygoni* DC.), foram realizadas pulverizações com KARATHANE WD (0,0045 g/l) quando necessário. O aspecto geral das condições em que foi conduzido o experimento pode ser constatado através da Foto 1.

Foto 1. Aspecto geral da condução do experimento. As plantas estão com 46 dias após o plantio e distribuídas em 4 bancadas, sendo as cultivares utilizadas como fêmea (♀) nas 2 bancadas centrais e como macho (♂) nas bancadas laterais.

3.2.3. Polinizações

As polinizações foram realizadas utilizando-se técnicas descritas por BUISSHAND (1956) e HONMA (1956) com modificações. Utilizou-se como fêmea (♀) as cultivares de *P. vulgaris* e como macho (♂) as cultivares de *P. acutifolius* e *P. lunatus*. As flores foram emasculadas 1 a 2 dias antes de sua abertura e em seguida polinizadas. O processo de emasculação foi realizado da seguinte forma: a quilha não era totalmente eliminada e retirava-se apenas uma pequena porção da mesma, o suficiente para a eliminação das anteras. A emasculação foi realizada com o auxílio de uma lapiseira e uma pinça, deixando acoplado no estigma da flor emasculada, o estigma carregado de pólen proveniente da flor utilizada como macho. As etapas no processo de polinização são descritas na Figura 1.

Em um grupo de 127 flores, foi utilizado solução nutritiva de White (IBRAHIM e COYNE, 1975), aplicada à superfície do estigma da flor emasculada. Um segundo grupo foi constituído de 50 flores polinizadas sem o uso da solução de White.

FIGURA 1. Etapas seguidas durante as polinizações interespecíficas em feijão entre as espécies *P.vulgaris* (♀) x *P. acutifolius* (♂) e *P. vulgaris* (♀) x *P. lunatus* (♂): 1. abertura da flor com auxílio de uma lapiseira; 2. afastamento do estandarte e asa esquerda com ajuda da lapiseira e polegar da mão esquerda, evidenciando a quilha; 3. com o auxílio da lapiseira, retira-se a porção superior da quilha pondo a descoberto as anteras e o estigma; 4. utilizando-se uma pinça, faz-se a emasculação da flor eliminando-se as anteras individualmente; 5. poliniza-se o estigma da flor emasculada com pólen trazido da flor que utiliza-se como macho acoplando os estigmas de ambas as flores; 6. recomposição da flor e identificação do cruzamento.

3.3. Cultivo *in vitro*

3.3.1. Protocolo

A obtenção de híbridos interespecíficos de feijão entre *P. vulgaris* (♀) × *P. acutifolius* (♂) e *P. vulgaris* (♀) × *P. lunatus* (♂), segue as etapas de acordo com a descrição da Figura 2.

3.3.2. Explantes

Os explantes foram embriões intactos destacados de sementes híbridas, em vários estádios de desenvolvimento, dentro da vagem.

3.3.3. Meios de cultura

Foram utilizados dois meios de cultura. O primeiro descrito por MOK *et alii* (1978) e o segundo, o meio E₂ de CROCOMO *et alii* (1979), modificado, que estão apresentados na Tabela 1.

FIGURA 2. Fluxograma de obtenção de híbridos interespecíficos de feijão (*Phaseolus* spp.).

- *P. vulgaris* (♀)
- *P. acutifolius* e/ou *P. lunatus* (♂)

TABELA 1. Meios de cultura para o cultivo de embriões híbridos de feijão.

	Meio de MOK <i>et alii</i> (1978)	Meio de CROCOMO <i>et alii</i> (1979)	Meio E2 Modificado*
A. Sais minerais (mg/l)			
NH ₄ NO ₃	1650,00	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	100,00	100,00
KNO ₃	1900,00	800,00	800,00
KCl	-	200,00	200,00
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	440,00	-	-
CaCl ₂	-	135,00	135,00
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	370,00	250,00	250,00
KH ₂ PO ₄	170,00	-	-
NaH ₂ PO ₄	-	173,00	173,00
Na ₂ PO ₄	-	37,70	37,70
Na ₂ -EDTA	37,30	37,30	37,30
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	27,80	27,80	27,80
H ₃ BO ₃	6,20	-	-
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	22,30	4,50	4,50
KI	0,83	0,05	0,05
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,025	0,25	0,25
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,025	0,25	0,25
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	8,60	2,40	2,40
B. constituintes orgânicos			
Sacarose (g/l)	30,00	20,00	30,00
Inositol (mg/l)	100,00	100,00	100,00
Thiamina-HCl (mg/l)	1,00	8,00	8,00**
Ácido nicotínico (mg/l)	5,00	-	5,00
Piridoxina - HCl (mg/l)	0,50	0,50	0,60**
Niacinamida (mg/l)	-	1,25	1,25**
D-pantotenato (mg/l)	-	1,00	1,00**
Caseína hidrolisada (g/l)	-	2,00	2,00***
Glutamina (mg/l)	10,00	-	25,00**
Ácido indol acético (mg/l)	-	1,30	-
Cinetina (mg/l)	-	0,25	-
Agar (g/l)	8,00	10,00	8,00
	pH = 5,7	pH = 5,6	pH = 5,6

* Meio estabelecido no presente trabalho

** Foi realizada filtração em milipore (0,22 µ) e em seguida adicionado ao meio de cultura autoclavado.

***Após o estabelecimento das plântulas intactas, as mesmas eram transferidas para um meio de cultura novo, com concentração de caseína hidrolisada reduzida (50%) (1,0 g/l) e mantidas nesse meio até o transplante para vasos.

3.3.4. Inoculações de explantes

Os embriões foram coletados com cerca de 19 dias após a polinização (D.A.P.). As vagens antes da coleta dos embriões eram catalogadas e posteriormente desinfectadas numa câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas, emergindo-as em etanol a 95%, durante 1 minuto e em seguida em solução de 20% (v/v) do produto comercial "Q-ba" (solução de hipoclorito de sódio), por período de 5 minutos. Após esse período as vagens eram imersas em água deionizada estéril; com auxílio de uma placa de Petri, papel de filtro, bisturi e pinça, abria-se a vagem e retirava-se a semente, recebendo-a em outra placa de Petri. Através de um estereomicroscópio (BAUSCH e LOMB com aumento de 10 a 25 vezes), destacava-se o embrião da semente, o qual, em qualquer estágio de desenvolvimento, era inoculado íntegro no meio de cultura. Os embriões inoculados eram mantidos em sala a 25/21°C com fotoperíodo de 18/6 horas (luz/escuro) e uma intensidade luminosa de aproximadamente 54,00 W/m² medida através do "EPPLEY RADIOMETER" (constante do aparelho = $9,48 \times 10^{-6}$ V/W. m⁻²).

3.3.5. Transplantes das plântulas híbridas para vasos

Foram testados dois substratos. O primeiro consistia de uma mistura de matéria orgânica: vermiculita:

areia de quartzo: esfagno (3:1/2: 2/3: 2/3) denominado de substrato sólido, autoclavada. O segundo substrato foi a solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950) diluída a 50%. A plântula era retirada do meio de cultura, as raízes lavadas em água corrente e posteriormente transplantadas para vasos. Essas plântulas foram mantidas na sala de manutenção nas mesmas condições anteriormente referidas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as cultivares da espécie *P. vulgaris* utilizadas neste trabalho, destacam-se Gordo, Goiano Precocê, linha mutante Carioca Precocê e California. As três primeiras, pelo número de embriões híbridos obtidos após as hibridações interespecíficas sem o uso da solução nutritiva de White e também porque alguns destes embriões se diferenciam para a formação de plantas híbridas intactas. Com relação à cultivar Gordo, vale também ressaltar a sua importância no Nordeste brasileiro, principalmente pelo seu cultivo no estado de Pernambuco. A cultivar California ressaltam-se pelo número de embriões híbridos obtidos nas mesmas condições. As espécies *P. acutifolius* e *P. lunatus* foram usadas devido a sua elevada importância como fonte de tolerância às condições de clima adverso (CROCOMO e CABRAL, 1985). Com relação às cultivares da espécie *P. acutifolius* utilizadas, destacam

-se G-40035 e G-40002 como polinizadores. O maior número de embriões híbridos foi obtido com a cultivar G-40035, embora ambas possibilitassem a regeneração de plantas híbridas intactas nos cruzamentos entre *P. vulgaris* (♀) × *P. acutifolius* (♂). Entre as cultivares da espécie *P. lunatus* utilizadas, destacam-se a cultivar G-25143 e a linha da geração F₂. A primeira pela obtenção de embrião híbrido e pela sua precocidade, floração com 30 dias após o plantio, caráter de elevada importância. A segunda, linha da geração F₂, destaca-se pela obtenção de embriões híbridos dos quais um destes embriões regenerou planta intacta e pela sua origem (obtida através do cruzamento intra-específico entre duas cultivares adaptadas às condições climáticas do Nordeste). KLOZ *et alii* (1966) e SMARTT (1970) relataram diferenças genéticas existentes entre as espécies *P. vulgaris* e *P. lunatus* que dificultam a obtenção de plantas híbridas interespecíficas entre ambas. RABAKOARIHANTA *et alii* (1979) também relataram que diferenças no tempo da divisão do endosperma e do embrião em relação a fertilização são barreiras entre esses cruzamentos. Portanto, é provável que a planta híbrida obtida neste trabalho entre *P. vulgaris* × *P. lunatus* tenha sido decorrente da utilização de material segregante (linha da geração F₂) como progenitor macho, o que possibilitou uma maior variabilidade genética do que um a cultivar pura. HONMA e HEECKT (1959) relataram a obtenção de plantas híbridas férteis entre espécies *P. vulgaris* × *P. lunatus* e destacaram a

utilização de linhas segregantes como progenitores nesses cruzamentos. MOK *et alii* (1978) mencionaram que o sucesso obtido por HONMA e HEECKT (1959) pode ter sido pela utilização de material segregante como progenitores e por uma combinação específica entre os pais que possibilitaram a regeneração de plantas híbridas com a capacidade de produzir sementes. Outros autores relataram a utilização de linhas segregantes como progenitores em cruzamentos interespecíficos entre espécies de *Phaseolus* (KEDAR e BEMIS, 1960; WALL e YORK, 1960; BEMIS e KEDAR, 1961; AL-YASIRI e COYNE, 1966; THOMAS e WAINES, 1980; THOMAS, 1983; THOMAS e WAINES, 1984).

Quanto ao processo de polinização, quando utilizada a solução nutritiva de White, obteve-se um índice de pegamento de 45%, o qual atingiu 58% quando essa solução não foi empregada. Segundo IBRAHIM e COYNE (1975), o uso da solução de White em cruzamentos interespecífico entre *P. coccineus* (♀) × *P. vulgaris* (♂), aumentou o nível de fertilidade, o que foi atribuído a uma melhor condição nutricional à germinação do grão de pólen. De acordo com a Figura 3, esses resultados não foram observados quando dos cruzamentos entre *P. vulgaris* (♀) × *P. acutifolius* (♂) e *P. vulgaris* (♀) × *P. lunatus* (♂), observando-se que, embora o uso da solução de White o número de vagens fosse superior, o número de embriões híbridos foi menor.

FIGURA 3. Efeito da solução nutritiva de White na obtenção de embriões híbridos interespecíficos de feijão entre *P. vulgaris* (♀) × *P. acutifolius* (♂) e *P. vulgaris* (♀) × *P. lunatus* (♂).

- Número na base da barra = número de vagens
- Número no topo da barra = número de embriões híbridos
- Ausência da barra = Ausência de embriões híbridos
- Número com ausência de barra = número de vagens.

Ainda na Figura 3 podem ser destacados os cru^zamentos entre as cultivares California (♀) x G.40035 (♂), Ca^rioca Precoce (♀) x G-40035 (♂) e Goiano Precoce (♀) x Linha F₂ (♂), obtendo-se 7, 10 e 8 embriões em 4, 3 e 2 vagens co^letadas, respectivamente. Na Figura 3 das cultivares de *P. acutifolius* destaca-se G-40035 pelo número de embriões híbri^udos obtidos. Valendo ressaltar ainda o último cruzamento en^utre as espécies *P. vulgaris* e *P. lunatus*, sendo o progenitor utilizado como macho uma linha segregante F₂, anteriormente discutido. No grupo de 127 flores polinizadas com o uso da solução de White, foram obtidas 58 vagens e 6 embriões híbri^udos, enquanto que em 50 polinizações sem o uso da solução de White, foram obtidas 29 vagens e 50 embriões híbridos. Na Ta^ubela 2 pode-se observar que em 28 polinizações com o uso da solução de White, foram obtidas 11 vagens e nenhum embrião, enquanto sem o uso desta, utilizando-se as mesmas combina^ções entre as cultivares, em 19 polinizações foram obtidas 11 vagens e destas, coletados 20 embriões híbridos. Observou⁻se ainda uma variação quanto ao tamanho médio das vagens: 4,0 cm com o uso da solução de White e 6,68 cm sem a mesma, nesta última o número médio de sementes variando de 0,5 a 4 por polinização. WALL e YORK (1960) demonstraram que em cru^zamentos interespecíficos entre as espécies *P. vulgaris* e *P. coccíneus*, utilizando *P. coccíneus* como macho, o número de sementes por polinizações variou de 0,5 a 2,6. Em cruzamen⁻tos interespecíficos entre espécies de *Phaseolus* essa varia-

TABELA 2. Efeito da solução nutritiva de White quanto ao número de vagens, quanto ao número de sementes por vagem e quanto ao número de embriões híbridos provenientes de cruzamentos interespecíficos entre as espécies *P. vulgaris* (cvs. Goiano precoce, Gordo e California), *P. acutifolius* (cvs. G-40018, T. Roxo, G-40002, G-40035) e *P. lunatus* (cv. G-25143).

Cruzamentos			Com solução de White					Sem solução de White							
			(♀)	x	(♂)	Nº po liniz.	Nº vags	Tamanho médio da vagem (cm)	Nº sem. por vagem	Nº total embriões híbridos	Nº po liniz.	Nº vags	Tamanho médio da vagem (cm)	Nº sem. por vagem	Nº total embriões híbridos
Goiano precoce	x	G-40018	3	1	4,0	(-)	0	1	1	9,0	3	3			
Goiano precoce	x	T. Roxo	1	1	3,3	(-)	0	1	1	9,8	4	4			
Goiano precoce	x	G-25143	6	3	3,5	(-)	0	2	2	4,9	0,5	1			
Gordo	x	G-40002	2	1	6,2	(-)	0	2	1	8,5	3	3			
California	x	G-40018	9	2	3,1	(-)	0	3	2	4,0	1	2			
California	x	G-40035	7	3	4,1	(-)	0	10	4	3,9	1,3	7			
Média			4,0					6,68							

(-) tamanho da semente menor que 1 mm (não considerado)

ção pode ser atribuída à natureza das cultivares utilizadas como progenitores, a heterozigose dos pais e ao nível de compatibilidade entre os pais.

As vagens provenientes de polinizações com o uso da solução de White apresentavam um bom aspecto morfológico, entretanto suas sementes eram muito pequenas, possuindo embriões em estágio de desenvolvimento rudimentar. Por outro lado, quando as sementes híbridas apresentavam tamanho suficiente para a retirada do embrião, observava-se o escurecimento típico das mesmas pela degeneração do endosperma (Foto 2).

Na Foto 3 é mostrada uma vagem advinda do cruzamento entre as cultivares Gordo (♀) x G-40002 (♂) coletada com 19 dias após a polinização (D.A.P.). As sementes encontradas nessa vagem eram maiores do que a semente híbrida mostrada na Foto 2, e apesar do endosperma, também encontra-se em estado de degeneração o aspecto das sementes (3 sementes) e dos embriões (3 embriões, sendo um em estágio de desenvolvimento cotiledonar mostrado na Foto 4) era bem mais vigoroso. Isto é característico das vagens provenientes de polinizações sem o uso de solução de White.

Os embriões obtidos de cruzamentos entre *P. vulgaris* (♀) x *P. lunatus* (♂) eram, em comparação aos obtidos entre *P. vulgaris* (♀) x *P. acutifolius* (♂), menos desen-

FOTO 2. Vagem híbrida advinda do cruzamento entre as cultivares Gordo (♀) x G-40035 (♂), mostrando o seu tamanho e a influência da solução nutritiva de White sobre o desenvolvimento das sementes híbridas, 26 dias após a polinização (D.A.P.).

FOTO 3. Vagem híbrida advinda do cruzamento entre as cultivares Gordo (♀) x G-40002 (♂), 19 dias após a polinização (D.A.P.), obtida sem o tratamento com a solução nutritiva de White.

volvidos, anormais, não apresentavam cotilédones definidos, chegando apenas ao estágio de desenvolvimento globular ("pre-heart-shape") como descrito por MOK *et alii* (1978). Contudo, aqueles advindos de *P. vulgaris* (♀) x *P. acutifolius* (♂) podiam apresentar os dois cotilédones assimétricos, embora também pudessem atingir estágio de desenvolvimento cotiledonar (Foto 4) sem que as sementes formadas atingissem a maturidade, como relatado por MOK *et alii* (1978).

Os embriões híbridos advindos dos cruzamentos entre *P. vulgaris* x *P. lunatus* e *P. vulgaris* x *P. acutifolius* não acompanhavam os estádios de desenvolvimento daqueles provenientes de autofecundação em relação à idade. Embriões híbridos de 18 a 20 D.A.P. podiam encontrar-se em qualquer estágio de desenvolvimento enquanto que os provenientes de autofecundação encontravam-se na forma de eixo embrionário com os indícios das folhas cotiledonares comparáveis aos eixos embrionários encontrados em sementes maduras.

Houve ainda grande variabilidade com relação ao número de cotilédones em embriões provenientes dos cruzamentos entre *P. vulgaris* x *P. acutifolius*, ausência ou presença de três cotilédones, anormais, como relatado por THOMAS e WAINES (1984). Observou-se também que os embriões mais vigorosos, ou seja, aqueles que atingiram estádios de desenvolvimento cotiledonares como mostrado na Foto 4, e outros provenientes dos cruzamentos entre as cultivares Goiano

FOTO 4. Embrião híbrido em estágio de desenvolvimento cotiledonar, mostrando os cotiledones assimétricos, típico de cruzamento interespecífico entre *P. vulgaris* (♀) × *P. acutifolius* (♂). Esse embrião é proveniente do cruzamento entre as cultivares Gordo (♀) × G-40002 (♂), coletado da vagem mostrada na Foto 3. Foto obtida 40 dias após a inoculação em meio de cultura (aumento 10 vezes, Foto ao estereomicroscópio).

Precoce (♀) x T. Roxo (♂), Goiano Precoce (♀) x G-40035 (♂), Goiano Precoce (♀) x G-40018 (♂), California (♀) x G-40035 (♂), Canário 101 (♀) x G-40002 (♂), coletados e inoculados entre 18 a 20 D.A.P. não se diferenciaram, sendo que os cotilédones oxidaram-se. No entanto, embriões de mesma idade (18 a 20 D.A.P.), e que se apresentavam nos primeiros estádios de desenvolvimento (globular ou coração), tiveram um maior índice de diferenciação, regenerando plantas híbridas intactas ou malformadas. Com relação aos embriões híbridos em estágio de desenvolvimento mais avançado (cotiledonar), provavelmente o eixo embrionário utiliza, para a sua diferenciação, a reserva nutritiva existente nos cotilédones (que o acompanham) quando destacado da semente e inoculado em meio de cultura. Estabelece-se assim uma maior superfície de contato do eixo embrionário com os cotilédones do que com o próprio meio de cultura. Desta forma, processos bioquímicos levando à formação de substâncias tóxicas passariam a interferir na relação entre eixo embrionário-cotilédones-meio de cultura, tornando assim inviável o desenvolvimento e a diferenciação para a formação de plantas. Os resultados obtidos por ALVAREZ *et alii* (1981) fortalecem essa hipótese. Esses autores admitiram que o sucesso alcançado (superior ao esperado) na obtenção de híbridos interespecíficos entre as espécies *P. vulgaris*, *P. acutifolius* e *P. coccineus* foi devido à eliminação dos cotilédones de embriões híbridos antes de sua inoculação em meio de cultura e do seu cultivo no escuro tem

porariamente.

A Tabela 1 mostra a composição dos meios de cultura utilizados neste trabalho, com exceção do meio E₂, o qual foi usado apenas em ensaios preliminares no cultivo de embriões maduros (eixos embrionários) e embriões imaturos de todas as cultivares em estudo (*P. vulgaris*, *P. acutifolius* e *P. lunatus*). Esse meio de cultura E₂ foi modificado em função da presença de reguladores de crescimento (ácido indolacético e cinetina) o que induzia algumas cultivares à diferenciação para uma planta intacta e a outra para a formação de calos. Esse desequilíbrio, provocado pela presença de reguladores de crescimento pode ser atribuído a uma necessidade diferencial em relação à fitohormônio exógeno, característica de cada genótipo para a sua diferenciação. A retirada daqueles reguladores de crescimento e a adição de ácido nicotínico, glutamina e uma maior concentração de sacarose ao meio, proporcionaram condições para que os embriões maduros ou imaturos fossem induzidos à diferenciação em planta intacta. O meio de cultura relatado por MOK *et alii* (1978), incluído na Tabela 1, foi utilizado apenas como ponto de referência.

Dos embriões híbridos obtidos através de polinizações com o uso da solução de White (Figura 3), 5 eram provenientes de cruzamentos entre as cultivares Carioca Precoce (♀) x G-40018 (♂), Carioca Precoce (♀) x T. Branco (♂),

Gordo (♀) x G-25143 (♂), Oax-62 (♀) x G-40064 (♂) e foram inoculados no meio de cultura proposto por MOK *et alii* (1978). Dos 50 embriões obtidos sem o uso da solução de White (Fig. 3), 6 eram provenientes do cruzamento entre Carioca Precoce (♀) x G-40035 (♂) e também foram inoculados no referido meio. Desses embriões inoculados, apenas 2 procedentes do cruzamento entre Carioca Precoce (♀) x G-40035 (♂) e 1 proveniente do cruzamento entre Carioca Precoce (♀) x G-40018 (♂) se diferenciaram regenerando plantas, as quais eram malformadas e não sobreviveram ao transplante do meio de cultura para o substrato sólido. No meio de cultura modificado e estabelecido no presente trabalho (vide Tabela 1), foram inoculados 44 embriões híbridos provenientes de polinizações sem o uso da solução de White. Destes, apenas 8 se diferenciaram, regenerando plantas. Também nesse meio foi inoculado 1 embrião híbrido obtido através de polinização com o uso da solução de White e que não se diferenciou. Os 8 embriões que sofreram diferenciação são advindos dos cruzamentos entre Carioca Precoce (♀) x G-40035 (♂), California (♀) x G-40002 (♂), California (♀) x G-40035 (♂), Goiano Precoce (♀) x Linha F₂ (♂) e Gordo (♀) x G-40002 (♂). Nas Fotos 5 e 6 são mostradas as plântulas híbridas geradas dos dois últimos cruzamentos.

As demais não sobreviveram ao transplante para o substrato sólido, apesar de se ter conseguido uma planta híbrida do cruzamento entre as cultivares Carioca Precoce

(♀) x G-40035 (♂) que apresentava um estado ótimo de desenvolvimento, comparável aos híbridos mostrados nas Fotos 5 e 6. ALVAREZ *et alii* (1981) afirmaram que o problema de transplante das plântulas do meio de cultura para as condições de vaso é um fator limitante na obtenção de híbridos interespecíficos de feijão, atingindo uma perda de 50% das plantas transplantadas.

A plântula híbrida mostrada na Foto 5 (*P. vulgaris* x *P. lunatus*) desenvolveu-se bem quando transplantada para o substrato sólido durante a fase de aclimação. A Foto 7 mostra essa plântula 8 dias após o seu transplante. Nessa época surgiram novas folhas, mas o substrato sólido não foi adequado para permitir o seu desenvolvimento normal subsequente.

As Fotos 6 e 8 mostram uma planta híbrida *P. vulgaris* x *P. acutifolius* em diferentes estádios de desenvolvimento e em diferentes meios. Essa planta foi transplantada diretamente do meio de cultura para o vaso contendo solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950) diluída a 50%. Treze dias após o transplante, a plântula apresentava aspecto vigoroso e a presença de novas folhas, desenvolvendo características do progenitor (*P. acutifolius*) como a forma da folha lanceolada, tendência à inclinação das mesmas e o tipo de pecíolo. Essas observações corroboram as obtidas por HONMA (1956) na geração F₁ de híbridos *P. vulgaris* x *P. acutifo*

FOTO 5. Plântula híbrida *P. vulgaris* (♀) x *P. lunatus* (♂) regenerada de embrião imaturo, 49 dias após a polinização (D.A.P.), advinda do cruzamento entre as cultivares Goiano Precoce (♀) x Linha F₂ (♂), desenvolvendo-se *in vitro*.

FOTO 6. Plântula híbrida *P. vulgaris* (♀) x *P. acutifolius* (♂) regenerada, de embrião imaturo, 70 dias após a polinização (D.A.P.), proveniente do cruzamento entre as cultivares Gordo (♀) x G-40002 (♂), desenvolvendo-se *in vitro*.

lius principalmente quanto à forma de folha lanceolada em plantas jovens. THOMAS *et alii* (1983) e THOMAS e WAINES (1984) relataram que em cruzamentos interespecíficos entre *P. vulgaris* (♀) × *P. acutifolius* (♂), a forma da folha lanceolada peculiar à espécie *P. acutifolius* pode ser dominante na geração F₁ entre plantas híbridas advindas desses cruzamentos. Outro aspecto notado no presente trabalho foi o de folhas rugosas, sintomas de virose, características estas relacionadas por outros autores em cruzamentos interespecíficos entre espécies de *Phaseolus* (ALVAREZ *et alii*, 1981; PRENDONTA *et alii*, 1982). Durante o seu desenvolvimento, a planta passou a mostrar características de ambos os progenitores na parte aérea, como morfologia foliar, comportamento este também observado e constatado por HONMA (1956). Essa planta não chegou a florescer, sendo estéril. THOMAS *et alii* (1983) enfatizaram que o problema de esterilidade na geração F₁ entre esses tipos de híbridos é um fator limitante na transferência de germoplasma entre essas espécies, o qual poderia ser contornado através de retrocruzamentos ou pela produção de alotetraplóides pelo tratamento com colchicina. O problema de esterilidade entre híbridos interespecíficos em feijão tem sido relatado por vários autores (LORZ, 1952; HONMA e HEECKT, 1959; WALL e YORK, 1960; AL-YASIRI e COYNE, 1966; SMARTT, 1970; MOK *et alii*, 1978; ALVAREZ *et alii*, 1981; THOMAS e WAINES, 1980; THOMAS, 1983; THOMAS e WAINES, 1984). Os internódios dessa planta (Fotos 8 e 9) eram curtos tornando

FOTO 7. Plântula híbrida *P. vulgaris* (♀) × *P. lunatus* (♂) de desenvolvendo-se em substrato sólido (mistura de vermiculite, areia de quartzo, matéria orgânica e esfagno, 57 dias após a polinização (D.A.P.).

FOTO 8. Plântula híbrida *P. vulgaris* (♀) × *P. acutifolius* (♂) desenvolvendo-se em solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950), diluída 50%, 83 dias após a polinização (D.A.P.).

a planta anã. Outros trabalhos têm relatado anormalidades em híbridos interespecíficos de feijão (KOOIMAN, 1931; KEDAR e BEMIS, 1960; BEMIS e KEDAR, 1961; IBRAHIM e COYNE, 1975).

A Foto 9 mostra o tipo de sistema radicular da mesma planta apresentada na Foto 8, demonstrando assim uma tendência a um sistema radicular tipo pivotante peculiar à espécie *P. acutifolius*.

FOTO 9. Planta híbrida *P. vulgaris* (♀) × *P. acutifolius* (♂), 115 dias após a polinização (D.A.P.). Destaca-se o sistema radicular pivotante, peculiar à espécie *P. acutifolius*.

THOMAS (1983) usando sonda de neutron, demonstrou que o sistema radicular da espécie *P. acutifolius* pode absorver água a uma profundidade superior a 2 m, enquanto a espécie *P. vulgaris* a menos de 1 m. Na planta híbrida (Foto 9), quando as folhas começaram a perder o vigor, não surgiram novas folhas (aproximadamente 160 dias após a polinização), mas o sistema radicular já ultrapassava 90 cm de comprimento. Essa peculiaridade não foi observada na cultivar Gordo (*P. vulgaris*), um dos progenitores (♀) desse híbrido (Foto 9), a qual, cultivada nas mesmas condições, em solução nutritiva, desenvolveu sistema radicular bem característico do tipo fasciculado. Desta forma, esse resultado demonstra a possibilidade de transferência desse caráter peculiar da espécie *P. acutifolius* para a espécie *P. vulgaris* como enfatizado por THOMAS (1983) como um dos parâmetros morfológicos que poderá contribuir com uma maior eficiência na absorção de água da espécie *P. vulgaris*, tornando-se menos vulnerável à adversidade climática.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstra a possibilidade do cultivo *in vitro* de embriões advindos de cruzamentos interespecíficos entre espécies de *Phaseolus*, levando a regeneração de plantas híbridas.

6. LITERATURA CITADA

- ALVAREZ, M.N., P.D. ASCHER e D.W. DAVIS, 1981. Interespecific hybridization in *Euphaseolus* through Embryo Rescue. *HortScience*, 16(4): 541-3.
- AL-YASIRI, S. e D.P. COYNE, 1964. Effect of growth regulators in delaying pod abscission and embryo abortion in the interspecific cross *Phaseolus vulgaris* x *Phaseolus acutifolius*. *Crop. Sci.*, 4: 433-5.
- AL-YASIRI, S.A. e D.P. COYNE, 1966. Interespecific hybridization in the genus *Phaseolus*. *Crop. Sci.*, 6: 59-60.
- BEMIS, W.P. e N. KEDAR, 1961. Inheritance of morphological abnormalities in seedlings of two species of *Phaseolus*. *J. Hered.*, 52: 171-8.

- BRAAK, J.P. e E. KOOISTRA, 1975. A successful cross between *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus ritensis* Jones with aid of embryo culture. *Euphytica*, 24: 669-79.
- BUISHAND, T.J., 1956. The crossing of beans (*Phaseolus* spp.) *Euphytica*, 5: 41-50.
- BURKART, A., 1952. *Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas*. 2ª Ed., B. Aires, Acme Agency, 569 p.
- CAMARGO, A.P., H.S. PINTO, M.J. PEDRO Jr., R.R. ALFONSI e A. A. ORTOLI, 1974. Clima do Estado de São Paulo. In: SAEEPS. Inst. Agrônômico. *Zoneamento Agrícola do Estado de São Paulo*. São Paulo, vol. 1.
- COSTA, M.P., 1983. *Efeito da matéria orgânica em alguns atributos do solo*. Piracicaba, ESALQ/USP, 137 p. (Dissertação de Mestrado).
- COYNE, D.P., 1964. Species hybridization in *Phaseolus*. *J. Hered.*, 55: 5-6.
- CROCOMO, O.J. e J.B. CABRAL, 1985. Interspecific hybridization in *Phaseolus*: Embryo Axis Culture. In: CROCOMO, O.J., F.C.A. TAVARES, D.A. EVANS, W.R. SHARP, J.E. BRAVO e E.F. PADDOCK. *Biotechnology of Plants and Microorganisms*. Columbus, The Ohio State University Press. (em impressão).

CROCOMO, O.J., L.A. GALLO, G.S. TONIN e N. SACCHI, 1979.

Developmental control of *Phaseolus vulgaris* using embryo axis culture. Piracicaba, CENA, *Energ. Nucl Agric.*, 1 (1): 55-8.

CROCOMO, O.J., A. TULMANN NETO e K. MICHAELSEN, 1976.

Breeding for protein in the bean (*Phaseolus vulgaris* L.):
I- Inventory of some brazilian varieties and a number of lines of differing origin. In: *Evaluation of Seed Protein Alternations by Mutation Breeding*. Viena, IAEA, p. 197-208.

GUNN, C.R., 1973. Recent nomenclatural changes in *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi. *Crop Sci.*, 13: 496.

HOAGLAND, D.R. e D.I. ARNON, 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Expt. Sta. Circ.*, 347 p.

HONMA, S., 1955. A technique for artificial culturing of bean embryos. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 65: 405-8.

HONMA, S., 1956. A bean interspecific hybrid. *J. Hered.*, 47: 217-20.

HONMA, S. e O. HEECKT, 1959. Interspecific hybrid between *Phaseolus vulgaris* and *P. lunatus*. *J. Hered.*, 50: 233-7.

- HUBBELING, N., 1957. New aspects of breeding for disease resistance in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*, 6: 111-41.
- IBRAHIM, A.M. e D.P. COYNE, 1975. Genetics of stigma shape, cotyledon position and flower color in reciprocal crosses between *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus coccineus* (Lam.) and implications in breeding. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100(6): 622-26.
- KEDAR, N. e W.P. BEMIS, 1960. Hybridization between two species of *Phaseolus* separated by physiological and morphological blocks. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 76: 397-402.
- KLOZ, J., E. KLOZOVÁ e V. TURKOVA, 1966. Chemotaxonomy and genesis of protein characters with special references to the genus *Phaseolus*. *Preslia (Praha)*, 38: 229-36.
- KOOIMAN, H.N., 1931. Monograph on the genetics of *Phaseolus*. *Bibliographia Genetica*, 8: 295-409.
- LAMPRECHT, H., 1941. The limit between *Phaseolus vulgaris* and *P. multiflorus* from the genetical point of view. In: 7 th INT. GENET. CONGR. (Edinburgh, 1939), p. 179-80.
- LAMPRECHT, H., 1948a. The genic basis of evolution. *Agric. Hort. Genet. Landskrona*, 6: 83-6.

LAMPRECHT, H., 1948b. Zur Lösung des artsproblems. Neue und bisher bekannte ergebnisse der kreuzung *Phaseolus vulgaris* L. x *P. coccineus* L. und Reziprok. *Agr. Hort. Genet. Landskrana*, 6: 87-145.

LAMPRECHT, M., 1966. *Die entstehung der arten*. Vienna, Springer, 452 p.

LORZ, A.P., 1952. An interespecific cross involving the lima bean *Phaseolus lunatus* L. *Science*, 115: 702-3.

MAFRA, R.C., 1981. Agricultura de sequeiro no Trópico Semi-Árido. Recife, Secret. Agr. do Estado de Pernambuco/Empresa Pernambucana de Pesq. Agrop. - IPA, 56 p.

MAGALHÃES, A.A. e A.A. MILLAR, 1978. Efeito do déficit de água no período reprodutivo sobre a produção do feijão, *Pesq. Agrop. Brasileira*, 13 (2): 55-60.

MARCARIAN, V., 1981. Salt tolerance in *Phaseolus* spp. *Ann. Rep. Bean Improvement Coop.* 24: 80-1. (Apud: THOMAS, C. V., R.M. MANSHARDT e J.G. WAINES, 1983. Teparies as a source of useful traits for improving common beans. *Deserts Plants*, 5(1): 43-8.

MENDEL, G., 1866. Versuch über Pflanzenhybriden. *Verhandlungen des Natur-forschenden Vereins in Brunn*, 4: 3-47. (English translation in experiments in plant hybridization). Edinburgh, Oliver e Boyd (1965), 95 p.

- MIRANDA, P., P.R.F. de BRITO, J.B. CABRAL e M.L. PIMENTEL, 1982. Deficiência hídrica na cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - IPA. *Programa Feijão: Relatório Anual de Pesquisa 1981*. Recife, p. 1-10.
- MIRANDA, P., A.P. MEDEIROS, J.B. CABRAL, M.L. PIMENTEL, C.R. F. da ENCARNAÇÃO e D.G. da CRUZ, 1983. Deficiência hídrica na cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). In: EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - IPA. *Programa Feijão: Relatório Anual de Pesquisa 1982*. Recife, p. 1-10.
- MOHAN, S.T., 1982. Estudos preliminares de cruzamentos interespecíficos em *Phaseolus*. In: 1ª REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. *Resumos*. Goiânia, 361 p.
- MOK, D.W.S., M.C. MOK e A. RABAKOARIHANTA, 1978. Interestpecific hybridization of *Phaseolus vulgaris* with *P. lunatus* and *P. acutifolius*. *Theor. Appl. Genet.*, 52: 209-15.
- NABHAN, G.P. e R.S. FELGER, 1978. Teparies in Southwestern North America. *Econ. Bot.*, 32(1): 2-19.
- PRENDOTA, K., J.P. BAUDOIN e R. MARECHAL, 1982. Fertile allopolyploids from the cross *Phaseolus acutifolius* x *Phaseolus vulgaris*. *Bull.Rech.Agron.Gembloux.*, 17(2):177-90.

- RABAKOARIHANT, A., D.W.S. MOK e M.C. MOK, 1979. Fertilization and early embryo development in reciprocal interspecific crosses of *Phaseolus*. *Theor. Appl. Genet.*, 54: 55-59.
- RAGHAVAN, V., 1977. Applied aspects of embryos culture. In: REINERT, J. e P.S. BAJAJ. *Plant cell, tissue and organ culture*. Berlin, Springer-Verlag, p. 375-97.
- RANZANI, G., O. FREIRE e T. KINJO, 1966. *Carta de solos do Município de Piracicaba*. Piracicaba, Centro de Estudos de Solo/ESALQ/USP.
- SHIH, C.T., A. RABAKOARIHANTA, M.C. MOK e D.W.S. MOK, 1982. Embryo development in reciprocal crosses of *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus coccineus* Lam. *Theor. Appl. Genet.* 62: 59-64.
- SMARTT, J., 1970. Interspecific hybridization between cultivated american species of the genus *Phaseolus*. *Euphytica*, 19: 480-9.
- THOMAS, H., 1964. Investigation into interrelationships of *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus coccineus* Lam. *Genetica*, 35: 59-74.

- THOMAS, C.V., 1983. *Genetic, morphological and physiological studies of drought and heat resistance in tepary beans (Phaseolus acutifolius A. Gray) and common bean (P. vulgaris L.).* Riverside, University of California, 90 p. (Tese de Doutorado).
- THOMAS, C.V., R.M. MANSHARDT e J.G. WAINES, 1983. Teparies as a source of useful traits for improving common beans. *Deserts Plants*, 5(1): 43-8.
- THOMAS, C.V. e J.G. WAINES, 1980. Interespecific hibridization between *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus acutifolius*. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 23: 75-7.
- THOMAS, C.V. e J.G. WAINES, 1984. Fertile backcross and allotetraploid plants from crosses between tepary beans and common beans. *The J. Hered.*, 75: 93-8.
- TSCHERMARK-SEYSENEGG, E., 1942. Über bastarde zwischen físole (*Phaseolus vulgaris* L.) und Feuerbone (*Phaseolus multiflorus* Lam.) und ihre eventuelle praktische verwertbarkeit. *Züchter*, 14: 153-64.
- VIEIRA, C., 1967. *O feijoeiro comum: cultura, doenças e melhoramento.* Viçosa-MG, Imprensa Universitária, p. 183-8.

WALL, J.R. e T.L. YORK, 1960. Gametic diversity as an aid
to interespecific hibridization in *Phaseolus* and in *Cucur-*
bita. *Am. Soc. For Hort. Sci.*, 75: 419-28.