



Artigo original

ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E REGENERAÇÃO DE FEIJÃO NHEMBA (*VIGNA UNGUICULATA* L. WALP)

Iris M. M. Victorino¹ e Ana Lúcia R. Pinto-Sintra²

¹Universidade Eduardo Mondlane, Moçambique

²Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

RESUMO: O feijão nhemba (*Vigna unguiculata*) é uma leguminosa que constitui a base da alimentação em muitos países subdesenvolvidos e particularmente em Moçambique. Entretanto, este apresenta baixa produtividade devido essencialmente à susceptibilidade a factores abióticos e pragas e, por isso, merece especial atenção, do ponto de vista de melhoramento da cultura em si. O presente trabalho descreve a primeira tentativa de estabelecer um protocolo de transferência de genes e regeneração de plantas eficiente para uma variedade local moçambicana de feijão nhemba, mediado pelo *Agrobacterium tumefaciens*. Foram inicialmente testados 36 meios de cultura com diferentes concentrações de fitorreguladores de modo a avaliar a resposta à morfogénese dos explantes utilizados (hipocótilos, epicótilos, discos foliares e sementes). De forma a estudar e implementar um protocolo de transferência de genes, utilizou-se como gene repórter o gene *gus* da β -glucuronidase e como marcador de selecção o gene *nptII* tendo-se verificado uma baixa infectividade e/ou uma baixa competência para a transferência de genes mediada pelo *Agrobacterium* por parte dos vários tipos de explante utilizados, materializada pela quase total ausência de marcação histoquímica do *gus*. Assim sendo, é recomendado que se explore um maior número de parâmetros envolvidos no processo de co-cultura de forma a conseguir níveis mais elevados de transferência de genes e regeneração neste genótipo.

Palavras-chave: *Agrobacterium*, gene *gus*, transferência de genes, *Vigna unguiculata*

ESTABLISHMENT OF A PROTOCOL OF GENETIC TRANSFORMATION AND REGENERATION OF COWPEA (*VIGNA UNGUICULATA* L. WALP)

ABSTRACT: The cowpea (*Vigna unguiculata*) is a legume that is a staple food in many developing countries and particularly in Mozambique. However, it has low productivity mainly due to susceptibility to abiotic pests and therefore deserves special attention from the standpoint of improving the crop itself. This paper describes the first attempt to establish a protocol for genetic transformation and regeneration of plants efficient for a local Mozambican variety of cowpea mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Thirty six culture media with different concentrations of growth regulators were initially tested to evaluate the response to the morphogenesis of the explants (hypocotyls, epicotyls, leaf discs and grains). In order to study and implement a gene transfer protocol, the gene *gus* was used as the reporter gene and the selectable marker gene *nptII*. It was observed a low infectivity and low *Agrobacterium*-mediated transfer by the various types of explants tested, materialized by the almost total absence of labeling with *gus* staining. Therefore, it is recommended to explore a larger number of parameters involved in the co-culture in order to achieve higher levels of gene transfer and regeneration in this genotype.

Keywords: *Agrobacterium*, gene *gus*, gene transfer, *Vigna unguiculata*

Correspondência para: (correspondence to:) irisvictorino@gmail.com.

INTRODUÇÃO

O feijão nhemba (*Vigna unguiculata* L.) é uma leguminosa pertencente à família das Fabáceas, rica em proteínas, tolerante à seca e, dada a sua capacidade de fixação de azoto, pode ser cultivada em solos pobres, melhorando-os (LOPES *et al.*, 2001). Este, é utilizado na alimentação humana e animal, e constitui um dos alimentos básicos da alimentação da população rural e urbana em Moçambique (FERY *et al.*, 2000).

Segundo dados da FAO, estima-se que 8 dos 12,5 milhões de hectares no mundo destinados ao cultivo do feijão nhemba pertençam ao continente africano (LOPES *et al.*, 2001) - Figura 1 - de modo que esta cultura deve merecer especial atenção no que concerne ao seu melhoramento em termos agronómicos, genéticos e de produtividade.

Segundo Segeren, Oever e Compton (1994) diversos factores afectam o cultivo do feijão nhemba (condução da cultura, a qualidade da semente, os factores abióticos e bióticos - vírus, bactérias, fungos, fitoplasmas, nemátodes e insectos) sendo este último o maior limitante à produção em Moçambique.

Como forma de contornar os problemas causados pelos factores bióticos, os produtores tem optado pelo uso de herbicidas e pesticidas, muitas vezes tóxicos para o homem e para o ambiente, dispendiosos e pouco eficazes devido a tolerância que se pode gerar (FRAZÃO e SILVA, 2005). Deste modo, a utilização de variedades geneticamente resistentes a doenças e pragas torna-se a opção mais barata, eficiente e não tóxica (ODUTAYO *et al.*, 2005).

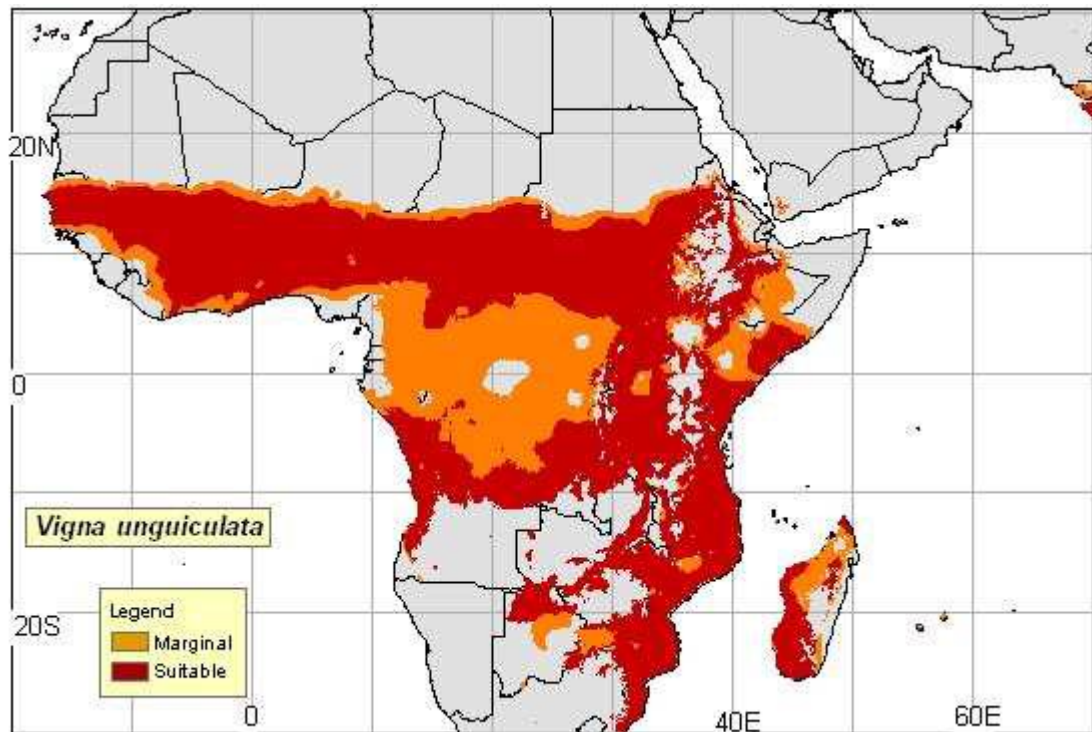


FIGURA 1: Regiões de cultivo do feijão nhemba em África. As regiões marcadas a laranja claro e escuro representam os locais pouco e mais favoráveis ao seu cultivo respectivamente. Retirado de http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Vigna_unguiculata.htm.

O feijão nhemba pode ser geneticamente modificado, expressando genes exógenos com sucesso, tornando-se uma possível fonte para a produção de substâncias bioactivas ou de importância industrial, com potencial para atrair riqueza e investimento para a região onde é cultivado (MENANCIO-HAUTEA *et al.*, 1993; MENENDEZ, HALL e GEPTS 1997; ARCHANA e JAWALI, 2007). A disponibilização de recursos com um elevado número de marcadores genéticos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (<http://phymap.ucdavis.edu/cowpea/phyma.pintro.jsp>) tem facilitado grandemente o acesso dos investigadores ao genoma deste feijão. Este importante avanço permite perspectivar uma utilização próxima de genes do seu fundo genético por engenharia genética e, desta forma, a adopção de uma abordagem cisgénica, sem qualquer DNA estranho à cultura (ROMMENS, 2004).

A Biotecnologia Vegetal reúne a Biologia Molecular e várias técnicas de cultura *in vitro* com vista a obter produtos com melhores características, quer do ponto de vista económico quer do ponto de vista genético e com o intuito de modificar geneticamente plantas de feijão vários trabalhos foram realizados, tendo no entanto, falhado devido a inexistência de sistemas eficientes de transferência de DNA e regeneração das suas plantas (McCLEAN *et al.*, 1991; VICTORINO, 2008).

O método de transferência de genes mediada pelo *Agrobacterium tumefaciens* envolve a utilização de um plasmídeo bacteriano, o plasmídeo indutor de tumores (Ti) de *A. tumefaciens*, para introduzir um ou vários genes nas células duma planta (THAKUR, SARITA e SRIVASTAVA, 2005).

Após a transferência de genes propriamente dita as plantas podem ser regeneradas por embriogénese somática - a partir de

embriões imaturos e/ ou a partir da organogénese directa da parte aérea ou a partir de calos, induzida pelo cultivo de meristemas apicais ou axilares sob altas taxas de citocininas (PERES *et al.*, 1999; LERCARI *et al.*, 1999; PERES e KERBAUY, 1999).

O feijão nhemba é um organismo diplóide, com $2n=22$ cromossomas e possui, entre as leguminosas, um dos menores genomas – aproximadamente 400 a 500 Mb (TEÓFILO, PAIVA e FILHO, 2001; ARCHANA e JAWALI, 2007). Por ser uma espécie autogâmica de genoma estável, reduz a possibilidade de “fuga” de genes para indivíduos selvagens ou para plantações circunvizinhas, e também impede a introgressão de caracteres indesejáveis (MENENDEZ, HALL e GEPTS, 1997).

A técnica de transferência de genes mediada por *Agrobacterium*, embora já reportada por alguns autores (MUTHUKUMAR *et al.*, 1996; CHOWRIRA, AKELLA e LURQUIN, 1995; KONONOWICZ, 1993, 1995, 1997) possui desvantagens como a susceptibilidade da cultura ou genótipo alvo e a elevada contaminação endógena por fungos e bactérias e carácter recalcitrante da espécie *Vigna* (COUTINHO *et al.*, 2003). No entanto, as vantagens - nomeadamente a sua fácil execução, o baixo custo, e a inserção de uma cópia única do gene nas plantas transgénicas evitando a formação de mosaicos - sobrepõem-se (LEWIN, 2000; FERRER, LINARES e GONZÁLEZ., 2000).

O presente trabalho apresenta como principal objectivo o estabelecimento de um sistema de transferência de genes e regeneração de plantas eficiente para o feijão nhemba mediado pelo *Agrobacterium tumefaciens* passando pelo ensaio com diferentes explantes com vista a identificar o tecido mais competente para a regeneração de plantas, em paralelo com o ensaio de diferentes composições do meio de cultura.

MATERIAIS E MÉTODOS

As sementes de *Vigna unguiculata* variedade 1T-18 foram cedidas pelo Ministério de Agricultura em Moçambique.

Foram utilizadas quatro estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1, LBA4404, LBA2915 e EHA105) com o plasmídeo p35S GUSINT, o qual contém o gene nptII, codificante da neomicina fosfotransferase II, que confere resistência à canamicina e o gene gus, codificante da β -glucuronidase, funcionando como marcador repórter; como o gene gus possui um intrão de origem vegetal, este só será expresso no interior das células eucariotas.

Desinfecção, Esterilização e Germinação do Material Vegetal

As sementes foram passadas por álcool etílico a 70% (v/v) durante cerca de dois minutos, seguida de imersão em solução lixiviada (1:5) com 1-2 gotas de Tween-20, durante cerca de 30 minutos, sob agitação manual. A partir daí, o processo decorreu na câmara de fluxo laminar, com as lavagens com água destilada esterilizada (3x). Após a desinfecção, 100 sementes

foram dispostas nas placas de Petri com meio MS e mantidas a 24 °C ($\pm$ 2°C) com fotoperíodo de 16 horas.

Outras 100 sementes foram colocadas sob uma camada de algodão embebido em água, no escuro, durante 5 dias. Findo este período, transferiu-se cada pé para areia para que continuasse o seu desenvolvimento. Após atingir as dimensões julgadas necessárias, eliminaram-se as raízes das plântulas, sendo então lavadas em abundante água corrente e seguidamente desinfetadas pelo processo acima descrito.

Meios de Cultura

Para a germinação das sementes, utilizaram-se os macros, micronutrientes e vitaminas de Murashige e Skoog (1962), suplementado com sacarose a 3% e agar a 0,7 %.

Para a indução da morfogénese nos vários explantes de feijão nhemba, utilizou-se também o meio base de Murashige & Skoog (1962), suplementados com caseína hidrolisada 0,1 %, glutamina 0,1 %, sacarose a 3%, agar a 0,7 % e 36 combinações de seis diferentes concentrações de BAP com seis de 2,4-D (Tabela 1).

TABELA 1: Combinações das diferentes concentrações de BAP e 2,4-D utilizadas.

		Sem citocininas	BAP				
	[mg/l]	0	1	2	3	4	5
Sem auxinas	0	MC1	MC2	MC3	MC4	MC5	MC6
2,4-D	1	MC7	MC8	MC9	MC10	MC11	MC12
	2	MC13	MC14	MC15	MC16	MC17	MC18
	3	MC19	MC20	MC21	MC22	MC23	MC24
	4	MC25	MC26	MC27	MC28	MC29	MC30
	5	MC31	MC32	MC33	MC34	MC35	MC36

Indução de Morfogénese

Utilizaram-se inicialmente vários tipos de explantes: folhas cotiledonares inteiras feridas com bisturi ou discos foliares, cotilédones, hipocótilos e epicótilos (geralmente fragmentados), resultantes das germinantes obtidas nas placas com meio MS. Esses explantes foram inoculados nas placas de Petri com os 36 meios de cultura já descritos, com 3 repetições por meio de cultura, num total de 144 placas. As culturas mantiveram-se a 24 °C ($\pm 2^\circ$ C), com fotoperíodo de 16 horas de luz, durante 4 semanas para indução de morfogénese.

Numa segunda fase, inocularam-se apenas discos foliares obtidos a partir das plântulas que se desenvolveram na areia. Os discos foliares foram inoculados em placas contendo os 36 meios de cultura, nas condições já descritas, excepto que permaneceram 2 x 8 semanas nos meios de indução.

Transferência de Genes Mediada pelo *A. tumefaciens*

Pré-cultura dos explantes: os discos foliares foram inoculados em placas de Petri com 15 cm de diâmetro contendo meio MS suplementado com 5 mg/l de 2,4-D, onde permaneceram durante 48 horas a 24 °C ($\pm 2^\circ$ C) com fotoperíodo de 16 horas.

Preparação das suspensões bacterianas: colocaram-se as 4 estirpes bacterianas a crescer em meio YEB líquido suplementado com rifampicina e canamicina, ambos a 50 mg/l, a 24 °C ($\pm 2^\circ$ C) e 160 rpm.

Cocultura: colocaram-se 100 µl de suspensão sobre cada disco foliar, contendo cada placa uma das estirpes bacterianas. A imersão dos explantes durou cerca de dez minutos, após o que se removeu o excesso de suspensão com papel de filtro estéril. O material foi

mantido durante 72 horas nas mesmas placas.

Deteção da Expressão Transiente da β -Glucuronidase

Após 24, 48 e 72 horas de cocultura, procedeu-se à detecção da expressão transiente do gene *gus* através da análise da actividade da β -glucuronidase. Para o efeito, imergiram-se os discos foliares em *X-gluc* durante 16-24 horas, a 37 °C. Após este período, removeu-se o *X-gluc* e fizeram-se várias lavagens com álcool a 70° até à remoção completa da clorofila.

Análise de dados

A análise de dados baseou-se na observação directa de explantes registando-se o número de explantes regenerados e não regenerados em forma de percentagem. Para além desta análise efectuou-se uma análise estatística dos discos foliares que apresentavam a cor azul, indicativo da transformação, mediante dados comparativos relativos à presença e/ou ausência de marcação histoquímica.

RESULTADOS

As sementes de feijão nhemba da variedade 1T-18 apresentavam uma morfologia e coloração heterogéneas entre si (Figura 2A). Após a introdução *in vitro*, as sementes evidenciaram uma elevada contaminação de origem endógena, associada a uma forte fenolização e baixa germinação, na maior parte das placas (Figura 2B), embora também se tenha observado alguma germinação *in vitro* (Figura 2C), quantificada no gráfico da Figura 2D.

A elevada contaminação do material germinado *invitro* conduziu ao ensaio de alternativas ao processo de germinação. A germinação em areia (Figura 3A) proporcionou melhores resultados que a germinação em terra (Figura 3BC), ao permitir uma maior percentagem de germinação (Figura 3D).

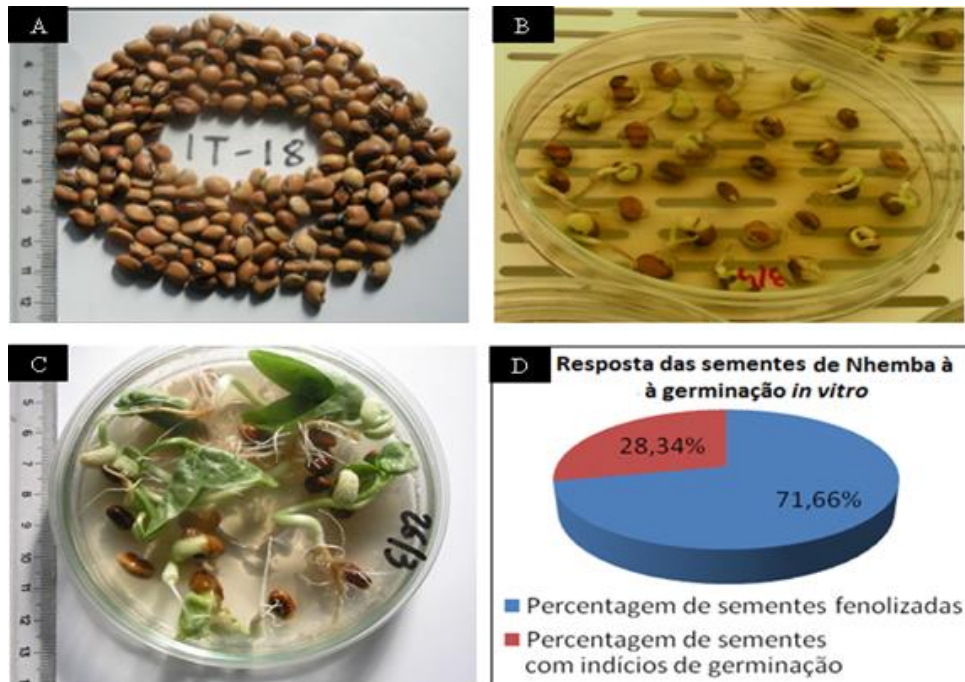


FIGURA 2: Heterogeneidade na morfologia e na germinação das sementes da variedade IT-18 de feijão nhemba. **A.** Aspecto geral das sementes demonstrando a diferença na morfologia e coloração das sementes do lote em estudo. **B.** Fase inicial da germinação das sementes nas placas com meio MS. **C.** Germinantes de nhemba nas placas com meio MS. **D.** Resposta das sementes de nhemba à germinação em meio MS.

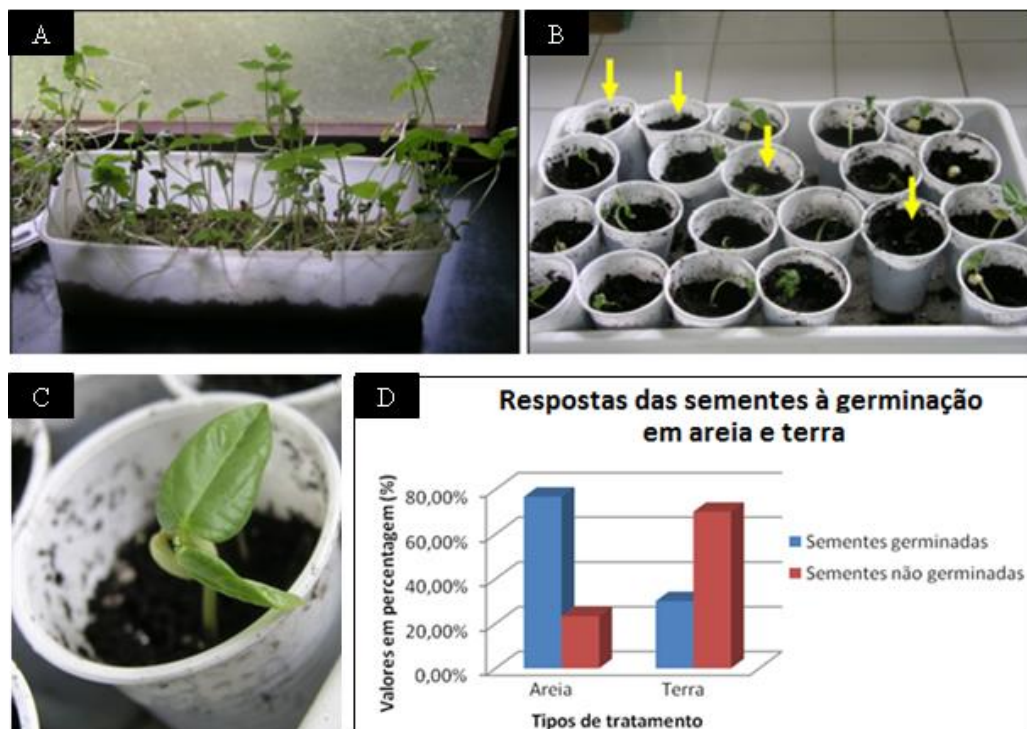


FIGURA 3: Germinação de sementes de nhemba em areia e terra. **A.** Aspecto das germinantes obtidas em areia. **B-C.** Aspecto das germinantes obtidas em terra. É notório o atraso no desenvolvimento das germinantes em terra (comparativamente às germinantes obtidas em areia, no mesmo período de tempo), bem como a ausência de germinação (setas amarelas). **C.** Pormenor de uma germinante obtida em terra. **D.** Resposta das sementes de nhemba à germinação em areia e em terra.

O ensaio com discos foliares de germinantes obtidas em areia, submetidas a desinfecção prévia, permitiu ultrapassar parte dos problemas associados com o mau estado sanitário das sementes: embora as perdas por contaminação fossem mais reduzidas, foram ainda acima do desejável. A calogénese ocorreu com alguma rapidez mas não foi possível encontrar uma relação entre a concentração e tipo de reguladores de crescimento presentes e o tipo de calos formados, embora os meios com 2,4-D tenham proporcionado os melhores resultados. Os calos formados foram classificados em duas categorias conforme descrito na Tabela 2.

Dos ensaios com *X-gluc* verificou-se que 60% dos discos foliares foram descartados por se encontrarem em mau estado, 25% estavam ainda em bom estado mas não mostraram marcação azul após 7 dias de incubação, e 15% mostraram uma tênue marcação azul (Tabela 3).

Decorrido o tempo previsto para a realização da experiência, não se verificou nenhuma alteração nos calos pelo que se recomenda que a experiência seja repetida num intervalo maior de tempo para se poder verificar a regeneração da planta a partir do calo.

TABELA 2: Classificação dos diferentes calos obtidos durante o ensaio dos 36 meios de cultura. Verificou-se a presença de calos friáveis e com aspecto de flocular e outros mais rígidos de tonalidade variável.

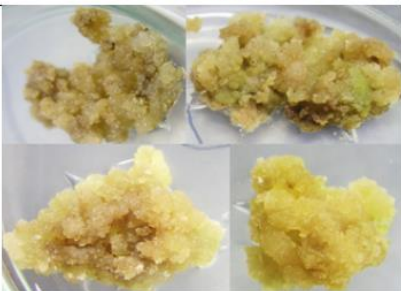
Categoria	Exemplos	Aspectos importantes
Calos com interesse do ponto de vista morfológico		Cor variável Nodulares Estrutura granular Consistência mole
Calos amorfos sem interesse do ponto de vista morfológico		Cor variável Aspecto friável e/ou cristalizado Consistência dura

TABELA 3: Resposta à transformação genética dos discos foliares. Verificou-se que apenas 3 discos foliares mostraram tênue marcação azul.

Parâmetros avaliados	Observações
Número de discos foliares com marcação azul	3 (15%)
Número de discos foliares sem marcação azul	5 (25%)
Número de discos foliares em mau estado	12 (60%)
Número total de discos	20 (100%)

DISCUSSÃO

De forma geral o principal objectivo do trabalho foi alcançado uma vez que pela primeira vez conseguiu estabelecer-se um protocolo de transferência de genes e regeneração de plantas para uma variedade local moçambicana de feijão nhemba, mediado pelo *Agrobacterium tumefaciens*. No entanto, como referido anteriormente, o feijão nhemba apresenta elevada taxa de contaminação por fungos e bactérias e isto foi verificado também neste trabalho. Coutinho *et al.* (2003) também reportaram este facto ao trabalhar com sementes de feijão vulgar. No entanto, algumas sementes foram capazes de originar rebentos evidenciando o comportamento diferenciado numa variedade dentro de um mesmo lote.

Apesar de não ter sido feita a avaliação da composição do solo e da areia, verificou-se germinação em ambas com diferentes graus tendo sido a germinação mais eficaz em areia tal como Silva *et al.* (2007) reportam. Existem infecções específicas da fase de armazenamento das sementes conforme referido por Menten (1991) o que poderá ter contribuído para o insucesso da germinação de algumas sementes. É de se referir que apesar da elevada taxa de contaminação endógena, também se verificou que as sementes apresentavam boa qualidade fisiológica, já que se obtiveram bons níveis de germinação em areia.

Contrariamente a muitos autores que utilizaram com sucesso as sementes como explante para regeneração de feijão nhemba (SAINI E JAWAL, 2005; ODUTAYO *et al.*, 2005; POPELKA *et al.*, 2006; OLIVEIRA, BENBADIS e CARVALHO 2006; AZEVEDO, HOULLOU e BENKO., 2007; BHOMKAR *et al.*, 2008) nesta experiência pôde-se concluir que o melhor tipo de explante para o processo foram os discos foliares uma vez que com estes eliminou-se o problema da contaminação (repetidamente obtida nas

sementes). A partir dos discos foi possível obter-se calo que contrariamente ao epi e hipocótilo, sofreram menor oxidação pelos compostos fenólicos. No entanto, após a imersão em álcool etílico a 70% estes sofreram oxidação o que pode ter dificultado a posterior o processo regenerativo pós transformação.

Dos 36 meios testados, todos se mostraram adequados a morfogénese uma vez que na maior parte deles houve formação de calos ainda que com diferentes taxas.

Foi referido por Oliveira, Benbadis e Carvalho (2006) que o BAP sozinho não cumpre o papel de indutor de formação de calos, mas, no entanto os explantes regeneram positivamente na sua presença. As placas que não continham 2,4-D apresentaram calos necróticos, mesmo com concentrações elevadas de BAP, o que mostra que não basta a presença de BAP para que ocorra a regeneração. A presença de 2,4-D também actua e até se pode dizer que tem maior importância pois nos meios sem BAP, mas com 2,4-D (incluindo baixas e elevadas concentrações), se verificou a formação de calos. Exemplos disso, foram as placas com 1 mg/l de 2,4-D, com 2 mg/l de 2,4-D e 1 mg/l de BAP, com 3mg/l de 2,4-D e sem BAP, com 4 mg/l de 2,4-D e sem BAP e por último com apenas 5 mg/l de 2,4-D.

Também se verificou a formação de calos na sua maioria friáveis e alguns do tipo “flocos de algodão” o que dá a ideia de que existia uma elevada taxa endógena de auxinas no próprio feijão, pois Coutinho *et al.* (2003) verificaram anteriormente que este factor podia ser apontado como fundador deste tipo de calos.

A eficiência da transformação pode ser avaliada com base no PCR ou através de testes histoquímicos. Segundo Pinto-Sintra (2001), por vezes os explantes não mostram a cor azul no teste histoquímico sugerindo que não houve inserção do gene apesar de a amplificação por PCR indicar a

presença deste. Noutros casos, a eficiência da transformação pode ser afectada pelas características da própria estirpe de *A. tumefaciens*. Nesta experiência observou-se uma ligeira marcação azul apenas nos discos inoculados com as estirpes LBA 2915 e LBA 4404 facto que sugere que possa existir falta de competência das células do feijão nhemba, no genótipo alvo portanto, na aquisição de novos genes. Um maior período de co-cultura dos explantes ou o uso de outro tipo de explante também poderão ajudar a realçar a marcação. Por outro lado, pode também ocorrer uma fraca susceptibilidade do nhemba ao método utilizado contrariamente ao decrito por Trinca *et al.*, 1991; Hooykaas e Shilperoort, 1992; Torres *et al.*, 2000; Saini e Jaiwal, 2005; Popelka *et al.*, 2006 e Chaudhury, 2007 no género *Vigna* e noutras espécies também consideradas recalcitrantes como o *Vigna unguiculata*.

O facto de as folhas do feijão nhemba não suportarem uma exposição prolongada à bactéria degradando-se precocemente também sugere que ainda é necessário um estudo mais aprofundado no que concerne a optimização dos parâmetros de regeneração após a transformação de feijão nhemba.

AGRADECIMENTOS

Especial agradecimento ao IPAD (Instituto Português de Apoio ao Desenvolvimento) que em conjunto com o MESCT (Ministério do Ensino Superior, Ciência e Tecnologia - actual Ministério da Ciência e Tecnologia em Moçambique) tornaram este projecto de pesquisa realidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCHANA, V.; JAWALI N. Genetic variation and relatedness in *Vigna unguiculata* revealed by microsatellites. **BARC Newsletter**, n. 285, 2007.

AZEVEDO, H; HOULLOU-KIDO, L; BENKO-ISEPPON, A. Análise do

Potencial Regenerativo *in vitro* de Diferentes Cultivares de Feijão-Caupi. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v.5, supl. 2, p. 528-530, 2007.

BHOMKAR, P. *et al.* Salt stress alleviation in transgenic *Vigna mungo* L. Hepper (blackgram) by verexpression of the glyoxalase I gene using a novel Cestrum yellow leaf curling virus (CmYLCV) promoter. **Molecular Breeding**, 2008.

CHAUDHURY, D. Agrobacterium tumefaciens-mediated high frequency genetic transformation of an Indian cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivar and transmission of transgenes into progeny. **Plant Science**, v. 172, p. 692-700, 2007.

CHOWRIRA, G.; AKELLA, V.; LURQUIN, P. Electroporation mediated gene transfer into intact nodal meristems in plants. **Molecular Biotechnology**, v. 3, p. 17-23, 1995.

COUTINHO, M. *et al.* Regeneração de plantas de feijão azuki (*Vigna angulgaris*) via organogénese directa. **Circular Técnica-Brasília**, v. 27, p. 1-10, 2003.

FERRER, E.; LINARES, C.; GONZÁLES J. Efficient transient expression of the bglucuronidase reporter gene in garlic (*Allium sativum* L.). **Agronomie**. v. 20, p. 869-874, 2000.

FERY, R. *et al.* Descritores para feijão-frade ou caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Biodiversity International**, 2000.

FRAZÃO, H.; SILVA, J. **Tolerância de cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) a herbicidas pós-emergentes**. Manaus: Universidade Federal da Amazônia, 2005.

HOOYKAAS, P.; SHILPEROORT, R. Agrobacterium and plant genetic engineering. **Plant Molecular Biology**, v. 19, p.15-38, 1992.

- KONONOWICZ, A. Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) using microprojectile bombardment and *Agrobacterium tumefaciens* infection. **Plant Physiology**, v. 102, p. 945, supl., 1993.
- KONONOWICZ, A. Developing a transformation system for cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). World Cowpea Conference, 2, 1995. Accra. 1995.
- KONONOWICZ, A. Development of transformation system for cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) In: SINGH, D. R. *et al.* (ed). **Advances in cowpea Research**, p. 361-371. 1997.
- LERCARI, B. *et al.* Photomorphogenic control of shoot regeneration from etiolated and light-grown hypocotyls of tomato. **Plant Science**, v. 140, p. 53-64, 1999.
- LEWIN, B. **Genes VII**. Oxford: Oxford University Press, 2000. 990 p.
- LOPES, A. *et al.* Variabilidade e correlações entre caracteres agronômicos em caupi (*Vigna unguiculata*). **Pesquisa agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 36, n. 3, p. 515-520, 2001.
- MCCLEAN, P. *et al.* Susceptibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Agrobacterium* infection: transformation of cotyledonary and hypocotyls tissues. **Plant Cell Tissue Organ Cultivation**. v. 23, p. 131-138, 1991.
- MENANCIO-HAUTEA, D. *et al.* Comparative genome analysis of mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walpers) using RFLP mapping data. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 86, p. 797-810, 1993.
- MENENDEZ, C.; HALL, A.; GEPTS, P. A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. **Theoretical and Applied Genetics**, p. 1210-1217, 1997.
- MENTEN, J. Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. In: _____. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1991. P. 115-136.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, p. 473-497, 1962.
- MUTHUKUMAR, B. *et al.* Genetic transformation of cotyledon explants of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Repository**, p. 980-985, 1996.
- ODUTAYO, O. *et al.* 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.
- OLIVEIRA, V.; BENBADIS A.; PINTO-CARVALHO A. Avaliação da regeneração in vitro de explantes de caupi e soja. **Revista Ciência Agronômica**. v.37, n.2, 2006. 153-159 p.
- PERES, L. *et al.* Effects of auxin, cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-cytokinin ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae) into buds. **Journal of Plant Physiology**, p. 551-555, 1999.
- PERES, L.; KERBAUY G. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl (Orchidaceae). **Plant Cell Repository**, p. 1002-1006, 1999.

- PINTO-SINTRA, A. **Contribuição para o estudo das condições de cultura in vitro e bases para a transferência de genes em castas durienses de Vitis vinífera**. Vila Real: UTAD, 2001. (Tese Doutorado, UTAD, 2001).
- POPELKA, J. *et al.* Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny. **Plant Cell Repository**, p. 304-312, 2006.
- ROMMENS, C. M. All-native DNA transformation: a new approach to plant genetic engineering. **Trends in Plant Science**, p. 457-464, 2004.
- SAINI, R.; JAIWAL, P. Transformation of a recalcitrant grain legume, Vignamungo L. Hepper, using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to shoot apical meristem cultures. **Plant Cell Repository**, p. 164-171, 2005.
- SEGEREN, P.; OEVER, R.; COMPTON, J. **Pragas, Doenças e Ervas Daninhas nas Culturas Alimentares em Moçambique**. Maputo: Instituto Nacional de Investigação Agronómica, 1994.
- SILVA G. *et al.* **Germinação de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) oriundas dos estados da Paraíba, Ceará, Piauí e Maranhão**. 2007.
- TEÓFILO, E.; PAIVA, J.; FILHO, S. Polinização artificial em feijão Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Ciências Agrotécnicas**. Lavras, v.25, n.1, p. 220-223, 2001.
- THAKUR, K.; SARITA, S.; SRIVASTAVA, D. Plant regeneration and genetic transformation studies in petiole tissue of Himalayan poplar (*Populus ciliata* Wall). **Current Science**, v. 89, n. 4, p. 664-668, 2005.
- TORRES, A. *et al.* Transformação genética da batata cultivar Achat via *Agrobacterium tumefaciens*. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v. 18, n. 1, p. 41-45, 2000.
- TRINCA, S. *et al.* Transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) leaf disc using *A. tumefaciens* transfer DNA sequences coding for lytic peptides. **Molecular methods for potato improvement**. Lima, 1991. 188p.
- VICTORINO, I. **Estabelecimento de um sistema de transformação e regeneração de feijão nhemba (*Vigna unguiculata* L. Walp)**. Vila Real: UTAD. Trabalho de Conclusão de Curso de Licenciatura. 2008.

Sites

http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Vigna_unguiculata.htm. Acessado a 19 de Junho de 2008.

http://phymap.ucdavis.edu/cowpea/phyma_pintro.jsp. Acessado a 22 de Março de 2013