
Biotecnologia

Valdomiro Aurélio Barbosa de Souza
Carlos Antônio Fernandes Santos

Introdução

Os métodos clássicos de melhoramento de plantas foram desenvolvidos com base na manipulação de genes e cromossomos, por meio da reprodução sexual da planta e seguindo os princípios básicos da genética mendeliana. No entanto, foi somente a partir da expansão dos conhecimentos em genética quantitativa que os impactos do melhoramento tornaram-se expressivos. Posteriormente, o desenvolvimento do conhecimento em outras áreas da genética, como a poliploidia, a indução de mutação, a incompatibilidade e a macho esterilidade, também contribuiu para o aperfeiçoamento dos métodos de melhoramento existentes e para o desenvolvimento de novos métodos (Fehr, 1987; Borém, 1998; Poehlman & Sleper, 1995; Lee, 1995).

A contribuição do melhoramento clássico ou convencional para o aumento da produtividade das principais culturas tem sido bem documentada na literatura (Duvick, 1986; Lee, 1995; Vuylsteke et al., 1997; Borém, 1998). Por exemplo, para a maioria das culturas de grãos, o aumento contínuo de produtividade vem sendo alcançado desde a década de 30, e aproximadamente 50% dos ganhos são atribuídos ao aumento do potencial genético das cultivares. Além do aumento da produtividade, o melhoramento genético clássico tem conseguido realizar transformações significativas em outras características importantes, como qualidade, hábito de crescimento e adaptação a ambientes altamente adversos (Fehr, 1987; Lee, 1995; Poehlman & Sleper, 1995; Vuylsteke et al., 1997; Borém, 1998). Contudo, existem vários fatores que têm limitado a manutenção ou a melhoria dos níveis atuais desses ganhos pelo melhoramento clássico, podendo ser citados, entre eles, o baixo nível de conhecimento sobre a resposta à seleção em nível genotípico e a base biológica dessa resposta (Lee, 1995), a ligação gênica e a auto-incompatibilidade, além da dificuldade ou mesmo impossibilidade de cruzamentos entre espécies não-relacionadas (incompatibilidade sexual) (Brasileiro & Dusi, 1999; Altman, 1999). Outro problema, resultante das modernas práticas na agricultura, nas quais é enfatizada a máxima produtividade associada à alta qualidade e à uniformidade do produto, é a redução da diversidade genética do *pool* gênico, para a maioria das espécies cultivadas (Lee, 1995; Brasileiro & Dusi, 1999).

Grande parte do sucesso do melhoramento genético vem sendo obtido sem o emprego dos conhecimentos sobre a biologia da planta.

Lee (1995) relata que, embora muitas informações estivessem disponíveis, não eram utilizadas, porque ou eram irrelevantes ou muito difíceis de ser incorporadas aos programas de melhoramento. Informa ainda que fenômenos biológicos de supra-importância para o melhoramento, como a heterose, a epistasia, a interação patógeno x hospedeiro e a resposta a estresses abióticos, não têm sido apropriadamente empregados pela maioria dos melhoristas de plantas.

O avanço do conhecimento em Biotecnologia, por sua vez, se adequadamente utilizado, pode contribuir bastante para o melhoramento genético clássico e, conseqüentemente, para o aumento da produção de alimentos (Altman & Ziv, 1997; Borlaug, 1997; Woodson, 1997; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Altman, 1999). "Biotecnologia" é, normalmente, conceituada como "um conjunto de técnicas que têm como base principal análises bioquímicas e manipulações, que podem ser utilizadas em qualquer estudo biológico" (King & Stansfield, 1990). O rápido e o crescente desenvolvimento de técnicas em Biotecnologia vem sendo um instrumento moderno e eficaz na manipulação da variação genética, e sua utilização permite oferecer em curto e médio prazos benefícios socioeconômicos bem mais significativos que as metodologias tradicionalmente utilizadas (Paterson et al., 1991; Christou, 1994; Ortiz & Vuylsteke, 1996; Woodson, 1997; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Ortiz, 1998; Altman, 1999).

Cronologicamente, é possível dividir a Biotecnologia Vegetal em três fases.

A primeira fase teve início com o surgimento da propagação de plantas por meio da cultura de tecidos. As técnicas de cultura de tecidos têm sido amplamente utilizadas:

- Na multiplicação de plantas de várias espécies (Ferreira et al., 1998; Grattapaglia & Machado, 1998), entre as quais o dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Duval et al., 1988; Rival et al., 1997, 1998; Ferry et al., 1998), o eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (Carvalho et al., 1996; Chang & Yang, 1995; Yang et al., 1996a, 1996b) e a bananeira (*Musa* spp.) (Ortiz & Vuylsteke, 1996; Oliveira et al., 1997; Crouch et al., 1998; Vuylsteke, 1998), além de espécies olerícolas e ornamentais (Lozoya-Saldaña et al., 1996; Woodson, 1997; Altman & Ziv, 1997).

- No manejo e na conservação de germoplasma (Mendes & Goes, 1996; Izquierdo & Roca, 1998; Withers & Williams, 1998).
- Na obtenção de plantas haplóides (Bjornstad et al., 1993; Feng & Wolyn, 1993; Barceló et al., 1994; Moraes-Fernandes et al., 1999; Peters et al., 1999).
- Na eliminação de doenças por meio do cultivo de meristemas *in vitro* (Lozoya-Saldaña et al., 1996; Crouch et al., 1998; Torres et al., 1998b).
- Na quebra de barreiras de incompatibilidade genética entre espécies não-relacionadas, por meio da cultura de protoplastos, permitindo a transferência de genes entre essas espécies (Brown et al., 1987; Bates et al., 1988; Dhir et al., 1992; Carneiro et al., 1998).

A segunda fase da Biotecnologia surgiu na década de 80, com o advento das técnicas de marcadores moleculares, cujas principais aplicações no melhoramento de plantas são: a caracterização de germoplasma; a orientação e a seleção de cruzamentos; o monitoramento da variabilidade genética; a seleção assistida por marcadores; e a proteção de cultivares (Andersen & Fairbanks, 1990; Hill et al., 1990; Rafalski & Tingev, 1993; Nybom, 1994; Lee, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998a). Além disso, os marcadores moleculares são aplicados no mapeamento genético e na prospecção e na clonagem de genes de interesse econômico (Hill et al., 1990; Rafalski & Tingev, 1993; Lee, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A terceira fase teve início com o surgimento da engenharia genética e das plantas transgênicas (Carneiro & Paiva, 2000), as quais foram rapidamente adotadas por um grande número de agricultores, em várias partes do mundo (Skerritt, 2000). A variabilidade genética existente na natureza é a matéria-prima que o melhorista de plantas utiliza e da qual depende para desenvolver novas cultivares. Assim, a possibilidade de engenheirar ou transformar plantas permite ao melhorista ter acesso a um novo e variado *pool* gênico, que não estaria disponível por meio do melhoramento clássico (Aragão et al., 1998; Brasileiro & Dusi, 1999).

Em síntese, o desenvolvimento de cultivares cada vez mais produtivas e adaptadas às mais diversas condições de cultivo, que têm sido tradicionalmente obtidas por meio do melhoramento genético clássico,

pode ser intensamente acelerado com a incorporação, nos programas, das várias técnicas disponíveis em biotecnologia (Hill et al., 1990; Nybom, 1994; Rafalski & Tingev, 1993; Lee, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Altman, 1999; Izquierdo & Riva, 2000).

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.), espécie largamente adaptada às mais diversas condições, é uma importante fonte de carboidratos, especialmente para as populações dos trópicos, conforme Nielsen & Hall (1985), Ntare & Williams (1993), Warrag & Hall (1983) e Singh et al. (2002), ocupando uma área aproximada de 11 milhões de hectares em todo o mundo (Singh et al., 2002). Aproximadamente dois terços da produção e três quartos da área cultivada com feijão-caupi localizam-se na África; a cultura, porém, apresenta áreas de produção significativas também na América do Sul, especialmente no Nordeste brasileiro, na Ásia e no Sudeste e no Sudoeste dos Estados Unidos (Fary, 1990; Ehlers & Hall, 1997). É uma espécie que, pelos seus atributos superiores – em termos nutricionais, versatilidade, adaptabilidade e produtividade –, foi escolhida pela Nasa como uma das culturas de interesse para estudos sobre cultivo em estações espaciais (Ehlers & Hall, 1997).

Em termos gerais, os principais objetivos dos programas de melhoramento do feijão-caupi ao redor do mundo envolvem resistência múltipla a doenças e pragas, resistência a nematóides, melhoria das características de grãos, porte, tolerância ao calor, ao frio e à seca (Ehlers & Hall, 1997). No Brasil, o melhoramento dessa cultura tem como objetivos principais: aumentar a produtividade e melhorar a qualidade visual, culinária e nutricional dos grãos; aumentar a adaptabilidade, a estabilidade e a tolerância a estresses hídricos; melhorar a arquitetura da planta; incorporar resistência múltipla a doenças; incorporar resistência a insetos; desenvolver cultivares com grãos de cor verde persistente após a secagem; e desenvolver cultivares para processamento industrial (Freire Filho et al., 1999).

Desse modo, tanto em âmbito mundial quanto em nacional, a realização desses objetivos pode ser amplamente facilitada e abreviada com o emprego das técnicas em Biotecnologia atualmente disponíveis, como mais uma ferramenta de apoio. Assim, pretende-se, com este capítulo, discorrer sobre as principais técnicas biotecnológicas, enfatizando a aplicabilidade dessas técnicas ao melhoramento genético de plantas, bem como sobre suas perspectivas de uso no melhoramento do feijão-caupi.

Principais técnicas em biotecnologia

Cultura de tecidos

O termo “cultura de tecidos” é uma denominação genérica que engloba as várias técnicas de cultivo *in vitro*, quais sejam: cultura de células isoladas; cultura de ápices caulinares; cultura de embrião; cultura de óvulos; cultura de anteras; cultura de protoplastos; além da micropropagação e microenxertia. Consiste no cultivo de tecidos embrionários, fragmentos de tecidos, calos, células isoladas ou protoplastos em um meio de cultura, em condições assépticas, e sua subsequente regeneração em plantas funcionais (Mantell et al., 1994; Poehlman & Sleper, 1995; Ferreira et al., 1998; Grattapaglia & Machado, 1998; Torres et al., 1998a, 1998b).

A capacidade de as células vegetais não-diferenciadas regenerarem plantas funcionais, quando apropriadamente cultivadas *in vitro*, é conhecida como “totipotência” (Krikorian & Berquam, 1969). O potencial de regeneração depende do tipo de planta, do órgão utilizado e do seu estágio de desenvolvimento. Órgãos jovens são mais suscetíveis à regeneração do que órgãos maduros, significando dizer que, à medida que a especialização se processa durante o desenvolvimento do órgão ou da planta, a desprogramação gênica (desdiferenciação) torna-se mais difícil (Vieira, 1993; Mantell et al., 1994; Poehlman & Sleper, 1995; Grattapaglia & Machado, 1998).

Os avanços dos conhecimentos sobre a capacidade de regeneração dos tecidos vegetais têm permitido que a técnica da cultura de tecidos funcione como um instrumento de auxílio importante na domesticação e no melhoramento das espécies vegetais (Poehlman & Sleper, 1995; Ferreira et al., 1998). Procedimentos aceitáveis de rotinas *in vitro* para a regeneração de plantas têm sido desenvolvidos para algumas espécies-modelo, como: tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), alfafa (*Medicago sativa* L.), cana-de-açúcar (*Sacharum officinarum* L.), arroz (*Oryza sativa* L.) e várias espécies hortícolas, muitas das quais são prontamente propagadas por meios vegetativos. Já para outras espécies de grande importância, tais como o milho (*Zea mays* L.), o sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.), o algodão (*Gossypium* sp.), a soja (*Glycine max* (L.) Merrill, as gramíneas forrageiras e as leguminosas, em geral, tem sido difícil o desenvolvimento de técnicas de regeneração que possam ser utilizadas rotineiramente (Poehlman & Sleper, 1995).

O sucesso na regeneração de plantas por meio de cultura de tecidos varia de acordo com: a espécie, o genótipo dentro da espécie, a natureza e a condição fisiológica da fonte do tecido cultivado (explante) e a idade e os estados nutricional e fitossanitário da planta-matriz. Varia também conforme o meio de cultura, os fitorreguladores utilizados e os fatores ambientais, como temperatura, fotoperíodo de incubação e intensidade da fonte de luz, além da interação desses fatores (Vieira, 1993; Mantell et al., 1994; Assis & Teixeira, 1998; Carneiro et al., 1998; Grattapaglia & Machado, 1998). Em consequência, aumenta o grau de dificuldade para a manipulação das várias técnicas, que é variável de espécie para espécie e de ambiente para ambiente (Vieira, 1993; Mantell et al., 1994). A regeneração de uma nova planta tanto pode processar-se a partir de fragmentos de tecidos maduros (folhas, caules, embriões, etc.) como de tecidos meristemáticos, constituídos por células em processo de divisão, e localizados, geralmente, nos ápices de caules e em raízes em crescimento. O baixo grau de diferenciação das células, associado à sua maior estabilidade genética, faz dos ápices meristemáticos uma das principais fontes de explantes (Torres et al., 1998b).

Após a desinfestação ou assepsia das superfícies externas, os explantes são transferidos para um meio de cultura, que consiste de uma mistura balanceada de macro- e micronutrientes (sais minerais), aminoácidos, vitaminas e uma fonte de carbono. A essa mistura balanceada, acrescenta-se uma fonte de auxina e outra de citocinina, em proporções apropriadas aos objetivos desejados (formação de calos, formação de raízes, regeneração e/ou alongamento caulinar). A solidificação do meio para efeito de sustentação do material em cultivo é obtida pela adição de ágar. Gemas vegetativas e mesmo florais, raízes e embriões somáticos poderão formar-se tanto diretamente do explante quanto indiretamente (via proliferação celular ou calos) (Mantell et al., 1994; Caldas et al., 1998; Grattapaglia & Machado, 1998; Torres et al., 1998a, 1998b).

Os componentes do meio de cultura são fundamentais para o sucesso da cultura de tecidos (Caldas et al., 1998). O meio de cultura geralmente contém sais inorgânicos, açúcar como fonte de carbono e vitaminas para manter altas taxas de crescimento. Fitormônios, como auxinas e citocininas, são adicionados para controlar o crescimento e a divisão celular. A proporção de auxina para citocininas tem um importante papel na iniciação dos primórdios de caule e raízes. De um modo geral, os balanços hormonais

mais favoráveis às auxinas promovem a formação de embriões e primórdios de raízes e, quando favoráveis às citocininas, induzem a formação de gemas. Quando a proporção é intermediária, ocorre a divisão contínua e desorganizada (não-diferenciada) das células, formando o calos (Mantell et al., 1994; Caldas et al., 1998). A formulação ótima do meio de cultura varia conforme a espécie, o genótipo dentro da espécie e a origem e a idade dos tecidos cultivados. Do mesmo modo, o meio de cultura, quer seja líquido quer solidificado em ágar, pode variar de acordo com a espécie e o ambiente de cultivo (Franklin & Dixon, 1994; Caldas et al., 1998). Refinamentos dos componentes de meios de cultura e das condições de cultivos têm possibilitado o sucesso da cultura de tecidos em um vasto número de espécies de plantas cultivadas (Finer, 1994; Franklin & Dixon, 1994; Caldas et al., 1998).

A formação de plântulas é iniciada por meio da indução de caules adventícios, de embriões somáticos ou de gemas axilares (Mantell et al., 1994; Caldas et al., 1998; Torres et al., 1998a, 1998b; Grattapaglia & Machado, 1998). Caules adventícios ou embriões somáticos podem ser originados do calos ou diretamente do explante. Embriões somáticos, do mesmo modo que embriões formados pela união sexual dos gametas, têm, ambos, ápices para formação do caule e raízes presentes e podem desenvolver-se diretamente em plântulas (Finer, 1994; Werbrouch & Debergh, 1994; Torres et al., 1998a, 1998b). A formação de caules adventícios (organogênese) ocorre em maior número de espécies de plantas do que a formação de embriões somáticos; são poucas as espécies cultivadas, de importância, que podem ser induzidas rotineiramente a formar embriões somáticos (Finer, 1994; Franklin & Dixon, 1994; Pöhlman & Sleper, 1995).

Após a formação dos caules adventícios, a cultura é transferida para um meio de enraizamento (rico em auxinas) para induzir enraizamento e, subsequentemente, a formação das plântulas (Caldas et al., 1998, Torres et al., 1998a). As plântulas assim regeneradas são transferidas para o solo, para crescimento e desenvolvimento, passando, porém, primeiro, por um período de adaptação em casa de vegetação. Durante esse período, as plântulas têm que mudar do estado heterotrófico para o autotrófico, quando adquirem a capacidade de sintetizar os próprios alimentos. A perda de água nesse período normalmente é elevada, por causa da inadequada formação do sistema radicular e da quantidade reduzida de cera epicuticular

nas folhas e nos caules das plântulas regeneradas. É essencial, também, protegê-las de patógenos do solo, de modo que possam crescer e desenvolver-se normalmente em plantas saudáveis (Mantell et al., 1994; Carneiro et al., 1998; Grattapaglia & Machado, 1998; Kerbauy, 1998; Torres et al., 1998a, 1998b).

Geralmente, materiais propagados por meio de cultura de tecidos tendem a apresentar alta proporção de variantes genéticas, variações essas denominadas de “variação somaclonal” (Finer, 1994; Franklin & Dixon, 1994; Mantell et al., 1994; Poehlman & Sleper, 1995; Caldas et al., 1998; Ferreira et al., 1998; Tulmann Neto et al., 1998). As anormalidades que freqüentemente ocorrem correspondem a: mutações de ponto, rearranjos cromossômicos, alterações no nível de ploidia, aneuploidia, inversões, duplicações e deleções. A ocorrência dessas variantes normalmente aumenta de acordo com o número de subcultivos (Poehlman & Sleper, 1995; Tulmann Neto et al., 1998).

Para a propagação de um determinado genótipo por meio de cultura de tecidos, é essencial que a estabilidade genética do material seja mantida com repetidos cultivos (Finer, 1994; Franklin & Dixon, 1994; Mantell et al., 1994; Poehlman & Sleper, 1995; Caldas et al., 1998; Ferreira et al., 1998; Tulmann Neto et al., 1998). Do ponto de vista do melhoramento, porém, tem sido postulado que as variantes induzidas pela cultura de tecidos podem propiciar ao melhorista novas e importantes fontes de variabilidade genética (Robins, 1994; Ferreira et al., 1998; Tulmann Neto et al., 1998). Na concepção de Poehlman & Sleper (1995), contudo, do mesmo modo que as mutações induzidas por radiação, o potencial de utilização dessa fonte de variação genética no melhoramento de plantas parece ter sido superestimado. Ressalta ainda que, assim como ocorre no tratamento de plantas com irradiação ou mutagênicos químicos, a variação somaclonal não pode ser direcionada para mudar uma determinada característica.

A regeneração de plantas por meio de técnicas de cultura de tecidos é um requerimento primário para a utilização de tecnologias em genética molecular, em qualquer espécie de planta (Poehlman & Sleper, 1995; Ferreira et al., 1998; Brasileiro & Dusi, 1999). Além dessa, existem muitas aplicações da cultura de tecidos, destacando-se a clonagem *in vitro*, a conservação de germoplasma *in vitro*, a multiplicação de genótipos para análise em experimentos replicados, a obtenção de variantes somaclonais, a quebra de barreiras de incompatibilidade genética, a clonagem de

genótipos superiores para teste de capacidade de combinação, a cultura de anteras para obtenção de diaplóides, a multiplicação de genótipos superiores e a recuperação de plantas livres de vírus (Scowcroft, 1984; Poehlman & Sleper, 1995; Ferreira et al., 1998).

Cultura de células isoladas

Consiste no cultivo de suspensão de células em meio líquido (Poehlman & Sleper, 1995; Barrueto Cid, 1998). Normalmente, o calos é formado entre 4 e 8 semanas após a incubação do explante. Quando pedaços desse calos são transferidos para um meio líquido e a cultura é agitada, células individuais ou agregados de células podem ser separados, dividindo-se e formando uma cultura de células em suspensão (Finer, 1994; Franklin & Dixon, 1994; Gonzales, 1994; Poehlman & Sleper, 1995; Barrueto Cid, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998). Culturas de células em suspensão também podem ser iniciadas a partir de células individuais ou agregados de células separados mecanicamente do explante (Finer, 1994; Franklin & Dixon, 1994; Gonzales, 1994; Poehlman & Sleper, 1995).

A grande vantagem da cultura de células é a seleção em nível celular, permitindo que milhões de células sejam cultivadas em um pequeno espaço (Finer, 1994; Franklin & Dixon, 1994; Gonzales, 1994). O procedimento é comparável ao de técnicas de seleção de micróbios, utilizadas com sucesso na indústria farmacêutica. Vale observar que, embora a seleção em nível celular propicie uma oportunidade única para a geração de mutantes genéticos, o processo é limitado pelos tipos de mutantes que podem ser selecionados e pela habilidade de regenerar plantas das células mutantes da espécie em estudo (Gonzales, 1994). Em geral, a regeneração de plantas a partir de culturas de células em suspensão é mais difícil do que a regeneração a partir do calos (Finer, 1994; Franklin & Dixon, 1994; Gonzales, 1994; Poehlman & Sleper, 1995).

Somente características expressas em nível celular, como tolerância à salinidade, à baixa temperatura ou a fatores nutricionais, e resistência a herbicidas ou toxinas produzidas por patógenos, podem ser identificadas por meio da seleção de células em cultura. Nesse caso, as células podem ser objeto de estresse por meio do crescimento em concentrações variadas de herbicidas ou solução salina ou na presença de toxinas de doenças. As células sobreviventes ao estresse são transferidas para um meio de

regeneração para iniciar o desenvolvimento de raízes e caule (Finer, 1994; Franklin & Dixon, 1994; Gonzales, 1994; Poehlman & Sleper, 1995). Características como produtividade, resistência ao acamamento ou qualidade de grãos, que são herdadas quantitativamente e de maneira complexa, não respondem à seleção em nível celular, exceto no caso em que possam ser afetadas pelas características mencionadas anteriormente (Finer, 1994; Gonzales, 1994; Poehlman & Sleper, 1995).

Clonagem in vitro ou micropropagação

A cultura de tecidos pode ser utilizada para a regeneração rápida de genótipos específicos de plantas. Essa tecnologia é denominada de "propagação clonal", "clonagem in vitro" ou "micropropagação". O termo "clonagem", já incorporado à Língua Portuguesa, significa "a formação de indivíduos geneticamente idênticos a partir de células ou fragmentos de uma determinada matriz". "Clone" deriva etimologicamente do grego *klón*, que quer dizer "broto" e pressupõe, portanto, a existência de um indivíduo gerador e a ocorrência de reprodução assexuada. A denominação de "micropropagação" é devida ao emprego de diminutas porções de tecidos (Poehlman & Sleper, 1995; Grattapaglia & Machado, 1998; Torres et al., 1998b).

A técnica da clonagem in vitro de plantas tem-se mostrado de enorme importância prática e potencial nas áreas agrícola, florestal e horticultural, bem como na pesquisa básica em geral (Finer, 1994; Franklin & Dixon, 1994; Mantell et al., 1994; Werbrouck & Debergh, 1994; Poehlman & Sleper, 1995; Ferreira et al., 1998; Grattapaglia & Machado, 1998; Torres et al., 1998b), por apresentar, entre outros atributos, potencial para propagação de milhares de plântulas a partir de um único material genético (Grattapaglia & Machado, 1998). A aplicação comercial extensiva da clonagem in vitro teve início com orquídeas, mas outras espécies possuem um grande potencial, tais como batata (*S. Tuberosum* L.), aspargo (*Asparagus officinalis* L.), morango (*Fragaria vesca* L.), banana (*Musa* spp.), eucalipto (*Eucalyptus* spp.), e várias espécies ornamentais de difícil produção de sementes (Poehlman & Sleper, 1995; Grattapaglia & Machado, 1998). Atualmente, a sua aplicação comercial já é factível em vários países (Chang & Yang, 1995; Yang et al., 1996a, 1996b; Grattapaglia & Machado, 1998; Assis & Teixeira, 1998), concentrando-se, principalmente, na limpeza clonal e na multiplicação de espécies ornamentais herbáceas e arbustivas

(Lozoya-Saldaña et al., 1996; Altman & Ziv, 1997; Woodson, 1997; Grattapaglia & Machado, 1998). No Brasil, sua aplicação comercial é recente e concentra-se em orquídeas, seleções de elites de essências florestais (Grattapaglia & Machado, 1998) e em banana (Souza et al., 1999).

Outros usos potenciais da clonagem *in vitro* em cultivos agrônômicos são: (1) multiplicação em larga escala de um genótipo heterozigoto; (2) multiplicação de um genótipo auto-incompatível; (3) multiplicação de linhagens macho estéreis para uso em programas de melhoramento para produção de híbridos; (4) propagação de materiais genéticos livres de doenças e pragas; (5) preservação e intercâmbio internacional de germoplasma (Werbrouck & Debergh, 1994; Poehlman & Sleper, 1995; Ferreira et al., 1998; Withers & Williamns, 1998; Silva et al., 1999).

Cultura de embriões e óvulos

Cultura de embrião consiste na excisão asséptica de um embrião imaturo do óvulo e o seu subsequente cultivo *in vitro*, utilizando-se um meio de cultura apropriado (Poehlman & Sleper, 1995). Hu & Ferreira (1998), no entanto, relatam que o termo "cultura de embrião" se refere ao cultivo *in vitro* de embriões zigóticos, independentemente da idade, do tamanho e do estágio de desenvolvimento em que foram excisados. Embriões híbridos provenientes de cruzamentos entre espécies longemente relacionadas são freqüentemente fracos e inviáveis por causa da inadequada nutrição do embrião pelo endosperma. Tais embriões podem abortar ou desintegrar-se logo após a formação do zigoto, não se desenvolvendo, assim, em sementes viáveis. Contudo, esses embriões imaturos podem, freqüentemente, ser resgatados, e seus crescimento, germinação e desenvolvimento em plantas, assegurados por meio da cultura de embrião (Poehlman & Sleper, 1995; Hu & Ferreira, 1998).

Nos primeiros estudos sobre cultura de embrião, os embriões utilizados eram mais ou menos maduros. Embriões maduros ou quase maduros são altamente autotróficos e têm requerimento nutricional relativamente simples; são também capazes de germinar e desenvolver-se em plântulas em meios de cultura simples (Poehlman & Sleper, 1995). Os pré-embriões, ou seja, os embriões em estádios iniciais de desenvolvimento, têm, por seu turno, requerimento nutricional mais complexo e não são capazes de desenvolver-se independentemente (Poehlman & Sleper, 1995;

Hu & Ferreira, 1998). Na natureza, embriões desenvolvem-se dentro de uma cavidade ovular estéril e são dependentes dos metabólitos supridos pelos tecidos endospermáticos em sua volta (Poehlman & Sleper, 1995). Por exemplo, um embrião híbrido resultante do cruzamento interespecífico, ou intergenérico, normalmente não é adequadamente nutrido em razão da incompatibilidade entre o endosperma e o embrião (Finer, 1994; Franklin & Dixon, 1994; Poehlman & Sleper, 1995; Hu & Ferreira, 1998), e, assim, para resgatá-lo, o pré-embrião é extraído do óvulo poucos dias após a fertilização e transferido para um meio sólido em ágar, ou um meio líquido, para subsequente crescimento e germinação.

A cultura de embrião tem sido algumas vezes utilizada para vencer barreiras de dormência de sementes em híbridos interespecíficos. Com a dormência, as sementes híbridas não germinam até que um determinado tempo tenha passado depois da polinização do óvulo. Porém, em virtude de os embriões jovens normalmente não exibirem dormência, os embriões híbridos podem ser cultivados e germinados rapidamente após a fertilização, resolvendo assim o problema de dormência (Poehlman & Sleper, 1995; Hu & Ferreira, 1998).

A cultura de óvulos, por sua vez, consiste no cultivo *in vitro* de óvulos fertilizados, com o objetivo de resgatar embriões provenientes de cruzamentos interespecíficos ou intergenéricos. Óvulos contendo embriões híbridos imaturos são extraídos assepticamente, pouco tempo depois da fertilização, e cultivados em um meio de cultura (Poehlman & Sleper, 1995; Hu & Ferreira, 1998). Postula-se que óvulos com embriões podem ser extraídos em um estágio de desenvolvimento mais precoce do que o poderiam os embriões isolados.

A cultura de óvulos pode ser utilizada também com o objetivo de cultivar óvulos não-fertilizados em um meio de cultura sob condições estéreis, visando à polinização e à fertilização *in vitro*. Esse procedimento tem sido utilizado para a obtenção de híbridos entre espécies, em que os tubos polínicos são incapazes de crescer e penetrar no óvulo normalmente após a polinização (Poehlman & Sleper, 1995).

Cultura de anteras

A cultura de anteras refere-se ao cultivo *in vitro* de anteras contendo micrósporos ou grãos de pólen imaturos em um meio de cultura, com o

propósito de gerar plantas haplóides (Peters et al., 1999). Plantas haplóides também podem ser geradas através da cultura de óvulos não fertilizados (Laurie & Bennett, 1987; O'Donoghue & Bennett, 1994; Peters et al., 1999). Duplicando-se o número de cromossomos da planta haplóide gerada, obtém-se uma planta diplóide completamente homocigota e aqui denominada de "haplóide duplo" ou "diplóide" (Barceló et al., 1994; Ferreira et al., 1998; Moraes-Fernandes et al., 1999; Peters et al., 1999).

A cultura de anteras é potencialmente útil ao melhorista porque os haplóides duplos podem ser utilizados imediatamente como linhagens melhoradas ou cultivares em espécies autógamas, ou como linhagens homocigotas em programas de produção de híbridos em espécies alógamas (Poehlman & Sleper, 1995; Moraes-Fernandes et al., 1999). Em um programa de melhoramento, o tempo requerido para produzir uma cultivar ou uma linhagem homocigota pela técnica de haplóide duplo é reduzido de duas a três gerações, quando comparado com o procedimento convencional para a obtenção de homocigose por autofecundação (Moraes-Fernandes et al., 1999). Outras vantagens das linhagens haplóides duplos são: 1) a homocigose é obtida em todos os loci, ao passo que algum resíduo de heterocigose persiste em linhagens homocigotas após cinco ou seis gerações de endogamia; 2) os genes recessivos que podem ser mascarados pela presença de alelos dominantes em linhagens diplóides heterocigotas são descobertos e expressos no fenótipo das linhagens diplóides (Herbele-Bors, 1985; Jensen, 1992; He et al., 1993; Barceló et al., 1994; Ferreira et al., 1998; Moraes-Fernandes et al., 1999; Peters et al., 1999).

Os procedimentos gerais para o cultivo de anteras são: 1) selecionar e esterilizar a superfície não aberta dos botões florais ou das flores imaturas; 2) extrair e colocar as anteras em um meio sólido em ágar ou meio líquido. As anteras cultivadas vão originar, entre 4 e 6 semanas, plântulas diretamente de embriões somáticos, ou indiretamente, e mais comumente do calos, ocorrendo, neste último caso, após 8 a 14 semanas (Herbele-Bors, 1985; Moraes-Fernandes et al., 1999; Peters et al., 1999). Os embriões somáticos originam-se, comumente, da divisão dos micrósporos. Entretanto, embriões somáticos diplóides podem originar-se também a partir de tecido esporofítico e, ainda, pela duplicação espontânea dos cromossomos de células desse tecido (Laurie & Bennett, 1987; O'Donoghue & Bennett, 1994; Moraes-Fernandes et al., 1999; Peters

et al., 1999). Após regeneradas, as plântulas são transferidas para os meios de enraizamento e de desenvolvimento e, posteriormente, para solo estéril (Moraes-Fernandes et al., 1999).

O método mais comum para diploidização (duplicação do número de cromossomos) de plantas haplóides é pelo tratamento com colchicina (Moraes-Fernandes et al., 1999; Peters et al., 1999). Deve-se ressaltar que nem todas as plântulas geradas em cultura de anteras serão haplóides. E, também, que a cultura de anteras com o objetivo de obter haplóides não tem sido fácil em muitas espécies cultivadas, particularmente em cereais, algodão, gramíneas e leguminosas (Poehlman & Sleper, 1995; Moraes-Fernandes et al., 1999; Peters et al., 1999).

Hibridação de células somáticas ou fusão de protoplastos

“Protoplastos” são células desprovidas da parede celular. A hibridação de células somáticas ou a fusão de protoplastos refere-se à fusão de dois protoplastos de dois genomas, incluindo o citoplasma e as organelas celulares, e a subsequente regeneração de plantas híbridas a partir dos protoplastos fundidos ou híbridos (Brown et al., 1987; Megia et al., 1993; Blackhall et al., 1994a, 1994b; Carneiro et al., 1998). Assim, a fusão de protoplastos é uma técnica especialmente importante para superar a incompatibilidade sexual entre espécies ou mesmo entre gêneros (Power et al., 1979, 1980; Ramulu et al., 1995; Binsfeld, 1998; Carneiro et al., 1998). Pode ser empregada também para a produção de anfidiplóides, a transferência de DNA citoplasmático e a transferência genômica parcial (fragmentação do núcleo da célula doadora) (Binsfeld, 1998).

O uso da hibridação de células somáticas requer o atendimento de dois requisitos básicos: o isolamento de protoplastos em quantidade suficiente para se estabelecer um cultivo e a totipotência dos protoplastos, isto é, devem ter a capacidade de regenerar-se em nova planta (Binsfeld, 1998; Carneiro et al., 1998). De acordo com Binsfeld (1998), essas condições básicas já estão estabelecidas para mais de 320 espécies.

A remoção da parede celular das células, condição para se isolar os protoplastos, é feita mediante tratamento enzimático que, em geral, reúne uma mistura de enzimas capazes de degradar individualmente a celulose, a pectina, a hemicelulose e outros polissacarídeos componentes da parede celular (Blackhall et al., 1994a; Carneiro et al., 1998). A fonte utilizada

para o isolamento de protoplastos é variável e tem influência na sua obtenção e também no processo de regeneração da parede celular e na frequência das divisões celulares que se sucedem. Protoplastos podem ser isolados de tecidos vegetais como o mesófilo foliar, de tecidos cotiledonar e hipocotiledonar, de raízes e também de calos e suspensões celulares (Megia et al., 1993; Blackhall et al., 1994a; Carneiro et al., 1998).

Existem dois tipos de hibridação somática: a simétrica, que consiste na fusão de dois protoplastos completos; e a assimétrica, que consiste na transferência parcial do genoma da célula doadora para uma célula somática receptora (Ramulu et al., 1995; Binsfeld, 1998). Em ambos os tipos, a obtenção de híbridos somáticos depende fundamentalmente de mecanismos eficientes, que promovam a fusão celular. Em plantas, a fusão pode ser mediada por um agente químico, como o polietileno glicol (PEG), ou por choques de corrente elétrica (eletrofusão) (Blackhall et al., 1994b; Carneiro et al., 1998). Na fusão mediada por PEG, protoplastos de espécies diferentes são colocados em contato por aproximadamente 30 minutos, juntamente com o PEG, em solução salina. A utilização da solução salina no meio de fusão visa neutralizar as cargas negativas e induzir a desestabilidade das membranas protoplasmáticas, facilitando a agregação/fusão dos protoplastos. Em seguida, procede-se à lavagem do PEG, que é tóxico para as células. A fusão elétrica ocorre em duas etapas. Na primeira, as células são submetidas a uma corrente do tipo alternada, gerando um campo elétrico de alta força e fazendo os protoplastos se polarizarem, dirigindo-se para o pólo de maior força (fenômeno conhecido como "dieletroforese"). A proximidade das membranas facilita a fusão que é provocada logo em seguida à aglutinação por choques de corrente contínua. Esses choques provocam a abertura reversível de poros na membrana plasmática. Os rearranjos das membranas eletroporadas provocam a fusão de células adjacentes (Blackhall et al., 1994b; Carneiro et al., 1998).

Em ambos os casos, a fusão não é um evento dirigido, podendo ocorrer entre protoplastos de uma mesma espécie, formando "homocários", ou entre espécies diferentes, dando origem a "heterocários" (Blackhall et al., 1994b; Carneiro et al., 1998). Técnicas sofisticadas de micromanipulação ou de citometria de fluxo podem ser adotadas para a seleção de heterocários. Para isso, é necessário utilizar marcadores morfológicos, que permitam a identificação dos protoplastos oriundos das

espécies envolvidas na fusão. Protoplastos verdes podem ser obtidos a partir de tecidos clorofilados, e protoplastos incolores, a partir de suspensões celulares. A seleção pode ser feita também na fase de calos ou de brotos, por meio de análises morfológicas, cromossômicas, isoenzimáticas e, principalmente, de marcadores de DNA (Binsfeld, 1998; Carneiro et al., 1998). A caracterização morfológica e o estudo do comportamento meiótico dos híbridos somáticos, assim como as avaliações agronômicas, vão determinar o seu potencial de aproveitamento em programas de melhoramento genético (Blackhall et al., 1994b).

Avanços recentes em regeneração de plantas a partir de protoplastos têm transformado a fusão de protoplastos em uma técnica bastante promissora para a introgressão de genes de interesse econômico em espécies cultivadas, especialmente leguminosas, gramíneas e solanáceas (Blackhall et al., 1994a, 1994b; Ramulu et al., 1995; Waara & Glimenius, 1995; Vieira, 1996; Binsfeld, 1998; Carneiro et al., 1998). Em brássicas, a maior parte dos trabalhos tem relatado a transferência de caracteres de herança citoplasmática, como a macho-esterilidade e a resistência a herbicidas (Guerche et al., 1987; Swanson et al., 1988); mais recentemente, foram obtidos híbridos somáticos intertribais entre *Brassica napus* L. e *Thlaspi perfoliatum*, visando ao incremento do teor de ácido nervônico no óleo de *B. napus* L. (Fahleson et al., 1994; Heath & Earle, 1995). Em citros, Grosser & Gmitter Junior (1990) regeneraram híbridos somáticos a partir de produtos de fusão entre protoplastos isolados de *Citrus reticulata* Blanco (tangerina Cleópatra) e de *Citropsis gilletiana* Swingle & M. Kellerman, uma espécie resistente à podridão-do-colo e ao nematóide *Radopholus citrophilus* Huettel, Dickeson & Kaplan. Em batata (*S. tuberosum* L.), têm sido incorporadas, via fusão de protoplastos, características como resistência a nematóides, a vírus e a bactérias do gênero *Erwinia* (Shepard et al., 1980). Da mesma forma, em tabaco (*N. tabacum* L.), têm sido incorporados, via fusão de protoplastos, genes de resistência a doenças fúngicas e a vírus (Nagao, 1978, 1982).

A hibridação somática oferece também a oportunidade de combinar citoplasmas diferentes na mesma célula. Essas combinações não podem ser produzidas por hibridação sexual, pois o citoplasma materno é o preferencialmente herdado (Poehlman & Sleper, 1995). Além disso, avanços na tecnologia de fusão, incluindo a fusão assimétrica de protoplastos (o núcleo da espécie selvagem é fragmentado antes da fusão), têm contribuído

para uma aplicação mais imediata dessa tecnologia no melhoramento de plantas (Ramulu et al., 1995; Waara & Glimenius, 1995; Binsfeld, 1998). A fusão de protoplastos é empregada ainda para a transferência de genes de uma espécie doadora para uma espécie receptora, ou seja, como uma técnica de engenharia genética (Guerche et al., 1987; Dhir et al., 1992; Ramulu et al., 1995; Binsfeld, 1998; Carneiro et al., 1998).

Marcadores moleculares

O aumento na eficiência da seleção, o melhor conhecimento e a caracterização do germoplasma e a maximização dos ganhos genéticos têm sido objetivo de melhoristas de plantas mundo afora, que têm perseguido novas formas de alcançá-los. Daí o interesse em tecnologias como as de marcadores de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os melhoristas de plantas têm, tradicionalmente, selecionado indivíduos com base no fenótipo (aparência de um indivíduo). Essa estratégia tem tido sucesso com características de alta herdabilidade (o fenótipo reflete a constituição genética do indivíduo), mas nem sempre com características de baixa herdabilidade, pois o efeito do ambiente é elevado (Souza et al., 1998a, 1998b). Esse é o motivo por que, em muitos programas de melhoramento, em que a maioria das características de interesse apresentam herança quantitativa, estratégias como teste de progênies e seleção em gerações avançadas têm sido utilizadas para minimizar as dificuldades da seleção (Hansche, 1983). Contudo, essas não diminuem ou evitam os efeitos da interação genótipo x ambiente, que é um dos fatores que mais afetam o processo de seleção (Hansche, 1983; Falconer, 1989). Portanto, uma forma de evitar esses problemas é a seleção com base na constituição genética do indivíduo (em nível de DNA), a qual independe do ambiente e não muda com o tempo (Bretting & Widrechner, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Entende-se por “marcadores moleculares” as características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e que são herdadas geneticamente (Milach, 1998a). Atualmente, diversos tipos de marcadores moleculares estão disponíveis, os quais, segundo Milach (1998a), diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA.

Os principais tipos de marcadores moleculares são classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los:

hibridação ou amplificação de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998a). Os identificados por hibridação são:

1) Marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (Botstein et al., 1980).

2) Os minissatélites ou locos VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) (Jeffreys et al., 1985).

Os identificados por amplificação do DNA são:

1) Marcadores RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) – DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (Williams et al., 1990).

2) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (Zabeau, 1993).

3) Microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats) - Seqüências Simples Repetidas (Litt & Luty, 1989).

4) SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) (Paran & Michelmore, 1993).

5) STS (Sequence Tagged Sites) (Olson et al., 1989).

Existem ainda os marcadores isoenzimáticos, que são baseados em diferenças na mobilidade de enzimas (proteínas) e vêm sendo utilizados desde a década de 60 (Bretting & Widrechner, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998). Cada marcador apresenta vantagens e desvantagens, porém, todos são suscetíveis de aplicação no melhoramento de plantas (Rafalski et al., 1991; Rafalski & Tingev, 1993; Bretting & Widrechner, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Em plantas, a identificação dos primeiros marcadores moleculares ocorreu na década de 70 (Botstein et al., 1980). Contudo, foi somente após o desenvolvimento das técnicas de PCR que os marcadores moleculares ganharam maior atenção por parte dos melhoristas de plantas (Rafalski & Tingev, 1993; Nybom, 1994; Bretting & Widrechner, 1995; Lee, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998). A tecnologia de PCR, desenvolvida por Mullis & Faloona (1987), graças a suas facilidade, rapidez, sensibilidade e versatilidade, constituiu-se rapidamente numa potente ferramenta em estudos genéticos e moleculares que envolviam grande número de indivíduos (Bretting & Widrechner, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Ferreira & Grattapaglia (1998) relatam que atributos como consistência e tempo para obtenção de resultados, nível de polimorfismo obtido, custo e facilidade de uso são características importantes para a implementação de marcadores moleculares na rotina de um programa de melhoramento. Relatam ainda que, além dessas características, existem os aspectos envolvidos na escolha do tipo de marcador molecular a ser utilizado e, por isso mesmo, não existe marcador superior aos demais em todos os atributos. Portanto, antes de tomar a decisão de qual marcador será implementado, o melhorista deve analisar criteriosamente cada uma das técnicas, considerando, além dos fatores acima mencionados, a estrutura laboratorial disponível, o nível de especialização dos recursos humanos, os recursos financeiros disponíveis, os objetivos em curto, médio e longo prazos do programa e ainda a espécie envolvida.

Entre as principais aplicações dos marcadores de DNA no melhoramento de plantas em geral, estão: 1) identificação de parentais; 2) identificação e proteção de cultivares; 3) atribuição de linhagens a grupos heteróticos em espécies alógamas; 4) certificação de pureza genética; 5) monitoramento de cruzamentos, como aplicações de curto prazo; 6) construção de mapas genéticos; 7) mapeamento de locos de herança simples; 8) mapeamento de características de herança quantitativa; 9) seleção assistida por marcadores – SAM; 10) clonagem de genes com base em mapeamento (Lee, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Entretanto, a maior vantagem do uso de marcadores moleculares talvez seja a SAM, em que características de difícil avaliação, ou caras de se avaliar, são selecionadas indiretamente, com base em um ou mais marcadores (Lee, 1995; Poehlman & Sleper, 1995). Nesse caso, é necessário primeiro identificar marcadores associados às características de interesse por meio do mapeamento molecular (Lee, 1995; Barbosa Neto, 1998; Ferreira & Grattapaglia, 1998). Uma vez estabelecida a associação, é possível selecionar os indivíduos indiretamente, por meio do marcador ou dos marcadores de interesse. Portanto, o sucesso da SAM depende do grau de associação entre marcador e característica de interesse. Quanto maior a associação, menor será a chance de ocorrer recombinação entre marcador e gene que controla a característica de interesse e, por conseguinte, maior será a eficiência da seleção. A SAM é especialmente importante no melhoramento de espécies perenes e de ciclo longo, quando geralmente há necessidade de esperar alguns anos até que a característica fenotípica

de interesse se expresse (Lee, 1995; Poehlman & Sleper, 1995; Barbosa Neto, 1998; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Marcadores isoenzimáticos

“Isoenzimas” são formas múltiplas de uma mesma enzima. Quimicamente, isoenzimas são proteínas complexas e foram os primeiros marcadores genéticos moleculares usados na genética de plantas e no melhoramento (Bretting & Widrechner, 1995; Poehlman & Sleper, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O princípio básico dos marcadores de isoenzimas consiste no uso de eletroforese em gel de amido e na visualização do produto enzimático por meio de métodos histoquímicos (Hunter & Markert, 1957). É assumido que diferenças na mobilidade de isoenzimas em um campo elétrico são resultantes de diferenças nas seqüências de DNA que codificam essas enzimas (Bretting & Widrechner, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998). Portanto, se dois indivíduos diferem no padrão de bandejamento, pressupõe-se que essas diferenças têm base genética e são herdáveis (Murphy et al., 1990). As isoenzimas podem ser controladas geneticamente por alelos localizados no mesmo loco, ou em diferentes locos, e sua expressão é co-dominante, ou seja, em um indivíduo diplóide ambos os alelos de um loco são expressos e visualizados (Bretting & Widrechner, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998). Além da vantagem de ser um marcador co-dominante, a técnica de isoenzimas é relativamente barata e tecnicamente acessível. Entretanto, essa técnica apresenta algumas limitações, como o número limitado de locos que podem ser detectados no genoma, o baixo nível de polimorfismo das isoenzimas, o efeito do ambiente na expressão do polimorfismo, a especificidade de expressão em alguns tecidos vegetais e as diferenças nas atividades enzimáticas, em virtude do estágio de desenvolvimento dos tecidos e/ou da planta (Murphy et al., 1990; Bretting & Widrechner, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O processo de detecção dos marcadores de isoenzimas constitui-se basicamente de: 1) extração de proteínas do tecido vegetal; 2) separação das proteínas por meio de eletroforese; 3) coloração histoquímica do gel, permitindo visualizar o produto da reação enzimática na forma de uma banda no gel (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

No início, os marcadores isoenzimáticos eram muito utilizados em estudos clássicos de genética de populações, com os objetivos de estimar e entender a estrutura da variabilidade genética em populações naturais e estudar o fluxo gênico entre populações, os processos de hibridação natural e a dispersão de espécies, além de estudos de filogenias (Ferreira & Grattapaglia, 1998). No melhoramento de plantas, esses marcadores têm sido empregados na identificação de cultivares, na avaliação de germoplasma, na introgressão gênica, na seleção indireta e na detecção de ligação gênica com caracteres monogênicos e poligênicos (Tanksley et al., 1982; Adams, 1983; Tanksley, 1983).

Marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

Os RFLPs são definidos como diferentes comprimentos de fragmentos de DNA digeridos por endonucleases de restrição, detectados entre indivíduos por meio de uma definida sonda (Andersen & Fairbanks, 1990; Rafalski & Tingev, 1993; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998a). Os diferentes fragmentos de DNA são produzidos por enzimas de restrição, as quais reconhecem e cortam o DNA em seqüências específicas de nucleotídeos (Rafalski & Tingev, 1993). Depois que a enzima de restrição corta o DNA, muitos fragmentos são resultados, desde fragmentos com centenas de pares de bases até com alguns milhares de pares de bases, porém, apenas seqüências específicas de DNA, que estão distribuídas por todo o genoma e que são complementares ao DNA da sonda (fragmentos clonados de DNA genômico, cDNA), são analisadas para se obter o padrão de restrição de um determinado indivíduo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O procedimento geral para a identificação de marcadores RFLP envolve as seguintes etapas (Andersen & Fairbanks, 1990; Rafalski & Tingev, 1993; Ferreira & Grattapaglia, 1998): 1) extração de DNA; 2) digestão do DNA com enzimas de restrição; 3) separação dos fragmentos em gel eletroforese; 4) transferência do DNA para uma membrana de nitrocelulose; 5) hibridação da membrana com uma sonda molecular radioativa; 6) autoradiografia da membrana para visualização do padrão de migração dos fragmentos de DNA, ou seja, os marcadores RFLPs. Na separação na eletroforese em gel, fragmentos de DNA de diferentes tamanhos movem-se em distintas velocidades através do gel, movendo-se os fragmentos

menores mais rapidamente. Em relação à visualização, cumpre lembrar que apenas aqueles fragmentos que hibridizaram com o DNA radioativo da sonda serão visíveis na auto-radiografia (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O polimorfismo observado nos RFLPs é devido ao fato de o DNA de indivíduos geneticamente distintos diferir nas seqüências de nucleotídeos ao longo da fita. Portanto, a presença ou a ausência de seqüências específicas de quatro a oito pares de base, as quais são reconhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, pode variar conforme o indivíduo, gerando polimorfismo. Dessa forma, a base genética do polimorfismo observado é devida a mutações nos sítios de restrição ou inserções, deleções e rearranjos entre esses sítios (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Assim como os marcadores isoenzimáticos, os marcadores RFLP apresentam expressão co-dominante, permitindo identificar genótipos homocigotos e heterocigotos em cada loco analisado. Essa característica de co-dominância possibilita aos RFLPs uma análise mais aprofundada da ação gênica e da interação entre alelos que os marcadores de isoenzimas. Também, contrariamente às isoenzimas, o número de marcadores RFLP é praticamente ilimitado e o nível de polimorfismo é muito maior. Há outras características importantes dos marcadores RFLP: a) alta estabilidade do DNA; b) efeitos pleiotrópicos mínimos; c) capacidade de ser detectado em todos os tecidos vivos e em todos os estádios de desenvolvimento de um organismo; d) capacidade de não ser afetado pelo ambiente (Andersen & Fairbanks, 1990; Rafalski & Tingev, 1993; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

No melhoramento de plantas, os marcadores RFLP podem ser utilizados para avaliação e caracterização de germoplasma, identificação de cultivares, construção de mapas genéticos, mapeamento comparativo, análises filogenéticas e como critério de seleção indireta ou seleção assistida por marcadores (Rafalski & Tingev, 1993; Nybom, 1994; Lee, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998). Entretanto, a técnica de RFLP apresenta algumas limitações, como: o alto custo e o uso intensivo de mão-de-obra, a não-disponibilidade de sondas no início dos trabalhos com uma determinada espécie e o requerimento de estrutura laboratorial mais sofisticada e de pessoal técnico especializado, que a tornam de difícil implementação em rotinas de programas de melhoramento (Andersen & Fairbanks, 1990; Rafalski & Tingev, 1993; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998a).

Marcadores de minissatélites

Minissatélites ou VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) ou seqüências adjacentes que se repetem em número variável são constituídos de um número variável de seqüências idênticas, de 15 a 100 pares de bases, e repetidas lado a lado até 50 vezes (Jeffreys et al., 1985; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os minissatélites são, na realidade, uma variação dos marcadores de RFLP. Portanto, o princípio de detecção e obtenção desses marcadores é basicamente o mesmo utilizado para RFLP, diferindo apenas no tipo de sonda utilizada para a detecção do polimorfismo de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998a). Em RFLP as sondas são homólogas às seqüências únicas no genoma, o que permite detectar um ou poucos locos de cada vez. Já nos minissatélites, as sondas são constituídas de seqüências homólogas às seqüências repetitivas, possibilitando que todos os locos VNTR sejam detectados simultaneamente (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Assim, além do polimorfismo de RFLPs (decorrente da variação na distribuição de sítios de restrição e das sondas utilizadas) em cada loco, a técnica VNTR apresenta polimorfismo no número e na distribuição das seqüências repetitivas ao longo do genoma, conferindo aos minissatélites um elevado nível de polimorfismo (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998a).

Por sua vez, por se tratar de uma técnica similar em essência à de RFLP, os marcadores de minissatélites compartilham também das mesmas vantagens e limitações já apresentadas para os marcadores RFLP, apresentando, porém, como vantagem adicional, o maior nível de polimorfismo (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998a). Em contrapartida, por conta da alta complexidade do padrão de bandas, esses marcadores não são muito recomendáveis em mapeamento genético e em testes de ligação entre marcadores e genes de ligação (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Marcadores RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) – DNA polimórfico amplificado ao acaso

A técnica de RAPD, desenvolvida por Williams et al. (1990), baseia-se na amplificação de múltiplos segmentos genômicos a partir da utilização

de *primers* arbitrários (pequenas seqüências de DNA, usualmente de dez pares de nucleotídeos). Dois outros grupos independentes de pesquisadores também desenvolveram a mesma técnica, denominando-a de AP-PCR (Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction), (Welsh & McClelland (1990)), e DAF (DNA Amplification Fingerprinting), (Caetano-Annólles et al., 1991).

De acordo com Ferreira & Grattapaglia (1998), com o desenvolvimento da técnica de RAPD, houve uma verdadeira “democratização” na área de marcadores moleculares, pois, além de facilitar e acelerar os estudos em andamento com espécies mais tradicionais (milho (*Z. mays* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), arroz (*O. sativa* L.), etc.), permitiu a realização de análises genéticas em espécies ainda não contempladas pelas metodologias anteriores.

O procedimento para detecção dos marcadores RAPD é simples e rápido, requer pequenas quantidades de DNA (15 a 25 ng) – não precisando esse DNA apresentar alto grau de pureza –, não requer conhecimentos aprofundados na área molecular, não envolve radioatividade e os resultados são obtidos em pouco tempo (Rafalski et al., 1991; Rafalski & Tingev, 1993; Ferreira & Grattapaglia, 1998). Em decorrência dessas características, os marcadores RAPD são extremamente eficientes na geração de dados e têm sido utilizados em estudos de análises genéticas e filogenéticas, bem como no melhoramento de plantas, desde a sua descrição (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os marcadores RAPD são de expressão fenotípica dominante, sendo o polimorfismo detectado no gel pela presença ou pela ausência de bandas. Portanto, uma desvantagem da técnica é que ela não consegue distinguir genótipos e fenótipos de indivíduos homocigotos daqueles heterocigotos para os marcadores (Rafalski et al., 1991; Rafalski & Tingev, 1993; Ferreira & Grattapaglia, 1998). Outra desvantagem dessa técnica é a reprodutibilidade e a consistência, que são baixas. Contudo, quando comparada com a técnica de RFPL, essa desvantagem é compensada pela grande quantidade de dados que é capaz de gerar a custo e tempo bem menores (Rafalski & Tingev, 1993; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Marcadores de microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats)

Microssatélites ou seqüências simples repetidas consistem de pequenas seqüências de DNA repetidas em tandem. Essas seqüências, normalmente, apresentam de um a quatro nucleotídeos de comprimento e estão distribuídas por todo o genoma de organismos eucariotos (Rafalski & Tingev, 1993; Bezte & Penner, 1998a; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998a). Litt & Luty (1989) foram os pioneiros na amplificação de microssatélites como marcadores.

A técnica baseia-se na amplificação individual via PCR dos microssatélites, utilizando-se *primers* específicos (20 a 30 pares de bases de comprimento), complementares às seqüências únicas que flanqueiam as seqüências repetidas de microssatélites. Assim, a base do polimorfismo desses marcadores resulta da existência de um grande número de diferentes seqüências repetidas, constituindo cada microssatélite, independentemente das seqüências repetidas (CA, AT, TG, ATG), um loco altamente polimórfico, multialélico e com elevado conteúdo informativo (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Bezte & Penner (1998a) afirmam que as seqüências repetidas dinucleotídicas (AT em plantas e CA em humanos) são as mais abundantes. Afirmam também que as seqüências mono-, di- e tetranucleotídicas e algumas seqüências trinucleotídicas são encontradas primariamente em regiões não-codificadoras e em regiões codificadoras do genoma, respectivamente.

A detecção dos marcadores de microssatélites é feita por eletroforese em gel de policrilamida, sendo a visualização das bandas realizada diretamente no gel por coloração com brometo de etídio ou nitrato de prata. Os locos SSR têm expressão co-dominante e são atualmente a classe de marcadores moleculares que apresentam maior nível de polimorfismo (Bezte & Penner, 1998a; Ferreira & Grattapaglia, 1998). A grande limitação dessa técnica atualmente decorre do processo de desenvolvimento dos *primers* para amplificação dos microssatélites. É um processo laborioso e caro, entretanto, uma vez obtidos os *primers*, o custo da técnica assemelha-se ao de RAPD (Bezte & Penner, 1998a; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998a).

Por conta do elevado nível de polimorfismo que apresenta, os marcadores de microssatélites são, atualmente, uma das melhores opções para uso em estudos de diversidade genética, mapeamento genético e na

identificação e na caracterização de germoplasma, especialmente daquelas espécies em que a variabilidade genética é baixa (Bezte & Penner, 1998a; Milach, 1998b).

Marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados

A técnica de AFLP foi desenvolvida por Zabeau (1993) e é uma combinação de RFLP e PCR, combinando a especificidade, a resolução e o poder de amostragem dos RFLPs (digestão por enzimas de restrição) com a velocidade e praticidade das técnicas de PCR (Bezte & Penner, 1998b; Ferreira & Grattapaglia, 1998). Também, da mesma forma que a técnica de RAPD, a análise de AFLP não requer informação prévia da seqüência de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os procedimentos para a análise de AFLP envolvem quatro etapas principais (Bezte & Penner, 1998b; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998a): 1) clivagem ou digestão do DNA com duas enzimas de restrição, sendo uma de corte raro (Pst I, EcoRI) e outra de corte freqüente (Mse I); 2) ligação de adaptadores específicos (20 a 30 pares de bases) às extremidades dos fragmentos genômicos resultantes da digestão do DNA com as enzimas de restrição; 3) amplificação seletiva de fragmentos com primers especificamente desenhados para reconhecer seqüências nos adaptadores; 4) separação dos fragmentos amplificados por eletroforese em gel de policrilamida.

O polimorfismo dos marcadores AFLP decorre das diferenças entre genótipos na distribuição dos sítios de restrição e na amplificação diferencial dos fragmentos. Em outras palavras, o polimorfismo dos AFLPs é devido a mutações de ponto, deleções, inserções e inversões nas seqüências de DNA, que resultam na perda ou no ganho de um sítio de restrição, e de alteração da seqüência reconhecida pelos nucleotídios arbitrários nos terminais 3' que orientam a amplificação a partir dos adaptadores, resultando na amplificação seletiva dos fragmentos (Bezte & Penner, 1998b; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998a). Portanto, essa técnica possui um alto poder de detecção de variabilidade genética e permite a análise de um grande número de marcadores por gel (40 ou mais), além da maior robustez em relação à técnica de RAPD.

Como maior limitação aos marcadores AFLP, tem-se o baixo nível de informação genética por loco analisado em decorrência de esses

marcadores possuírem, da mesma forma que os de RAPD, expressão fenotípica dominante (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Portanto, genótipos heterozigotos não podem ser distintos dos homozigotos.

A técnica de AFLP apresenta também outras limitações quando comparada com a de RAPD, destacando-se o maior número de etapas requeridas para análise e o maior gasto com reagentes e equipamentos de laboratório, o que torna essa técnica menos acessível ao melhorista que a de RAPD (Bezte & Penner, 1998b; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Marcadores baseados em PCR de seqüência específica

1) Marcadores STS (Sequence Tagged Sites)

Resultam da conversão de marcadores RFLP em marcadores baseados em PCR (Olson et al., 1989). O procedimento consiste basicamente do seqüenciamento das extremidades das sondas (cDNA ou genômicas) utilizadas para detecção de RFLP e da construção de primers específicos para a recuperação dos fragmentos polimórficos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Em geral, a conversão de marcadores RFLP em marcadores STS resulta em menor nível de polimorfismo porque, no processo de conversão, o polimorfismo vai depender basicamente de variações no comprimento dos fragmentos (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998a). Assim, o polimorfismo depende apenas de eventos de inserção/deleção na região coberta pela PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Contudo, esse problema pode ser minimizado com a digestão por enzimas de restrição dos fragmentos amplificados (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998a) e com o seqüenciamento das bandas monomórficas e o posterior desenvolvimento de primers que amplificam seqüências mais variáveis entre diferentes indivíduos (Milach, 1998a).

2) Marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions)

Os marcadores SCAR são similares aos STS, só que resultam da conversão de marcadores RAPD em marcadores de seqüência específica (Paran & Michelmore, 1993). Assim, SCAR nada mais são do que fragmentos de DNA genômico amplificados via PCR, utilizando primers

(Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os fragmentos amplificados estão localizados em locos geneticamente definidos (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998a).

A principal diferença entre os marcadores SCAR e STS reside no fato que o SCAR pode amplificar seqüências repetitivas de DNA, enquanto o STS amplifica apenas seqüências de DNA de cópia única (Paran & Michelmore, 1993).

Ambos, SCAR e STS, são bastante semelhantes à técnica de RAPD, com a exceção do tipo de primer utilizado, apresentando a vantagem de serem mais consistentes e a desvantagem de envolverem o desenvolvimento de primers e, conseqüentemente, ser de custo mais elevado. Contudo, estando os primers disponíveis, ambas as técnicas apresentam custos comparáveis à de RAPD (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998a). Em decorrência disso e da alta consistência, SCAR e STS apresentam-se como técnicas bastante promissoras do ponto de vista da implementação como rotina em programas de melhoramento (Milach, 1998a).

Engenharia genética

O termo “engenharia genética” (também denominada de “transformação genética”, no caso de plantas) refere-se à transferência de seqüências específicas de DNA de um organismo doador para um organismo receptor, por meios não-convencionais. Os organismos assim obtidos são denominados de “transgênicos” ou “organismos geneticamente modificados” (Davey et al., 1989; De Block, 1993; Jouanin et al., 1993; Brasileiro & Dusi, 1999).

Com o advento dessa tecnologia, tornou-se possível abreviar o tempo de obtenção de novas cultivares e a permuta de material genético (genes) entre espécies sexualmente incompatíveis, ou seja, vencer as barreiras naturais ao cruzamento entre diferentes espécies, e até mesmo entre diferentes reinos (De Block, 1993; Jouanin et al., 1993; Brasileiro & Dusi, 1999), aumentando sobremaneira as possibilidades de sucesso do melhoramento clássico (Poehlman & Sleper, 1995). Hoje, é possível isolar e clonar genes de bactérias, vírus, plantas e animais, introduzi-los e expressá-los em plantas (Davey et al., 1989; De Block, 1993; Jouanin et al., 1993; Brasileiro & Dusi, 1999; Lacorte et al., 1999; Romano & Monte, 1999; Sluys, 1999).

Em muitos aspectos, no entanto, a engenharia genética em plantas é comparável ao método de melhoramento por retrocruzamento, no qual genes desejáveis são transferidos para um genótipo receptor por meio de sucessivos cruzamentos. A diferença consiste em que o melhorista pode usar o retrocruzamento somente entre espécies compatíveis, enquanto, na engenharia genética, teoricamente não existe essa limitação (Poehlman & Sleper, 1995).

As duas formas básicas pelas quais um gene pode ser transferido de um organismo para outro são: a transferência indireta intermediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn. e a transferência direta por meio de métodos físicos e químicos (Davey et al., 1989; De Block, 1993; Jouanin et al., 1993; Birch, 1997; Brasileiro & Dusi, 1999; Lacorte et al., 1999; Romano & Monte, 1999; Sluys, 1999).

Na transferência indireta, a bactéria *A. tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn., que infecta principalmente dicotiledôneas, é capaz de inserir, no momento da infecção, parte de seus genes no genoma da planta hospedeira. Na verdade, esses genes estão codificados em um pedaço de DNA denominado de T-DNA (DNA transferido) do Ti-plasmídeo existente nessas bactérias. No momento da infecção, o T-DNA, carregando os genes bacterianos, integra-se ao genoma da planta hospedeira, que passa a expressá-los, causando a doença conhecida como *crown gall* ou tumorda-coroa (Birch, 1997; Brasileiro & Dusi, 1999; Sluys, 1999). Esses tumores são desenvolvidos porque o T-DNA da bactéria contém genes que regulam a biossíntese dos hormônios ácido indolacético (AIA) e citocinina. Assim, após as plantas tornarem-se infectadas com a bactéria, níveis anormais de AIA e citocinina provocam crescimento anormal e formação de tumor (Brasileiro & Dusi, 1999; Sluys, 1999).

Desse modo, a ciência nada mais fez do que aproveitar a capacidade natural dessa bactéria e utilizá-la para a transferência de genes de interesse econômico (Hooykaas & Schilperoort, 1992). Para tanto, faz-se necessário eliminar as características indesejáveis do T-DNA, mantendo, contudo, sua capacidade de integrar-se ao genoma da planta hospedeira. Em outras palavras, eliminam-se os genes indesejáveis e, em lugar deles, são inseridos genes de interesse econômico, por exemplo genes de resistência a doenças e pragas e genes que aumentam o valor protéico, entre outros (Brasileiro & Dusi, 1999; Sluys, 1999). Diversos mutantes de *A. tumefaciens* (Smith &

Townsend) Conn. têm sido desenvolvidos, nos quais os T-DNAs dos plasmídeos não produzem AIA ou citocinina, com a finalidade de servirem como um veículo para introduzir DNA contendo genes de interesse econômico em plantas (Leplé et al., 1992; Herrera-Estrella et al., 1992).

A transferência direta de genes baseia-se na transferência de moléculas de DNA para dentro das células vegetais, por métodos físicos ou químicos, com o propósito de quebrar a barreira da parede celular e da membrana plasmática para permitir a livre penetração do DNA na célula; pode-se utilizar tecidos intactos ou protoplastos (Birch, 1997; Brasileiro & Dusi, 1999; Lacorte et al., 1999). Entre os vários métodos de transferência direta de genes propostos, os mais eficientes são: biobalística, aceleração de partículas ou bombardeamento de partículas; e a eletroporação de protoplastos e tecidos (Birch, 1997; Lacorte et al., 1999).

O processo de biobalística consiste na utilização de microprojéteis de ouro ou tungstênio acelerados a altas velocidades (superiores a 1.500 km/h) para carrear e introduzir moléculas de DNA e outras moléculas em células e tecidos in vivo (Lacorte et al., 1999), enquanto a eletroporação de protoplastos e tecidos submete a choques elétricos protoplastos ou tecidos incubados com o DNA ou genes de interesse (D'Halluin et al., 1992; Birch, 1997; Brasileiro & Dusi, 1999; Lacorte et al., 1999). Na biobalística, as micropartículas aceleradas penetram na parede e na membrana celular de maneira não-letal, localizando-se aleatoriamente nas organelas celulares. Em seguida, o DNA é dissociado das micropartículas pela ação do líquido celular, ocorrendo o processo de integração do gene exógeno ao genoma do organismo a ser modificado (Lacorte et al., 1999). O desenvolvimento de métodos físicos e químicos de transformação permitiu viabilizar a engenharia genética em plantas monocotiledôneas (milho (*Z. mays* L.), arroz (*O. sativa* L.), trigo (*Triticum* spp.), etc.), porquanto as bactérias do gênero *Agrobacterium* normalmente não infectam essa classe de plantas (Birch, 1997; Brasileiro & Dusi, 1999; Lacorte et al., 1999).

Os requisitos necessários para realizar a transformação genética são: 1) um gene, ou genes, de interesse econômico localizado, isolado, clonado e seqüenciado; 2) uma técnica de transformação que permita a introdução desse gene, ou genes, no organismo receptor; 3) um gene marcador para permitir a identificação das plantas transformadas; 4) uma técnica de cultivo in vitro que permita a regeneração de uma nova planta a partir das células

ou dos tecidos transformados; 5) a expressão fenotípica do gene introduzido e sua perpetuação por meio de sucessivas gerações pelo processo sexual normal (Birch, 1997; Brasileiro & Dusi, 1999). Atualmente, conta-se com poucos genes disponíveis, isto é, identificados, seqüenciados e clonados, para transferência via engenharia genética. Muitos genes, embora já seqüenciados e mapeados, correspondem a seqüências de DNA de tamanho grande, o que dificulta a clonagem e a transferência (Lindsey, 1992; Dale et al., 1993; De Block, 1993).

Após o processo de transformação, as plantas transgênicas passam por rigoroso processo de seleção antes de estarem aptas a ser lançadas no mercado como novas cultivares, tal como ocorre no melhoramento clássico (Birch, 1997; Brasileiro & Dusi, 1999; Fontes & Melo, 1999; Romano & Monte, 1999). Assim, em geral, as outras alterações que não sejam as resultantes da característica introduzida são eliminadas por esse processo rigoroso de seleção, pois essas alterações são, em sua quase totalidade, deletérias, isto é, conferem desvantagem seletiva (Fontes & Melo, 1999).

As primeiras plantas transgênicas foram obtidas na década de 80 (De Block, 1993; Birch, 1997), quando foi introduzido o gene *neo*, que confere resistência ao antibiótico kanamicina, em células de plantas de fumo. Nos últimos anos, tem havido avanços consideráveis. Atualmente a maioria das espécies de valor econômico já foi transformada ou engenheirada (Brasileiro & Dusi, 1999). No entanto, a maioria dos problemas do melhoramento de plantas se referem a caracteres quantitativos e controlados por poligenes, os quais não serão solucionados por meio da transferência de pequenos segmentos isolados de DNA (Lindsey, 1992; Dale et al., 1993; De Block, 1993; Poehlman & Sleper, 1995). Portanto, para que a utilização de técnicas de engenharia genética se torne rotina em programas de melhoramento, será preciso que sistemas de transformação mais eficientes e que permitam a transferência de poligenes sejam desenvolvidos, além da disponibilidade de informações detalhadas sobre localização, estrutura e função dos genes a serem transformados (Birch, 1997; Brasileiro & Dusi, 1999). A principal limitação que enfrenta a engenharia genética é, hoje, a transferência apenas de genes de herança qualitativa (Poehlman & Sleper, 1995; Birch, 1997; Brasileiro & Dusi, 1999).

A Biotecnologia e o melhoramento do feijão-caupi

Técnicas em cultura de tecidos

O emprego de técnicas em cultura de tecidos como ferramenta para auxiliar no melhoramento do feijão-caupi tem sido relatado na literatura em diversos trabalhos (Kulothungan et al., 1993; Dicamber et al., 1997; Gomathinayagam et al., 1998; Brar et al., 1999; Tyagi & Chawla, 1999). No entanto, ainda existem várias dificuldades para a implementação dessas técnicas no melhoramento dessa cultura, dificuldades essas relacionadas, especialmente, à definição de protocolos de regeneração (Pandey & Bansal, 1989; Cheema & Bawa, 1991; Kulothungan et al., 1993, 1995).

Kulothungan et al. (1993) e Brar et al. (1999) regeneraram plantas de feijão-caupi por meio do cultivo *in vitro*, respectivamente, de explantes de folhas primárias e de meristemas apicais, enquanto Cheema & Bawa (1991) obtiveram o mesmo, mas a partir de explantes caulinares e hipocotilares. Amitha & Reddy (1996b), por sua vez, estudaram o potencial de explantes de feijão-caupi extraídos de epicótilos, cotilédones e hipocótilos para o cultivo *in vitro* e concluíram que as três fontes de explantes foram capazes de regenerar plantas. Resultados semelhantes foram relatados por Kulothungan et al. (1995) e Pellegrineschi (1997a). A frequência máxima de embriões obtidos por Kulothungan et al. (1995) ocorreu quando o calos foi transferido para um meio líquido, suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ da auxina 2,4-D. Por seu turno, Pandey & Bansal (1989) obtiveram eficiência na regeneração quando utilizaram explantes apenas de folhas cotiledonares – entre as plantas regeneradas, apenas 1%, aproximadamente, apresentou aneuploidia.

Amitha & Reddy (1996a) induziram embriogênese somática em feijão-caupi a partir de eixos embrionários de sementes maduras, cultivados em meio MS com diferentes concentrações de auxinas. Observaram que a embriogênese somática foi inibida com a adição de citocininas no meio, suplementado com 2,4-D ou 2,4,5-T, ou ainda com altas concentrações de sacarose. Em outro estudo, Amitha & Reddy (1998) desenvolveram protocolos para indução de embriogênese somática a partir de explantes de diferentes partes de sementes e plântulas de feijão-caupi. Embriões somáticos foram obtidos a partir de explantes de folhas imaturas, eixos de embriões maduros e imaturos e cotilédones imaturos. Amitha & Reddy (1998) verificaram ainda que 2,4-D foi a auxina mais eficiente para a indução

de embriões somáticos, com a maior frequência de embriões sendo obtida a partir de calos provenientes de explantes de folhas imaturas, e a menor, de explantes de cotilédones imaturos.

Entre as várias aplicações da cultura de tecidos no melhoramento do feijão-caupi, o resgate de embriões zigóticos imaturos e o respectivo cultivo *in vitro* tem sido implementado com relativo sucesso (Pellegrineschi et al., 1997b; Gomathinayagam et al., 1998; Tyagi & Chawla, 1999). Pellegrineschi et al. (1997a) e Gomathinayagam et al. (1998) desenvolveram procedimentos para o resgate e o posterior cultivo de embriões imaturos de híbridos interespecíficos entre *V. unguiculata* (L.) Walp. e *Vigna vexilata* (L.) Richard, com alta taxa de regeneração de progênies viáveis. Utilizando procedimento semelhante, Tyagi & Chawla (1999) obtiveram em torno de 10% de híbridos viáveis do cruzamento interespecífico entre *Vigna radiata* (L.) Wilczek e *V. unguiculata* (L.) Walp.

Outras possíveis aplicações da cultura de tecidos no melhoramento do feijão-caupi envolvem a cultura de anteras e a cultura de células. Estudos visando determinar a viabilidade da cultura de anteras em feijão-caupi foram realizados por Mix & Wang (1988) e Arya & Chandra (1989). Dicamber et al. (1997), por sua vez, utilizaram a cultura de células para selecionar variantes de feijão-caupi resistentes ao herbicida atrazime.

Finalmente, existem as técnicas de cultivo *in vitro* e a transformação genética de plantas, em que a literatura enfatiza que a existência de protocolos de regeneração de plântulas *in vitro* é um pré-requisito básico para a obtenção de sucesso na recuperação de transformantes. Em feijão-caupi, diversos estudos têm mostrado que a transformação pode ser bem-sucedida a partir de co-cultivos da bactéria *A. tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn. com calos obtidos do cultivo *in vitro* de embriões (Penza et al., 1991) e com cotilédones (Gnanam et al., 1995), e por meio da eletroporação de embriões (Akella & Lurquin, 1993). Em feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), Barros et al. (1997) ressaltam a importância da cultura de tecidos para a obtenção de sucesso na transformação genética dessa espécie.

Técnicas em marcadores moleculares

Nas diversas regiões do mundo, a avaliação e a caracterização dos recursos genéticos de feijão-caupi, bem como de outras espécies, para

uso em programas de melhoramento, têm sido feitas com base, principalmente, em características agrônômicas e morfológicas (Fatokun et al., 1993; Bretting & Widrechner, 1995). Quanto às características agrônômicas e morfológicas, assim como outros marcadores morfológicos, são afetadas, em maior ou menor grau, pelas condições ambientais, e podem, conseqüentemente, não representar com fidelidade as similaridades e/ou as diferenças genéticas existentes entre indivíduos (Andersen & Fairbanks, 1990; Rafalski & Tingev, 1993).

Nos últimos anos, no entanto, tem sido comum o uso de marcadores moleculares para auxiliar na caracterização e no manejo de bancos de germoplasma, bem como no desenvolvimento de programas de melhoramento genético clássico em várias espécies, incluindo o feijão-caupi (Andersesn & Fairbanks, 1990; Bretting & Widrechner, 1995). Nessas espécies, a contribuição dos marcadores moleculares tem se verificado, principalmente, pela identificação e pela avaliação de germoplasma, pela construção de mapas genéticos, pela análise filogenética e pela localização de genes de interesse econômico (Paterson et al., 1990; Hill et al., 1990). Podem também ser utilizados para caracterizar o genótipo de um indivíduo a partir de células de tecidos em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, o que permite acelerar o processo de seleção e recombinação dos indivíduos desejados e, conseqüentemente, reduzir o tempo necessário para completar uma geração de melhoramento (Bretting & Widrechner, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Em feijão-caupi, a utilização de marcadores moleculares e isoenzimáticos tanto na caracterização, na avaliação e no manejo de germoplasma, como na identificação de cultivares e no desenvolvimento de mapas genéticos para auxiliar nos processos de cruzamento e seleção, é bastante recente (Ehlers & Hall, 1997). Muitos estudos têm sido desenvolvidos objetivando, principalmente, o desenvolvimento de mapas genéticos (Fatokun et al., 1992; Menancio et al., 1993; Kaga et al., 1996; Maugham et al., 1996; Menéndez et al., 1997), o mapeamento de genes que controlam características específicas, como resistência a doenças (Verdier et al., 1998; Gillaspie Junior et al., 1999) e pragas (Myers et al., 1996), e o relacionamento filogenético entre as diversas espécies de *Vigna* (Fatokun et al., 1993; Kaga et al., 1993; Menancio et al., 1993; Maugham et al., 1996; Vaillancourt & Weeden, 1996; Mignouna et al., 1998; Ajibade et al., 2000).

Entre os primeiros estudos com marcadores em feijão-caupi visando à construção de mapas genéticos, estão os de Young et al. (1992) e Fatokun et al. (1992). Em ambos, os marcadores empregados foram RFLPs. Em seu estudo, Young et al. (1992) encontraram nível de polimorfismo relativamente baixo, porém, de acordo com esses autores, o suficiente para a construção de mapas genéticos. Encontraram ainda um marcador intimamente ligado a um dos genes maiores que controlam comprimento de vagem. Por sua vez, Maugham et al. (1996) utilizaram 91 marcadores RFLPs, RAPDs e SSRs, originados do mapeamento de indivíduos F_2 e linhagens $F_{2:3}$ de feijão-caupi, com a finalidade de construir um mapa de ligação e determinar se indivíduos dessa espécie compartilhavam com a soja genes que controlam o peso de grãos. Três marcadores associados ao peso de grãos foram encontrados em F_2 e quatro em $F_{2:3}$, enquanto os mesmos marcadores RFLPs associados ao peso de grãos, na mesma ordem, indicaram que ambas as espécies compartilham genes comuns quanto a essa característica. Resultados semelhantes foram relatados por Fatokun et al. (1992).

Kaga et al. (1993) avaliaram a utilidade da análise de RAPD para discriminar, entre 12 cultivares de *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohasshi, uma de *V. unguiculata* (L.) Walp. e uma de *P. vulgaris* L. Utilizaram 37 *primers* arbitrários de 10 pares de bases cada um e obtiveram polimorfismo entre cada combinação de *V. angularis* (Willd.) Ohwi & Ohasshi, *V. unguiculata* (L.) Walp. e *Phaseolus vulgaris* L. para todos os *primers* utilizados, indicando elevado grau de diferenciação entre elas. No entanto, entre as cultivares de *V. angularis* (Willd.) Ohwi & Ohasshi, foram encontrados apenas 10 marcadores polimórficos em um total de 184 marcadores, o que levou os autores a concluir que a construção de mapas de ligação por meio de marcadores RAPD não parece ser adequada com o uso de populações de segregação intervarietal. Em outro estudo, Kaga et al. (1996) construíram um mapa de ligação para *V. angularis* (Willd.) Ohwi & Ohasshi a partir de uma população F_2 resultante do cruzamento interespecífico dessa espécie com seu parente silvestre (*Vigna nakashimae* (Ohwi) Ohwi & Ohasshi). Mapearam um total de 132 marcadores, sendo 108 RAPDs, 19 RFLPs e cinco marcadores morfológicos, em 14 grupos de ligação cobrindo uma região do genoma de 1.250 cM. Ao compararem o mapa obtido com mapas de *V. unguiculata* (L.) Walp. e *Vigna radiata* (L.) Wilczek, utilizando 20 marcadores RFLP comuns às três espécies, esses

autores observaram que alguns marcadores pertenciam ao mesmo grupo de ligação, nos respectivos mapas, o que é um indicativo de que eles são conservadores nas três espécies.

As técnicas em marcadores moleculares também têm sido muito importantes em estudos de relacionamento filogenético dentro do gênero *Vigna*, o qual se constitui de um amplo e heterogêneo grupo de espécies distribuídas ao longo dos trópicos (Verdcourt citado por Christou, 1994). Além do feijão-caupi (*V. unguiculata* (L.) Walp.), esse gênero abrange outras espécies cultivadas de importância econômica, com destaque para *V. radiata* (L.) Wilczek, *Vigna mungo* (L.) Hepper, *Vigna subterranea* (L.) Verdec, *Vigna aconitifolia* (Jacq.) Maréchal, *V. angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi e *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi (Ajibade et al., 2000). Entre essas espécies, o feijão-caupi é a de maior importância econômica, embora seja também a mais isolada dentro do gênero *Vigna*, apresentando *pool* gênico secundário ainda pobremente caracterizado (Ng & Padulosi, 1991).

Um dos primeiros trabalhos nessa linha foi realizado por Fatokun et al. (1993), que usaram marcadores RFLP para estudar o relacionamento filogenético entre 18 espécies de quatro subgêneros de *Vigna*, em um total de 44 acessos, encontrando alto nível de variação genética, especialmente nas espécies provenientes da África em comparação com aquelas originárias da Ásia. O relacionamento filogenético entre as espécies abrangidas nesse estudo concorda com aqueles realizados usando as metodologias clássicas. No entanto, segundo Ajibade et al. (2000), o estudo não conseguiu distinguir com clareza divisões acima do nível de espécie. Por seu turno, Menancio et al. (1993) compararam, por meio de mapas genômicos construídos a partir de marcadores RFLP, *V. unguiculata* (L.) Walp. com *V. radiata* (L.) Wilczek e observaram que cerca de 90% das sondas utilizadas hibridizaram com fragmentos de ambas as espécies, indicando um alto grau de similaridade entre suas seqüências de DNA. Em *V. radiata* (L.) Wilczek, o nível de polimorfismo detectado (75,7%) foi bem maior do que em *V. unguiculata* (L.) Walp. (41,2%), concordando com Panella & Gepts (1992), Panella et al. (1993) e Vaillancourt et al. (1993), que postularam a ocorrência de *bottleneck* induzida pela domesticação de *V. unguiculata* (L.) Walp. em relação a várias características. Estudo semelhante ao de Fatokun et al. (1993), utilizando marcadores RAPD e abrangendo apenas *V. unguiculata* (L.) Walp., foi desenvolvido por Mignouna et al. (1998). Nesse trabalho, foram empregados 95 acessos

de três grupos de cultivares de feijão-caupi provenientes de diferentes origens geográficas da África, da América e da Ásia, e os resultados revelaram alto nível de diversidade entre os acessos estudados.

Ainda em relação à filogenia, Ajibade et al. (2000) utilizaram 62 acessos de 18 espécies de *Vigna* e marcadores SSR para estudar o grau de relacionamento filogenético dentro desse gênero. *Vigna reticulata* Hooker Fil. foi identificada como a espécie mais próxima de *V. unguiculata* (L.) Walp. Vaillancourt & Weeden (1996), usando DNA dos cloroplastos e isoenzimas, obtiveram resultados semelhantes. Por sua vez, Sonnante et al. (1996), estudando o relacionamento filogenético entre *V. unguiculata* (L.) Walp. e outras espécies de *Vigna*, por meio de isoenzimas, concluíram que *V. unguiculata* (L.) Walp. estava mais proximamente relacionada à *Vigna vexillata* (L.) Richard do que a qualquer uma das demais espécies de *Vigna* investigadas. Ainda em relação ao estudo de Ajibade et al. (2000), foi observado que os marcadores SSR foram eficientes ao discriminar indivíduos em nível de espécie ou abaixo, porém, não em nível de subgênero.

Em relação ao mapeamento de genes que controlam características de resistência a doenças e pragas, o trabalho de Myers et al. (1996) foi um dos mais importantes. Nesse trabalho, foram cruzadas duas cultivares de feijão-caupi, sendo uma resistente e outra suscetível ao pulgão *Aphis craccivora* (Koch), e foi utilizada a técnica de RFLP para detectar a presença de ligação entre o gene Rac 1, de resistência a esse pulgão, e marcadores RFLPs. Como resultado, foram encontrados um marcador RFLP, o bg4D9b, intimamente ligado ao gene de resistência Rac 1, e vários marcadores flanqueando esse gene no mesmo grupo de ligação. A íntima relação entre o gene Rac 1 e o marcador bg4D9b levou Myers et al. (1996) a concluir que a clonagem do referido gene pode ser feita com sucesso. A forte ligação entre o gene Rac 1 e o marcador bg4D9b é, também, um indicativo de que a Seleção Assistida por Marcadores (SAM) pode ser empregada para o desenvolvimento de cultivares resistentes ao pulgão *A. craccivora* (Koch).

No que concerne a doenças, marcadores moleculares têm sido utilizados tanto para a caracterização como para o desenvolvimento de metodologias para determinar a presença de agentes patogênicos em plantas de feijão-caupi. Verdier et al. (1998), por exemplo, utilizaram

marcadores RFLP para caracterizar molecularmente diversas linhagens da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola* (Burkh) Dye., isoladas de folhas de feijão-caupi em diversas áreas geográficas. Os resultados das análises de RFLPs indicaram que a variação genética dessa bactéria foi independente do local de origem e da patogenicidade das linhagens. Algumas linhagens foram amplamente distribuídas, enquanto outras apresentaram distribuição localizada. Com base nos resultados de seus estudos e de estudos prévios de caracterização bioquímica e de patogenicidade, Verdier et al. (1998) concluíram que as linhagens da bactéria isoladas de folhas com sintomas de murcha ou de pequenas pústulas pertenciam ao mesmo pathovar. Gillaspie Junior et al. (1999), por sua vez, descreveram, a partir da transcrição reversa da reação de polimerase em cadeia (RT-PCR), um método altamente eficiente para identificação da presença do vírus-do-mosqueado-do-feijão-caupi (*Cowpea mottle virus*, CPMoV) em germoplasma de feijão-caupi. Segundo esses autores, o método por eles descrito foi até 105 vezes mais sensível que o procedimento tradicional Elisa em detectar o CPMoV.

As técnicas em marcadores moleculares têm sido utilizadas ainda para investigar genes envolvidos no controle da fixação de N_2 em feijão-caupi via bactérias do gênero *Rhizobium* (Purdom & Trese, 1995). Esses autores identificaram morfológica e molecularmente as características de nodulação de raízes de feijão-caupi em relação a vários isolados de *Rhizobium*. Em primeiro lugar, compararam nódulos normais com nódulos mutantes e observaram que ambos eram anatomicamente similares e continham marcas de infecções e bacterióides, porém, os nódulos não-fixadores de N_2 eram menores, o número de bacterióides era reduzido e a senescência ocorria prematuramente nas células infectadas. A análise de RFLP em mRNA de quatro genes de nodulação indicou que, nos nódulos não-fixadores de N_2 , os níveis dos transcritos do gene de nodulação precoce, V_uENOD_2 , foram reduzidos inicialmente, porém, foram equivalentes aos dos nódulos normais aos 21 dias. Contrariamente, para o gene de nodulação precoce V_uB , foram inicialmente similares em ambos os genótipos, porém, à medida que os nódulos se desenvolviam, os níveis de mRNA declinavam mais lentamente nos nódulos não-fixadores de N_2 . Os genes de nodulação tardia, leghemoglobina e uricase, foram expressos em nódulos não-fixadores de N_2 , porém, em níveis muito baixos. Desse modo, Purdom & Trese (1995) concluíram que o defeito de nodulação

estava associado com a maturação e a manutenção de bacterióides danificados, expressão de genes de nodulação alterada e senescência acelerada.

Mapas de ligação

O primeiro mapa de ligação em feijão-caupi (*V. unguiculata* (L.) Walp.) dentro do *pool* gênico cultivado foi desenvolvido por Fatokun et al. (1993), citados por Quédraogo et al. (2002), e o segundo, por Menéndez et al. (1997). No primeiro, construído por meio de marcadores RFLPs, utilizando progênies de um cruzamento entre uma cultivar melhorada de *V. unguiculata* (L.) Walp. e um progenitor silvestre de *Vigna unguiculata* subs. *dekindtiana* (Harms) Verdc., os autores obtiveram 92 marcadores mapeados em oito grupos de ligação, cobrindo uma distância genética de 684 cM. No segundo, utilizando como população de mapeamento 94 linhagens endogâmicas F8 resultantes do cruzamento entre duas linhagens melhoradas, '1T84S-2049' e '524B', foram obtidos 181 marcadores, sendo 133 RAPDs, 19 RFLPs, 25 AFLPs, três marcadores morfológicos e um isoenzimático, os quais formaram 12 grupos de ligação e cobriram uma região de 972 cM, com uma distância média entre marcadores de 6,4 cM. Foram mapeados ainda um gene para precocidade e um marcador RAPD significativamente ligado ao peso de grãos.

Quédraogo et al. (2002), utilizando uma população de mapeamento constituída pelas 94 linhagens endogâmicas empregadas por Menéndez et al. (1997), nesse caso em F9, construíram o mais recente e, também, o mais completo mapa de ligação em feijão-caupi (*V. unguiculata* (L.) Walp.), que consiste de 11 grupos de ligação e cobre 2.670 cM do genoma dessa espécie, com uma distância média entre marcadores de 6,43 cM. Para desenvolver esse mapa de ligação, Quédraogo et al. (2002) obtiveram 242 marcadores, a maioria AFLP, e os associou a outros 181 marcadores RAPD, RFPL, AFLP e, também, a marcadores bioquímicos, já mapeados em estudos anteriores. Além do mapa em si, marcadores associados a várias características de resistência e/ou tolerância biológica, genes de resistência e genes de resistência análoga, incluindo resistência a *Striga gesnerioides* raças 1 e 2, *Cowpea mosaic virus*, CPMV, *Cowpea severe mosaic virus*, CPSMV, *Blackeye cowpea mosaic virus*, BICMV, *Southern bean mosaic virus*, SBMV, fusário-selvagem (*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphylum* (E.F. Smith) W.C. Snyder & H.N. Hansen) e nematóides-das-galhas

(*Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood). Quédraogo et al. (2002) ressaltam que esses marcadores são de grande importância para o desenvolvimento da seleção assistida por marcadores moleculares no melhoramento de feijão-caupi, bem como para a clonagem dos vários genes de resistência.

Engenharia genética

Entre as muitas espécies de leguminosas de importância econômica, a soja (*G. max* (L.) Merrill) tem sido a mais intensamente empregada em estudos de engenharia genética (Christou, 1994). No entanto, diversas espécies, como o feijão-comum (*P. vulgaris* L.), a alfafa (*Medicago sativa* L.), a lentilha (*Lens culinaris* Med.), a ervilha (*Pisum sativum* (L.) Partim.) e o feijão-caupi (*V. unguiculata* (L.) Walp.), entre outras, têm sido objeto de estudos de transformação genética (Damiani & Arcioni, 1991; Pezzotti et al., 1991; Akella & Lurquin, 1993; Aragão et al., 1993; Davies et al., 1993; Fontana et al., 1993; Schroeder et al., 1993; Chowrira et al., 1995; Gnanam et al., 1995; Barros et al., 1997; Matsuoka et al., 1997; Okamoto et al., 2000).

No gênero *Vigna*, as primeiras experiências em transgenia foram realizadas ainda na década de 80. As espécies *V. unguiculata* (L.) Walp. e *V. aconitifolia* (Jacq.) Maréchal têm sido as mais estudadas. Garcia et al. (1986, 1987) desenvolveram um método de introdução de DNA em tecidos de feijão-caupi, utilizando o sistema de *Agrobacterium*. Cultivaram discos foliares em um meio seletivo para o antibiótico kanamicina e obtiveram a formação de calos, porém, não foram bem-sucedidos na regeneração de plantas. Eapen et al. (1987), por sua vez, estudaram o efeito de cultivar na taxa de transformação de *V. aconitifolia* (Jacq.) Maréchal. Co-cultivaram protoplastos com *A. tumefaciens* (Smith & Townsend) Corn. e obtiveram 23% de células resistentes ao antibiótico kanamicina, indicando que as células foram transformadas. Contudo, apesar de terem relatado a regeneração de linhagens transformadas, não apresentaram nenhuma análise genética ou molecular que evidenciasse sua natureza transgênica (Christou, 1994). Em outra experiência, Kohler et al. (1987) eletroporaram protoplastos de *V. aconitifolia* (Jacq.) Maréchal com um plasmídeo carregando um gene que codifica para a enzima clorofenicol acetiltransferase; no entanto, nenhum transformante foi obtido. Por sua vez, Akella & Lurquin (1993) conseguiram obter plantas de feijão-caupi transformadas por meio de eletroporação de embriões intactos.

Penza et al. (1991) também utilizaram embriões para transformar plantas de feijão-caupi através do sistema *Agrobacterium*. Primeiramente, incubaram sementes esterilizadas de cinco acessos em água destilada por 12 horas, à temperatura ambiente e, posteriormente, os embriões foram separados das sementes, cortados longitudinalmente, sendo ambos os meristemas apical e radicular feridos em experimentos de co-cultivo com *A. tumefaciens* (Smith & Townsend) Corn. No entanto, nenhuma planta com transformação estável foi obtida. Christou (1994) ponderou que os problemas desses estudos envolvendo a engenharia genética em *Vigna* foram a não-realização de estudos genéticos e moleculares para, de fato, atestarem a natureza transgênica das plantas transformadas. Ressaltou ainda que a realização desses estudos é fundamental para que essa técnica biotecnológica possa ser utilizada de forma eficiente no melhoramento do feijão-caupi e de outras espécies de *Vigna*.

Nos últimos anos, contudo, muitas das dificuldades para a obtenção de plantas transgênicas no gênero *Vigna*, mais especificamente em feijão-caupi, já foram superadas. Gnanam et al. (1995), por exemplo, obtiveram sucesso na transformação de plantas de feijão-caupi, utilizando explantes de cotilédones. Primeiramente, pré-incubaram os cotilédones por 24 horas e, posteriormente, co-cultivaram com a bactéria *A. tumefaciens* (Smith & Townsend) Corn., linhagem pUCD2614, carregando o plasmídeo pUCD2340 por 48 horas. Chowrira et al. (1995), por sua vez, descreveram um procedimento para a obtenção de plantas transgênicas de feijão-caupi, ervilha, soja e lentilha, por meio da eletroporação de DNA em meristemas nodais intactos, sem a necessidade de utilização de técnicas de cultivo *in vitro* para regenerar plantas a partir dos tecidos transformados. Segundo esses autores, a viabilização da transformação genética do feijão-caupi e outras espécies de valor econômico pelo emprego dessa técnica será um avanço importante para a incorporação da engenharia genética como uma rotina do melhoramento. Diversos estudos bem-sucedidos na transformação genética em feijão-caupi têm sido registrados na literatura (Filippone, 1990; Matsuoka et al., 1997; Yamagushi et al., 1997; Okamoto et al., 2000).

Em relação à transferência de genes de resistência a pestes, especialmente a insetos, o feijão-caupi, que é portador do gene CpTI, que confere resistência a diversos insetos pela inibição da síntese de tripsina (Boulter et al., 1989; Gatehouse & Murray, 1991; Gatehouse et al., 1992;

Murdock, 1992; Myers et al., 1996; Prasad et al., 1996; Ogbuinya, 1997), tem dado importante contribuição para o desenvolvimento de genótipos resistentes de várias espécies.

A literatura é ampla sobre a utilização, por meio da engenharia genética, desse gene para conferir resistência a diversos insetos, como a lagarta *Helicoverpa zea* (Boddie) em fumo (Hoffmann et al., 1992), a lagarta *Helicoverpa armigera* (Hubner), também em fumo (Zhao et al., 1996), e duas espécies causadoras da broca-do-caule-do-arroz (Xu et al., 1996). O gene CpTI também foi introduzido em morango, James et al. (1993) e Graham et al. (1995), em maçã (*Malus domestica* Bork), por James et al. (1993), visando à transferência de resistência a insetos para essas culturas.

Do mesmo modo, o desenvolvimento de cultivares de feijão-caupi resistentes a insetos deve ser, segundo Ehlers & Hall (1997), uma das contribuições imediatas da engenharia genética para o melhoramento dessa cultura. Ainda na concepção desses autores, o gene inibidor da alfa-amilase, que confere resistência ao caruncho (*Callosobruchus maculatus* (Fabricius)), e os genes Bt do *Bacillus thuringiensis* Berliner, que conferem resistência à broca-da-vagem, estão entre os mais promissores a serem engenheirados nessa espécie. Contudo, outros genes que controlam características como tolerância à seca (Yamagushi et al., 1997) e resistência a doenças, especialmente aquelas causadas por vírus (Sijen et al., 1995), além de características de qualidade alimentar, apresentam potencial de transferência via engenharia genética.

Considerações finais

O feijão-caupi é uma das principais culturas anuais dos trópicos, onde sua importância econômico-social é explicitada pelos mais de 11 milhões de hectares plantados ao redor do mundo (Singh et al., 2002). Apesar de sua importância, os níveis tecnológicos ainda são muito baixos, especialmente no Brasil, onde têm recebido pouca atenção dos setores agrícolas público e privado.

Ainda em relação ao Brasil, as pesquisas com feijão-caupi estão centradas na Região Nordeste, onde a cultura tem sua maior importância e o melhoramento genético tem sido uma das linhas de pesquisa mais enfatizadas, em virtude, principalmente, dos baixos níveis de produtividade

alcançados pelos produtores da região (IBGE, 1996). É sempre interessante salientar que a essência do progresso genético no melhoramento está no quanto o fenótipo de um indivíduo expressa o seu genótipo, e essa tarefa, segundo Hansche (1983), tem sido uma das maiores dificuldades enfrentadas pelo melhorista de plantas. Isso porque, para a maioria das características, especialmente para aquelas de baixa herdabilidade, o valor genotípico de um indivíduo é afetado por efeitos ambientais e/ou outros efeitos de confundimento.

É nesse contexto que o uso da biotecnologia pode ter uma de suas maiores contribuições, ou seja, no avanço dos ganhos genéticos dessa cultura, especialmente pelo uso de marcadores moleculares, porquanto esses permitem acessar diretamente o genótipo do indivíduo.

Os grandes e crescentes avanços nessa área vêm sendo um instrumento moderno e eficaz de manipulação da variação genética, e seu uso associado às técnicas convencionais pode oferecer, em curto e médio prazos, grandes benefícios socioeconômicos. Os recentes avanços nessa área têm possibilitado ganhos consideráveis para as culturas que delas têm se beneficiado (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Portanto, é importante que o melhoramento do feijão-caupi no Brasil passe, também, a beneficiar-se desses avanços. Para tanto, é necessário que a pesquisa pública e, principalmente, os melhoristas dessa cultura tenham consciência dos ganhos potenciais advindos do seu uso.

Em relação aos marcadores de DNA, entre as contribuições mais significativas, em curto e médio prazos, que poderiam dar ao melhoramento do feijão-caupi, estão: a identificação de parentais para a utilização nos cruzamentos; a identificação e a proteção de cultivares; a certificação de pureza genética; o monitoramento de cruzamentos; a construção de mapas genéticos; o mapeamento de locos de herança simples; e a SAM, cujo uso em programas de melhoramento em geral ainda é muito limitado, principalmente por conta da necessidade de procedimentos elaborados da maioria dos marcadores atualmente disponíveis.

O melhorista de feijão-caupi também pode utilizar os marcadores moleculares para caracterização e manejo de bancos de germoplasma, bem como para caracterizar indivíduos a partir de células de tecidos em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, o que permite acelerar o processo de seleção e recombinação dos indivíduos desejados e, conseqüentemente,

reduzir o tempo necessário para se completar uma geração de melhoramento (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Outras técnicas em biotecnologia, como as de cultivo *in vitro* e a engenharia genética, não devem ser esquecidas. Em relação à engenharia genética, especificamente, deve-se salientar que existem, em uso, atualmente, inúmeras cultivares transgênicas de plantas de várias espécies que receberam genes para resistência a insetos, a vírus e a herbicidas, além de cultivares que receberam genes para longa vida pós-colheita, entre outras. Assim, entende-se que todo empenho deve ser feito para que essa tecnologia seja incorporada aos programas de melhoramento de feijão-caupi.

Referências

- ADAMS, W. T. Application of isozymes in tree breeding. In: TANSKEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). **Isozymes in plant genetics and breeding. Part A**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983. p. 60-64.
- AJIBADE, S. R.; WEEDEN, N. F.; CHITE, S. M. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. **Euphytica**, Wageningen, Holanda, v. 111, n. 1, p. 47-55, 2000.
- AKELLA, V.; LURQUIN, P. F. Expression in cowpea seedlings of chimerical transgenes after electroporation into seed-derived embryos. **Plant Cell Reports**, New York, v. 12, n. 2, p. 110-117, 1993.
- ALTMAN, A. Plant biotechnology in the 21st century: the challenges ahead. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, Chile, v. 2, n. 2, 1999. Disponível em: <<http://www.ejb.ucv.cl/content/vol2/issue2/full/1/index.html>>. Acesso em: 12 abr. 2001.
- ALTMAN, A.; ZIV, M. Horticulture biotechnology: a historical perspective and future prospects. **Acta Horticulturae**, The Hague, Holanda, v. 447, p. 31-35, 1997.
- AMITHA, K.; REDDY, T. P. Induction of somatic embryogenesis and regeneration in cowpea (*Vigna sinensis* L.). **Advances in Plant Sciences**, Hyderabad, India, v. 9, n. 2, p. 23-28, 1996a.
- AMITHA, K.; REDDY, T. P. Induction of somatic embryos from different explants of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Journal of Genetics and Breeding**, Roma, Itália, v. 52, n. 4, p. 281-288, 1998.

- AMITHA, K.; REDDY, T. P. Regeneration of plantlets from different explants and callus cultures of cowpea (*Vigna unguiculata* L.). **Phytomorphology**, New Delhi, Índia, v. 46, n. 3, p. 207-211, 1996b.
- ANDERSEN, W. R.; FAIRBANKS, D. J. Molecular markers: important tools for plant genetic resource characterization. **Diversity**, Bethesda-MD, v. 6, n. 3/4, p. 51-53, 1990.
- ARAGÃO, F. J. L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. **Feijão transgênico**: um produto da engenharia genética. New York, NY, Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/bio/5_i.htm>. Acesso em: 12 set. 1998.
- ARAGÃO, F. J. L.; GROSSI DE SÁ, M. F.; DAVEY, M. R.; BRASILEIRO, A. C. M.; FARIA, J. C.; RECH, E. L. Factors influencing transiente gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an electrical particle acceleration device. **Plant Cell Reports**, New York, NY, v. 12, n. 9, p. 483-490, 1993.
- ARYA, I. D.; CHANDRA, N. Organogenesis in anther-derived callus culture of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Current Science**, Bangalore, Índia, v. 58, n. 5, p. 257-259, 1989.
- ASSIS, T. F. de; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPB, 1998. v. 1, p. 261-296.
- BARBOSA NETO, J. F. Seleção assistida por marcadores moleculares. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998, p. 75-87.
- BARCELÓ, P.; CABRERA, A. C.; HAGEL, C.; LORZ, H. Production of doubled-haploid plants from *Triticum* anther culture. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, NY, v. 87, n. 6, p. 741-745, 1994.
- BARROS, L. M. G.; GAMA, M. I. C. S.; GONÇALVES, C. H. R. de P.; BARRETO, C. C.; SANTANA, E. F.; CARNEIRO, V. T. de C. Cultura de tecidos de feijoeiro visando a introdução de genes exógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 3, p. 267-275, 1997.
- BARRUETO CID, L. P. Suspensão celular. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPB, 1998. v.1, p. 331-353.
- BATES, G. W.; PIASTUSCH, W.; RIGGS, C. D.; RABUSSAY, D. Electroporation for DNA delivery to plant protoplasts. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, Holanda, v. 12, p. 213-218, 1988.

- BEZTE, L.; PENNER, G. Microsatellite markers. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998a. p. 117-121.
- BEZTE, L.; PENNER, G. AFLP. Amplified Fragment Length Polymorphism. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998b. p. 123-129.
- BINSFELD, P. C. **Transferência genômica parcial entre espécies sexualmente incompatíveis por meio de hibridação somática assimétrica**. 1998. 130 f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- BIRCH, R. G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, CA, v. 48, p. 297-326, 1997.
- BJORNSTAD, A.; SKINNES, H.; THORESEN, K. Comparison between doubled haploid lines produced by anther culture, the *Hordeum bulbosum* - method and lines produced by single seed in barley crosses. **Euphytica**, Wageningen, Holanda, v. 66, n. 1-2, p. 135-144, 1993.
- BLACKHALL, N. W.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Applications of protoplasts technology: fusion and selection of somatic hybrids. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. **Plant cell culture: a practical approach**. New York: Orfox University Press, 1994b. p. 41-48.
- BLACKHALL, N. W.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Isolation, culture, and regeneration of protoplasts. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. **Plant cell culture: a practical approach**. New York: Orfox University Press, 1994a. p. 27-39.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 1998. 453 p.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, IL, v. 32, p. 314-331, 1980.
- BORLAUG, N. E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, Israel, v. 3, p. 119-127, 1997.
- BOULTER, D.; GATEHOUSE, A. M. R.; HILDER, V. Use of cowpea trypsin inhibitor (CpTI) to protect plants against insect predation. **Biotechnology Advances**, Oxford, Inglaterra, v. 7, n. 4, p. 489-497, 1989.
- BRAR, M. S.; AL-KHAYRI, J. M.; MORELOCK, T. E.; ANDERSON, E. J. Genotypic response of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) to *in vitro* regeneration from cotyledon explants. **In vitro Cellular and Developmental Plant Biology**, New York, NY, v. 35, n. 1, p. 8-12, 1999.

- BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPB, 1999. v. 2, p. 679-735.
- BRETTING, P. K.; WIDRLECHNER, M. P. Genetic markers and horticultural germplasm management. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 30, n. 7, p. 1349-1356, 1995.
- BROWN, C.; LUCAS, J. A.; POWER, J. B. Plant regeneration from protoplasts of a wild lettuce species (*Lactuca saligna* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 6, p. 180-182, 1987.
- CAETANO-ANNÓLES, G.; BASSAM, B. J.; GRESSHOFF, P. M. DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, Holanda, v. 10, n. 2, p. 294-307, 1991.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPB, 1998. v.1, p. 87-132.
- CARNEIRO, N. P. E.; PAIVA, E. Desenvolvimento e contribuições da biotecnologia no melhoramento genético do milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 23., 2000, Uberlândia, MG. **Anais...** Uberlândia: ABMS: Embrapa-CNPMS, 2000. 1 CD-ROM.
- CARNEIRO, V. T. de C.; CONROI, T.; BARROS, L. M. G.; MATSUMOTO, K. Protoplastos, cultura e aplicações. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPB, 1998. v. 1, p. 413-458.
- CARVALHEIRA, S. B. R. C.; CID, L. P. B.; BRASILEIRO, A. C. M. Regeneração de colos de *Eucalyttus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. In: TALENTO ESTUDANTIL DO CENARGEN, 1996, Brasília. **Resumos...** Brasília, DF: Embrapa: MAA, 1996. p. 27.
- CHANG, S.; YANG, J. Callus culture and regeneration of *Eucalyptus camaldulensis*. **Bulletin Taiwan Forestry Research Institute**, v. 10, n. 1, p. 15-24, 1995.
- CHEEMA, H. K.; BAWA, J. Clonal multiplication via multiple shoots in some legumes (*Vigna unguiculata* and *Cajanus cajan*). **Acta Horticulturae**, n. 289, p. 93-96, 1991.
- CHOWRIRA, G. M.; AKELLA, V.; LURQUIN, P. F. Electroporation-mediated gene transfer into intact nodal meristems in planta: generating transgenic plants without *in vitro* tissue culture. **Molecular Biotechnology**, Dordrecht, Holanda, v. 3, n. 1, p. 17-23, 1995.
- CHRISTOU, P. The biotechnology of crop legumes. **Euphytica**, Wageningen, Holanda, v. 74, n. 3, p. 165-185, 1994.

- CROUCH, J. H.; VUYLSTEKE, D.; ORTIZ, R. Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plaintain and banana (*Musa* sp.). **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, Chile, v. 2, n. 2, 1998. Disponível em: <<http://www.ejb.ucv.cl/convent/vol1/issue2/full/2/index.html>>. Acesso em: 12 abr. 2001.
- DALE, P. J.; IRWIN, J. A.; SCHEFFLER, J. A. The experimental and commercial release of transgenic crop plants. **Plant Breeding**, Berlin, Alemanha Ocidental, v. 111, n. 1, p. 1-22, 1993.
- DAMIANI, F.; ARCIONI, S. Transformation of *Medicago arborea* L. with a *Agrobacterium rhizogenes* binary vector carrying the hygromycin resistance gene. **Plant Cell Reports**, New York, NY, v. 10, n. 6-7, p. 300-303, 1991.
- DAVEY, M. R.; RECH, E. L.; MULLIGAN, B. J. Direct DNA transfer to plant cells. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, Holanda, v. 13, n. 3, p. 273-285, 1989.
- DAVIES, D.; HAMILTON, J.; MULLINEAUX, P. Transformation of peas. **Plant Cell Reports**, New York, NY, v. 12, n. 3, p. 180-183, 1993.
- DE BLOCK, M. The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implication for the plant breeding. **Euphytica**, Wageningen, Holanda, v. 71, n.1-2, p. 1-14, 1993.
- D'HALLUIN, K.; BONNE, E.; BOSSUT, M. B.; LEEMANS, J. Transgenic maize plants by tissue electroporation. **Plant Cell**, Rockville, MD, v. 4, n. 12, p. 1495-1505, 1992.
- DHIR, S. K.; DHIR, S.; SAVKA, M. A.; BELANGER, F.; KRIZ, A. L.; FARRAND, S. K.; WIDHOLM, J. M. Regeneration of transgenic soybean (*Glycine max*) plants from electroporated protoplasts. **Plant Physiology**, Bethesda, MD, v. 99, n. 1, p. 81-88, 1992.
- DICAMBER, R.; RAMULU, C. A.; RAO, D. Selection for herbicide resistance in tissue culture and isolation of phenotypic variants in cowpea and chickpea. In: REDDY, S. M.; SRIVASTAVA, H. P.; PUROHIT, D. K.; REDDY, S. R. (Ed.) **Microbial biotechnology**. Jodhpur: Scientific Publishers, 1997. p. 18-21.
- DUVAL, Y.; DURAND-GASSELIN, T.; KONAN, K.; PANNETIER, C. Multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) par culture *in vitro*. **Oleagineux**, Paris, v. 43, n. 2, p. 39-44, 1988.
- DUVICK, D. N. Plant breeding: past achievements and expectations for the future. **Economic Botany**, Bronx, NY, v. 40, p. 289-297, 1986.
- EAPEN, S.; KOHLER, F.; GERDEMANN, M.; SCHICDER, O. Cultivar dependence of transformation rates in moth bean after co-cultivation of protoplasts with *Agrobacterium tumefaciens*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, NY, v. 75, p. 207-210, 1987.

EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Field Crops Research**, Amsterdam, Netherlands, v. 53, n. 1-2, p. 187-204, 1997.

FAHLESON, J.; ERIKSSON, I.; LANDGREN, M.; STYMNE, S.; GLIMENIUS, K. Intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Thlaspi perfoliatum* with high content of the *T. perfoliatum* nernonic acid. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 87, p. 795-804, 1994.

FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. 3. ed. New York: Longman Scientific and Technical, 1989. 438 p.

FARY, R. L. The cowpea: production, utilization, and research in the United States. **Horticultural Reviews**, Westport, CT, v. 12, p. 197-222, 1990.

FATOKUN, C. A.; MENANCIO-HAUTEA, D.; DANESH, D.; YOUNG, N. D. Evidence of orthologous seed weight in cowpea and mung bean based on RFLP mapping. **Genetics**, Maryland, TX, v. 132, n. 3, p. 841-846, 1992.

FATOKUN, C. A.; DANESH, D.; YOUNG, N. D.; STEWART, E. L. Molecular taxonomic relationships in the genus *Vigna* based on RFLP analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, NY, v. 85, n. 1, p. 97-104, 1993.

FEHR, W. R. **Principles of cultivar improvement: theory and technique**. Ames: Macmillan Publishing Company, 1987. v. 1, 535 p.

FENG, X. R.; WOLYN, D. J. Development of haploid asparagus embryos from liquid cultures of anther-derived calli is enhanced by ancyimidol. **Plant Cell Reports**, New York, v. 12, n. 5, p. 281-285, 1993.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. (Ed.). Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPB, 1998. v. 1, p. 21-43.

FREIRE FILHO F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; Santos, C. A. F. Melhoramento genético de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região do Nordeste. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas no Nordeste brasileiro**. Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido: Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatas.embrapa.br>>. Acesso em: 10 nov. 1999.

- FILIPPONE, E. Genetic transformation of pea (*Pisum sativum* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L.) by co-cultivation of tissues with *Agrobacterium tumefaciens* carrying binary vectors. In: NG, N. Q.; MONTI, L. M. (Ed.). **Cowpea genetic resources**. Ibadan: IITA, 1990. p. 175-181.
- FINER, J. J. Plant regeneration via embryogenic suspension cultures. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. **Plant cell culture: a practical approach**. New York: Orfox University Press, 1994. p. 99-125.
- FONTANA, G.; SANTINI, L.; CARETTO, S.; FRUGIS, G.; MARIOTTI, D. Genetic transformation in the grain legume *Cicer arietinum* L. (chickpea). **Plant Cell Reports**, New York, v. 12, p. 194-198, 1993.
- FONTES, E. G.; MELO, P. E. de. Avaliação de riscos na introdução no ambiente de plantas transgênicas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPQ, 1999. v. 2, p. 815-843.
- FRANKLIN, C. I.; DIXON, R. A. Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. **Plant cell culture: a practical approach**. New York: Orfox University Press, 1994. p. 1-25.
- GARCIA, J. A.; HILLE, J.; GOLDBACH, R. Transformation of cowpea *Vigna unguiculata* cells with an antibiotic resistance gene using a Ti-plasmid-derived vector. **Plant Science**, Limerick, Irlanda, v. 44, n.?, p. 37-46, 1986.
- GARCIA, J. A.; HILLE, J.; VOS, P.; GOLDBACH, R. Transformation of cowpea *Vigna unguiculata* cells with a full-length DNA copy of cowpea mosaic virus mRNA. **Plant Science**, Limerick, Irlanda, v. 48, p. 89-98, 1987.
- GATEHOUSE, J. A.; MURRAY, D. R. Breeding for resistance to insects. In: MURRAY, D. R. (Ed.). **Advanced methods in plant breeding and biotechnology**. Wallingford: CAB International, 1991. p. 250-276.
- GATEHOUSE, A. M. R.; HILDER, V. A.; GATEHOUSE, J. A. Control of insect pests by plant genetic engineering. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh**, London, Inglaterra, v. 99, n. 3/4, p. 51-60, 1992.
- GILLASPIE JUNIOR, A. G.; MITVHELL, S. E.; STUART, G. W.; BOZARTH, R. F. RT-PCR method for detecting cowpea mottle carmovirus in *Vigna* germplasm. **Plant Disease**, Beltsville, MD, v. 83, n. 7, p. 639-643, 1999.
- GNANAM, A.; MUTHUKUMAR, B.; MAMMEN, M.; VELUTHAMBI, K.; MATHIS, P. Genetic transformation using cotyledones as explants. In: INTERNATIONAL PHOTOSYNTHESIS CONGRESS, 10., 1995, Montpellier. **Proceedings...** Dordrecht: Academic Publishers, 1995. v. 3, p. 707-710.

- GOMATHINAYAGAM, P.; RAM, S. G.; RATHNASWAMY, R.; RAMASWAMY, N. M. Interspecific hybridization between *Vigna unguiculata* (L.) Walp.) and *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. through *in vitro* embryo culture. **Euphytica**, Wageningen, Holanda, v. 102, n. 2, p. 203-209, 1998.
- GONZALES, R. A. Selection of plant cells for desirable characteristics. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. **Plant cell culture: a practical approach**. New York: Orfox University Press, 1994. p. 67-72.
- GRAHAM, J.; MCNICOL, R. J.; GREIG, K. Towards genetic based insect resistance in strawberry using the cowpea trypsin inhibitor gene. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, Inglaterra, v. 127, n. 1, p. 163-173, 1995.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.
- GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 8., p. 339-374, 1990.
- GUERCHE, P.; CHARBONNIER, M.; JOUANIN, L.; TOURNEUR, C.; PASZKOWSKI, J. PELLETIER, G. Direct gene transfer by electroporation in *Brassica napus*. **Plant Science**, Limerick, Irlanda, v. 52, p. 111-116, 1987.
- HANSCH, P. E. Response to selection In: MORRE, J. N.; JANICK, J. (Ed.). **Methods in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1983. p. 154-171.
- HE, G. Y.; KORBULY, E.; BARNABÁS, B. High frequency callus formation and regeneration of fertile plants from haploid cell suspensions derived from anther culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Science**, Limerick, Irlanda, v. 90, p. 81-87, 1993.
- HEATH, D. W.; EARLE, E. D. Synthesis of high erucic acid rapeseed (*Brassica napus* L.) somatic hybrids with improved agronomic characters. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 91, p.1129-1136, 1995.
- HERBELE-BORS, E. *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review. **Plant Science**, Limerick, Irlanda, v. 71, p. 361-374, 1985.
- HERRERA-ESTRELLA, L.; DEPICKER, A.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid derived vector. **Nature**, London, Inglaterra, v. 309, v. 24, p. 377-381, 1992.
- HILL, J.; SCHAAP, T.; HABERFELD, A.; JEFFREYS, A. J.; PLOTSKY, Y.; CAHANER, A.; LAVI, U. Genomic selection application of DNA fingerprint for efficient gene introgression. **Genetics**, Maryland, TX, v. 124, p. 983-989, 1990.

HOFFMANN, M. P.; ZALOM, F. G.; WILSON, L. T.; SMILANICK, J. M.; MALYJ, L. D.; KISER, J.; HILDER, V. A.; BARNES, W. M. Field of evaluation of transgenic tobacco containing genes encoding *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin or cowpea trypsin inhibitor: efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, MD, v. 85, n. 6, p. 2516-2522, 1992.

HOOYKAAS, P. J. J.; SCHILPEROORT, R. A. Agrobacterium and plant genetic engineering. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, Holanda, v. 19, p. 15-38, 1992.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 371-393.

HUNTER, R. L.; MARKERT, C. L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis instarch gels. **Science**, Washington, MD, v. 125, p. 1294-1295, 1957.

IBGE. Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro, 1996. v. 55.

IZQUIERDO, J.; RIVA, G. A. de la. Plant biotechnology and food security in Latin America and the Caribbean. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 2, 2000. Disponível em: <<http://www.ejb.ucv.cl/content/vol3/issue1/full/1/index.html>>. Acesso em: 12 abr. 2001.

IZQUIERDO, J.; ROCA, W. Under-utilized Andean food crops: status and prospects of plant biotechnology for the conservation and sustainable agricultural use of genetic resources. **Acta Horticulturae**, Hague, Holanda, v. 457, p. 157-172, 1998.

JAMES, D. J.; PASSEY, A. J.; WEBSTER, A. D.; BARBARA, D. I.; DANDEKAR, A. M.; URATSU, S. L.; VISS, P. Transgenic apples and strawberries: advances in transformation,, introduction of genes for insect resistance and field studies of tissue cultured plants. **Acta Horticulturae**, Hague, Holanda, n. 336, p. 179-184, 1993.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, London, Inglaterra, v. 316, p. 76-79, 1985.

JENSEN, R. C. On the selection for specific genes in double haploids. **Heredity**, Edinburgh, Inglaterra, v. 69, p. 92-95, 1992.

JOUANIN, L.; BRASILEIRO, A. C. M.; LEPLÉ, J. C.; PILATE, G.; CORN, D. Genetic transformation: a short review of methods and their applications, results and perspectives for forest trees. **Annales des Sciences Forestières**, Paris, França, v. 50, p. 325-336, 1993.

KAGA, A.; HOSAKA, T.; MISCO, S.; KAMIJIMA, O. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for adzuki bean and its related genera. **Science Reports of Faculty of Agriculture Kobe University**, Rokkodai, Nada-Ku, Japan, v. 20, n. 2, p. 171-176, 1993.

KAGA, A.; OHNISHI, M.; ISHII, T.; KAMIJIMA, O. A linkage genetic map of azuki bean constructed with molecular and morphological markers using an interspecific population (*Vigna angularis* x *Vigna nakashimae*). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 93, n. 5-6, p. 658-663, 1996.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 519-531.

KING, R. C.; STANSFIELD, W. D. **A dictionary of genetics**. 4. ed. New York: Oxford University Press, 1990. 406 p.

KOHLER, F. C.; GOLZ, C.; EAPEN, H.; KOHN, H.; SCHIEDER, O. Stable transformation of moth bean *Vigna aconitifolia* via direct gene transfer. **Plant Cell Reports**, New York, NY, v. 6, p. 313-317, 1987.

KRIKORIAN, A. D.; BERQUAM, D. L. Plant cell and tissue culture: the role of Haberlandt. **Botanical Review**, Bronx, NY, v. 35, p. 59-88, 1969.

KULOTHUNGAN, S.; BASKARAN, A.; KASHINATHAN, P.; SHAJAHAN, A.; GANAPATHI, A. Morphogenetic studies on excised embryo culture of cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Legume Research**, Haryana, Índia, v. 16, n. 1/2, p. 71-74, 1993.

KULOTHUNGAN, S.; GANAPATHI, A.; SHAJAHAN, A.; KATHIRAVAN, K. Somatic embryogenesis in cell suspension culture of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Israel Journal of Plant Sciences**, Jerusalém, Israel, v. 43, n. 4, p. 385-390, 1995.

LACORTE, C.; ARAGÃO, F. J. L.; VAINSTEIN, M. H.; RECH, E. L. Biobalística. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1999. v. 2, p. 761-781.

LAURIE, D. A.; BENNET, M. D. The effect of crossability loci Kr 1 and Kr 2 on fertilization frequency in hexaploid wheat x maize crosses. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, NY, v. 73, p. 403-409, 1987.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advances in Agronomy**, New York, NY, v. 55, p. 265-343, 1995.

LEPLÉ, J. C.; BRASILEIRO, A. C. M.; MICHEL, M. F.; DELMOTTE, F.; JOUANIN, L. Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. **Plant Cell Reports**, New York, NY, v. 11, p. 137-141, 1992.

LINDSEY, K. Genetic manipulation of crop plants. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, Holanda, v. 26, p. 1-28, 1992.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, IL, v. 44, p. 397-401, 1989.

LOZOYA-SALDANÑA, H.; ABELLÓ, J. F.; GARCIA, de la R. G. Electrotherapy and shoot tip culture eliminate potato virus X in potato. **American Potato Journal**, Orono, ME, v. 73, n. 4, p. 149-154, 1996.

MANTELL, S. H.; MATHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução a engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1994. 333 p.

MATSUOKA, M.; KAI, Y.; YOSHIDA, T. Induction of adventitious buds and gene transfer by particle gun in cowpea (*Vigna unguiculata*). **Bulletin of the Shikoku National Agricultural Experiment Station**, Zentsuji-Cho-Japão, n. 61, p. 31-39, 1997.

MAUGHAM, P. J.; SAGHAI-MAROOF, M. A.; BUSS, G. R. Molecular-marker analysis of seed-weight: genomic locations, gene action, and evidence for orthologous evolution among three legume species. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 93, n. 4, p. 574-579, 1996.

MEGIA, R.; HAICOUR, R.; TIZROUTINE, S.; BUI TRANG, V.; ROSSIGNOL, L.; SIHACHAKR, D.; SCHWENDIMAN, J. Plant regeneration from cultured protoplasts of the cooking banana cv. Bluggoe (*Musa* spp., ABB group). **Plant Cell Reports**, New York, v. 13, p. 41-44, 1993.

MENANCIO, H. D.; FATOKUN, C. A.; KUMAR, L.; DANESH, D.; YOUNG, N. D. Comparative genome analysis of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) and cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) using RFLP mapping data. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 86, n. 7, p. 797-810, 1993.

MENDES, R. A.; GOES, M. de. Cultura de tecidos na conservação de germoplasma vegetal. In: PUINGNAU, J. P.; CUNHA, R. da. (Ed.). **Conservação de germoplasma vegetal**. Montevideo: IICA-Procisur, 1996. p. 129-138. (Procisur. Dialogo, 45).

MENÉNDEZ, C. M.; HALL, A. E.; GEPTS, P. A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between 2 inbred domesticated lines. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, n. 8, p. 1210-1217, 1997.

MIGNOUNA, H. D.; NG, N. Q.; IKEA, J.; THOTTAPILLY, G. Genetic diversity in cowpea as revealed by random amplified polymorphic DNA. **Journal of Genetics & Breeding**, Roma, Itália, v. 52, n. 2, p. 151-159, 1998.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998a. p. 17-28.

MILACH, S. C. K. Mapeamento molecular de características de importância agrônômica. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998b, p. 67-73.

MIX, G.; WANG, H. M. *In vitro* generation of haploid cowpea plants (*Vigna unguiculata* L.). **Landbauforschung Volkenrode**, Volkenrode, Alemanha Oriental, v. 38, n. 4, p. 305-309, 1988.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. de; STIVAL, A. L.; BRAMMER, S. P.; GRANDO, M. F. Haplodiploidização: genética e melhoramento. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPQ, 1999. v. 2, p. 613-650.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific Synthesis Of Dna In Vitro Via A Polymerase-catalyzed Chain Reaction. **Methods In Enzymology**, San Diego, CA, v. 155, p. 335-350, 1987.

MURDOCK, L. L. Improving insect resistance in cowpea through biotechnology: initiatives at Purdue University, USA. In: THOTTAPILLY, G.; MONTI, L. M.; MOHAN-RAJ, D. R.; MOORE, A. W. (Ed.). **Biotechnology: enhancing research on tropical crops in Africa**. Wageningen: TCARC, 1992. p. 313-320.

MURPHY, R. W.; SITES JUNIOR, J. W.; BUTH, D. G.; HAUFLE, C. H. Proteins I: isozyme electrophoresis. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C. (Ed.). **Molecular Systematics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p. 45-126.

MYERS, G. O.; FATOKUN, C. A.; YOUNG, N. D. RFLP mapping of an aphid resistance gene in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Euphytica**, Wageningen, Holanda, v. 91, n. 2, p. 182-187, 1996.

NAGAO, T. Somatic hybridization by fusion protoplasts. I. The combination of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana rustica*. **Japanese Journal of Crop Science**, Tokyo, Japão, v. 47, p. 491-498, 1978.

NAGAO, T. Somatic hybridization by fusion protoplasts. III. Somatic hybrids of sexually incompatible combinations of *Nicotiana tabacum* + *N. repanda* and *N. tabacum* + *Salpiglossis sinuata*. **Japanese Journal of Crop Science**, Tokyo, Japão, v. 51, p. 35-42, 1982.

NG, N. Q.; PADULOSI, S. Constraints in the accessibility and use of germplasm collections. In: THOTTAPPILLY, G.; MONTI, L. M.; MOHAN, D. R.; MOORE, A. W. (Ed.). **Biotechnology**: enhancing research on tropical crops in Africa. Ibadan: IITA, 1991. p. 45-50.

NIELSEN, C. L.; HALL, A. E. Responses of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) in the field to high night air temperature during flowering. II. Plant responses. **Field Crop Research**, v. 10, p. 181-196, 1985.

NTARE, B. R.; WILLIAMS, J. H. Selection of cowpea cultivars for cool-season production in the Sahel. **Field Crop Research**, Amsterdam, Netherlands, v. 32, p. 27-40, 1993.

NYBOM, H. DNA fingerprinting - a useful tool in fruit breeding. **Euphytica**, Wageningen, Holanda, v. 77, n. 1-2, p. 59-64, 1994.

O'DONOUGHUE, L. S.; BENNETT, M. D. Comparative response of tetraploid wheats pollinated with *Zea mays* L. and *Hordeum bulbosum* L. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, NY, v. 87, p. 673-680, 1994.

OGBUINYA, P. O. Advances in cowpea research. **Biotechnology and Development Monitor**, Amsterdam, Holanda, n. 33, p. 10-12, 1997.

OKAMOTO, N. A.; TAKAHASHI, K.; KIDO, N.; OWARIBE, K.; KATOU, K. Molecular cloning of yieldins regulating the yield threshold of cowpea cell walls: cDNA cloning and characterization of recombinant yieldin. **Plant Cell and Environment**, Oxford, Inglaterra, v. 23, n. 2, p. 155-164, 2000.

OLIVEIRA, R. P.; MACHADO, C. L.; SANTOS, F. M. Avaliação da micropropagação massal em bananeira prata comum. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE FRUTÍFERAS, 1., 1997, Jaticabal. **Resumos...** Jaticabal: FCAVJ: UNESP, 1997. p. 35.

OLSON, M.; HOOD, L.; CANTOR, C.; DOSTSTEIN, D. A common language for physical mapping of the human genome. **Science**, Washington, DC, v. 254, p. 1434-1435, 1989.

ORTIZ, R. Critical role of plant biotechnology for the genetic improvement of food crops perspective for the next millenium. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, nov. 1998. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol1/issue3/full/7/bip/index.html>>. Acesso em: 12 abr. 2001.

ORTIZ, R.; VUYLSTEKE, D. Recent advances in *Musa* genetics, breeding and biotechnology. **Plant Breeding Abstracts**, Cambridge, Inglaterra, v. 66, p. 1355-1363, 1996.

- PANDEY, P.; BANSAL, Y.K. Plantlet formation from callus culture of cowpea (*Vigna sinensis* L.). **Current Science**, Bangalore, Índia, v. 58, n. 7, p. 394-396, 1989.
- PANELLA, L.; GEPTS, P. Genetic relationships within *Vigna unguiculata* (L.) Walp.) based on isozyme analyses. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, Holanda, v. 39, p. 71-88, 1992.
- PANELLA, L.; KAMI, J.; GEPTS, P. Vignin diversity in wild and cultivated taxa of *Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (Fabaceae). **Economic Botany**, New York, NY, v. 47, n. 4, p. 371-386, 1993.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, NY, v. 85, p. 985-993, 1993.
- PATERSON, H. H.; DEVERNA, J. W.; LANINI, B.; TANKSLEY, S. D. Fine mapping of quantitative trait locus using selected overlapping recombinant chromosomes in interspecies cross of tomato. **Genetics**, Maryland, TX, v. 124, p. 735-742, 1990.
- PATERSON, H. H.; TANKSLEY, S. D.; SORRELS, M. E. DNA markers and plant improvement. **Advances in Agronomy**, New York, NY, v. 55, p. 265-344, 1991.
- PELLEGRINESCHI, A. *In vitro* plant regeneration via organogenesis of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Plant Cell Reports**, New York, NY, v. 17, n. 2, p. 89-95, 1997a.
- PELLEGRINESCHI, A.; FATOKUN, C. A.; THOTTAPPILLY, G.; ADEPOJU, A. A. Cowpea embryo rescue: influence of culture media composition on plant recovery from isolated immature embryos. **Plant Cell Reports**, New York, NY, v. 17, n. 2, p. 133-138, 1997b.
- PENZA, R.; LURQUIN, P. F.; FILIPPONE, E. Gene transfer by cocultivation of mature embryos with *Agrobacterium tumefaciens*: application to cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, Alemanha Ocidental, v. 138, n. 1, p. 39-43, 1991.
- PETERS, J. A.; BOBROWSKI, V. L.; ROSINHA, G. M. S. Produção de haplóides e duplohaplóides. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1999. v. 2, p. 569-611.
- PEZZOTTI, M. F.; PUPILLI, F.; DAMIANI, F.; ARCIONI, S. Transformation of *Medicago sativa* L. using a Ti plasmid derived vector. **Plant Breeding**, Berlin, Alemanha Ocidental, v. 106, p. 39-46, 1991.
- POEHLMAN, J. M.; SLEPER, D. A. **Breeding field crops**. 4. ed. Ames: Iowa State University Press, 1995. 494 p.

- POWER, J. B.; BERRY, S. F.; CHAPMAN, J. V.; COCKING, E. C. Somatic hybrids between unilateral cross incompatible *Petunia* species. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, NY, v. 55, p. 97-99, 1979.
- POWER, J. B.; BERRY, S. F.; CHAPMAN, J. V.; COCKING, E. C. Somatic hybridization of sexually incompatible petunias: *Petunia parodii*, *Petunia parviflora*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, NY, v. 57, p. 1-4, 1980.
- PRASAD, D. T.; UMPATHY, N. S.; VEERANNA, R. Genotypic variation in cowpea (*Vigna unguiculata*) cultivars in relation to insect resistance. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, New Delhi, Índia, v. 5, n. 1, p. 47-49, 1996.
- PURDOM, D.; TRESE, A. T. Morphological and molecular characteristics of host-conditioned ineffective root nodules in cowpea. **Plant Physiology**, Bethesda, MD, v. 109, n. 1, p. 239-244, 1995.
- QUÉDRAOGO, J. T.; GOWDA, B. S.; JEAN, M.; CLOSE, T. J.; EHLERS, J. D.; HALL, A. E.; GILLASPLE, A. G.; ROBERTS, P. A.; ISMAIL, G.; BRUENING, G.; GEPTS, P.; TIMKO, M. P.; BELZILE, F. J. An improved genetic map for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) combining AFLP, RFLP, RAPD, biochemical markers, end biological resistance traits. **Genome**, Ottawa, Canadá, v. 45, p. 175-188, 2002.
- RAFALSKI, J. A.; TINGEV, S. V. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPAs, microsatellites and machines. **Trends in Genetics**, Amsterdam, Holanda, v. 9, n. 8, p. 275-280, 1993.
- RAFALSKI, J. A.; TINGEV, S. V.; WILLIAMS, J. G. K. RAPD markers - a new technology for genetic mapping and plant breeding. **AgBiotech News and Information**, Oxon, Inglaterra, v. 3, p. 645-648, 1991.
- RAMULU, K. S.; DIJKHUIS, P.; RUTGERS, E.; BLASS, J.; VERBEEK, W. H. J.; VERHOEVEN, H. A.; COLIJN-HOOYMANS, C. M. Microprotoplast fusion technique: a new tool for gene transfer between sexually-incongruent plant species. **Euphytica**, Wageningen, Holanda, v. 85, p. 255-268, 1995.
- RIVAL, A.; BERLENC, A.; MORCILLO, F.; TREGGAR, J.; VERDEIL, J. L.; DUVAL, Y. Scaling up in vitro clonal propagation through somatic embryogenesis: the case of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, Israel, v. 3, n. 2, p. 74-83, 1997.
- RIVAL, R.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; BEULÉ, T.; MORCILLO, F.; RICHAUD, F.; TREGGAR, J.; VERDEIL, J. L.; DURAND-GASSELIN, T.; KONAN, E. K.; DUVAL, Y.; KOUAME, B. Multiplication clonale du palmier à huile par embryogenèse somatique (*Elaeis guineensis* Jacq.). Programmes de recherche liés au transfert d'échelle. **Cahiers Agricultures**, [Montrouge, França], v. 7, n. 6, p. 492-988, 1998.

- ROBINS, R. J. Secondary products from cultured cells and organs: I. Molecular and cellular approaches. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. **Plant cell culture: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1994. p. 169-198.
- ROMANO, E.; MONTE, D. C. Plantas transgênicas resistentes a vírus. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPB, 1999. v. 2, p. 783-814.
- SCHROEDER, H.; SCHOTZ, A.; WARDLEY-RICHARDSON, T.; SPENCER, D.; HIGGINS, T. Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Physiology**, Bethesda, MD, v. 101, p. 751-757, 1993.
- SCOWCROFT, W. R. **Genetic variability in tissue culture**: impact on germplasm conservation and utilization. Rome: IBPGR Secretariat, 1984. 41 p.
- SHEPARD, J. F.; BIDNEY, D.; SHAHIN, E. Potato protoplasts in crop improvement. **Science**, Whashington, DC, v. 208, p. 17-24, 1980.
- SIJEN, T.; WELLINK, J.; HENDRIKS, J.; VERVER, J.; VAN-KAMMEN, A. Replication of cowpea mosaic virus RNA1 or RNA2 is specifically blocked in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing the full-length replicase or movement protein genes. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, MN, v. 8, n. 3, p. 340-347, 1995.
- SILVA, S. de O. e; SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; SOUZA, A. da S.; CARNEIRO, M. S. Germoplasma. In: ALVES, E. J. (Ed.). **A cultura da bananeira**: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. 2. ed. rev. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Cruz das Almas: Embrapa-CNPB, 1999. p. 61-84.
- SINGH, B.B.; EHLERS, J.D.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F.R. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C.A.; TARAWALI, S.A.; SINGH, B.B.; KORMAWA, P.M.; TAMO, M. (Ed.). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan: IITA, 2002. p. 22-40.
- SKERRITT, J. H. Genetically modified plants: developing countries and the public acceptance debate. **AgBiotechNet**, v. 2, 2000. Disponível em: <<http://www.agbiotech.net/reviews/feb00/html/skerrit.htm>>. Acesso em: 12 jun 2001.
- SLUYS, M. A. V. Agrobacterium: um vetor natural para transformação em plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPB, 1999. v. 2, p. 737-759.
- SONNANTE, G.; PIERGIOVANNI, A. R.; NG, Q. N.; PERRINO, P. Relationships of *Vigna unguiculata* (L.) Walp.) , *V. vexillata* (L.) A. Rich. And species of section *Vigna* based on isozyme variation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, Holanda, v. 43, p. 157-165, 1996.

SOUZA, A. da S.; DANTAS, J. L. L.; SOUZA, F. V. D.; CORDEIRO, Z. J. M.; SILVA NETO, S. P. da. Propagação. In: ALVES, E. J. (Ed.). **A cultura da bananeira: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2. ed. rev. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF, 1999. p. 151-195.

SOUZA, V. A. B. de; BYRNE, D. H.; TAYLOR, J. F. Heritability, genetic and phenotypic correlations, and predicted response to selection of several quantitative plant traits in peach. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, VA, v. 123, n. 4, p. 598-603, 1998a.

SOUZA, V. A. B. de; BYRNE, D. H.; TAYLOR, J. F. Heritability, genetic and phenotypic correlations, and predicted response to selection of several quantitative fruit traits in peach. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, VA, v. 123, n. 4, p. 604-611, 1998b.

SWANSON, E. B.; COUMANS, M. P.; BROWN, G. L.; PATEL, J. D.; BEVERSDORF, W. D. The characterization of herbicide tolerant plants in *Brassica napus* L. after in vitro selection of microspores and protoplasts. **Plant Cell Reports**, New York, NY, v. 7, p. 83-87, 1988.

TANKSLEY, S. D. Molecular markers in plant breeding. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, Holanda, v. 1., n. 1, p. 3-8, 1983.

TANKSLEY, S. D.; MEDINA-FILHO, H.; RICK, C. M. Use of naturally occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. **Heredity**, Edinburgh, Inglaterra, v. 49, p. 11-25, 1982.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, M. E. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPMPF, 1998a. v. 1, p. 11-20.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPMPF, 1998b. v. 1, p. 133-145.

TULMANN NETO, A.; MENDES, B. M. J.; ANDO, A. Progressos na indução e uso de mutações *in vitro*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPMPF, 1998. v. 1, p. 459-506.

TYAGI, D. K.; CHAWLA, H. S. Effects of seasons and hormones on crossability barriers and *in vitro* hybrid development between *Vigna radiata* and *Vigna unguiculata*. **Acta Agronomica Hungarica**, Budapest, Hungria, v. 47, n. 2, p. 147-154, 1999.

- VAILLANCOURT, R. E.; WEEDEN, N. F. *Vigna unguiculata* and its position within the genus vigna. In: PICKERSGILL, B.; LOCK, J. M. (Ed.). **Advances in legume systematics 8**: legumes of economic importance. Kew: Royal Botanic Gardens, 1996. p. 89-93.
- VAILLANCOURT, R. E.; WEEDEN, N. F.; BARNARD, J. Isozyme diversity in the cowpea species complex. **Crop Science**, v. 33, p. 606-613, 1993.
- VERDIER, V.; ASSIGBETSE, K.; GOPAL-KHATRI, C.; WYDRA, K.; RUDOLPH, K.; GEIGER, J. P. Molecular characterization of the incitant of cowpea bacterial blight and pustule, *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, Holanda, v. 104, n. 6, p. 595-602, 1998.
- VIEIRA, M. L. C. Cultura de tecidos vegetais. In: **Cultivo in vitro e manipulação genética em plantas**. Piracicaba: CBAB: ESALQ, 1993. p. 2-7. Apostila.
- VIEIRA, R. F. Aspéctos práticos da coleta de germoplasma. In: PUIGNAU, J. P.; CUNHA, R. da. (Ed.). **Conservación de germoplasma vegetal**. Montevideo: IICA-Procisur, 1996. p. 75-84. (IICA-Procisur. Diálogo, 45).
- VUYLSTEKE, D. Field performance of banana micropropagules and somaclones. In: JAIN, S. M.; BRAR, D. S.; AHLHOOWALIA, B. S. (Ed.). **Somaclonal variation and induced mutation in crop improvement**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 219-231.
- VUYLSTEKE, D.; ORTIZ, R.; FERRIS, R.S.B.; CROUCH, J.H. Plantain improvement. **Plant Breeding Reviews**, New York, NY, v.14, p.267-320, 1997.
- WAARA, S.; GLIMENIUS, K. The potential of somatic hybridization in crop breeding. **Euphytica**, Wagenigen, Holanda, v. 85, p. 217-233, 1995.
- WARRAG, M. O. A.; HALL, A. E. Reproductive responses of cowpea to heat stress: genotypic differences in response to heat at flowering. **Crop Science**, Madison, WI, v. 23, p. 1088-1092, 1983.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, Inglaterra, v. 18, p. 303-306, 1990.
- WERBROUCH, S. P. O.; DEBERGH, P. C. Applied aspects of plant regeneration: micropropagation. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. **Plant cell culture**: a practical approach. New York: Orfox University Press, 1994. p. 127-135.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research**, London, Inglaterra, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WITHERS, L. A.; WILLIAMNS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPB, 1998. v. 1, p. 297-330.

WOODSON, W. R. Biotechnology and horticulture. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 32, p. 1021-1023, 1997.

XU, D. P.; XUE, Q. Z.; MCELROY, D.; MAWAL, Y.; HILDER, V. A.; WU, R. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, CpTI, in transgenic rice plants confers resistance to two major rice insect pests. **Molecular Breeding**, Dordrecht, Holanda, v. 2, n. 2, p. 167-173, 1996.

YAMAGUSHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Developing transgenic tolerance to environmental stresses including drought in plant. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE BIOSAFETY RESULTS OF FIELD TESTS OF GENETICALLY MODIFIED PLANTS AND MICROORGANISMS, 4., 1997, Tsukuba. **Proceedings...** Tsukuba: JIRCAS, 1997. n. 5, p. 243-252.

YANG, J. C.; HO, C. K.; CHEN, Z. Z.; CHEN, C. F. Comparison of different methods of vegetative propagation of *Eucalyptus camaldulensis* plus trees. **Taiwan Journal of Forest Science**, Taipei, Taiwan, v. 11, n. 4, p. 433-444, 1996b.

YANG, J. C.; HO, C. K.; CHEN, Z. Z.; CHEN, C. F. Micropropagation of mature trees of *Eucalyptus camaldulensis* with fast-growing phenotype. **Taiwan Journal of Forest Science**, Taipei, Taiwan, v. 11, n. 4, p. 421-432, 1996a.

YOUNG, N. D.; FATOKUN, C. A.; DANESH, D.; MENANCIO-HAUTEA, D. RFLP mapping in cowpea. In: THOTTAPPILLY, G.; MONTI, L. M.; MOHAN-RAJ, D. R.; MOORE, A. W. (Ed.). **Biotechnology: enhancing research on tropical crops in Africa**. Wageningen: TCARC, 1992. p. 237-246.

ZABEAU, M. **Selective restriction fragment amplification**: a general method for DNA finger printing. European Patent Application n°. 0534858-A1, 30 jun. 1993.

ZHAO, R. M.; SHI, X. P.; WANG, J. H.; FAN, Y. L. Transgenic tobacco plants expressed both Bt and CpTI genes and their homozygotes. **Rice Biotechnology Quarterly**, West Lafayette, IN, v. 25, p. 35-36, 1996.