



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

JOSÉ DIOGO CAVALCANTI FERREIRA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE UMA
DEFENSINA DE *MOMORDICA CHARANTIA* EM *VIGNA UNGUICULATA***

Recife
2016

JOSÉ DIOGO CAVALCANTI FERREIRA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE UMA
DEFENSINA DE *MOMORDICA CHARANTIA* EM *VIGNA UNGUICULATA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Benko-Iseppon

Coorientadora: Dr^a. Hayana Millena de Arruda Azevedo

Recife

2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Ferreira, José Diogo Cavalcanti

Expressão diferencial e transformação genética de uma defensina de *Momordica charantia* em *Vigna unguiculata* / José Diogo Cavalcanti Ferreira. – Recife: O Autor, 2016.

106 f.: il.

Orientadores: Ana Maria Benko-Iseppon, Hayana Milena de Arruda Azevedo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2016.
Inclui referências e anexos

1. Feijão- caupi 2. Plantas transgênicas 3. Bioinformática I. Benko-Iseppon, Ana Maria (orient.) II. Azevedo, Hayana Milena de Arruda (coorient.) III. Título.

635.652

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-005

JOSÉ DIOGO CAVALCANTI FERREIRA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE UMA DEFENSINA DE
MOMORDICA CHARANTIA EM *VIGNA UNGUICULATA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 25 / 02 / 2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Ana Maria Benko Iseppon
(Orientadora)
Depto. de Genética/UFPE

Profº Drº Ederson Akio Kido
(Titular)
Depto. de Genética/UFPE

Profª Drª Ana Christina Brasileiro Vidal
(Titular)
Depto. de Genética/UFPE

Aos meus pais, José Ferreira e Marcell Cavalcanti,
e toda minha família, pelo amor, carinho e confiança.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a minha mãe, Marceli Cavalcanti, e ao meu pai, José Ferreira, por acreditar e investir na minha educação como forma de mudança social, sempre incentivando os meus desejos.

Aos meus irmãos, Diego Cavalcanti e Débora Cavalcanti, pelo carinho, atenção e estímulo para seguir lutando na construção do meu conhecimento.

A minha companheira Jéssica Xavier, pela paciência de escutar as dificuldades que passei ao longo desta pesquisa, fazendo de entendida e sempre tentando me ajudar a solucionar os problemas.

A toda minha família, representado o lado paterno pela figura do meu avô Ferreira e minha avó Lilia, e o lado materno pelo meu avô Pedro (*in memorian*) e minha avó Mara (*in memorian*).

Em especial, à minha orientadora Ana Benko, por me receber de braços abertos desde o primeiro encontro para discutir o projeto, mesmo eu não tendo nenhuma experiência na área de genética e transgenia. A minha coorientadora, Hayana Azevedo, pela ajuda imensurável, que sem esta não seria possível o desenvolvimento do nosso trabalho.

Ao nobre pesquisador Francisco Aragão, que mesmo não conhecendo pessoalmente, sempre proporcionou uma consultoria técnica, fundamental desde a implantação do laboratório, quanto ao desenvolvimento do projeto.

À professora Ana Christina, pelo imenso apoio e confiança depositada ao longo deste período e no desenvolvimento de trabalhos futuros.

Ao Dr. Félix, sempre de braços abertos para o desenvolvimento dos trabalhos na casa de vegetação, assim como pelas consultorias técnicas prestadas nestes experimentos.

Aos amigos do LGBV (Manu, Rafa, Sheyla, Valesca, Neto, Roberta, Carlos, Livia, Mirtalle, Bruna, Flávia, Marx, Rodrigo, Vanessa, Carol, Jéssica, Ayug, Wilson, Jaiza) pela convivência harmoniosa, assim como momentos de distração

importantíssimos para a rotina diária de laboratório, além das conversas científicas extremamente importantes para gerar alguns *insights* em relação a minha pesquisa.

A Santelmo Vasconcelos e Diego Sotero, que além da amizade construída ao longo desse tempo, me ajudaram profundamente nas análises fenéticas e filogenéticas. E a João pela ajuda na edição do alinhamento, entre outras coisas.

Ao Luís Carlos Belarmino, vulgo Luca, por todo acompanhamento e ajuda nas análises de bioinformática. Ao grupo de transformação, representado por Dulci, Marina e Paulo Vitor, pela convivência, ajuda ao próximo e coragem de enveredar por essa nova linha de pesquisa do LGBV.

Ao querido amigo Geraldo Moura, que foi a primeira pessoa a me receber e incentivar no desenvolvimento de pesquisas acadêmicas, e sempre me incentivou independente da mudança da área de pesquisa. E a Reginaldo Fonseca, Jonas Marôpo e Joana, pela amizade e incentivo de todos estes anos.

Ao suporte financeiro concedido pelas agências de fomento à pesquisa, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco).

Ao IFPE (Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia de Pernambuco), pela ajuda financeira, assim como pelo incentivo e ajuda dos amigos Isnard, Heleno, Rosário, Lucicláudio, Kleber, Valdemir Mariano e Mario Monteiro.

Enfim, a todos que de alguma maneira direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado!

*“As pegadas na areia do tempo não são
deixadas por pessoas sentadas”*

A. C. Lee

RESUMO

O aumento da produtividade agrícola é impactado negativamente por estresses bióticos e abióticos, que são os principais responsáveis pela drástica redução da produção do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). Para se defender dos estresses bióticos, os vegetais desenvolveram sofisticados mecanismos, incluindo o sistema de defesa pré-invasivo, localizado nas partes externas dos vegetais e impedindo a entrada do patógeno, e a imunidade inata, que reconhece estruturas fundamentais dos microorganismos e induz a produção de proteínas de combate aos patógenos. Dentre elas as defensinas, que inviabilizam o estabelecimento de agentes invasores. Por sua vez, o melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*) dispõe de transcriptoma sequenciado e destaca-se pelo seu potencial antimicrobiano. A partir de análises *in silico* no transcriptoma dessa espécie foram selecionados cinco genes-candidatos da classe das defensinas. Destes, o gene *McDef1* apresentou domínio conservado completo com predição de atividade antifúngica. A defensina *McDef1* exibe regiões conservadas na maioria das defensinas de plantas incluindo oito cisteínas, uma serina na posição 8, um aminoácido aromático na posição 11 e resíduos de glicina nas posições 13 e 34. Após análise fenética a *McDef1* foi agrupada com outras defensinas já descritas com atividades antifúngicas *in vitro* e/ou *in vivo*, o que reforça a predição revelada pelas análises *in silico*. Um vetor pAHASMCDEF1, portando o gene *McDef1* e *Atahas*, que confere resistência ao herbicida Imazapyr, foi construído e utilizado para bombardear 880 embriões de feijão-caupi através da técnica de biobalística. Destes, sete plantas transformadas foram geradas, com eficiência de transformação semelhante àquela de trabalhos anteriores com feijão-caupi. As próximas etapas compreendem a multiplicação das plantas transformadas até a geração T3, após o que as mesmas serão inoculadas com fungos fitopatogênicos, os quais podem causar perdas de até 50% na produção em feijão-caupi.

PALAVRAS-CHAVE: Transgênicos, bioinformática, peptídeo antimicrobiano (AMP), defensinas, fitopatógenos.

ABSTRACT

Increased agricultural productivity is negatively impacted by biotic and abiotic stresses, that are responsables for the drastic reduction in cowpea (*Vigna unguiculata*) production. To defend against biotic stresses, plants have developed sophisticated mechanisms including a pre-invasive defense system, located in the external parts of plants to prevent pathogenic entry, and the innate immunity, which recognizes fundamental structures of microorganisms and induces proteins production that avoid the pathogen establishment. Among them defensins, that prevent the establishment of invading agents. In turn, the bitter melon (*Momordica charantia*) disposes a sequenced transcriptome and stands out for its antimicrobial potential. After an *in silico* analysis of *M. charantia* transcriptome, five defensin gene candidates were selected. Of these, *McDef1* gene exhibited a complete conserved domain with prediction of its antifungal activity. The *McDef1* defensin displayed conserved regions similar to most plant defensins including eight cysteines, a serine at position 8, an aromatic amino acid at position 11 and glycine residues at positions 13 and 34. After phenetic analyzes, *McDef1* was grouped with other defensins previously described with *in vitro* and/or *in vivo* antifungal activity, reinforcing the *in silico* prediction analysis. A pAHASMCDEF1 vector was constructed, bearing the *McDef1* and *Atahas* gene, which confers resistance to the herbicide Imazapyr, being used for bombardment of 880 cowpea embryos by biolistic technique. Of these, seven transformed plants were generated, with transformation efficiency similar to previous reports for cowpea. The next steps include the multiplication of transformed plants up to the T3 generation, after which they will be inoculated with pathogenic fungi, which can cause losses of up to 50% in cowpea production.

KEY-WORDS: Transgenics, bioinformatics, antimicrobial peptide (AMP), defensins, phytopathogens.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Os componentes do *gene gun* utilizado na pesquisa são: A – entrada do gás hélio pressurizado na válvula solenoide; B – saída do gás hélio, liberado após o tiro; C – entrada da bomba a vácuo; D – saída do vácuo, aberta após o tiro; E – local onde se colocam as membranas de ruptura; F – Local onde se colocam a tela de retenção e a membrana carreadora com as partículas de DNA; G – local onde se posicionam os embriões a serem bombardeados.**33**

CAPÍTULO I

Figure 1: Timeline of genetic transformation events of cowpea and the main related articles.**56**

Figure 2: Frequency of transformation methods used for development of transformed cowpea from 1986 to 2015.**60**

CAPÍTULO I

Figura 1: Diagrama representativo das etapas realizadas na análise *in silico* para seleção dos genes candidatos.**68**

Figura 2: Placa de Petri com colônias de bactérias *E. coli* DH10B transformadas por choque térmico com o plasmídeo pAHASMCDEF1 resistente ao antibiótico ampicilina.**72**

Figura 3: Fragmentos amplificados por PCR para confirmação da presença dos insertos no vetor pAHASMCDEF1. C- corresponde ao controle negativo, 1 e 4 aos produtos de amplificação do gene *McDef1* e *Atahas* com 401 pb e 685 pb, respectivamente, com alíquotas do tubo 1 da extração por maxi-prep. Números 2 e 5 correspondem ao produto de amplificação do gene *McDef1* e *Atahas* com 401 pb e 685 pb, respectivamente, com alíquotas do tubo 2 da extração por maxi-prep. Números 3 e 6 correspondem ao produto da PCR do tubo 3.**73**

Figura 4: Embriões em meio MS *with salt mixture* dispostos em círculo, equidistantes entre 6 e 12 mm do centro da placa de Petri, com a região do meristema apical exposta voltada para cima. Foram posicionados de 10 a 15 embriões por placa. Foto: Diogo Cavalcanti.....74

Figura 5: Alinhamento múltiplo de 48 sequências de aminoácidos gerado pelo programa Clustal ômega. Na sequência consenso a letra C representa a conservação de resíduos de cisteína (destacado em cinza), a S de serina (destacado em amarelo), G de glicina (destacado em laranja), a região destacada em verde são os resíduos aromáticos, que podem ser a fenilalanina (F), o triptofano (W) e tirosina (Y). As linhas na parte superior da imagem, representa as pontes dissulfídicas. No caso das defensinas PhDef1 e PhDef2, ocorre uma ponte dissulfídica adicional, representada pela linha vermelha na parte superior da imagem. Na parte inferior da figura encontram-se os gráficos de conservação, qualidade e consenso, bem como a estrutura tridimensional da defensina consenso, no qual as setas amarelas representam as folhas-beta e o cilindro vermelho a alfa-hélice.....77

Figura 6: Árvore fenética das 48 sequências de defensina utilizadas no alinhamento, gerado pelo método de neighbor-joining, sendo o teste de confiabilidade dos nós realizado pelo método de bootstrap com 1000 replicações. As linhas de cor azul representam as defensinas com função antifúngica e antibacteriana, as de coloração vermelha, indicam as defensinas com atividade inseticida, a de cor verde representa defensina com atividade antibacteriana e as demais representam defensinas com apenas atividade antifúngica comprovada. A defensina candidata *McDef1* utilizada na transformação, está destacada em negrito com o nome da espécie de origem, *Momordica charantia*.....78

Figura 7: Produtos da PCR das plantas transformadas de feijão-caupi em gel de agarose. A linha C- representa o controle negativo, que corresponde ao DNA da cv. Boca Negra não transformada. A linha C+ corresponde ao controle positivo, representado pela amplificação do vetor pAHASMCDEF1. As linhas 8, 11, 12, 13, 14, 33 e 34 correspondem às sete plantas transformadas em eventos distintos.79

Figura 8: Etapas da cultura de tecidos após o bombardeamento dos embriões de feijão-caupi. A – Embriões em meio MS com 250 nM do agente de seleção Imazapyr. B – Plântula com cerca de 3 a 4 semanas de desenvolvimento, com o surgimento das primeiras folhas. Neste momento o vegetal está apto para a transferência para o meio de enraizamento. C – Plântula em meio MS de enraizamento com carvão ativado 3 g/L. Após o desenvolvimento das raízes (cerca de uma a duas semanas neste meio), a plântula está apta para a transferência para o solo. D – Planta no período de aclimação, em solo com a cobertura da bolsa plástica. E – Remoção do elástico após uma semana de crescimento com a bolsa plástica. F – Após mais uma semana ocorre a remoção da bolsa plástica. G – Por fim, a planta é transferida para pote de 5 dm³ com composto orgânico até o período reprodutivo.80

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table I: State of the art of the cowpea transformation (<i>Vigna unguiculata</i>) with the work done from 1986 to 2015.....	57
--	-----------

CAPÍTULO II

Tabela I: Defensinas obtidas no banco de dados CAMP, cujas atividades <i>in vitro</i> foram descritas e utilizadas nas análises de alinhamento e construção do fenograma.....	70
--	-----------

Tabela II: Defensinas utilizadas para transformação de diversas espécies vegetais, mostrando sua origem e as espécies de plantas transformadas, com registro das suas atividades <i>in vivo</i>	71
---	-----------

Tabela III: Pares de <i>primers</i> utilizados para amplificação de regiões do DNA exógeno inserido no genoma das plantas transformadas.	75
--	-----------

LISTA DE SIGLAS ABREVIATURAS

AMP	<i>Antimicrobial Peptides</i> , Peptídeos Antimicrobianos
BAP	Benzilaminopurina
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i> , Vírus do Mosaico da Couve-Flor
CENARGEN	Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia
CTAB	Cetyl-trimethyl-amoniumbromide
Cv	Cultivar
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> ; Ácido Desoxirribonucleico
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FACEPE	Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
Kg	Quilograma
Ha	Hectare
HMM	<i>Hidden Markov Model</i>
IPA	Instituto Agrônômico de Pernambuco
LB	Luria Bertani
mg	Miligrama
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mM	Milimolar
Ng	Nanograma
nM	Nanomolar
Nos	Nopalina sintase
PR	<i>Pathogene Related</i> , Relacionado à Patogênese
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i> , Receptores de Reconhecimento de Padrão
p.s.i.	<i>Pound Force Per Square Inch</i> , Libra Força Por Polegada Quadrada
Rpm	Rotação por minuto
SAR	<i>Systemic Acquired Resistance</i> , Resistência Sistêmica Adquirida
T	Tonelada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i>).....	19
2.1.1. Características, cultivo e importância econômica.....	19
2.1.2 Recursos genéticos (bancos de germoplasma).....	21
2.2. Estresse bióticos e consequências para as plantas.....	22
2.2.1. Principais pragas e patógenos de feijão-caupi	22
2.2.3. Mecanismos de defesa das plantas contra patógenos.....	25
2.2.2. Defensinas: estrutura, funções e aplicações biotecnológicas.....	27
2.3. Biotecnologia vegetal	28
2.3.1. Métodos de transformação vegetal	28
2.3.2. Transformação via <i>Agrobacterium</i>	29
2.3.3. Transformação via biobalística	31
2.4. Plantas transformadas superexpressando defensinas vegetais	34
2.4. Perspectiva histórica de eventos associados a transformação genética em feijão-caupi.....	36
3. OBJETIVOS	39
3.1. Objetivo Geral.....	39
3.2. Objetivos Específicos	39
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
5. CAPÍTULO I	
Historic, evolution and prospects of cowpea (<i>Vigna unguiculata</i>) genetic transformation.....	48

6. CAPÍTULO II

Obtenção de feijão-caupi transgênico com uma defensina exógena de Melão-de-São-Caetano via biobalística	66
---	----

7. CONCLUSÕES GERAIS.....87

8. ANEXOS.....88

8.1. Anexo I. Imagem do vetor.....	88
---	----

8.2. Anexo II. Resumo publicado em evento científico	89
---	----

8.3. Anexo III. Instruções para autores: <i>Genetics and Molecular Biology</i>	90
---	----

8.4. Anexo IV. Instruções para autores: <i>Plant Cell Reports</i>	95
--	----

1. INTRODUÇÃO

O feijão-caupi, feijão macassar ou feijão-de-corda é uma leguminosa anual, herbácea, com moderada tolerância à seca (VERDCOURT, 1970). Possui um elevado valor nutricional devido ao alto teor de proteínas (24%), maior que a carne, leite e ovos, além de ser rico em carboidratos (70%), vitaminas e possuir uma excelente digestibilidade (FROTA *et al.*, 2008). O maior produtor mundial é a Nigéria, seguido de Níger e do Brasil, segundo a FAOSTAT (2014). No Brasil a região de maior produção corresponde ao Nordeste, onde compreende a principal fonte de proteína vegetal. Estima-se que a cultura do feijão-caupi no Brasil gere mais de um milhão de empregos e movimente cerca de 700 milhões de reais/ano (FREIRE-FILHO *et al.*, 2011).

Estresses bióticos são os principais responsáveis pelas perdas de produtividade do feijão-caupi, com destaque para doenças causadas por fungos e vírus (OBI e BARRIUSO-VARGAS, 2014), cujas perdas chegam a 50% e 80%, respectivamente (BARBOSA *et al.*, 2008). Para combater estes e demais problemas que afetam a produtividade, é fundamental o sucesso dos programas de melhoramento genético e a busca por acessos com bases genéticas amplas (FREIRE-FILHO *et al.*, 2014). Nesse sentido foi realizada uma busca por recursos genéticos adicionais em espécies selvagens do gênero *Vigna*, mas os resultados foram desanimadores, devido à incompatibilidade dos cruzamentos (SINGH *et al.*, 2000).

Considerando os estresses bióticos, peptídeos antimicrobianos (AMPs) apresentam-se como interessantes candidatos para incremento da defesa vegetal. Dentre os referidos, destacam-se as defensinas vegetais, que são caracterizadas pelo motivo gama-tionina, com oito resíduos de cisteína conservados, além da glicina nas posições 13 e 34. Exibem, adicionalmente quatro pontes dissulfídicas, de 45 a 54 aminoácidos e uma estrutura tridimensional CS α β , com três β -folhas antiparalelas e uma alfa-hélice (LAY E ANDERSON, 2005). Em geral, possuem atividade antimicrobiana, principalmente contra fungos e bactérias (GAO *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2006; ABDALLAH *et al.*, 2010), além de algumas possuírem atividade inseticida (CHOI *et al.*, 2009).

As defensinas fazem parte do sistema de defesa baseado na imunidade inata do vegetal, ativada pelo reconhecimento de sinais externos "não próprios", fundamentais para o desenvolvimento dos microrganismos, tais como a flagelina (presente nos flagelos das bactérias), quitinas e glucanos (presentes na parede celular dos fungos) (BURKETOVÁ *et al.*, 2015). A partir do reconhecimento destes sinais externos, ocorre a indução de uma ampla variedade de respostas de defesa, que induzem a produção de um largo espectro de compostos antimicrobianos, dentre eles as defensinas.

A transgenia compreende um método eficiente no melhoramento genético vegetal, pois permite a introdução de um ou poucos genes no genoma vegetal, com reduzido impacto nas características nutricionais e fenotípicas das plantas transformadas, comparativamente ao melhoramento convencional, além de gerar linhagens elites após poucas gerações (ARAGÃO, 2004). Os métodos de transformação mais utilizados são via *Agrobacterium tumefaciens* e biobalística. Ambos os métodos possuem uma boa eficiência de transformação e propiciam a integração de uma ou poucas cópias do transgene no genoma transformado. A transformação direta via biolística pode ser aplicada a uma grande diversidade de espécies e genótipos, comparativamente à transformação mediada por agrobactéria, pois esta última depende da interação vetor-hospedeiro (ZANETTINI e PASQUALI, 2004).

O primeiro vegetal transgênico com uma defensina foi produzido por Gao e colaboradores (2000). Este grupo transformou batata, cuja resistência ao fungo *Verticillium dahliae* foi verificada pelo crescimento e produção semelhante das batatas transformadas submetidas ao patógenos, com as batatas não transformadas da mesma cultivar cultivada em solo sadio, cujo resultado foi obtido tanto em casa de vegetação, quanto em ensaio de campo. Posteriormente, diversos trabalhos desenvolveram plantas transformadas com defensinas com atividades antimicrobianas e inseticidas (TERRAS *et al.*, 1995; CHOI *et al.*, 2009; GASPAR *et al.*, 2014; GHAG *et al.*, 2014).

Até o momento já foram desenvolvidos alguns protocolos de transformação do feijão-caupi com transmissão estável do transgene (POPELKA *et al.*, 2006; IVO *et al.*, 2008; BAKSHI *et al.*, 2011), contudo nenhum trabalho de transgenia

desenvolveu feijão-caupi transformado para aquisição de resistência a fungos, nenhuma planta transgênica com um gene de defensina foi introduzida comercialmente (ZELLER *et al.*, 2013), assim como não há feijão-caupi transgênico comercialmente disponível.

Em face dos cenários apresentados, torna-se fundamental o desenvolvimento de linhagens elite de feijão-caupi resistentes a fungos fitopatogênicos. Portanto, o presente trabalho objetiva o desenvolvimento de uma planta transgênica de feijão-caupi superexpressando um gene (*McDef1*) codificante de defensina derivada do melão-de-são-caetano (*M. charantia*), caracterizado por análises *in silico* como um excelente candidato com potencial antifúngico.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Feijão-caupi (*Vigna unguiculata*)

2.1.1. Características, cultivo e importância econômica

O feijão-caupi, feijão-de-corda ou feijão macassar, [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], é uma angiosperma dicotiledônea da família Fabaceae. Trata-se de uma leguminosa anual, herbácea, que produz frutos secos deiscentes do tipo legume (vagem). Possuem raízes profundas, podendo atingir até dois metros, o que torna o feijão-caupi um vegetal, relativamente, tolerante à seca. As flores são hermafroditas, realizando autofecundação (SELLSCHOP, 1962; VERDCOURT, 1970).

O feijão-caupi é uma excelente fonte de proteína (cerca de 24%), carboidratos (70%), vitaminas (como a vitamina B₁ – tiamina, B₂ – riboflavina, B₉ – ácido fólico), e sais minerais (ferro, zinco, manganês, fósforo, potássio). Apresenta baixo teor de lipídios (2%) (NIELSON *et al.*, 1993; CASTELLÓN *et al.*, 2003; FROTA *et al.*, 2008), sendo a principal fonte de proteína de origem vegetal no nordeste do Brasil e a principal fonte de proteína nas regiões pobres do continente africano, devido ao alto preço da proteína animal em relação à vegetal (SILVA e FREIRE-FILHO, 1998). O feijão-caupi possui todos os aminoácidos essenciais para nutrição humana, porém, como todas as leguminosas, ele possui baixo teor dos aminoácidos sulfurados

(cisteína e metionina) (SHEWRY *et al.*, 1995), o que já resultou em tentativa de melhoramento genético via biobalística, visando introduzir um gene codificante de zeína (proteína presente do milho rica em aminoácidos sulfurados), infelizmente sem sucesso (CITADIN, 2013).

Em relação aos carboidratos totais, cerca de 30% destes são representados por fibras (SALGADO *et al.*, 2005; FROTA *et al.*, 2008), o que promove uma maior absorção de água pelo bolo fecal minimizando a prisão de ventre e o desenvolvimento do câncer intestinal (FELDHEIM e WINSKER, 2000). Quanto aos lipídeos, o feijão-caupi apresenta baixo teor, porém com um maior conteúdo de ácidos graxos insaturados (cerca de 70% dos lipídios totais). Contém, adicionalmente, teor apreciável dos ácidos graxos essenciais linoleico e linolênico (CASTELLÓN, 2003; FROTA *et al.*, 2008). Portanto verifica-se que o feijão-caupi é uma excelente fonte de energia, proteínas, vitaminas e sais minerais, além de possuir melhor digestibilidade em relação aos demais tipos de feijão (SILVA e FREIRE-FILHO, 1998).

Segundo Freire-Filho e colaboradores (2011), a partir de dados do IBGE, entre 2005 e 2009, a região de maior produção no Brasil é a Nordeste, responsável por 83,01% da produção nacional, seguida pela região Norte (8,85%) e Centro-Oeste (8,14%). Porém, a produção no Norte e Centro-Oeste vem aumentando nos últimos anos, sendo nesta última região cultivada como safrinha, após a colheita da soja ou do arroz, principais culturas da região. Como no Centro-Oeste a produção é maquinizada, a produtividade é três vezes maior que a região Nordeste, onde predomina a agricultura familiar. Devido a essas peculiaridades, no Centro-Oeste o preço do feijão-caupi se torna muito competitivo, o que vem aumentando o interesse dos produtores. Já para a região Nordeste, os dados demonstram que para um aumento da produção não seria necessário um incremento das áreas cultivadas, mas sim maior aplicação de tecnologia e obtenção de linhagens geneticamente melhoradas que propiciassem uma maior produtividade (Freire-Filho *et al.*, 2011).

A cultura de feijão-caupi tem uma grande importância socioeconômica, estimando-se que entre 2005 e 2009 tenham sido produzidas em média 513.619 t numa área de aproximadamente 1,4 milhões de ha, sendo que cada hectare gera 0,8 emprego/ano, implicando na geração de aproximadamente 1,1 milhão de

empregos/ano (FREIRE-FILHO *et al.*, 2011). Como o valor mínimo da saca de 60 kg é de 80 reais (HETZEL, 2009) a produção anual em reais movimentou quase R\$ 700 milhões em 2009 (FREIRE-FILHO *et al.*, 2011). Vale destacar que os dados atuais da área de cultivo e produção de feijão no Brasil é representada juntamente com o feijão-caupi e feijão-comum, o que dificulta estimar a produção exata de cada cultura.

2.1.2 Recursos genéticos (bancos de germoplasma)

O feijão-caupi tem como centro de origem e diversidade genética a África. Propõe-se que sua introdução no Brasil tenha sido realizada pelos colonizadores portugueses na segunda metade do século XVI (FREIRE-FILHO *et al.*, 2011).

Para o crescimento e a expansão da cultura de feijão-caupi no Brasil e no mundo, torna-se necessária uma intensificação dos programas de melhoramento genético e o desenvolvimento de novas cultivares comerciais. Isso decorre do fato que o cultivo em novas áreas ou áreas maiores que as tradicionais, torna o ambiente propício para o desenvolvimento de novas pragas e patógenos. Para isso é fundamental buscar acessos com bases genéticas amplas, como tem ocorrido no centro de origem da espécie, bem como na Ásia e Europa (FREIRE-FILHO *et al.*, 2014).

Recursos genéticos de feijão-caupi podem ser encontrados em vários bancos de germoplasma, com destaque para o *International Institute of Tropical Agriculture* (IITA) na Nigéria; o *United State Department of Agriculture* (USDA) nos Estados Unidos da América; a Embrapa no Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) em Brasília (Distrito Federal), com cerca de 4.000 acessos (WETZEL *et al.*, 2005), bem como na Embrapa Meio-Norte, em Teresina Piauí, com aproximadamente 3.500 acessos (FREIRE-FILHO, 2011).

Uma parte dos recursos genéticos que poderia ser utilizado no melhoramento do feijão-caupi encontra-se presente em diversas espécies selvagens do gênero *Vigna*. Porém esta alternativa não tem sido viável, devido à incompatibilidade no cruzamento do feijão-caupi cultivado com espécies selvagens, como *Vigna vexilata*

(L.) A. Rich., que possui resistência a uma série de insetos-praga e ao caruncho (FATOKUN *et al.*, 1997; SINGH *et al.*, 2000; FANG *et al.*, 2007). Essa realidade torna a engenharia genética, e a transferência de genes para feijão-caupi, como uma ferramenta para contornar este problema e aumentar a produtividade e segurança alimentar desta cultura.

2.2. Estresse bióticos e consequências para as plantas

2.2.1. Principais pragas e patógenos de feijão-caupi

As doenças patogênicas são os principais fatores da redução da produtividade do feijão-caupi, destacando-se fungos e vírus como os principais agentes causadores de danos nas plantações. Segundo levantamento de Obi e Barriuso-Vargas (2014), baseado nas publicações dos últimos cinco anos, foram publicados 343 artigos reportando as citadas doenças, as quais são responsáveis por 68,7% dos ataques de fitopatógenos em feijão-caupi. Outros patógenos e pragas também associados ao feijão-caupi envolvem doenças causadas por bactérias, destacando-se: (1) a mancha-bacteriana (*Xanthomonas vignicola*), que provoca lesões com centro necrosado e bordas alaranjadas (AMODU *et al.*, 2014); (2) ataque por nematoides, como a galhas-das-raízes ou meloidoginose, que provoca deformações do sistema radicular (ANDRADE, 2003) e (3) pragas por insetos fitófagos, que corresponde à principal causa de perdas pós-colheita durante a conservação das sementes em armazém (TARVER *et al.*, 2007), com destaque para *Callosobruchus maculatus* e *C. chinensis*, conhecidos popularmente como carunchos, provocando furos nas sementes, alterando seu sabor e sua capacidade de germinação (SANTOS e VIEIRA, 1971).

Segundo a FAOSTAT (2014), a África é responsável por mais de 80% da produção mundial de feijão-caupi, tendo a Nigéria como maior produtor mundial. Nas regiões úmidas deste país a doença que provoca mais prejuízos econômicos é a Antracnose (ADEGBITE e AMUSA, 2008), causada pelo fungo *Colletotrichum destructivum* O’Gara, que, de acordo com os níveis de infecção, pode acarretar perdas de 35% a 50% da produção (OBI e BARRIUSO-VARGAS, 2014). No Brasil, as doenças causadas por fungos possuem um maior número de agentes etiológicos,

entretanto, o baixo impacto econômico representado pela maior parte das doenças causadas por estes fitopatógenos, remete-os a uma posição secundária no ponto de vista dos investimentos em pesquisas científicas (ATHAYDE SOBRINHO, 2005). As principais doenças causadas por fungos que atacam as culturas brasileiras de feijão-caupi são a mela, o oídio, a murcha do fusário, a podridão cinzenta do caule e a antracnose (OBI e BARRIUSO-VARGAS, 2014).

A mela é causada pelo fungo *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk, e se encontra nas regiões quentes e úmidas do norte brasileiro, ela incide mais frequentemente nas folhas, e provoca manchas de aspecto aquoso, de bordas escuras e centro mais claro. À medida que a doença evolui, ocorre o aumento do tamanho das lesões e a necrose das folhas. Por exemplo, em Roraima a doença já provocou redução da produtividade em até 80% (NECHET e VIEIRA, 2006).

Nas regiões semiáridas do Norte e Nordeste, uma das doenças mais prevalentes é o oídio, causado pelo fungo *Oidium* sp. Os principais sintomas são manchas pulverulentas de coloração branco-acinzentado, que corresponde à esporulação do fungo sobre folhas, caule e pecíolos das plantas, as quais também podem ser observadas nas vagens. Os sintomas ocorrem principalmente no período de intenso florescimento e provocam deformação e queda das vagens, estando diretamente associados com a irrigação por gotejamento (PEREIRA *et al.*, 2013)

A murcha-de-fusário é uma doença causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* cujo primeiro sintoma é a redução no crescimento da planta; em seguida as folhas ficam amareladas, caem e a planta murcha e morre (VIEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2010). Porém, existem várias espécies de *Fusarium* que atacam o feijão-caupi (ITO *et al.*, 2013). Uma delas é a espécie *F. solani* (Martius) Appel & Wr que provoca a doença denominada podridão-das-raízes e está disseminada na maioria das produções agrícolas. Seu primeiro sintoma é visto no caule, que passa a ter uma coloração avermelhada, evoluindo posteriormente para um tom amarronzado, período esse em que os tecidos se rompem e interrompem a condução da seiva, o que leva a planta à morte (ABREU, 2005).

A podridão cinzenta do caule é causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Essa doença provoca lesões acinzentadas no caule e cancro, que

evoluem para a completa podridão dos tecidos, o que leva a um amarelecimento completo da planta, e posteriormente à sua morte. Estes sintomas são verificados quando não ocorre a morte das sementes ou tombamento das plântulas (ATHAYDE SOBRINHO, 2005).

A antracnose é uma doença causada pelo fungo *C. destructivum* O'Gara, apresentando ampla distribuição no Brasil, especialmente nas Regiões Sul e Sudeste (ABREU, 2005). A ocorrência de temperaturas moderadas, aliadas à alta umidade, favorece o desenvolvimento da doença. Os sintomas são pequenas lesões elípticas com manchas marrons no pecíolo, escurecimento das nervuras, principalmente da região inferior das folhas, lesões de coloração escura nos cotilédones e nas vagens, que podem murchar e secar (ABREU, 2005; ADEGBITE e AMUSA, 2008).

No que tange aos vírus, as plantas jovens do feijão-caupi são muito suscetíveis aos mesmos e, quando infectadas, sofrem uma intensa redução em todas as suas partes. No Brasil, as doenças causadas por vírus ocupam posição de destaque em relação às perdas de produtividade do feijão-caupi. As principais viroses que atacam as culturas brasileiras de feijão-caupi são: o *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) (família Bromoviridae), o *Cowpea Severe Mosaic Virus* (CPSMV) (família Comoviridae), o *Cowpea Golden Mosaic Virus* (CGMV) (família Geminiviridae), o *Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus* (CABMV) (família Potyviridae) e o *Cowpea Severe Mottle Virus* (CPSMV) (família Potyviridae). Entre as viroses citadas, o CPSMV merece destaque, devido à sua severidade e aos danos que provoca, enquanto o CABMV destaca-se por sua ampla ocorrência (BARROS *et al.*, 2013).

O CPSMV ou vírus do mosaico severo do feijão-caupi, do gênero *Comovirus*, é bastante comum e causa nas sementes das plantas infectadas uma forte coloração marrom, com uma acentuada redução na germinação. Na planta já estabelecida, a infecção provoca redução drástica do crescimento e necrose dos brotos foliares e florais. A doença destaca-se pela sua severidade, fácil transmissão mecânica e pode ser transmitida naturalmente por algumas espécies de coleópteros (LIMA *et al.*, 2005). Por sua vez, o CABMV ou vírus do mosaico do feijão-caupi, do gênero *Potyvirus*, é transmitido por afídeo e disseminado por diferentes espécies de

pulgões, principalmente *Aphis craccivora* Koch. Destaca-se pela ampla ocorrência e provoca mosaico intenso do limbo foliar, distorção das folhas e, em casos mais extremos, redução do crescimento da planta (SOUSA, 2013). Outro vírus, o CMV ou vírus do mosaico do pepino (gênero *Cucumovirus*), provoca mosaico leve e manchas anelares sistêmicas em algumas cultivares suscetíveis e não acarreta grandes problemas econômicos. Porém, pode ocorrer o sinergismo com alguns potyvírus, situação que provoca o “nanismo”. Já as plantas infectadas pelo vírus do mosaico dourado do feijão-caupi ou CGMV, do gênero *Geminivirus*, apresentam mosaico amarelo-brilhante com redução no porte da planta, caso a infecção ocorra no estágio de plântula.

2.2.2. Mecanismos de defesa das plantas contra patógenos

As plantas possuem um sistema de defesa eficiente, que é capaz de combater a maioria dos invasores microbianos, tais como bactérias, fungos, vírus ou oomicetos, presentes no ambiente. Devido à vida sésil, esses organismos têm evoluído sofisticados mecanismos para perceber tais ataques, para traduzir essa percepção em uma resposta adaptativa (DANG e JONES, 2001).

A primeira linha de defesa dos vegetais é denominada “pré-invasiva”, encontrada nas mais diversas partes externas da planta como uma barreira física (pelos, espinhos, cutículas, tricomas e ceras recobrimo principalmente a superfície de caules e frutos), que impede ou dificulta a penetração dos microorganismos (SOARES e MACHADO, 2007). Tal mecanismo pode ser induzido, como deposição de calose e fechamento dos estômatos, ou uma barreira química, com a liberação de quitinase, glucanase ou compostos antimicrobianos contra a invasão dos patógenos (HUCKELHOVEN, 2007).

As plantas também possuem uma linha de defesa “pós-invasiva” que pode ser induzida por meio da detecção da presença microbiana através imunoreceptores. O principal e mais antigo mecanismo evolutivo deste sistema imune se baseia no reconhecimento de sinais externos “não próprios”, denominados padrões moleculares micróbio/patógeno associado (MAMPs / PAMPs - *microbe/pathogen-associated molecular patterns*). Os MAMPs / PAMPs são estruturas fundamentais para o desenvolvimento dos microorganismos, tais como flagelina, presente nos

flagelos das bactérias e quitina e glucanos, presentes na parede celular dos fungos (BURKETOVÁ *et al.*, 2015).

Os MAMPs e PAMPs são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs - *pattern recognition receptors*), localizados na membrana plasmática, que induzem uma ampla variedade de respostas de defesa comumente referidos como MTI ou PTI (MAMP / PAMP *pattern-triggered immunity*), os quais por sua vez induzem a produção de um largo espectro de compostos antimicrobianos, incluindo peptídeos antimicrobianos. Porém, o patógeno pode produzir uma série de proteínas efetoras específicas para suprimir a PTI ou MTI. Para conseguir superar o patógeno que suprimiu a PTI/MTI, as plantas possuem uma segunda linha de defesa “pós-invasiva” denominada ETI (*effector-triggered immunity*) (BOLLER e FELIX, 2009).

A ETI que é baseada na ação de um gene *R* (ou resistência vertical), detecta por interação direta ou indireta a presença dos efetores do patógeno. Após o reconhecimento dos mesmos, a ETI promove uma vigorosa reação de defesa denominada “resposta hipersensível”, caracterizada pela morte celular por apoptose e necrose local. PTI/MTI e ETI compreendem duas formas do sistema de imunidade inata das plantas (BOLLER e FELIX, 2009).

As plantas também podem produzir diversos sinais que podem ser transportados pelo sistema vascular. Isso ativa o sistema de defesa em órgãos não infectados, o que promove o estabelecimento da memória imunológica levando a uma maior resposta a uma infecção subsequente (SAMPEDRO e VALDIVIA, 2014).

A partir do conhecimento dos mecanismos de defesa vegetal, uma quantidade considerável de plantas transgênicas foram desenvolvidas baseadas na superexpressão constitutiva das diversas classes de peptídeos antimicrobianos naturais, peptídeos sintéticos e metabólitos secundários (CARY *et al.*, 2000; GAO *et al.*, 2000; GASPAR *et al.*, 2014). No entanto, existem evidências de que as diversas classes de peptídeos antimicrobianos e metabólitos secundários possuem ação sinérgica, sendo que o desenvolvimento de plantas transgênicas com pelo menos dois genes de defesa promove uma resistência bem maior que aquela envolvendo apenas um único gene (CHEN *et al.*, 2006; SAMPEDRO e VALDIVIA, 2014).

2.2.3. Defensinas: estrutura, funções e aplicações biotecnológicas

As defensinas vegetais são pequenos peptídeos básicos, carregados positivamente, com massa molecular de cinco KDa, que possuem de 45 a 54 aminoácidos e estabilidade a variações de temperatura e de pH (LAY e ANDERSON, 2005). São caracterizadas pelo motivo conservado de oito resíduos de cisteínas, formando quatro pontes dissulfídicas, e uma glicina entre o quarto e quinto resíduo de cisteína (BROEKAERT *et al.*, 1995). As defensinas de plantas apresentam uma estrutura terciária conservada pelo motivo cisteína-estabilizada α/β (CS $\alpha\beta$), que consiste de três β -folhas antiparalelas e uma α -hélice, que são estabilizadas em uma forma compacta através das quatro pontes dissulfídicas (LACERDA *et al.*, 2014).

As defensinas foram encontradas em diversas partes das plantas como folhas, flores, sementes, raízes e tubérculos, porém a maior parte dos isolados provém de sementes (GAO *et al.*, 2000; MELLO, 2010). Podem ser classificadas, de acordo com o precursor codificante, em duas classes. A classe I corresponde ao maior grupo de defensinas, caracterizado pelo RNAm maduro que dá origem a duas regiões. A primeira, na extremidade amino-terminal, origina o peptídeo-sinal responsável pela secreção do peptídeo maduro para o meio extracelular, enquanto a segunda região dá origem ao peptídeo maduro. Em contrapartida, o RNAm maduro da classe II é constituído por três regiões. A região responsável pela produção do peptídeo sinal, a região do peptídeo maduro e a região C-terminal (denominada CTPP - *C-terminal pro-peptide*) que codifica um pró-peptídeo. O CTPP é responsável pelo armazenamento da defensina no vacúolo. Portanto, as defensinas da classe II não são secretadas para o espaço extracelular e possuem mecanismo de ação diferente das defensinas da classe I, sendo encontradas, predominantemente, em plantas da família Solanaceae (LAY e ANDERSON, 2005; GASPAR *et al.*, 2014).

Em relação à imunidade inata, apenas as defensinas são conservadas em plantas, invertebrados e vertebrados (THOMMA *et al.*, 2002). São sintetizadas como primeiro mecanismo de defesa em diferentes organismos, com papel contra diversos patógenos, principalmente fungos e bactérias (CHEN *et al.*, 2006; GASPAR *et al.*,

2014; LACERDA *et al.*, 2014). As defensinas da classe I agem através da interação com moléculas carregadas negativamente presentes na membrana das células dos patógenos, causando um aumento da sua permeabilização, o que provoca a morte celular por necrose e interrupção do crescimento dos patógenos. A interação desse grupo com a membrana também pode provocar a formação de poros. Outro mecanismo de ação é a interação da defensina com os fosfolipídios, sem danificar a membrana, aumentando sua permeabilidade iônica e consequentemente o teor das espécies reativas de oxigênio (ROS) com ativação da morte celular programada (STOTZ *et al.*, 2009). No caso das defensinas da classe II – que apresentam CTPP – como ficam armazenadas no vacúolo, o contato com as hifas ocorre durante a penetração intracelular, ruptura da epiderme radicular e córtex celular, quando as hifas estão em crescimento direcionado para o tecido vascular, como demonstrado por Gaspar e colaboradores (2014) em algodão.

2.3. Biotecnologia vegetal

2.3.1. Métodos de transformação vegetal

A transformação vegetal consiste na introdução controlada de DNA em um genoma alvo, sem envolver a introdução por fecundação. Ao longo dos últimos anos foram desenvolvidas diversas técnicas para esse fim, que podem ser classificadas em duas categorias: a transferência direta e a indireta. O método indireto de transferência de DNA é caracterizado pela necessidade de um vetor intermediário para a inserção do DNA exógeno no interior da célula-alvo, e tem como exemplo a transformação via *Agrobacterium*. Por sua vez, o método de transferência direta, corresponde à introdução direta do DNA exógeno no interior da célula-alvo sem necessidade de intermediários, como é o caso da eletroporação, transformação de protoplasto e biobalística (RECH e ARAGÃO, 1998).

Na eletroporação as células são submetidas a um tratamento enzimático para remoção da parede celular e em seguida são expostas a um campo elétrico controlado, curto e de alta voltagem (cerca de 1000 V por milissegundos). Os choques gerados pelos pulsos elétricos induzem a permeabilização reversível da membrana, o que provoca a abertura parcial de poros da membrana plasmática, o

que permite a entrada do DNA exógeno no interior da célula e a integração com o genoma celular. Para facilitar e aumentar a eficiência da transformação por eletroporação, são utilizados lipídios polares (capazes de formar lipossomos) e protetores do DNA carregados positivamente (como a espermidina), juntamente com o vetor, de modo a facilitar a entrada do DNA exógeno no interior da célula (AKELLA e LURQUIN, 1993). A maior dificuldade da eletroporação é a regeneração das células transformadas, pois a digestão da parede celular com celulase e pectinase torna as células frágeis e sensíveis. Para contornar esse viés pode ser realizada a eletroporação de tecidos intactos, a diferença em relação à eletroporação convencional é que são utilizados tecidos intactos, ou seja, a parede celular é levemente modificada com enzimas e são utilizados lipídios que formam lipossomos (ZANETTINI e PASQUALI, 2004).

A transformação do cloroplasto pode ser realizada por tratamento químico ou elétrico. Inicialmente é realizada a remoção enzimática da parede celular e retirada dos cloroplastos, que em seguida são submetidos à eletroporação ou tratados quimicamente com polietilenoglicol (PEG) juntamente com polycation. Como o DNA e a membrana do cloroplasto são carregados negativamente, o cátion divalente (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) interage com o DNA e a membrana do mesmo, o que facilita a entrada e posterior integração do DNA exógeno com o genoma do cloroplasto (ZANETTINI e PASQUALI, 2004). A grande vantagem desta técnica deve-se a esta organela está basicamente presente no gameta feminino e ausente no gameta masculino, logo o risco de disseminação do transgene através do grão de pólen é insignificante, o que aumenta a biossegurança do produto transgênico e evita a transmissão do transgene tanto para a espécie selvagem, quanto a espécies silvestres próximas (ARAGÃO, 2004). Além do mais, a síntese proteica em nível cloroplastidial é significativamente maior que em nível citoplasmático, pelo retículo endoplasmático rugoso (ZANETTINI e PASQUALI, 2004).

2.3.2. Transformação via *Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria que vive naturalmente no solo e causa a doença denominada “galha da coroa”, caracterizada pelo aparecimento de tumores na planta. Ela ataca uma grande variedade de plantas, o que a torna

possivelmente a bactéria patogênica de maior espectro para os vegetais. Há mais de 150 anos essa doença é conhecida na agricultura, porém o impacto econômico é restrito a um número limitado de espécies que podem ser infectadas e transformadas (PACURAR *et al.*, 2011).

A bactéria *A. tumefaciens* apresenta um plasmídeo chamado Ti (*tumour inducing*) ou Ti-DNA, que contém genes que provocam neoplasia nos tecidos vegetais. O plasmídeo Ti apresenta um segmento de DNA denominado T-DNA (*transferred DNA*), que tem a capacidade de se transferir para a célula vegetal e se inserir no seu genoma. O T-DNA é delimitado pelas bordas direita e esquerda, constituídas por sequências repetitivas de 25 pares de bases (ZANETTINI e PASQUALI, 2004; SANTOS e TORRES, 2007).

Para a transferência do T-DNA da agrobactéria para a planta, é necessário um conjunto de genes cromossômicos de virulência (*chv*) e um conjunto de oito genes de virulência (*vir*) – *vir A* até *vir H* - localizados no plasmídeo Ti. Os genes *chv* são responsáveis pelo processo inicial da infecção, promovendo a interação da bactéria com a célula vegetal. Já os genes *vir* têm a capacidade de perceber a liberação de compostos fenólicos liberados pelas células vegetais injuriadas e cortam o plasmídeo nas bordas direita e esquerda. Esses genes codificam proteínas que carregam o plasmídeo Ti da bactéria até o núcleo da célula vegetal e promovem a integração do T-DNA ao genoma da planta (ZIEMIENOWICZ, 2014).

Após a integração do T-DNA ao genoma vegetal, ocorre a expressão dos seus oncogenes, que induzem a produção de opinas, auxina e citocinina. Esses dois últimos hormônios induzem divisões celulares, o que provoca o tumor. A utilização de agrobactéria para transformação vegetal, só foi possível porque os genes relacionados à indução da produção de auxina e citocinina não são fundamentais para a transferência do T-DNA. A partir deste conhecimento foram desenvolvidas estirpes de *A. tumefaciens* desarmadas, ou seja, que possuem um T-DNA com a capacidade de se transferir para o genoma vegetal e sem provocar tumores. Neste T-DNA é possível a inserção do gene (ou genes) de interesse, desde que as bordas e os genes *vir* do vetor sejam preservados (ZANETTINI e PASQUALI, 2004).

Há dois métodos de transformação via *Agrobacterium*: (1) o método *in vitro*, que envolve o cocultivo de células e tecidos vegetais em suspensão com *Agrobacterium* e a subsequente regeneração da planta, e (2) o método *in planta*, no qual uma célula ou tecido da própria planta é infectado. Neste último método podem ser utilizadas diversas partes dos vegetais, como sementes, tecido meristemático, botões florais, dentre outras (CHUMAKOVA e MOISEEVA, 2012). A inoculação e cocultivo de *Agrobacterium* pode ser realizada por spray ou infiltração a vácuo, cujo tecido alvo, para maior eficiência da infecção e transformação, precisa estar injuriado. Estes ferimentos são realizados através de bisturis, agulhas, sonicador ou através do bombardeamento de micropartículas sem o vetor, apenas para realizar microferimentos e facilitar a regeneração do vegetal (SOLETTI *et al.*, 2008b; DROSTE *et al.*, 2000; BAKSHI *et al.*, 2011).

A transformação vegetal mediada por agrobactéria é um dos métodos mais usuais, porém existem algumas dificuldades. No início, essa metodologia era utilizada basicamente para transformação de gimnospermas e dicotiledôneas. Existiam limitações para o uso em monocotiledôneas, pois estas não são hospedeiras naturais de agrobactérias. Porém, atualmente, com a otimização de protocolos e virulência do plasmídeo Ti, já tem sido possível a transformação de algumas espécies do referido grupo (ZANETTINI e PASQUALI, 2004; ZIEMIENOWICZ, 2014). Outra limitação dessa técnica ocorre na transformação de espécies recalcitrantes para cultivo *in vitro*, havendo dificuldade na fase de regeneração do explante, no tempo demandado para obtenção da planta transformada. Adicionalmente há a necessidade de equipamentos especializados e pessoal altamente qualificado (CHUMAKOVA e MOISEEVA, 2012).

2.3.3. Transformação via biobalística

A utilização da biobalística em estudos genéticos para obtenção de plantas transgênicas foi descrita por SANFORD e colaboradores em 1987, na Universidade de Cornell, EUA. A técnica consiste no revestimento de micropartículas de metais inertes, como ouro ou tungstênio, pelo vetor (plasmídeo contendo o gene de interesse e o marcador de seleção). Em seguida, estas partículas são aceleradas

por meio de uma descarga elétrica, pólvora, propulsão a ar comprimido, vapor d'água ou cilindro de gás hélio pressurizado, sendo dirigidas aos tecidos das plantas (DANILOVA, 2007).

No bombardeamento, as micropartículas atingem cerca de 1500 km/h e assim atravessam a parede celular, membrana plasmática e membrana nuclear, cujo DNA recombinante se integra ao genoma de uma parte das células que permanecem viáveis (BENEVENTI, 2006). O explante utilizado pode ser folhas e cotilédones. Porém, o tecido meristemático é o preferencial, pois é constituído por células totipotentes, que – caso estejam transformadas – poderão originar todos os demais tecidos dos vegetais (RECH *et al.*, 2008). Esse explante é colocado em um meio de cultura, que estimula a regeneração do mesmo com a formação de um calo ou uma planta, podendo o novo fragmento de DNA participar dos processos celulares, resultando na transcrição e tradução do transgene (APEZZATO-DA-GLÓRIA e CARMELLO GUERREIRO, 2003).

O equipamento usado pelo grupo de pesquisa (Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), denominado “*gene gun*” está representado na (Figura 1). Para transformação com o uso desse equipamento, segundo o protocolo de Rech *et al.* (2008), a placa de Petri com os eixos embrionários é posicionada a 80 mm abaixo da tela de retenção, posicionada 13 mm abaixo da membrana carreadora que transporta o DNA revestido com as micropartículas. Os discos de ruptura ficam posicionados 8 mm acima da membrana carreadora. Quando o regulador do cilindro de hélio é aberto e a câmara de alta pressão é pressurizada até atingir a pressão de 1.200 psi, pode ser realizado o disparo. Quando ocorre o disparo uma válvula solenoide é ativada, orientando a agulha energizada em direção aos discos de ruptura. Estes dirigem a membrana carreadora, que transporta o DNA revestido com micropartículas, em direção à tela de retenção. A tela segura a membrana carreadora e permite que o vetor revestido com micropartículas se espalhe e penetre na região meristemática dos eixos embrionários. O DNA com as micropartículas se dissociam no citoplasma devido ao pH levemente ácido, e o vetor se integra aleatoriamente no genoma do hospedeiro. O sistema deve funcionar sob um vácuo de 27-28 mmHg, para reduzir as forças

aerodinâmicas e minimizar a desaceleração das micropartículas revestidas com DNA (RECH e ARAGÃO, 1998).

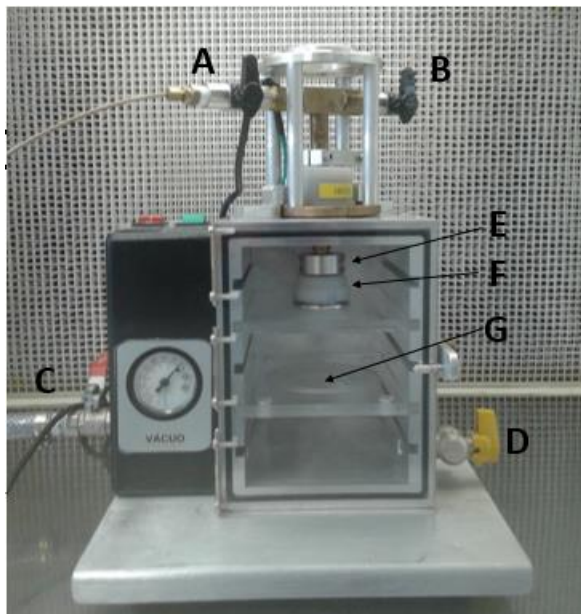


Figura 1: Os componentes do *gene gun* utilizado na pesquisa são: A – entrada do gás hélio pressurizado na válvula solenoide; B – saída do gás hélio, liberado após o tiro; C – entrada da bomba a vácuo; D – saída do vácuo, aberta após o tiro; E – local onde se colocam as membranas de ruptura; F – Local onde se colocam a tela de retenção e a membrana carreadora com as partículas de DNA; G – local onde se posicionam os embriões a serem bombardeados.

A grande vantagem do uso da técnica de biobalística é a sua versatilidade, podendo ser usada na transformação de diversos tipos de tecidos e células, independentemente da espécie e do seu genótipo. Além disso, trata-se de uma técnica rápida que utiliza menos manuseio de células em cultura, em comparação com outras técnicas de transformação (LACORTE *et al.*, 1999).

Para uma melhor eficiência da transformação via biobalística é necessária uma otimização do protocolo para a espécie a ser transformada, sendo fundamental: o pré e o pós-tratamento dos explantes; o dano causado ao tecido alvo; o marcador de seleção; a quantidade, composição e tamanho das partículas utilizadas para bombardeamento; e a distância entre as micropartículas e o acelerador. As micropartículas que transportam o DNA alvo devem ser suficientemente rápidas para penetrar as paredes celulares, mas não devem matar as células (ZANETTINI e PASQUALI, 2004; RECH *et al.*, 2008).

2.4. Plantas transformadas superexpressando defensinas vegetais

Devido ao potencial antimicrobiano das defensinas, diversos trabalhos com a superexpressão de um gene de defensina em plantas transgênicas foram publicados nos últimos anos. O primeiro transgênico expressando uma defensina foi gerado em experimento conduzido por Gao e colaboradores (2000). A batata transgênica portadora do gene de defensina *alfAFP*, de alfafa, teve o nível de infecção por colônias do fungo *V. dahliae* reduzido em seis vezes quando comparado com o controle não transformado. As plantas transformadas não tiveram diferenças fenotípicas e de taxa de crescimento quando comparadas com o controle sem a presença do patógeno. Os resultados obtidos em casa de vegetação foram consistentes com os resultados das análises em campo, o que reforça a atividade *in vivo* da defensina (GAO *et al.*, 2000).

Em 2002, Kazanki e colaboradores desenvolveram um arroz transgênico com uma defensina de wasabi (*Eutrema japonicum* Matsum., Brassicaceae). Porém, os níveis de resistência ao fungo *Magnaporthe grisea* (*blast fungus*) dos diversos transformantes de arroz obtidos foram bastante variáveis, com plantas transgênicas sendo tão resistentes quanto o controle resistente e outras transgênicas tão susceptíveis quanto o controle susceptível. Esta variação dos níveis de resistência foi justificada pelos efeitos epigenéticos da posição de inserção do gene no genoma, a eventos de silenciamento gênico ou ainda a mudanças pós-transcricionais.

Chen e colaboradores (2006) fizeram três construções de vetores para transformação de tomate. Uma com o gene *alfAFP* (defensina de alfafa), uma com o gene *GLU* (glucanase defensina de tabaco) e a construção com os dois genes *alfAFP-GLU*. Os pesquisadores observaram que o nível de resistência à bactéria *Ralstonia solanacearum* das plantas transgênicas carregando apenas um gene de defensina foram semelhantes, porém as plantas transgênicas com os dois genes tiveram uma resistência mais acentuada, o que demonstra o efeito sinérgico da coexpressão desses genes.

A transformação de tabaco e amendoim com o gene *BjD* (defensina de mostarda), mostrou níveis, significativamente, elevados de resistência das plantas

de tabaco transgênico aos fungos *Phytophthora parasitica* e *F. moniliforme*; e das plantas de amendoim aos fungos *Pheoisariopsis personata* e *Cercospora arachidicola* (ANURADHA *et al.*, 2008).

Em 2010, Abdallah e colaboradores desenvolveram um tomate transgênico, portador do gene *Msdef1* (defensina de *Medicago sativa*), com níveis de resistência elevados a *F. oxysporum*. Nos bioensaios de inoculação, as plantas transgênicas chegaram a uma taxa de 70% sem apresentar sintomas do patógeno e apenas 7% das plantas-controle (tomate não transformados) foram assintomáticas.

Gaspar e colaboradores (2014) desenvolveram algodão cv. Coker transgênico portando o gene *NaD1* responsável pela síntese de uma defensina da classe II em *Nicotiana glauca*, sendo o primeiro transgênico com defensinas dessa classe. O grupo realizou, além de testes em casa de vegetação, três anos de bioensaios em campo. Foi verificado que os níveis de resistência das plantas de algodão transgênico foram duas a três vezes maiores em relação à mesma cultivar não transformada submetida à inoculação do fungo patogênico *F. oxysporum* e 10% maiores nas transgênicas em relação à resistência ao fungo *V. dahliae*. O trabalho também mostrou que a produtividade das plantas transformadas com uma defensina, dirigida por um promotor constitutivo, foi semelhante àquela das não transformadas na ausência de patógeno, possivelmente devido ao armazenamento da defensina da classe II no vacúolo, o que promove uma menor fitotoxicidade.

Segundo Gaspar e colaboradores (2014), mais de 100 publicações relatam expressão de genes com propriedades antifúngicas em plantas transgênicas, porém poucas validam os dados de casa de vegetação em campo, o que deve ser devido à complexidade de traduzir resultados laboratoriais em campo ou à dificuldade de atender às exigências regulatórias necessárias para esse tipo de experimento. Até o momento nenhuma planta transgênica com peptídeo antimicrobiano foi introduzida comercialmente (GASPAR *et al.*, 2014), isso pode ser devido aos trâmites burocráticos em relação aos testes com OGM ou ao custo da resistência em relação à produtividade. Em 88 estudos analisados, relacionados a plantas transgênicas com resistência a patógenos, cerca da metade das plantas resistentes tiveram menor produtividade que seus respectivos controles (Zeller *et al.*, 2013).

Zeller et al. (2013) avaliaram o custo da resistência a fungos patogênicos em trigo geneticamente modificado. Os autores analisaram quatro transformantes distintas portadoras de genes de resistência ao oídio *Blumeria graminis* e verificaram que três delas, mesmo na presença do patógeno, não diferiram no desempenho agrônômico em relação ao controle (planta não transformada da mesma cultivar). O único acesso que teve uma maior resistência, só teve melhor desempenho agrônômico quando os níveis de infecção foram extremamente elevados. Porém, em condições naturais, os níveis de infecção em geral variam de ano para ano de acordo com os fatores ambientais.

Vale salientar que mesmo diante destas dificuldades, espera-se que no futuro próximo, agroprodutos comerciais à base de defensinas devam ser apontados como essenciais para o aumento da produção agrícola. Isso vai estimular e acelerar a transição entre a investigação biotecnológica e aplicações em campo de bioprodutos (LACERDA *et al.*, 2014).

2.5. Perspectiva histórica de eventos associados à transformação genética em feijão-caupi

O primeiro registro de transformação de uma planta leguminosa, comercialmente importante, foi com o feijão-caupi, reportado por Garcia e colaboradores (1986). Através da transformação de discos foliares via *Agrobacterium*, foram obtidos calos transgênicos para estudos de expressão gênica. Em 1987 o grupo de Garcia, inseriu o gene do M-RNA completo do vírus do mosaico do caupi (CPMV), com obtenção de calos transgênicos para estudo da expressão do cDNA-M viral. Foram realizadas outras tentativas de obtenção de plantas transformadas de feijão-caupi (PENZA et al., 1991; PENZA et al., 1992; AKELLA e LURQUIN, 1993). Porém, apenas 10 anos após o primeiro evento de transformação da espécie é que foram obtidas as primeiras plantas transgênicas, cujas sementes geradas, infelizmente, não germinaram (MUTHUKUMAR *et al.*, 1996).

Em 1996, Kononowicz e colaboradores transformaram feijão-caupi, mas não reportaram a transmissão do transgene para as gerações subsequentes. O primeiro trabalho que reportar a transformação de feijão-caupi com transmissão do gene de

interesse para os descendentes, foi realizado por Ikea e colaboradores (2003). Porém, tal evento não seguiu o padrão mendeliano de segregação. Apenas 20 anos após as primeiras tentativas de transgenia em feijão-caupi, foram obtidas as primeiras plantas transformadas que transmitiram o transgene de forma estável, seguindo o padrão de segregação mendeliano e com eficiência de transformação entre 0,05% e 0,15% (POPELKA *et al.*, 2006).

A partir deste marco, diversos trabalhos foram desenvolvidos para aumentar a eficiência de transformação (CHAUDHURY *et al.*, 2007; ADESOYE *et al.*, 2008; SOLLETI *et al.*, 2008a; SOLLETI *et al.*, 2008b; RAJI *et al.*, 2008; ADESOYE *et al.*, 2010; RAVEENDAR e IGNACIMUTHU, 2010; LLORI e PELLEGRINESCHI, 2011; BAKSHI *et al.*, 2012; KAUR e MURPHY, 2012; AASIM *et al.*, 2013; CITADIN *et al.*, 2013; CRUZ e ARAGÃO, 2014; MISHRA *et al.*, 2014), com destaque para o trabalho de Ivo e colaboradores (2008). Os citados pesquisadores desenvolveram um protocolo pioneiro, eficaz e mais simples que os anteriores para transformação do feijão-caupi via biolística, com o gene *Atahas* como marcador de seleção, que confere resistência ao herbicida Imazapyr. A partir de embriões maduros com o meristema exposto foi obtida uma eficiência de transformação de 0,90%, com o transgene transmitido estavelmente conforme o padrão mendeliano, podendo ser aplicado a qualquer cultivar.

Outro trabalho a ser destacado foi o desenvolvido por Higgins e colaboradores (2010), que desenvolveram plantas transgênicas de feijão-caupi portadoras do gene *Cry1AB* (derivado do *Bacillus turigiensis*, que confere resistência à larva de *Maruca vitrata*) ou gene inibidor da alfa amilase 1 (derivado de *Phaseolus vulgaris*, confere resistência a *C. maculatus*, o caruncho), a partir da otimização do protocolo de Popelka *et al.* (2006). Os pesquisadores detectaram uma excelente proteção contra *Helicovora armigera*, tratando-se do único trabalho que chegou a realizar testes de campo com as plantas transformadas, embora não tenha ocorrido pressão suficiente de insetos para confirmar os bioensaios *in vitro*.

Bakshi *et al.* (2011) realizaram a transformação do feijão-caupi via *Agrobacterium*, onde realizaram o ferimento do eixo embrionário através de sonicação e fizeram a inoculação a vácuo da *Agrobacterium*. Como a sonicação é menos agressiva do que o ferimento realizado através de agulhas ou bisturi e a

infiltração a vácuo é mais penetrante para a bactéria, ocorreu um aumento de mais de 20 vezes na eficiência da transformação, comparativamente ao primeiro trabalho de transformação do feijão-caupi com transmissão estável do transgene (POPELKA *et al.*, 2006), atingindo o valor de 3,09%. A transmissão do transgene foi estável e sua expressão foi confirmada em nível de RNA, por RT-PCR (Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction), análise proteica e por ELISA, o que demonstrou não haver nenhum mecanismo de silenciamento gênico.

A metodologia de transformação do feijão-caupi mais utilizada nos experimentos reportados foi via *Agrobacterium* (74,07%), seguida de biobalística (18,52%) e eletroporação (7,41%). Vale salientar que 42,3% dos trabalhos foram realizados nos últimos cinco anos, comparativamente aos demais (57,7%) realizados ao longo de 23 anos. Deve-se ressaltar que apenas um trabalho chegou a realizar testes de campo, e que os ensaios foram insuficientes para inferir sobre o aumento da resistência a insetos da planta transformada. A ausência ou baixo número de testes de campo com plantas transformadas, que servem para verificar se os resultados são compatíveis com experimentos de casa de vegetação e laboratório, pode justificar-se pela complexidade de traduzir resultados laboratoriais em campo, bem como pela dificuldade de negociar as exigências regulatórias necessárias para esse tipo de experimento (GASPAR *et al.*, 2014). Até o momento, nenhuma planta transgênica de feijão-caupi foi introduzida comercialmente.

2. OBJETIVOS

➤ Geral

- ✓ Avaliar a expressão de um gene de defensina isolado de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*) dentre os candidatos disponíveis no transcriptoma da espécie, por meio da transformação genética em feijão-caupi, visando avaliar sua influência sob condições de estresse biótico.

➤ Específicos

- ✓ Selecionar um gene de defensina através de análise *in silico* a partir dos transcriptomas disponíveis de melão-de-são-caetano.
- ✓ Utilizar o gene de defensina selecionado para desenho de minigene (vetor plasmidial) e síntese para transformação genética em uma planta de feijão-caupi superexpressando o gene candidato.
- ✓ Testar protocolos de transformação genética disponíveis com uso da metodologia de biobalística visando à expressão transiente do gene selecionado em feijão-caupi.
- ✓ Gerar no mínimo uma planta transformada com a defensina selecionada, avaliando os níveis de expressão e inferindo sobre as atribuições fenotípicas e fisiológicas das plantas.
- ✓ Caracterizar por técnicas moleculares os indivíduos transformantes, incluindo a validação da expressão diferencial do gene-candidato nas plantas transgênicas e na geração T0.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASIM, M.; KHAWAR, K. M.; ÖZCAN, S. Production of herbicide-resistant cowpea (*Vigna unguiculata* L.) transformed with the bar gene. **Turk J Biol**, v. 37, p. 472-478, 2013.

ABDALLAH, N.A.; SHAH, D.; ABBAS, D.; MADKOUR, M. Stable integration and expression of a plant defensin in tomato confers resistance to *Fusarium* wilt. **GM Crops** v. 1, p. 344–350. 2010.

ABREU, A. F. B. Cultivo do Feijão da Primeira e Segunda Safras na Região Sul de Minas Gerais. **Embrapa Arroz e Feijão**. Sistemas de Produção, n.6, ISSN 1679-8869. Versão eletrônica. 2005.

ADEGBITE, A. A.; AMUSA, N. A. The major economic field diseases of cowpea in the humid agro-ecologies of South-western Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 25, p. 4706-4712, 2008.

ADESOYE, A.; MACHUKA, J.; TOGUN, A. CRY 1AB transgenic cowpea obtained by nodal electroporation. **Afr J Biotechnol**, v. 7, p. 3200-3210, 2008.

ADESOYE, A.; MACHUKA, J.; TOGUN, A. Transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.Walp.) by Agrobacterium infiltration. **Appl Biosci**, v. 30, p. 1845-1860, 2010.

AKELLA, V.; LURQUIN, P, F. Expression in cowpea seedlings of chimeric transgenes after electroporation into seed-derived embryos. **Plant Cell Rep**, v. 12, p. 110-117, 1993.

ANDRADE, N. C. **Resistência do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) a *Meloidogyne incognita*: Aspectos anatômicos, bioquímicos e moleculares**. 2003. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

ANURADHA, T.S.; DIVYA, E.K.; JAMI, E. S. K.; KIRTI, E. P. B. Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens. **Plant Cell Rep**, v. 27, p. 1777–1786, 2008.

AMODU, S. U.; AGBENIN, N. O.; AKPA, A. D.; SHENGE, K. C. The Role of Nonhost Cereal Seeds in the Epidemiology of Cowpea Bacterial Blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* (Burkholder) Dye). **Adv Plants Agric Res**, v. 1 (5), p. 1-6, 2014.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2003. 438p.

ARAGÃO. Organismos Geneticamente Modificados: Impacto do Fluxo Gênico. In: Luis Mir (org.). **Genômica**. Atheneu, São Paulo, 2004. cap. 38, p. 767-783.

ATHAYDE SOBRINHO, C. **Patossistema caupi X *Macrophomina phaseolina*: método de detecção em sementes, esporulação e controle do**

patógeno. 2005. 150 f. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2005.

BAKSHI, S.; SADHUKHAN, A.; MISHRA, S.; SAHOOIMPROVED, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of cowpea via sonication and vacuum infiltration. **Plant Cell Reports**, v. 30, p. 2281–2292. 2011.

BAKSHI, S.; SAHA, B.; ROY, N. K.; MISHRA, S.; PANDA, S. K.; SAHOO, L. Successful recovery of transgenic cowpea (*Vigna unguiculata*) using the 6-phosphomannose isomerase gene as the selectable marker. **Plant Cell Rep**, v. 31, p. 1093–1103, 2012.

BARBOSA, P. K. A. et al. **Análise transcricional de *Vigna unguiculata* infectada por Potyvirus (CABMV) através de LongSAGE**. In: Congresso Brasileiro de Genética, 54, Salvador-BA, 2008, p 246.

BARROS, G. B.; NOGUEIRA, M. S. R.; OLIVEIRA, C. R. R.; FREIRE-FILHO, F.R.; RIBEIRO, V. Q.; VEIGA, C. F. M.; BRIOSO, P. S. T.; EIRAS, M. Obtenção de plantas de feijão-caupi resistentes ao Cowpea severe mosaic virus e ao Cowpea aphid-borne mosaic virus. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.2, p.130-136, 2013.

BENEVENTI, M. A. **Transformação genética em soja pela inserção da construção gênica contendo a região promotora do gene *rd29a* e a região codante do gene *DREB1A* de *Arabidopsis thaliana*, visando tolerância à seca**. 2006, 126 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2006.

BOLLER, T.; FELIX, G. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 60, p. 379–406, 2009.

BROEKAERT, W.F.; TERRAS, F.R.G.; CAMMUE, B. P. A.; OSBORN, R. W. Plant Defensins: Novel Antimicrobial Peptides as Components of the Host Defense System. **Plant Physiol**, v. 108, p. 1353-1358, 1995.

BURKETOVÁ, L.; TRDÁ, L.; OTT, P.; VALENTOVÁ, O. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. **Biotechnol. Adv**, v. 33, p. 994-1004, 2015.

CARY, J. W.; RAJASEKARAN, K.; JAYNES, J. M.; CLEVELAND, T. E. Transgenic expression of a gene encoding a synthetic antimicrobial peptide results in inhibition of fungal growth in vitro and in planta. **Plant Sci**, v. 154, p. 171–181, 2000.

CASTELLÓN, R. E. R.; ARAÚJO, F. M. M. C.; RAMOS, M. V.; ANDRADE-NETO, M.; FREIRE-FILHO, F. R.; GRANGEIRO, T. B.; CAVADA, B. D. Composição elementar e caracterização da fração lipídica de seis cultivares de caupi. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 7, n. 1, p. 149-153, 2003.

CHAUDHURY, D.; MADANPOTRA, S.; JAIWAL, R.; SAINI, R.; KUMAR, A. P.; JAIWAL, P. K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated high frequency genetic

transformation of an Indian cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivar and transmission of transgenes into progeny. **Plant Sci**, v. 172, p. 692-700, 2007.

CHEN, S. C.; LIU, A. R.; ZOU, Z. R. Overexpression of glucanase gene and defensin gene in transgenic tomato enhances resistance to *Ralstonia solanacearum*. **Russia J. Plant Physiol**, v. 53, p. 756–763, 2006.

CHUMAKOVA, M. I.; MOISEEVA, E. M. Technologies of Agrobacterium Plant Transformation In planta. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 48, n. 8, p. 657–666, 2012.

CHOI, M. S.; KIM, Y. H.; PARK, H. M.; SEO, B. Y.; JUNG, J. K.; KIM, S. T.; KIM, M. C.; SHIN, D. B.; YUN, H. T.; CHOI, I. S.; KIM, C. K.; LEE, J. Y. Expression of BrD1, a Plant Defensin from Brassica rapa, Confers Resistance against Brown Planthopper (*Nilaparvata lugens*) in Transgenic Rices. **Mol. Cells**, v. 28, p. 131-137, 2009.

CITADIN, C. T. 2013. **Expressão de genes de características agronômicas em feijão-caupi**. 102 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

CITADIN, C. T.; CRUZ, A. R. R.; ARAGÃO, F. J. L. Development of transgenic imazapyr-tolerant cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant Cell Reports**, v. 3, p. 537–543, 2013.

CRUZ, A. R. R.; ARAGÃO, F. J. L. RNAi-based enhanced resistance to Cowpea severe mosaic virus and Cowpea aphid-borne mosaic virus in transgenic cowpea. **Plant Pathology**, v. 63, p. 831–837, 2014.

DANG, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogen and integrate defence responses to infection. **Nature**, v. 411, p. 826-833, 2001.

DANILOVA, S. A. The Technologies for Genetic Transformation of Cereals. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 54, n. 5, p. 569–581, 2007.

DROSTE, A.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, H. M. Integrated Bombardment and *Agrobacterium* Transformation System: an Alternative Method for Soybean Transformation. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 18, p. 51-59, 2000.

FANG, J.; CHAO, C. T.; ROBERTS, P. A.; EHLERS, J. D. Genetic diversity of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] in four West African and USA breeding programs as determined by AFLP analysis. **Genet Resour Crop Evol**, v. 54, p. 1197–1209, 2007.

FATOKUN, C. A.; PERRINO, P.; NG, N. Q. Wide crosses in African *Vigna* species. pp. 50-57, In: SINGH, B. B.; MOHAN, R. A. J.; DASHIELL, K. E.; JACKAI, L. E. N. (Eds.) **Advances in cowpea research**. I.I.T.A. and Japan International Research Centre for Agricultural Science (JIRCAS). I.I.T.A., Ibadan, Nigeria. 1997.

FELDHEIM, W.; WISKER, E. Studies on the improvement of dietary fibre intake. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau, Hamburg**, v. 96, n. 9, p. 327-330, 2000.

FREIRE-FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; CARDOSO, M. J.; SANTOS, A. A.; NOGUEIRA, M. S. R.; VIEIRA, P. F. M. J.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D. **Cruzamentos de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp.] realizados na Embrapa Meio-Norte, no período de 1982 a 2012**. Teresina-PI: Embrapa Meio-Norte, 2014, 119p.

FREIRE-FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Produção, melhoramento genético e potencialidades do feijão-caupi no Brasil**. In: Reunião de Biofortificação, 4, Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011.

FROTA, K. G. M.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 28, p. 470-476, 2008.

GAO, Ai-Guo.; HAKIMI, S. M.; MITTANCK, C. A.; WU, Y.; WOERNER, B. M.; STARK, D. M.; SHAH, D. M.; LIANG, J.; ROMMENSET, C. M. T. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. **Nat. Biotechnol**, v. 18, p. 1307–1310, 2000.

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 Sci**, v. 44, p. 37-46, 1986.

GARCIA, J. A.; HILLE, J.; VOS, P.; GOLDBACH, R. Transformation of cowpea *Vigna unguiculata* with a full-length DNA copy of cowpea mosaic virus M-RNA. **Plant Sci**, v. 48, p. 89-98, 1987.

GASPAR, Y. M.; MCKENNA, J. A.; MCGINNESS, B. S.; HINCH, J.; POON, S.; CONNELLY, A. A.; ANDERSON, M. A.; HEATH, R. L. Field resistance to *Fusarium oxysporum* and *Verticillium* in transgenic cotton expressing the plant defensin NaD1. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 6, p. 1541–1550, 2014.

GHAG, S. B.; SHEKHAWAT, U. K. S.; GANAPATHI, T. R. Transgenic banana plants expressing a *Stellaria media* defensin gene (Sm-AMP-D1) demonstrate improved resistance to *Fusarium oxysporum*. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 119, p. 247–255, 2014.

HETZEL, S. **Com preço alto, área do feijão deve crescer**. In: AGRIANUAL 2009: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: Instituto FNP, 2009. p. 312-313.

HIGGINS, T. J. V.; GOLLASCH, S.; MOLVIG, L.; MOORE, A.; POPELKA, C.; WATKINS, P. et al. **Genetic transformation of cowpea for protection against bruchids and caterpillars**. In: Fifth World Cowpea Research Conference, 50. IITA, Sally-Senegal. 2010.

HUCKELHOVEN, R. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 45, p.101–127, 2007.

IKEA, J.; INGELBRECHT, I.; UWAIFO, A.; THOTTAPPILLY, G. Stable gene transformation in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) using particle gun method. **Afr J Biotechnol**, v. 2, p. 211-218, 2003.

ITO, M. F.; COSTA, A. F.; PIRES, B. E.; CANUTO, V. T. B.; OLIVEIRA, L. G.; SOUZA, M. C. M. **Sanidade de sementes de feijão-caupi**. In: III Conac – Congresso Nacional de feijão-caupi, 3, Recife-PE, 2013.

IVO, N. L.; NASCIMENTO, C. P.; VIEIRA, L. S.; CAMPOS, F. A.; ARAGÃO, F. J. Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. **Plant Cell Rep**, v. 27, n. 9, p. 1475-1483, 2008.

KANZAKI, H.; NIRASAWA, S.; SAITOH, H.; ITO, M.; NISHIHARA, M.; TERAUCHI, R.; NAKAMURA, I. Overexpression of the wasabi defensin gene confers enhanced resistance to blast fungus (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice. **Theor. Appl. Genet**, v. 105, p. 809–814, 2002.

KAUR, N.; MURPHY, J. B. Enhanced Isoflavone Biosynthesis in Transgenic Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Callus. **Plant Mol Biol Biotechnol**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2012.

KONONOWICZ, A. K.; CHEAH, K. T.; NARASIMHAN, M. L.; MURDOCK, L. L.; SHADE, R. E.; CHRISPEELS, M. J.; FILIPPONE, E.; MONTI, L. M.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Development of transformation system for cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Adv. Cowpea Res**, p. 361-371, 1997.

LACERDA, A. F.; VASCONCELOS, E. A. R.; PELEGRINI, P. B.; SA, M. F. G. Antifungal defensins and their role in plant defense. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.

LACORTE, C.; ARAGÃO, F. J. L.; VAINSTEIN, M. H.; RECH, E. L. Biobalística. In: TORRES AC, CALDAS LS, BUSO JÁ. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPQ, 1999. p 761-781.

LAY, F. T.; ANDERSON, M. A. Defensins – components of the innate immune system in plants. **Curr. Protein Pept. Sci**, v. 6, p. 85–101, 2005.

LIMA, J. A. A.; SITTOLIN, I. M.; LIMA, R. C. A. Diagnóstico e estratégias de controle de doenças ocasionadas por vírus. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2005. p. 403-459.

LLORI, C. O.; PELLEGRINESCHI, A. Transgene expression in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) through Agrobacterium transformation of pollen in flower buds. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 56, p. 11821-11828, 2011.

MELLO, E. O. **Atividade antifúngica e mecanismo de ação da defensina pvd1 isolada de sementes de *Phaseolus vulgaris* L.** 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes – RJ. 2010.

- MISHRA, S.; BEHURA, R.; AWASTHI, J. P.; DEY, M.; SAHOO, D.; BHOWMIK, S. S. D.; PANDA, S. K.; SAHOO, L. Ectopic overexpression of a mungbean vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene (VrNHX1) leads to increased salinity stress tolerance in transgenic *Vigna unguiculata* L. Walp. **Mol Breeding**, v. 34, p. 1345–1359, 2014.
- MUTHUKUMAR, B.; MARIAMMA, M.; VELUTHAMBI, K.; GNANAM, A. Genetic transformation of cotyledon explants of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Rep**, v. 15, p. 980-985, 1996.
- NECHET, K. L.; HALFELD VIEIRA, B. A. Severidade da mela (*Rhizoctonia solani*) em genótipos de feijão-caupi em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 374, 2006.
- NIELSON, S. S.; BRANDT, W. E.; SINGH, B. B. Genetic variability for nutritional composition and cooking time of improved cowpea lines. **Crop Sci**, v. 33, p. 469-472, 1993.
- OBI, V. I.; BARRIUSO-VARGAS, J. J. Situation of biofungicides reconnaissance, a case of anthracnose disease of cowpea. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 1202-1211, 2014.
- PACURAR, D. I.; CHRISTENSEN, H. T.; PACURAR, M. L.; PAMFIL, D.; BOTEZ, C.; BELLINI, C. *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 76, p. 76-81, 2011.
- PENZA, R.; LURQUIN, P. F.; FILIPPONE, E. Gene transfer by co-cultivation of mature embryos with *Agrobacterium tumefaciens*: application to cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **J Plant Physiol**, v. 138, p. 39-43, 1991.
- PENZA, R.; AKELLA, V.; LURQUIN, P. F. Transient expression and histological localization of a gus chimeric gene after direct transfer to mature cowpea embryos. **Biotechniques**, v. 13, p. 576-580, 1992.
- PEREIRA, D. L.; EVANGELISTA-JÚNIOR, W. S.; SOUZA, L. P.; LARANJEIRAS-JÚNIOR, A. L. R.; LEOPOLDINO-NETO, A. **Incidência De Oídio Na Cultura Do Feijão-Caupi Sob Diferentes Tipos De Irrigação**. In: *III Conac – Congresso Nacional de feijão-caupi*, 3, Recife-PE. 2013.
- POPELKA, J. C.; GOLLASCH, S.; MOORE, A.; MOLVIG, L.; HIGGINS, T. J. V. Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny. **Plant Cell Rep**, v. 25, p. 304-312, 2006.
- RAJI, A. A. J.; ORIERO, E.; ODESEYE, B.; ODUNLAMI, T.; INGELBRECHT, I. L. Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of African cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] genotypes using embryonic axis explants. **J. Food Agric. Environ**, v. 6, p. 350-356, 2008.
- RAVEENDAR, S.; IGNACIMUTHU, S. Improved *Agrobacterium* mediated transformation in cowpea *Vigna unguiculata* L. Walp. **Asian J Plant Sci**, v. 9, p. 256-263, 2010.

RECH, E. L.; VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L. High efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nat Protoc**, v. 3, p. 410–418, 2008.

RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L. Biobalística. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C (Eds.). **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 1998, cap. 3, p. 51-64.

SALGADO, S. M.; GUERRE, N. B.; ANDRADE, S. A. C.; LIVERA, A. V. S. Caracterização físico-química do grânulo do amido do feijão caupi. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 525-530, 2005.

SAMPEDRO, J.; VALDIVIA, E. R. New antimicrobial agents of plant origin. In: VILLA, T. G.; VEIGA-CRESPO, P. (Eds.). **Antimicrobial Compounds: Current Strategies and New Alternatives**. Springer, 2014, p. 83-114.

SANTOS, M. D. M.; TORRES, A. C. Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*. In: TORRES, A. C.; DUSI, A. N.; SANTOS, M. D. M. (Eds.). **Transformação genética de plantas via *Agrobacterium*: Teoria e Prática**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2007. p. 33-58.

SANTOS, J.H.R. dos; VIEIRA, F.V. Ataque do *Callosobruchus maculatus* (F.) a *Vigna sinensis* Endl. I. Influência sobre o poder germinativo de semente da cv. Seridó. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.1, p.71-74, 1971.

SELLSCHOP, J. P. F. Cowpeas: *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Field Crop Abstracts, **Slough**, v. 15, n. 4, p. 259-266, 1962.

SHEWRY, P. R.; NAPIE, JÁ.; TATHAN, A. S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **Plant Cell**, v. 7, p. 945-956, 1995.

SILVA, S. M. S.; FREIRE-FILHO, F. R. Proteína de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.): Caracterização e aplicação nutricional. **Embrapa Documentos**, v. 44, p. 5-20, 1998.

SINGH, B. B.; EHLERS, J. D.; SHARMA, B.; FREIRE-FILHO, F. R. **Recent progress in cowpea breeding**. In: Proceedings of World Cowpea Conference III, 3, IITA, Ibadan, Nigeria, p. 22–40.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, p. 9-19, 2007.

SOLLETI, S. K.; BAKSHI, S.; PURKAYASTHA, J.; PANDA, S. K.; SAHOO, L. Transgenic cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds expressing a bean α -amylase inhibitor 1 confers resistance to storage pests, bruchid beetles. **Plant Cell Rep**, v. 27, p. 1841-1850, 2008a.

SOLLETI, S. K.; BAKSHI, S.; SAHOO, L. Additional virulence genes in conjunction with efficient selection scheme, and compatible culture regime enhance recovery of stable transgenic plants in cowpea via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Journal of Biotechnology**, v. 135, p. 97–104, 2008b.

SOUSA, A. R. R. C. **Transformação genética de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) visando à introdução de genes de resistência a viroses**. 2013. 102 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

STOTZ, H. U.; THOMSON, J. G.; WANG, Y. Plant defensins Defense, development and application. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. 11, p. 1010-1012, 2009..

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol Biol Evol**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TARVER, M. R.; SHADE, R. E.; SHUKLE, R. H.; MOAR, W. J.; MUIR, W. M.; MURDOCK, L. M.; PITTENDRIGH, B. R. Pyramiding of insecticidal compounds for control of the cowpea bruchid (*Callosobruchus maculatus* F.). **Pest Manag Sci**, v. 63, p. 440–446, 2007.

TERRAS, F. R. G.; EGGERMONT, K.; KOVALEVA, V.; RAIKHEL, N. V.; OSBORN, R. W.; KESTER, A.; REES, S. B.; LEUVEN, S. T. F.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B. P. A.; BROEKAERT, W. F. Small Cysteine-Rich Antifungal Proteins from Radish: Their Role in Host Defense. **The Plant Cell**, v.7, p. 573-588, 1995.

THOMMA, B. P. H. J.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K. Plant defensins. **Planta**, v. 216, p. 193–202, 2002.

VERDCOURT, B. Studies in the leguminosae: papilionoideae for the 'Flora of tropical East Africa'. **Kew Bulletin**, v. 24, p. 507-569, 1970.

VIEIRA-JÚNIOR, J. R.; FERNANDES, C. F.; ROSA-NETO, C.; MARCOLAN, A. L.; ANTUNES-JÚNIOR, H.; REIS, N. D. **Ocorrência da fusariose (*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*) em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. em Rondônia**. Comunicado técnico 355, Embrapa, Rondônia. 2010.

WETZEL, M. M. V. S.; FREIRE, M. S.; FAIAD, M. G. R.; FREIRE, A. B. Recursos genéticos: coleção ativa e de base. In: FREIRE-FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2005. p. 29-92.

ZANETTINI, M. H. B.; PASQUALI, G. Plantas transgênicas. In: LUIS, M. I. R. (org.). **Genômica**. Atheneu, São Paulo, 2004, cap. 35, p. 721-736.

ZELLER, S. L.; KALININA, O.; SCHMID, B. Costs of resistance to fungal pathogens in genetically modified wheat. **Journal of Plant Ecology**, v. 6, n. 1, p. 92-100, 2013.

ZIEMIENOWICZ, A. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 3, p. 95–102, 2014.

Historical retrospective and prospects of cowpea (*Vigna unguiculata*) genetic transformation

José Diogo Cavalcanti Ferreira^{1,2}, Hayana Millena de Arruda Azevedo¹ and Ana Maria Benko-Iseppon¹

¹Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Recife, PE, Brazil.

²Instituto Federal de Pernambuco, Pesqueira, PE, Brazil.

ABSTRACT

Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] is a legume with significant importance, especially in regions of low water availability in Africa and South America. In these places, plants are often affected by pathogen attack, pests and abiotic stresses, situations that conventional breeding methods are not enough to overcome these problems. Molecular analyzes generally target the isolation of a given gene, especially combined with the use of biotechnology tools, like genetic transformation, having the potential to contribute effectively to a reduction of the problems generated by such adversities. In cowpea the application of these tools has faced difficulties and challenges over the past 30 years, culminating in adjustments and improvement of some techniques, as reported in this review. This paper summarizes the principal steps undertake and the evolution of these studies, allowing several findings and trends as well as outlining future paths of biotechnology applications with promising prospects.

KEYWORDS: Transgenics, genetic engineering, crop improvement.

1. Introduction

Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] is a legume whose possible origin occurred in the African continent (Simon *et al.*, 2007; Delgado-Salinas *et al.*, 2006; 2011), that accounts for over 80% of world production of this crop (FAOSTAT, 2014). Its grains have high protein (24%) and carbohydrates (70%) contents, with a great variety of vitamins and minerals (Nielson *et al.*, 1993; Castellón *et al.*, 2003; Frota *et al.*, 2008). Cowpea also presents higher protein content than meat, milk and eggs, being the primary source of protein in the low-income regions of Africa and South America (Silva and Freire-Filho, 1998).

The production of mentioned legume is limited by several factors, with emphasis on biotic stresses. Among these, fungi and phytopathogenic viruses stand out, accounting for about 70% of the diseases that attack this crop, causing losses of up to 50% (Obi and Barriuso-Vargas, 2014). Regarding the post-harvest period, during seeds storage, the attack of phytophagous insects deserves mentioning, mainly *Callosobruchus maculatus* and *C. chinensis*, popularly known as cowpea weevil, causing holes in the seeds, changing taste and germination capacity of the beans (Tarver *et al.*, 2007).

To improve cowpea production and productivity, additional genetic resources have been searched in wild *Vigna* relatives, but the results were disappointing due to crossing incompatibility (Singh *et al.*, 2000). Also, traditional breeding procedures present some difficult to develop resistant genotypes or tolerant to biotic and abiotic stresses, with high productivity and superior characteristics of the grain. Besides, these methods often consume many years to insert favorable genes in a crop of interest. In turn, molecular procedures, as marker-assisted selection (MAS), may achieve the same goal in much lower time (Winter and Kahl, 1995; Mir *et al.*, 2012), especially when combined with genetic engineering approaches, providing direct transfer of a given trait by genetic transformation (McKersie, 2015). Therefore, the use of genetic engineering as a method for the introduction an exogenous gene regards an essential and promising approach to improve the crop species in question.

The present paper reviews the genetic transformation approaches undertaken in cowpea, showing the evolution of the studies, difficulties encountered and future prospects.

2. Historical perspective of the cowpea transformation process

Cowpea genetic transformation announcement, which is also the first record of a commercially important legume transformation, was reported by Garcia and coworkers (1986). The approach involved the insertion of a nopaline synthase gene (*nos*) by *Agrobacterium tumefaciens* technique into explants of leaf discs. The selection was by the antibiotic kanamycin to obtain transgenic calluses for gene expression studies. In 1987, the same group (Garcia et. al., 1987), following the same protocol, inserted a DNA fragment corresponding to a complete copy of the M-RNA of *Cowpea Mosaic Virus* (CPMV) driven by the 35S promoter *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV) or by the nopaline synthase promoter, obtaining transgenic calli. The authors observed that the expression of viral cDNA-M was about ten times higher in the calli directed by the promoter CaMV 35S

In 1991, Penza and collaborators used mature embryos cut longitudinally as explants for cowpea transformation aided by *Agrobacterium*, inserting the neomycin phosphotransferase gene (*npt*) as selection marker and the *uidA* reporter gene that exhibits *gus* (β -glucuronidase) activity. The authors detected several transgenic embryos, shoots, and calluses expressing *gus* activity, but did not recover transgenic plants. Moreover, it was not possible to detect the full vector integration by Southern Blot hybridization.

Through electroporation of mature embryos, Akella and Lurquin (1993) succeed the insertion of the *gus* gene driven by CaMV 35S promoter or *pal2*, obtaining transgenic seedlings expressing *gus* in all tissues driven by CaMV 35S promoter. In turn, seedlings with the *gus* gene driven by *pal2* presented no staining in the epidermis, cortex, and xylem, indicating that expression of the transgene did not occur.

The first transgenic cowpea plant obtained was reported by Muthukumar and coworkers (1996), ten years after the first attempt of developing a transgenic cowpea. The transformation was performed via *Agrobacterium*, with

mature embryos as explants, with the insertion of the hygromycin phosphotransferase gene (*hpt*), which confers resistance to the antibiotic hygromycin. Four transgenic plants have been obtained, which produced seeds, but were not able to germinate. In the same year, Kononowicz and collaborators (1996) developed transgenic cowpea plants with the *alf-AI* gene, which inhibits insect amylase. The transformation was performed by *Agrobacterium* and biolistic, but the work does not report the transmission of the target gene to the progeny, possibly due to the regeneration of chimeric plants.

The first cowpea transgenic plant that transmitted the transgene to progeny was developed by Ikea and contributors (2003). The embryonic axes were transformed via biolistic with vector containing the *gus* gene and *pat* or *npt* gene (which confers resistance to the herbicide Bialaphos), with the transgene transmission record until the T3 generation with non-Mendelian inheritance.

In contrast, the first study generating a transgenic plant with stable transmission of the transgene to their progeny following Mendelian inheritance patterns was carried out by Popelka *et al.* (2006). The group performed transformation by *Agrobacterium* of cotyledonary explants nodes of cowpea, with an efficiency of 0.05% to 0.15% depending of the cultivar (Popelka *et al.*, 2006). Since cowpea is a recalcitrant species, a mechanism used to increase the efficiency of regeneration of transformed shoots was accomplished by grafting not transformed cowpea plants with ten days of age, using a silicone ring.

In 2007, a research led by Chaudhury *et al.* (2007) developed a transformation protocol of cowpea via *Agrobacterium*, which increased by more than five times the efficiency of transformation (0.76%) compared to the study of Popelka *et al.* (2006). This was possible with tissue culture protocol optimization, and may have influenced the cultivar used. The authors obtained three transgenic plants (T0) that transmitted the transgene according to Mendelian inheritance patterns, generating two plants with a single copy and one with two copies of the transgene. Another considerable increase in transformation efficiency (1.64%) was obtained by *Agrobacterium* with the vector added of copies of virulence genes, being the transgene transmitted following the Mendelian inheritance pattern (Solleti *et al.*, 2008a).

Raji *et al.* (2008) developed a regeneration and transformation system tested in eight cultivars. From the *Agrobacterium*-mediated transformation, the authors tested several hormones to improve explants regeneration, induction, elongation, and rooting. They concluded that all cultivars were transformed and regenerated, but regeneration frequency was genotype dependent. In the same year, Ivo *et al.* adapted a pioneer, efficient and simpler protocol than the previously available for cowpea transformation via biolistic. This protocol included the *gus* and *Atahas* gene as a selectable marker, which confers resistance to the herbicide Imazapyr (Rech *et al.*, 2008). From mature embryos with the exposed meristem, they managed a 0.90% transformation efficiency, being the first work regarding cowpea transformation via biolistic whose transgene was transmitted with stable Mendelian inheritance.

Soletti *et al.* (2008b) developed transgenic cowpea plants with the insertion of the α -AI-1 gene of common bean (*Phaseolus vulgaris*), an insect amylase inhibitor which promotes resistance to cowpea weevil. The gene was driven by *pha* (phytohemagglutinin) promoter which is expressed only in seeds, and the transformation occurred according to the protocol of Solletti *et al.* (2008a). From laboratory bioassays, it was found that inhibition of a pig amylase reached 37%, and mortality of the insects fed on the seeds of transformed plants was higher than the seeds of untransformed plants.

Adesoye *et al.* (2008) inserted the *Bt* gene, also known as *Cry1Ab* (that produces the toxic protein derived from *Bacillus thuringiensis* which confers resistance to the caterpillar-pods) in cowpea plants. Transgenic plants were obtained by electroporation of apical and lateral buds of 25 days old plants. They found that from the ten T3 plants treated with insect larvae, nine promoted increased insect mortality. PCR and Southern blot analysis confirmed integration of the transgene, but the gene of interest exhibited no Mendelian inheritance pattern, possibly due to the occurrence of chimerism or still due to the inefficiency of the selection agent.

In 2010, Adesoye and collaborators developed a transgenic cowpea plants via *Agrobacterium* with vacuum infiltration. They observed that the presence of acetosyringone (virulence inductor in *Agrobacterium*) and silwet (a surfactant that increases the penetration of this bacteria) in the inoculation medium improved the efficiency of transformation. However, in this study, the

transmission of the transgene did not follow the Mendelian inheritance and transgenic plants have not been confirmed by Southern blot or by another molecular approach.

Raveendar and Ignacimuthu (2010) carried out cowpea transformation by *Agrobacterium* and found that the use of thiol compounds, L-cysteine, and acetosyringone in the coculture medium, increased substantially the efficiency of transformation, which in the case of this study was 1.61%. However, the work did not report the transmission of the transgene to their progeny, and the molecular results were insufficient to confirm the integration of the transgene.

The work of Higgs *et al.* (2010) led to the production of transgenic cowpea plants carrying the *Cry1Ab* gene (derived from *Bacillus thuringiensis*, which confers resistance to *Maruca vitrata* larvae) or the inhibitor gene of the alpha amylase 1 (derived from *Phaseolus vulgaris*, conferring resistance to *C. maculatus*, the cowpea weevil), using the optimization protocol developed by Popelka *et al.* (2006). These researchers detected an excellent protection against *Helicovora armigera*, which was used as a substitute of *M. vitrata* in the tests with transformed plants carrying the *Cry1Ab* gene. Regarding the transgenic plants with the alpha-amylase 1 gene, four plants were randomly selected to perform bioassays with cowpea weevil, and three of them had total resistance, whereas one of them delayed larval development in 24 days. Field tests were conducted, but enough pressure from insects lacked, hindering the confirmation of the *in vitro* bioassay.

In 2011, Llori and Pellegrineschi carried out transformation of pollen via *Agrobacterium* for the first time in cowpea. The flower buds were inoculated (before opening) with 0.1 mL of a culture medium with *Agrobacterium* suspension, using a syringe. The vector used included the *gus* and *bar* genes, the last of them conferring resistance to phosphinothricin. However, none of the transgenic plants obtained carried the *bar* gene. Also, the transformation efficiency was low (0.36%), possibly because the pollen of cowpea is hydrophobic, so that rarely flowers produce pollen when it rains. When the excess of bacterial suspension incubated in flower buds was dried, the abortion rate of flowers (which corresponds to the non-development of the flower bud) reduced significantly. This method is promising because it bypasses the use of *in vitro* regeneration protocols, which in the case of *V. unguiculata* has been

recognized as the main hindering factor of an efficient transformation (Mao *et al.*, 2006; Popelka *et al.*, 2006). However, no transmission of the transgene to the next generation was reported by Llori and Pellegrineschi (2011).

Bakshi *et al.* (2011a) conducted the transformation of cowpea via *Agrobacterium* carrying the plasmid pSouv:cry1Ac, which included the *Cry1Ac* and the *gus* genes. The authors injured embryonic axis by sonication with subsequent vacuum inoculation of *Agrobacterium*. As evasion is less aggressive than the wound through the needle or scalpel and the vacuum infiltration is sharper for bacteria, there was an 88.4% increase in the efficiency of transformation, reaching 3.09%. The transgene transmission was stable, and the expression was confirmed in RNA level by RT-PCR as well as on protein level by ELISA, demonstrating that there was no mechanism for genetic silencing.

Bakshi and collaborators (2012) innovated the cowpea transformation process using the positive selection method for the first time. The authors introduced the *pmi* gene (6-phosphomannose isomerase) which confers the ability to metabolize mannose. The *Agrobacterium*-mediated transformation was according to the protocol of Bakshi *et al.* (2011) with minor modifications. Explants were cultured in selective medium with a prevalence of mannose as a carbon source, obtaining a transformation efficiency of 3.60%. Transgenic plants transmitted the gene following Mendelian rules. Integration and expression of the transgene were confirmed by molecular analysis and enzymatic assays.

Kaur and Murphy (2012) attempted to develop cowpea plants with increased content of isoflavones, plant secondary metabolites that are potent antioxidants and are found in low amounts in cowpea beans. The protocol of Popelka *et al.* (2006) was used, but it was just possible obtain transformed calluses, not been possible obtain regenerated plants. Both the insertion and transgene expression were confirmed by PCR and RT-PCR techniques, as well as analysis of isoflavone levels.

Aasim *et al.* (2013) developed transgenic cowpea plants with *Agrobacterium*-mediated transformation using immature cotyledons without embryos as explants. Plants were tested by GUS assay, selection with Basta herbicide spraying and confirmation by PCR. The transgene was transmitted to

the T1 generation, but it was not reported if segregation followed the Mendelian inheritance or not.

Citadin *et al.* (2013) have produced a transformed variety of the cultivar 'Novaera', tolerant to Imazapyr herbicide with *Atahas* gene. The transformation was via biolistics from Ivo *et al.* (2008) protocol for development of 10 transformed lines, one of which showed higher enzymatic activity and tolerance to Imazapyr, possibly due to a position effect of the transgene on the chromosome where the insertion occurred. The obtained transformed plants were included in the Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) improvement program.

Cruz and Aragão (2014) developed transgenic cowpea plants resistant to CPSPV and CABMV viruses. The resistance was achieved by the introduction of a vector construct containing RNA fragments from both viruses aiming to their silencing via RNA interference. The transformation was performed via biolistics, and the resistance was obtained in homozygotic plants. However, tolerance levels to the virus were not correlated with siRNA expression levels, as expected.

The first transgenic cowpea plant including a gene that confers tolerance to abiotic stress was developed by Mishra *et al.* (2014), with the introduction of the gene *VrNHX1* gene of *Vigna radiata* via *Agrobacterium* as described in Solleti *et al.* (2008a, b). From experiments in the laboratory and greenhouse, it was observed that the proline and ascorbate quantity increased in the transformed plants under saline stress as compared to the control (non-transformed) plants. The authors noted that the chlorophyll quantity and RWC (relative water content) had a greater reduction in non-transformed plants subjected to stress. These results demonstrate the transgene efficiency with increased salt tolerance in the generated cowpea transgenic plants.

The history in chronological order of cowpea transformation studies is shown in Figure 1, as well as the main information on progress and difficulties achieved after of each transformation event is present in Table 1.

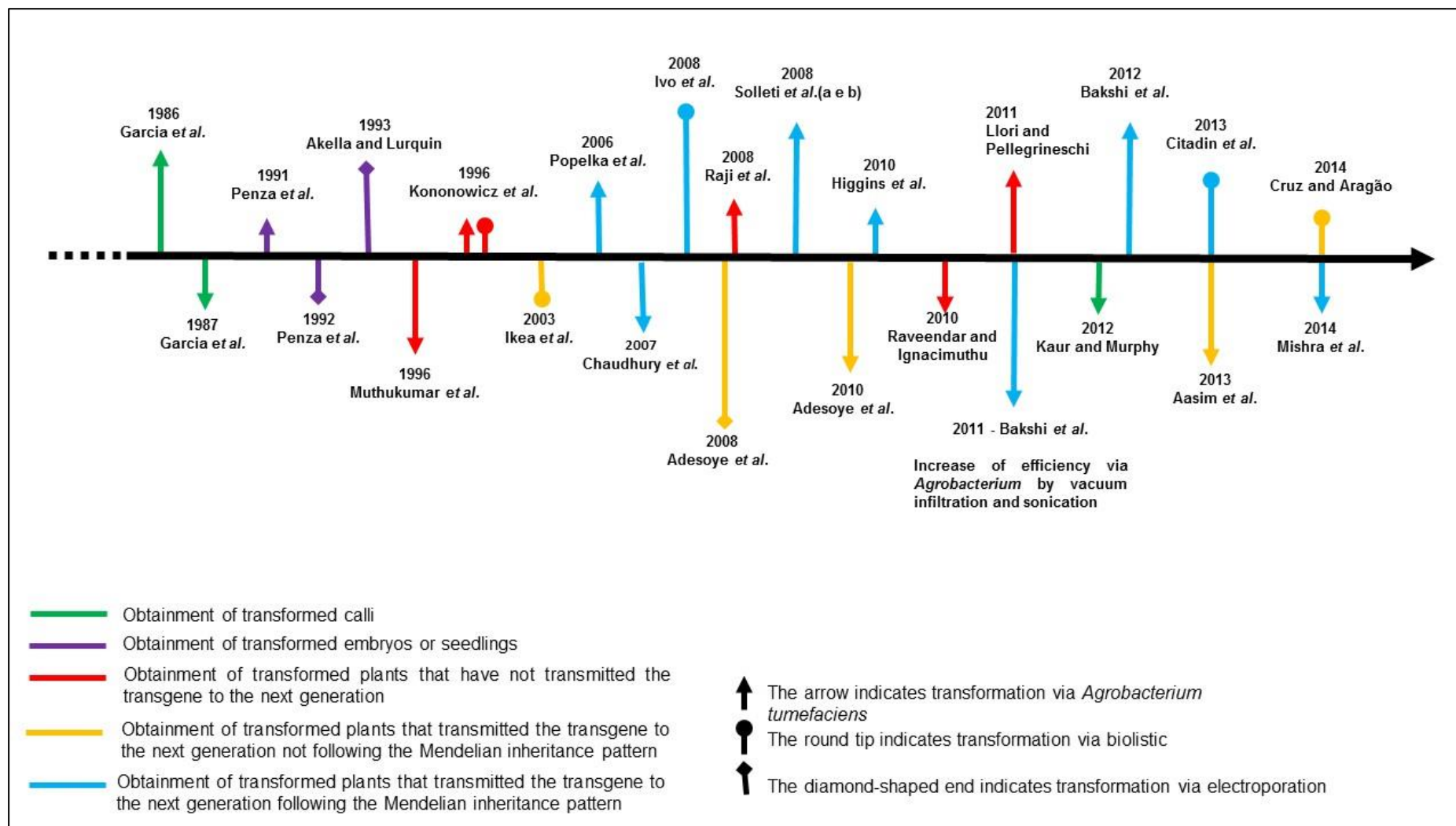


Figure 1: Timeline of genetic transformation events of cowpea and the main related articles.

Table I: State of the art of the cowpea transformation (*Vigna unguiculata*) with the work done from 1986 to 2015.

Year	Gene of interest	Selection marker	Method	Cultivar	Target tissue	Transformation efficiency	Transgene integration	References
1986	<i>nptII</i>	Kanamycin and G418 antibiotic	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	NR	Cellular disks	NR	Calluses did not regenerate transgenic plants	Garcia <i>et al.</i> (1986)
1987	Complete M-RNA of the CPMV	Kanamycin and G418 antibiotic	<i>A. tumefaciens</i>	NR	Cellular disks	NR	Calluses did not regenerate transgenic plants	Garcia <i>et al.</i> (1987)
1991	<i>gus</i>	Geneticin	<i>A. tumefaciens</i>	IT81D-994; TVu3236; TVu9062; VITA4; VITA201	Mature embryos	NR	Transgenic embryos	Penza <i>et al.</i> (1991)
1992	<i>gus</i>	Geneticin	Eletroporação	NR	Mature embryos	NR	Transgenic embryos	Penza <i>et al.</i> (1992)
1993	<i>gus</i>	Absent	Eletroporação	Blackeye	Mature embryos	NR	Transgenic seedlings/the formation of transgenic plants was not reported	Akella and Lurquin (1993)
1996	<i>hpt</i>	Hygromycin	<i>A. tumefaciens</i>	C-152	Cotyledon explants	NR	Regenerated transgenic plants/without transmission of the gene of interest to their progeny. All of the seeds from T0 were not viable	Muthukumar <i>et al.</i> (1996)
1996	α AI or Pig 2S Brazil Albumin	Kanamycin and/or biolaphos	Biolistics/ <i>A. tumefaciens</i>	TARS-36 and CBS	Cotyledonary segments and embryonic axis	NR	Transgenic plants regenerated/ transmission of the gene of interest to progeny was not reported	Kononowicz <i>et al.</i> (1996)
2003	<i>gus</i>	Phosphinothricin	Biolistics	IT83D-442	Embryonic axis	NR	Regenerated transgenic plants/Transmission of the gene of interest to progeny with non-Mendelian inheritance	Ikea <i>et al.</i> (2003)
2006	<i>gus</i>	Phosphinothricin	<i>A. tumefaciens</i>	Sasaque, Ebony, and Holstein.	Cotyledonary nodes with excised embryo adhered to the cotyledon	0,05% to 0,15%	Regenerated transgenic plants/Transmission of the gene of interest to progeny followed the Mendelian inheritance.	Popelka <i>et al.</i> (2006)
2007	<i>gus</i>	Kanamycin	<i>A. tumefaciens</i>	IC-202786; IC-257438; IC-259159; IC-243501; V-240; V-130; V-585.	Cotyledonary nodes	0,76%	Regenerated transgenic plants/Transmission of the gene of interest to progeny followed the Mendelian inheritance.	Chaudhury <i>et al.</i> (2007)
2008	<i>gus</i>	Rapamycin	<i>A. tumefaciens</i>	IT86D-1010; IT82D-889; IT82E-16; IT90K-277-2; IT93K-452-1; IT97K-499-35; Ife Brown; Drum.	Cotyledonary nodes with or without excised embryo adhered to the cotyledon	NR	Transgenic plants regenerated/ transmission of the gene of interest to progeny was not reported	Raji <i>et al.</i> (2008)
2008	<i>gus</i>	Geneticin	<i>A. tumefaciens</i>	Pusa Komal; Pusa Safed; Pusa Sampada; Rambha; V-16; V-240; V-130; V-585.	Cotyledonary nodes	1,64%	Transgenic plants regenerated/ transmission of the gene of interest to progeny was not reported	Solleti <i>et al.</i> (2008a)
2008	<i>gus</i>	Imazapyr	Biolistics	Paraguaçu; Gurguéia; MNC99-5417-8; Guariba; Vita 7; Pitiúba; Rouxinol; CE-315; CE-11; MNC01-623-51	Exposed apical meristem from mature embryos	0,90%	Regenerated transgenic plants/Transmission of the gene of interest to progeny followed the Mendelian inheritance	Ivo <i>et al.</i> (2008)
2008	α AI-1	Geneticin	<i>A. tumefaciens</i>	Pusa Komal	Cotyledonary nodes	1,67%	Regenerated transgenic plants/Transmission of the gene of interest to progeny followed the Mendelian inheritance.	Solleti <i>et al.</i> (2008b)
2008	<i>Cry1Ab</i>	Geneticin and Kanamycin	Electroporation	TVu 201; Ife Brown; IT90K-277-2; IT90K-288; IT90K-391.	Apical and lateral buds of plants with 25 days after germination	NR	Regenerated transgenic plants/Transmission of the gene of interest to progeny with non-Mendelian inheritance	Adesoye <i>et al.</i> (2008)

Year	Gene of interest	Selection marker	Method	Cultivar	Target tissue	Transformation efficiency	Transgene integration	References
2010	<i>gus</i>	Phosphinothricin or Hygromycin	<i>A. tumefaciens</i>	IT86D-1010 or IT96D-734.	Decapitated embryos	NR	Regenerated transgenic plants/Transmission of the gene of interest to progeny with non-Mendelian inheritance	Adesoye <i>et al.</i> (2010)
2010	<i>gus</i>	Hygromycin	<i>A. tumefaciens</i>	VBN-1; VBN-2; Co-6; Co(cp)-7.	Cotyledonary nodes	1,61%	Transgenic plants regenerated/not reported transmission of the gene of interest to progeny	Raveendar and Ignacimuthu (2010)
2010	<i>Cry1Ab</i> or <i>αAI-1</i>	Phosphinothricin	<i>A. tumefaciens</i>	IT86D-1010	Cotyledonary nodes with excised embryo adhered to the cotyledon.	0,05% à 0,15%	Regenerated transgenic plants/Transmission of the gene of interest to progeny following the Mendelian inheritance	Higgins <i>et al.</i> (2010)
2011	<i>gus</i>	Phosphinothricin	<i>A. tumefaciens</i> (by pollen transformation)	IT 86D-719; TVx 3236; IT 82D-716; TVu 8340; IT 84S-2246-4; TVu 1390; IT 89KD-374-57; TVu 10050; TVu 10241; IT 82E-16; IT 90K-284-2; TVu 1362.	Flower buds before opening	0,36%	Transgenic plants regenerated/not reported transmission of the gene of interest to progeny	Llori and Pellegrineschi (2011)
2011	<i>Cry1Ac</i> and <i>gus pmi</i> (6-phosphomannose isomerase) <i>ifs1</i> from soybean (production of isoflavones)	Kanamycin	<i>A. tumefaciens</i>	Pusa Komal	Cotyledonary nodes	3,09%	Regenerated transgenic plants/Transmission of the gene of interest to progeny following the Mendelian inheritance.	Bakshi <i>et al.</i> (2011)
2012		Mannose as a carbon source (positive selection)	<i>A. tumefaciens</i>	Pusa Komal	Cotyledonary nodes	3,60%	Regenerated transgenic plants/Transmission of the gene of interest to progeny following the Mendelian inheritance	Bakshi <i>et al.</i> (2012)
2012		Hygromycin	<i>A. tumefaciens</i>	IT86D-1010	Cotyledonary nodes with excised embryo adhered to the cotyledon.	NR	Calluses/Do not regenerate transgenic plants	Kaur and Murphy (2012)
2013	<i>gus</i>	Phosphinothricin	<i>A. tumefaciens</i>	Akkiz	Immature cotyledons without embryo	NR	Regenerated transgenic plants/Transmission of the Gene of interest to progeny, but does not show the transmission pattern	Aasim <i>et al.</i> (2013)
2013	<i>At-ahas</i>	Imazapyr	Biolistics	Novaera	Exposed apical meristem from mature embryos	NR	Regenerated transgenic plants/Transmission of the gene of interest to progeny following the Mendelian inheritance.	Citadin <i>et al.</i> (2013)
2014	siRNA of CPSPMV and CABMV virus	Imazapyr	Biolistics	Novaera	Exposed apical meristem from mature embryos	1,04%	Regenerated transgenic plants/Transgene transmission of interest to progeny, but does not show the transmission pattern	Cruz and Aragão (2014)
2014	<i>VrNHX1</i>	Kanamycin	<i>A. tumefaciens</i>	Pusa Komal	Cotyledonary nodes	3,68%	Regenerated transgenic plants/ Transmission of the Gene of interest to progeny following the Mendelian inheritance and some transmitted with non-Mendelian inheritance	Mishra <i>et al.</i> (2014)

Legend of Abbreviations: NR = Not Reported.

2. Conclusions and Perspectives

Most cowpea transformation approaches were performed to establish an efficient and reproducible protocol for transgeny (Ivo *et al.*, 2008; Popelka *et al.*, 2006; Soleti *et al.*, 2008a), especially considering the difficulties involving protocols used in research works before 2003. In this period the main difficulties involved (i) obtaining only transformed calluses or transgenic embryos, with difficulties to regenerate transformed plants (Garcia *et al.*, 1986; Garcia *et al.*, 1987; Penza *et al.*, 1991; Penza *et al.*, 1992), or (ii) obtaining transgenic plants that survived but were unable to transmit the transgene to subsequent generations (Muthukumar *et al.*, 1996; Kononowicz *et al.*, 1996).

Regarding the transformation applied to crop improvement, the primary objective was the development of cowpea plants resistant to cowpea weevil by inserting the inhibitor of salivary amylase gene ($\alpha AI-1$) and/or the Bt toxin gene (*Cry1Ab*) (Kononowicz *et al.*, 1996; Adesoye *et al.*, 2008; Solleti *et al.*, 2008b; Higgins *et al.*, 2010; Bakshi *et al.*, 2011). However, the durability of genetically modified cowpea resistant to insects can be relatively short because of the insect-plant coevolution process. Studies of genes which express toxins that delay maturation of insects (toxin delaying insect maturation, MDTs) in transgenic cowpea showed that the use of non-lethal MDT genes did not control the losses caused by *C. maculatus*, while MDT lethal genes promoted excellent resistance and reduced losses, but with the durability of just two years (Kang *et al.*, 2013).

Other biotechnological interventions for improving cowpea involved the development of transgenic plants resistant to the herbicide Imazapyr (Citadin *et al.*, 2013), tolerant to salinity (Mishra *et al.*, 2014) and tolerant to CPSMV and CABMV virus, based on viral silencing through a RNA interference (Cruz and Aragão, 2014). An attempt was also made to improve the nutritional quality through the introduction of a corn zein, for increasing the sulfur aminoacids rate but without success (Citadin, 2013, unpublished data).

The methodology for cowpea transformation most commonly used involved the use of *Agrobacterium* – 74.07%, followed by biolistic – 18.52% and electroporation – 7.41% (Figure 2). It is noteworthy that 42.3% of the research

reports were published in the last five years, compared to other 57.7% realized in 23 years.

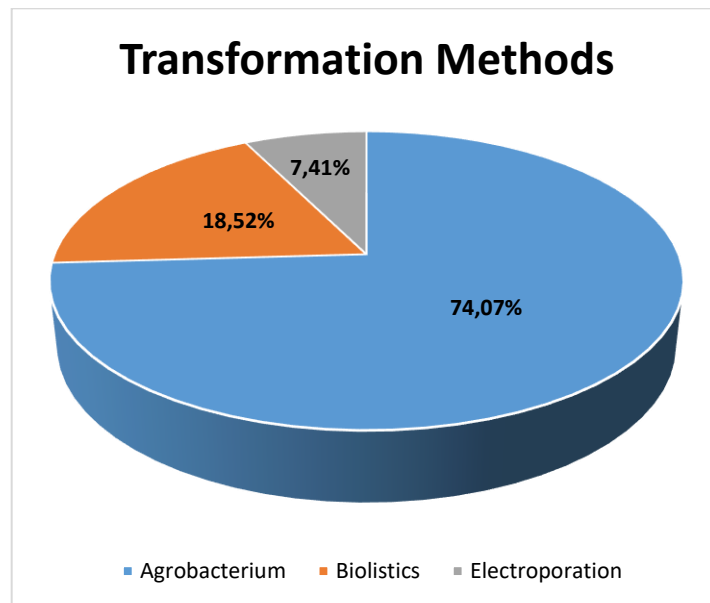


Figure 2: Frequency of transformation methods used for development of transformed cowpea from 1986 to 2015.

It should be highlighted that only a single work carried out field tests, and the tests were insufficient to infer increased resistance to insects of the transformed plants. Such an absence or low number of field tests with transformed plants, which serve to verify if the results are compatible with greenhouse and laboratory experiments, can be justified by the complexity of translating results of field trials. Another hindrance regards the difficulty of negotiating the regulatory requirements necessary for this type of experiment (Gaspar *et al.*, 2014), besides the high costs involved. To date no cowpea transgenic cowpea plant is commercially available.

Despite the potential of biotechnology for the benefit of underprivileged populations, yet this progress has mostly benefited large landowners and farmers in developed countries. The cultivation and commercialization of a cowpea transgenic plant has the potential to change this scenario.

3. References

Aasim M, Khawar KM and Özcan S (2013) Production of herbicide-resistant cowpea (*Vigna unguiculata* L.) transformed with the bar gene. Turk J Biol 37: 472-478.

- Adesoye A, Machuka J and Togun A (2008) CRY 1AB transgenic cowpea obtained by nodal electroporation. *Afr J Biotechnol* 7: 3200-3210.
- Adesoye A, Machuka J and Togun A (2010) Transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) by *Agrobacterium* infiltration. *Appl Biosci* 30: 1845-1860.
- Akella V and Lurquin PF (1993) Expression in cowpea seedlings of chimeric transgenes after electroporation into seed-derived embryos. *Plant Cell Rep* 12: 110-117.
- Bakshi S, Sadhukhan A, Mishra S, Sahoo L (2011) Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of cowpea via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports* 30: 2281–2292.
- Bakshi S, Saha B, Roy NK, Mishra S, Panda SK and Sahoo L (2012) Successful recovery of transgenic cowpea (*Vigna unguiculata*) using the 6-phosphomannose isomerase gene as the selectable marker. *Plant Cell Rep* 31: 1093–1103.
- Castellón RER, Araújo FMMC, Ramos MV, Andrade-Neto M, Freire-Filho FR, Grangeiro TB e Cavada BD (2003) Composição elementar e caracterização da fração lipídica de seis cultivares de caupi. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v 7, p 149-153.
- Chaudhury D, Madanpotra S, Jaiwal R, Saini R, Kumar AP and Jaiwal PK (2007) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated high frequency genetic transformation of an Indian cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivar and transmission of transgenes into progeny. *Plant Sci* 172: 692-700.
- Citadin CT, Cruz ARR and Aragão FJL (2013) Development of transgenic imazapyr-tolerant cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Cell Reports* 3: 537–543.

- Cruz ARR and Aragão FJL (2014) RNAi-based enhanced resistance to Cowpea severe mosaic virus and Cowpea aphid-borne mosaic virus in transgenic cowpea. *Plant Pathology* 63: 831–837.
- Delgado-Salinas A, Thulin M, Pasquet R, Weeden N and Lavin M (2011) *Vigna* (Leguminosae) sensu lato: the names and identities of the American segregate genera. *Am J Bot* 98:1694-1715.
- Delgado-Salinas , A; Bibler R and Lavin M (2006) Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): A recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany* 31 : 779 – 791 .
- Food and Agriculture Organization, Statistics Division (FAOSTAT), <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. (Janeiro 8, 2016).
- Frota KGM, Soares RAM e Arêas JAG (2008) Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. *Ciênc Tecnol Aliment* 28: 470-476.
- Garcia JA, Hille J and Goldbach R (1986) Transformation of cowpea *Vigna unguiculata* cells with an antibiotic resistance gene using a Ti-plasmid-derived vector. *Plant Sci* 44: 37-46.
- Garcia JA, Hille J and Goldbach R (1987) Transformation of cowpea *Vigna unguiculata* with a full-length DNA copy of cowpea mosaic virus M-RNA. *Plant Sci* 48: 89-98.
- Gaspar YM, Mckenna JA, McGinness BS, Hinch J, Poon S, Connelly AA, Anderson MA and Heath RL (2014) Field resistance to *Fusarium oxysporum* and *Verticillium* in transgenic cotton expressing the plant defensin NaD1. *Journal of Experimental Botany* 65(6): 1541–1550.

- Higgins TJV, Gollasch S, Molvig L, Moore A, Popelka C, Watkins P, Armstrong J, Mahon R, Ehlers J, Huesing J, Margam V, Shade R and Murdocket L (2010) Genetic transformation of cowpea for protection against bruchids and caterpillars. In: Fifth World Cowpea Research Conference, 50. IITA, Sally-Senegal. 2010.
- Ikea J, Ingelbrecht I, Uwaifo A and Thottappilly G (2003) Stable gene transformation in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) using particle gun method. *Afr J Biotechnol* 2: 211-218.
- Ivo NL, Nascimento CP, Vieira LS, Campos FA and Aragão FJ (2008) Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. *Plant Cell Rep* 27(9):1475-83.
- Kang JK, Pittendrigh BR and Onstad DW. Insect Resistance Management for Stored Product Pests: A Case Study of Cowpea Weevil (Coleoptera: Bruchidae). *J. Econ. Entomol* 106(6): 2473-2490.
- Kaur N and Murphy JB (2012) Enhanced Isoflavone Biosynthesis in Transgenic Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Callus. *Plant Mol Biol Biotechnol* 3(1): 1-8.
- Kononowicz AK, Cheah KT, Narasimhan ML, Murdock LL, Shade RE, Chrispeels MJ, Filippone E, Monti LM, Bressan RA and Hasegawa PM (1997) Development of transformation system for cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Adv. Cowpea Res* 1: 361-371.
- Llori CO and Pellegrineschi A (2011) Transgene expression in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) through *Agrobacterium* transformation of pollen in flower buds. *African Journal of Biotechnology* 10(56): 11821-11828.
- Mao JQ, Zaidi MA, Arnason JT, Altosaar I (2006) In vitro regeneration of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Cv. Blackeye cowpea via shoot organogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 87: 121-125.

- McKersie B (2015) Planning for food security in a changing climate. *Journal of Experimental Botany* 66(12): 3435–3450.
- Mishra S, Behura R, Awasthi JP, Dey M, Sahoo D, Bhowmik SSD, Panda SK and Sahoo L (2014) Ectopic overexpression of a mungbean vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene (VrNHX1) leads to increased salinity stress tolerance in transgenic *Vigna unguiculata* L. Walp. *Mol Breeding* 34: 1345–1359.
- Muthukumar B, Mariamma M, Veluthambi K and Gnanam A (1996) Genetic transformation of cotyledon explants of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 15: 980-985.
- Nielson SS, Brandt WE and Singh BB (1993) Genetic variability for nutritional composition and cooking time of improved cowpea lines. *Crop Sci* 33: 469-472.
- Obi VI and Barriuso-Vargas JJ (2014) Situation of Biofungicides Reconnaissance, a Case of Anthracnose Disease of Cowpea. *American Journal of Plant Sciences* 5: 1202-1211.
- Penza R, Lurquin PF and Filippone E (1991) Gene transfer by co-cultivation of mature embryos with *Agrobacterium tumefaciens*: application to cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *J Plant Physiol* 138: 39-43.
- Penza R, Akella V and Lurquin PF (1992) Transient expression and histological localization of a gus chimeric gene after direct transfer to mature cowpea embryos. *Biotechniques* 13: 576-580.
- Popelka JC, Gollasch S, Moore A, Molvig L and Higgins TJV (2006) Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny. *Plant Cell Rep* 25: 304-312.
- Raji AAJ, Oriero E, Odeseye B, Odunlami T and Ingelbrecht IL (2008) Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of African cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] genotypes using embryonic axis explants. *J. Food Agric. Environ* 6: 350-356.

- Raveendar S and Ignacimuthu S (2010) Improved *Agrobacterium* mediated transformation in cowpea *Vigna unguiculata* L. Walp. Asian J Plant Sci 9: 256-263.
- Rech EL, Vianna GR and Aragão FJ (2008) High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. Nature Protocol 3: 410-8.
- Simon, MV, Benko-Iseppon, AM: Resende, LV, Winter P, Kahl G (2007). Genetic diversity and phylogenetic relationships in *Vigna* Savi germplasm revealed by DNA amplification fingerprinting (DAF). Genome 50: 538-547.
- Silva SMS e Freire-Filho FR (1998) Proteína de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.): Caracterização e aplicação nutricional. Embrapa Documentos 44: 5-20.
- Singh BB, Ehlers JD, Sharma B and Freire-Filho FR (2000) Recent progress in cowpea breeding. In: Proceedings of World Cowpea Conference III, 3, IITA, Ibadan, Nigeria, p. 22–40.
- Solleti SK, Bakshi S, Purkayastha J, Panda SK and Sahoo L (2008a) Transgenic cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds expressing a bean α -amylase inhibitor 1 confers resistance to storage pests, bruchid beetles. Plant Cell Rep 27: 1841-1850.
- Solleti SK, Bakshi S and Sahoo L (2008b) Additional virulence genes in conjunction with efficient selection scheme, and compatible culture regime enhance recovery of stable transgenic plants in cowpea via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Journal of Biotechnology 135: 97–104.
- Tarver MR, Shade RE, Shukle RH, Moar WJ, Muir WM, Murdock IM and Pittendrigh BR (2007) Pyramiding of insecticidal compounds for control of the cowpea bruchid (*Callosobruchus maculatus* F.). Pest Manag Sci 63:440–446.
- Winter P, Kahl G (1995). Molecular marker technologies for plant improvement. World Journal of Microbiology and Biotechnology 11: 438-448.

Obtenção de feijão-caupi transgênico com uma defensina exógena de Melão-de-São-Caetano via biobalística

José Diogo Cavalcanti Ferreira¹, Hayana Millena de Arruda Azevedo¹, Luíz Carlos Belarmino, Antonio Félix da Costa², and Ana Maria Benko-Iseppon¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Av. Prof. Moraes Rêgo 1235, CEP 50670-420, Recife, PE, Brasil;

² Instituto Agrônomo de Pernambuco, Av. General San Martin, 1371, CEP: 50761-000, Recife, PE, Brazil

Autor correspondente: Diogo Cavalcanti, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Av. Prof. Moraes Rego 1235, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brasil. Tel. +55 81-2126-8520; Email: jdiogocavalcantif@yahoo.com.br

RESUMO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] é uma leguminosa com grãos de elevado conteúdo proteico e baixos teores de gordura, sendo a principal fonte de proteínas em regiões pobres da África e América do Sul. Porém, a produção desta leguminosa é fortemente prejudicada pela ação de fitopatógenos, com destaque para fungos e vírus. A defensina *McDef1* minerada do transcriptoma do melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.) possui oito cisteínas conservadas, que formam quatro pontes dissulfeto e são responsáveis pela estrutura tridimensional CS α β . Análises *in silico* indicaram que esta defensina tem propriedades antifúngicas, corroborando com análises fenéticas, nas quais a *McDef1* agrupou-se com outras defensinas com atividades antimicrobianas *in vitro* e/ou *in vivo* já descritas, com valores de bootstrap acima de 75%. O referido peptídeo foi então utilizado na construção do vetor pAHASMCDEF1, que possui o gene *Atahas*, como marcador de seleção, conferindo tolerância ao herbicida Imazapyr. Através do método de biobalística, 880 embriões foram bombardeados, sendo obtidas sete plantas transformadas confirmadas por PCR. A eficiência de transformação foi semelhante a trabalhos já publicados. O presente estudo compreende o primeiro registro de feijão-caupi transgênico portador de uma defensina exógena.

Palavras-chave: Peptídeo antimicrobiano, engenharia genética, transgenia, melhoramento genético.

1. INTRODUÇÃO

O feijão-caupi, também conhecido como feijão macassar, verde ou de corda, é uma leguminosa que produz grãos com elevado valor nutricional (Frota et al. 2008). A planta, caracteriza-se pela presença de raízes profundas, que chegam a atingir dois metros de profundidade, o que a torna, relativamente, tolerante à seca. O centro de origem é a região oeste da África, sendo um dos grãos cultivados mais importantes nas regiões mais secas da África, Ásia, Sul da Europa, América Central e América do Sul, com uma produção total de 5,6 milhões de toneladas de grãos secos colhidos em 2014 (FAOSTAT, 2014).

A produção do feijão-caupi é acometida por diversos fitopatógenos, com destaque para as doenças causadas por fungos e vírus, que acarretam perdas de até 80% da produção (Barbosa et al. 2008; Obi and Barriuso-Vargas 2014). E para se defender destes patógenos, as plantas desenvolveram ao longo dos processos evolutivos, sofisticados mecanismos de defesa, com destaque para imunidade inata e a produção de defensinas (Burketová et al. 2015). As defensinas vegetais são pequenos peptídeos que possuem de 45 a 54 aminoácidos, caracterizados pela conservação de oito resíduos de cisteína, originando quatro pontes dissulfídicas. Possuem estrutura tridimensional CS $\alpha\beta$, caracterizada pela presença de três folhas-beta antiparalelas e uma alfa-hélice, e tem propriedades antimicrobianas, principalmente antifúngicas (Lay and Anderson 2005).

Diante deste panorama, o melhoramento genético visando à obtenção de linhagens elite resistentes a fitopatógenos é fundamental para o crescimento da produtividade desta cultura. Porém, o melhoramento convencional tem dificuldade para introgressão de genes exógenos, devido à incompatibilidade de cruzamento do feijão-caupi com outras espécies do gênero *Vigna*, e à dificuldade de obtenção de linhagem elite a partir de banco de germoplasma das linhagens silvestres (Singh et al. 2002; Fang et al. 2007). Neste contexto, a transgenia torna-se uma ferramenta fundamental no melhoramento genético desta espécie (Popelka et al. 2006). E uma fonte potencial doadora de genes de resistência a fitopatógenos é o Melão-de-São-Caetano ou melãozinho (Cucurbitaceae, *Momordica charantia* L.), pois esta espécie se destaca por sua ampla utilização na medicina popular, apresentando atividades antimicrobianas e anti-inflamatórias cientificamente comprovadas (Grover and Yadav 2004).

Nos últimos anos, alguns trabalhos desenvolveram feijão-caupi transgênico com transmissão estável do transgene para as próximas gerações, seguindo o padrão mendeliano (Popelka et al. 2006; Ivo et al. 2008; Bakshi et al. 2011; Mishra et al. 2014), com destaque para a transformação via biobalística, que através do sistema de aceleração de micropartículas de tungstênio, foram obtidas linhagens transformadas de feijão-caupi de diversas cultivares com a introdução de baixo número de cópias do transgene (Ivo et al. 2008; Citadin et al. 2013; Cruz and Aragão 2014). Neste trabalho, objetivou-se a obtenção de uma linhagem de feijão-caupi transformada via biobalística com uma defensina, com potenciais propriedades antifúngicas, minerada através de análises *in silico* do transcriptoma do melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*).

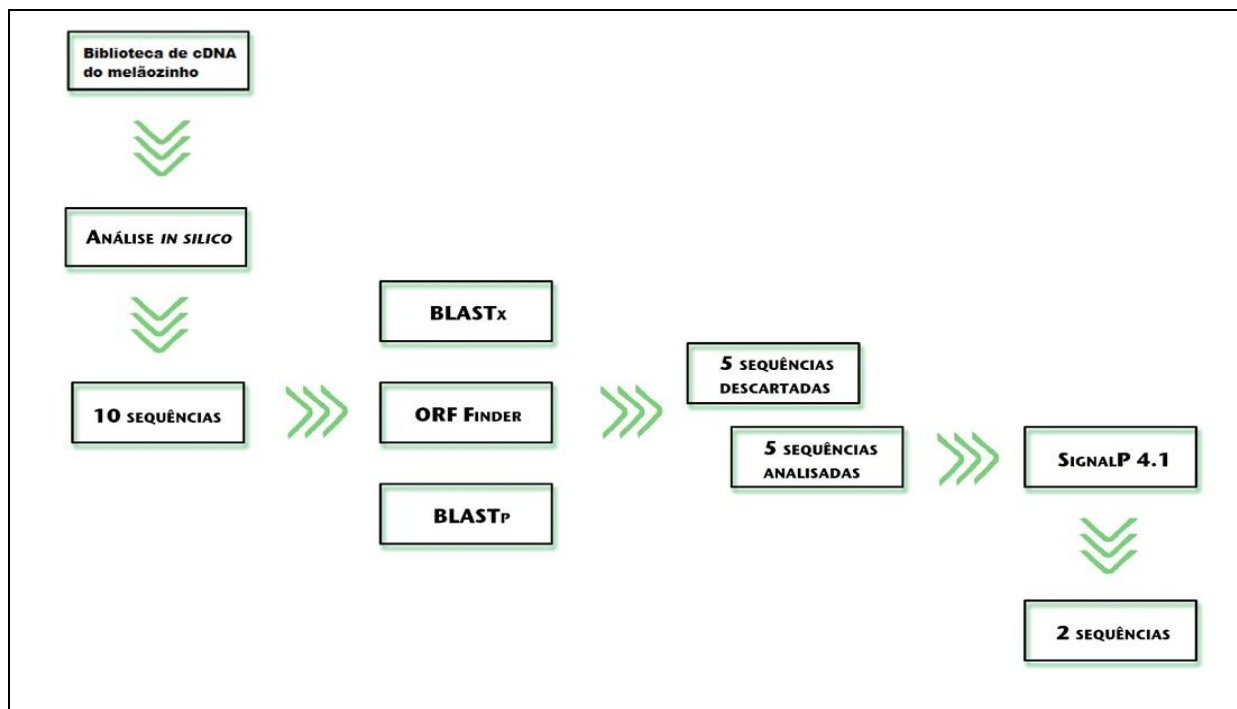
2. METODOLOGIA

a. Seleção do gene e construção do vetor

O gene que codifica uma defensina foi selecionado a partir do transcriptoma da semente do melão-de-são-caetano ou melãozinho (*Momordica charantia*), sem ser submetida a qualquer tipo de estresse. As sequências do transcriptoma estão depositados no banco de dados *Sequence Read Archive* (SRA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>).

As defensinas foram mineradas através de análises *in silico* com o auxílio do programa HMMer (Wheeler and Eddy 2013) a partir do cDNA de *M. charantia*. As sequências obtidas foram submetidas aos programas BLASTx (Altschul et al. 1990), ORF-Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) e BLASTp (Altschul and Koopin 1998) para verificar se as defensinas possuíam as sequências completas de aminoácidos. As defensinas completas foram submetidas ao programa SignalP 4.1 (Petersen et al. 2011) para identificar a presença de peptídeo sinal. Apenas as defensinas que tinham o peptídeo sinal foram testadas para a predição de atividade antimicrobiana *in silico*, através de quatro algoritmos presentes no banco de dados de peptídeos antimicrobianos CAMP (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/predict/>).

Figura 1: Diagrama representativo das etapas realizadas na análise *in silico* para seleção dos genes candidatos.



A construção do inserto foi realizada pela síntese da sequência gênica *McDef1* com adição dos sítios de restrição *NcoI* e *SacI* antes do códon de iniciação e após o *stop* códon, respectivamente. A elaboração do mapa do plasmídeo foi realizada a partir do vetor pGS52499-4. Este possui o gene *NHX1* dirigido pelo promotor constitutivo CaMV 35S (*Cauliflower Mosaic Virus*) e contém o NOS terminador. O gene *NHX1* está delimitado pelos sítios de restrição *NcoI* e *SacI*, sendo o cassete completo 35S-*NHX1*-NOS terminador delimitado pelo sítio de restrição *NotI*. Após a síntese do *McDef1* foi realizada a substituição do *NHX1* nos sítios de restrição *SacI* e

NcoI, que originou o cassete 35S CaMV – McDef1 – NOS Terminador. Este cassete foi transferido para o vetor pAHAS / pAC321 (Rech *et al.*, 2008) no sítio de restrição *NotI*, originando o vetor binário pAHASMCDEF1 (Anexo 1), que além do gene de interesse possui como marcador de seleção o gene *Atahas* (que confere resistência ao herbicida Imazapyr). A construção e a síntese da sequência do vetor foram realizadas pela empresa americana Epoch Life.

b. Alinhamento das sequências e análises fenéticas

O alinhamento de sequências múltiplas de aminoácidos foi realizado a partir do programa Clustal Omega. Foi utilizado um total de 48 sequências no alinhamento múltiplo, das quais cinco sequências foram mineradas do transcriptoma de *M. charantia* (denominada *McDef1*, que foi o candidato utilizado na transformação do feijão-caupi, *McDef2*, *McDef3*, *McDef4* e *McDef5*); 28 sequências de diversas espécies de vegetais foram obtidas no banco de dados CAMP (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/>) com registro de atividade antimicrobiana *in vitro* (Tabela I), sendo as outras 15, sequências de defensinas utilizadas para transformação de diversas espécies vegetais com registro da atividade *in vivo* (Tabela II). Os peptídeos sinais de todas as sequências foram removidos, pois provocam grandes divergências no alinhamento, assim como foi removido o domínio C-terminal para as defensinas que apresentavam essa região.

A árvore fenética foi realizada a partir das 48 sequências do alinhamento múltiplo descrito acima, utilizando o método de neighbor-joining, sendo o teste de confiabilidade dos nós realizado pelo método de bootstrap com 1000 replicações (MEGA 5.0; <http://www.megasoftware.net>).

Tabela I: Defensinas obtidas no banco de dados CAMP, cujas atividades *in vitro* foram descritas e utilizadas nas análises de alinhamento e construção do fenograma.

Nome	Origem	Atividade <i>in vitro</i>	Referência
CAMPSQ1049	<i>Raphanus sativus</i>	Antifúngica	Terras et al. (1995)
CAMPSQ2152	<i>Raphanus sativus</i>	Antifúngica	Terras et al. (1995)
CAMPSQ236	<i>Pisum sativum</i>	Antifúngica	Almeida et al. (2000)
CAMPSQ237	<i>Pisum sativum</i>	Antifúngica	Almeida et al. (2000)
CAMPSQ2712	<i>Heliophila coronopifolia</i>	Antifúngica	de Beer and Vivier (2011)
CAMPSQ2713	<i>Heliophila coronopifolia</i>	Antifúngica	de Beer and Vivier (2011).
CAMPSQ2714	<i>Heliophila coronopifolia</i>	Antifúngica	de Beer and Vivier(2011)
CAMPSQ2715	<i>Heliophila coronopifolia</i>	Antifúngica	de Beer and Vivier (2011)
CAMPSQ3385	<i>Vitis vinifera</i>	Antifúngica	de Beer and Vivier (2008)
CAMPSQ3755	<i>Heliophila coronopifolia</i>	Antifúngica	de Beer and Vivier (2011)
CAMPSQ3757	<i>Heliophila coronopifolia</i>	Antifúngica	de Beer and Vivier (2011)
CAMPSQ3758	<i>Heliophila coronopifolia</i>	Antifúngica	de Beer and Vivier (2011)
CAMPSQ4212	<i>Pinus sylvestris</i>	Antifúngica	Kovaleva et al. (2009)
CAMPSQ4223	<i>Echinochloa crus-galli</i>	Antifúngica	Odintsova et al. (2008)
CAMPSQ4224	<i>Echinochloa crus-galli</i>	Antifúngica	Odintsova et al. (2008)
CAMPSQ4731	<i>Nigella sativa</i>	Antifúngica e Antibacteriana	Rogozhin et al. (2011)
CAMPSQ4732	<i>Nigella sativa</i>	Antifúngica e Antibacteriana	Rogozhin et al. (2011)
CAMPSQ918	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Antifúngica	Osborn et al. (1995)
CAMPSQ919	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Antifúngica	Terras et al. (1993)
CAMPSQ922	<i>Clitoria ternatea</i>	Antifúngica	Osborn et al. (1995)
CAMPSQ923	<i>Heuchera sanguinea</i>	Antifúngica	Osborn et al. (1995)
CAMPSQ925	<i>Sinapis alba</i>	Antifúngica	Terras et al. (1993)
CAMPSQ926	<i>Sinapis alba</i>	Antifúngica	Terras et al. (1993)
CAMPSQ929	<i>Petunia hybrida</i>	Antifúngica	Lay et al. (2003)
CAMPSQ930	<i>Raphanus sativus</i>	Antifúngica	Terras et al. (1995)
CAMPSQ951	<i>Raphanus sativus</i>	Antifúngica	Terras et al. (1995)
CAMPSQ953	<i>Vigna unguiculata</i>	Antibacteriana	Franco et al. (2006)
VuD1	<i>Vigna unguiculata</i>	Inseticida	Pelegriini et al. (2008)

Tabela II: Defensinas utilizadas para transformação de diversas espécies vegetais, mostrando sua origem e as espécies de plantas transformadas, com registro das suas atividades *in vivo*.

Nome	Origem	Plantas Transformadas	Atividade <i>In vivo</i>	Referência
BrD1	<i>Brassica rapa</i>	Arroz	Inseticida contra ninfas e fêmeas adultas da cigarrinha marrom (<i>Nilaparvata lugens</i>)	Choi et al. (2009)
alfAFP (MsDef1)	<i>Medicago sativa</i>	Batata e Tomate	Antifúngica contra <i>Verticillium dahliae</i> (batata), <i>Fusarium oxysporum</i> (tomate) e antibacteriana contra <i>Ralstonia solanacearum</i> (tomate)	Gao et al. (2000); Chen et al. (2006); Abdallah et al. (2010)
asabi defensin	<i>Wasabia japonica</i>	Arroz, tabaco, beringela, tomate, <i>Phalaenopsis</i> , Melão ‘Egusi’ (<i>Colocynthis citrullus</i>)	Antifúngica contra <i>Magnaporthe grisea</i> (arroz), <i>Botrytis cinerea</i> (tabaco e tomate), <i>Alternaria solani</i> (berinjela e tomate), <i>Erwinia carotovora</i> (<i>Phalaenopsis</i>), <i>Alternaria</i> leaf spot e <i>Fusarium wilt</i> (Melão ‘Egusi’), <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Erysiphe lycopersici</i> (tomate)	Kanzaki et al. (2002); Khan et al. (2006); Sjahril et al. (2006); Ntui et al. (2010); Khan et al. (2011); Darwish et al. (2014)
BjD	<i>Brassica japonica</i>	Tabaco e Amendoim	Antifúngica contra <i>Phytophthora parasitica</i> e <i>Fusarium moniliforme</i> (tabaco), <i>Phaeosariopsis personata</i> e <i>Cercospora arachidicola</i> (amendoim)	Anuradha et al. (2008)
NaD1	<i>Nicotiana glauca</i>	Algodão	Antifúngica contra <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Verticillium dahliae</i>	Gaspar et al. (2014)
Sm-AMP-D1	<i>Stellaria media</i>	Banana	Antifúngica contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Cubense</i> (Foc)	Ghag et al. (2014)
Rs-AFP2	<i>Raphanus sativus</i>	Tabaco, trigo e amendoim	Antifúngica contra <i>Alternaria longipes</i> (tabaco), <i>F. graminearum</i> e <i>R. cerealis</i> (trigo), <i>Phaeosariopsis personata</i> (amendoim)	Terras et al. (1995); Li et al. (2011); Vasavirama e Kirti (2012)
BSD1	<i>Brassica campestris</i>	Tabaco	Antifúngica contra <i>Phytophthora parasitica</i>	Park et al. (2002)
PhDef1	<i>Petunia hybrida</i>	Banana	Antifúngica contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Foc)	Ghag et al. (2012)
PhDef2	<i>Petunia hybrida</i>	Banana	Antifúngica contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Foc)	Ghag et al. (2012)
DDR30	<i>Pisum sativum</i>	Canola	Antifúngica contra <i>Leptosphaeria maculans</i>	Wang et al. (1999)
DmAMP1	<i>Dahlia merckii</i>	Mamão e Arroz	Antifúngica contra <i>Phytophthora palmivora</i> (mamão), <i>Magnaporthe oryzae</i> e <i>Rhizoctonia solani</i> (arroz)	Zhu et al. (2007); Jha et al. (2009)
J1-1	<i>Capsicum annuum</i>	Pimenta	Antifúngica contra <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Antracnose)	Seo et al. (2014)
MtDef4.2	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Antifúngica contra <i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i> Noco2 e <i>Fusarium graminearum</i>	Kaur et al. (2012)
NmDef02	<i>Nicotiana megalosiphon</i>	Tabaco e Batata	Antifúngica contra <i>P. parasitica</i> var. <i>nicotianae</i> e <i>P. hyoscyami</i> f.sp. <i>tabacina</i> (tabaco), <i>A. solani</i> e <i>P. infestans</i> (batata)	Portieles et al. (2010)

c. Transformação por choque térmico de bactérias competentes

A transformação da bactéria *Escherichia coli*, linhagem DH10B quimiocompetente, com o vetor pAHASMCDEF1, foi realizada por choque térmico, seguindo o protocolo de Aragão and Rech (1998), com poucas modificações. Foram transferidos 40 μ L da suspensão bacteriana para tubo de microcentrífuga contendo 2 μ L do vetor plasmidial pAHASMCDEF1. Para controle negativo foi transferido 40 μ L da suspensão bacteriana para tubo de microcentrífuga sem a presença do vetor.

A suspensão bacteriana juntamente com o vetor foi incubada em gelo durante 20 minutos e em seguida foi realizado o choque térmico a 42°C durante 5 minutos em termociclador. Na sequência, os tubos de microcentrífugas foram rapidamente transferidos para gelo, por 5 minutos. Após os choques térmicos, foi adicionado 500 μ L de meio LB líquido para cada tubo, que foram colocados sob agitação de 150 rpm a 37°C durante uma hora. Os tubos foram centrifugados a 35 rpm durante 3 minutos e os sobrenadantes foram descartados.

Em seguida, foram plaqueados 100 μ L das células putativamente transformadas em placa de Petri com meio LB sólido contendo ampicilina na concentração de 100 μ g/L. Também foram plaqueados 100 μ L das células controles em meio LB sólido contendo ampicilina. As placas de Petri foram incubadas invertidas a 37°C, durante 12 a 16 horas, quando foi possível observar as colônias. Como o vetor plasmidial possui o gene *bla*, que confere resistência a ampicilina, as bactérias transformadas formaram colônias (Figura 2). Em contrapartidas, as bactérias controle não cresceram.

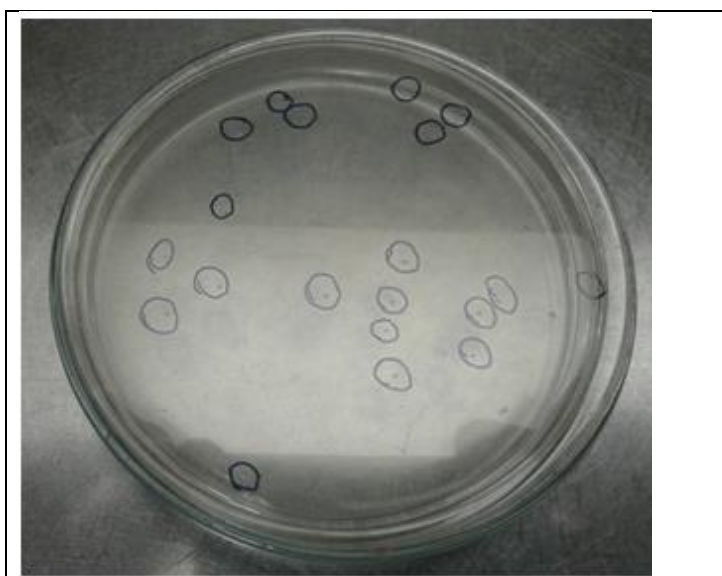


Figura 2: Placa de Petri com colônias de bactérias *E. coli* DH10B transformadas por choque térmico com o plasmídeo pAHASMCDEF1 resistente ao antibiótico ampicilina.

d. Multiplicação das bactérias e Isolamento do vetor plasmidial

As bactérias transformadas foram multiplicadas em meio LB líquido contendo ampicilina na concentração de 100 μ g/L. Uma colônia bacteriana foi colocada, através de uma alça de platina, em 300 mL de meio LB líquido em um Erlenmeyer de 1L. As bactérias cresceram durante 12-16h a 180 rpm e 37°C, até atingir uma OD600 de 0,6 a 0,8. O plasmídeo foi isolado através da Maxi-prep seguindo o protocolo de Aragão e Rech (1998).

Após o crescimento das bactérias em 300 mL de meio LB líquido, as mesmas foram transferidas para tubos falcons de 50 mL, seis no total. Porém, como numa das etapas ocorre a união do conteúdo de dois tubos falcons, foram obtidos no final três tubos de microcentrífugas contendo o vetor isolado. O conteúdo destes três tubos de microcentrífugas foi amplificado por PCR para verificar a presença do gene de interesse (a defensina do melão-de-são-caetano), e o gene *Atahas* (marcador de seleção). Todas as alíquotas amplificaram o gene de interesse *McDef1*, de 401 pb, e o gene *Atahas* de 685 pb, confirmando que o vetor pAHASMCDEF1 foi realmente isolado (Figura 3).

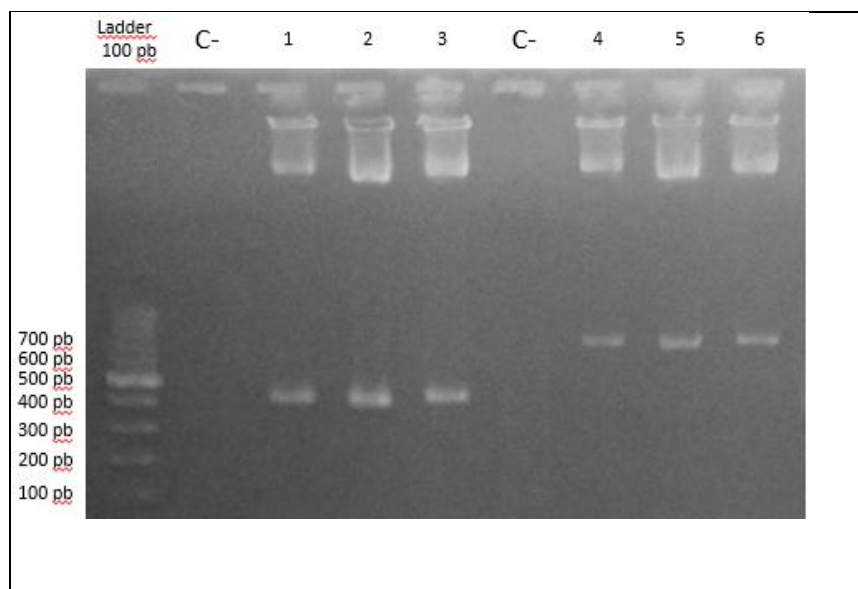


Figura 3: Fragmentos amplificados por PCR para confirmação da presença dos insertos no vetor pAHASMCDEF1. C- corresponde ao controle negativo representado pela reação da PCR sem DNA, 1 e 4 aos produtos de amplificação do gene *McDef1* e *Atahas* com 401 pb e 685 pb, respectivamente, com alíquotas do tubo 1 da extração por maxi-prep. Números 2 e 5 correspondem ao produto de amplificação do gene *McDef1* e *Atahas* com 401 pb e 685 pb, respectivamente, com alíquotas do tubo 2 da extração por maxi-prep. Números 3 e 6 correspondem ao produto da PCR do tubo 3.

e. Transformação de feijão-caupi

A transformação genética do feijão-caupi foi realizada através da técnica de biobalística, cujas sementes da cv. Boca Negra foram esterilizadas e embebidas em água destilada autoclavada por 16-18 horas. A seguir os embriões foram removidos dos cotilédones, e as folhas primárias e primordiais foram excisadas. Então, os eixos embrionários foram posicionados no meio sólido (Meio basal MS com sal, suplementado com 3% de sacarose e 0,8% de phytigel Sigma, pH 5,8) dispostos em círculo, equidistantes entre 6 e 12 mm do centro da placa de Petri (5 cm de diâmetro e aproximadamente 12 mL do meio), com a região do meristema apical voltada para cima, para serem submetidos ao bombardeamento, conforme protocolo de Ivo et al. (2008) e Rech et al. (2008).

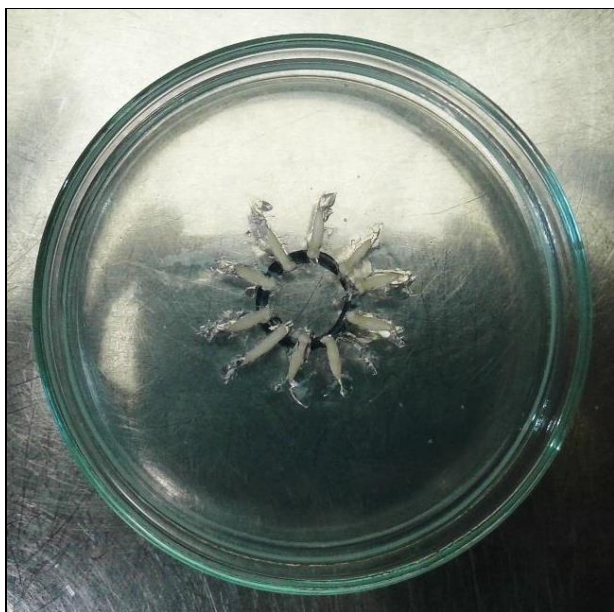


Figura 4: Embriões em meio MS *with salt mixture* dispostos em círculo, equidistantes entre 6 e 12 mm do centro da placa de Petri, com a região do meristema apical exposta voltada para cima. Foram posicionados de 10 a 15 embriões por placa. Foto: Diogo Cavalcanti.

O bombardeamento foi realizado conforme Rech et al. (2008) e Azevedo (2013) com o plasmídeo pAHASMCDEF1 que continha, além do gene de interesse (uma defensina de *M. charantia* dirigida pelo promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor), o gene *Atahas* como marcador de seleção. Após o bombardeamento, os eixos embrionários foram transferidos para frascos de vidro contendo 30 mL do meio de seleção e indução (Meio basal MS com vitaminas, suplementado com 3% de sacarose, 0,6% de ágar, 250 nM de Imazapyr e BAP 2,5 mg/L, pH 5,8), sendo mantidos em fotoperíodo de 16 horas com temperatura de 25°C.

Os explantes que atingiram cerca de 5 cm, desenvolvendo as primeiras folhas, foram transferidos para meio MS suplementado com 3% de sacarose, 0,6% de ágar e 3 g L⁻¹ de carvão ativado sem o agente de seleção, para o enraizamento. Explantes enraizados foram transferidos individualmente para vasos de plástico contendo 0,2 dm³ de uma mistura de solo adubado: vermiculita (1 : 1) autoclavado, cobertos com um saco plástico transparente selado com um faixa de borracha e mantidos em casa de vegetação. Após uma semana, o elástico foi removido e com mais uma semana, o saco de plástico também foi removido. Assim que as plantas foram aclimatadas e atingiram cerca de 10 cm de comprimento, elas foram transferidas para um vaso contendo 5 dm³ de solo fertilizado até produzirem sementes.

f. Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens de feijão-caupi cv. Boca Negra através do método Miniprep-CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) como descrito por Weising et al. (1995) com modificações conforme Benko-Iseppon et al. (2003). Aproximadamente 150 mg de tecido foliar de cada planta foi macerado em Eppendorf de 1,5 mL com 600 µL do tampão de extração a base de CTAB. A mistura foi incubada a 60°C por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 400 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), sendo a amostra centrifugada a 14.000 rpm a 25°C por cinco minutos. O sobrenadante foi resgatado e transferido para novo tubo de 1,5 mL, sendo a seguir adicionado igual volume de isopropanol ao volume do material vegetal coletado (cerca de 200 µL) a fim de precipitar

o DNA. Então, foi realizada uma nova centrifugação a 14.000 rpm a 25°C por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com 200 µL de etanol 70% por cinco minutos. Após uma última centrifugação a 14.000 rpm a 25°C por cinco minutos, o álcool foi descartado e o DNA foi colocado para secar por aproximadamente 10 minutos no *speed-vac*. Finalmente, o *pellet* foi ressuspensionado em 50 µL de água Milli-Q autoclavada, sendo o DNA estocado a 20°C negativo.

g. Triagem das plantas transgênicas por PCR

A análise das plantas transgênicas da geração T0 foi realizada pela amplificação dos fragmentos dos genes *Atahas* e *McDef1* por PCR. As reações de amplificação foram realizadas seguindo os seguintes parâmetros: 2,0 ng do DNA genômico, 1x PCR buffer, 1,2 µL MgCl₂ 25mM, 0,2 µL dNTP-mix 10 mM, 2 mM de cada primer, 0,5 U de Taq polymerase com volume final ajustado para 20 µL. A amplificação foi realizada num termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient e o programa da PCR utilizado envolveu uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos seguida de 35 ciclos com as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, com a extensão final a 72°C por 7 minutos. O produto da amplificação foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, sendo visualizado num transiluminador ultravioleta e fotografado.

Tabela III: Pares de *primers* utilizados para amplificação de regiões do DNA exógeno inserido no genoma das plantas transformadas.

Primers	Sequências (5'→3')	Fragmento esperado	Região amplificada
AHAS1F	ACTAGAGATTCCAGCGTCAC	685 pb	Fragmento do gene <i>Atahas</i>
AHAS2F	GTGGCTATACAGATACCTGG		
MCDEF1F	ATCATCGCAAGACCGGCA	401 pb	Gene completo <i>McDef1</i> com fragmento do promotor e terminador
MCDEF1R	CCACTATCCTTCGCAAGAC		

3. RESULTADOS

a. Seleção do gene e construção do vetor

Após análises *in silico* a partir da ferramenta HMMer, foram identificadas 10 sequências que possivelmente codificam peptídeos da família das defensinas em *M. charantia*. Após BLASTx observou-se que destas, duas apresentavam alinhamento incompleto, enquanto o programa ORF-Finder apontou três outras sequências sem ORF ou alinhadas parcialmente com uma pequena região codificante de defensina. As cinco sequências restantes foram submetidas ao programa SignalP 4.1 para averiguar a presença de peptídeo sinal completo, o qual foi encontrado em apenas duas das sequências, que foram analisadas quanto a predição de atividade antimicrobiana, apresentando peptídeos maduros com 57 e 48 aminoácidos. A análise possibilitou a seleção do gene/proteína mais promissor para construção do vetor de transformação, considerando a sequência denominada *McDef1* (*Momordica charantia* Defensina 1) cuja ORF contém 280 pb, significativa similaridade com a defensina antifúngica J1-2-like de *Cucumis*

sativus e uma concentração de transcritos 73,58 vezes maior do que a outra defensina completa (McDef2) identificada, determinada através da metodologia do RNAseq a partir da semente do melãozinho. O diagrama da análise *in silico* encontra-se na Figura 1.

A partir da sequência de 280 pb, foi verificado que do códon de iniciação (ATG) ao códon de parada (TGA) ocorrem 230 pb. Nesta sequência foi adicionado um sítio de restrição *Nco*I, antes do códon de iniciação e o sítio *Sac*I, após o *stop* códon. A elaboração do mapa do plasmídeo pAHASMCDEF1(Anexo 1) foi realizada conforme descrito na metodologia.

b. Alinhamento múltiplo e Análise fenética

O alinhamento múltiplo de 48 sequências de defensina foi realizado pelo programa ClustalO, no qual se observou que as cinco defensinas mineradas do cDNA de *M. charantia* possuem o domínio gamationina completo, com conservação das oito cisteínas, da serina na posição oito, do resíduo aromático na posição 11 e das glicinas nas posições 13 e 34, conforme a Figura 5. Em geral, estas oito cisteínas formam quatro pontes dissulfídicas na seguinte sequência: Cys1-Cys8, Cys2-Cys5, Cys3-Cys6 e Cys4-Cys7 (Lay and Anderson 2005), que estão representadas pelas linhas pretas na parte superior da figura 5. No entanto, algumas defensinas vegetais possuem 10 resíduos de cisteína, possuindo uma ponte dissulfeto adicional, como a CAMPSQ929 (Lacerda et al. 2014), representada pela linha vermelha (Fig. 5).

Em relação à árvore fenética, a defensina de *M. charantia*, *McDef1*, que foi utilizada na transformação, está no grupo XII constituído por seis defensinas com suporte de bootstrap de 79%. A *McDef1* compartilhou o mesmo nó com outra candidata minerada do cDNA de *M. charantia*, a *McDef2* com bootstrap de 49%. As outras quatro defensinas agrupadas com as candidatas, são a CAMPSQ3385 da espécie *V. vinifera*, *MtDef4.2* da *M. truncatula*, CAMPSQ4223 e CAMPSQ4224 da espécie *E. crus-galli*, todas elas com atividades antimicrobianas descritas (Figura 6).

Figura 5: Alinhamento múltiplo de 48 sequências de aminoácidos gerado pelo programa Clustal ômega. Na sequência consenso a letra C representa a conservação de resíduos de cisteína (destacado em cinza), a S de serina (destacado em amarelo), G de glicina (destacado em laranja), a região destacada em verde são os resíduos aromáticos, que podem ser a fenilalanina (F), o triptofano (W) e tirosina (Y). As linhas na parte superior da imagem, representa as pontes dissulfídicas. No caso das defensinas PhDef1 e PhDef2, ocorre uma ponte dissulfídica adicional, representada pela linha vermelha na parte superior da imagem. Na parte inferior da figura encontram-se os gráficos de conservação, qualidade e consenso, bem como a estrutura tridimensional da defensina consenso, no qual as setas amarelas representam as folhas-beta e o cilindro vermelho a alfa-hélice.

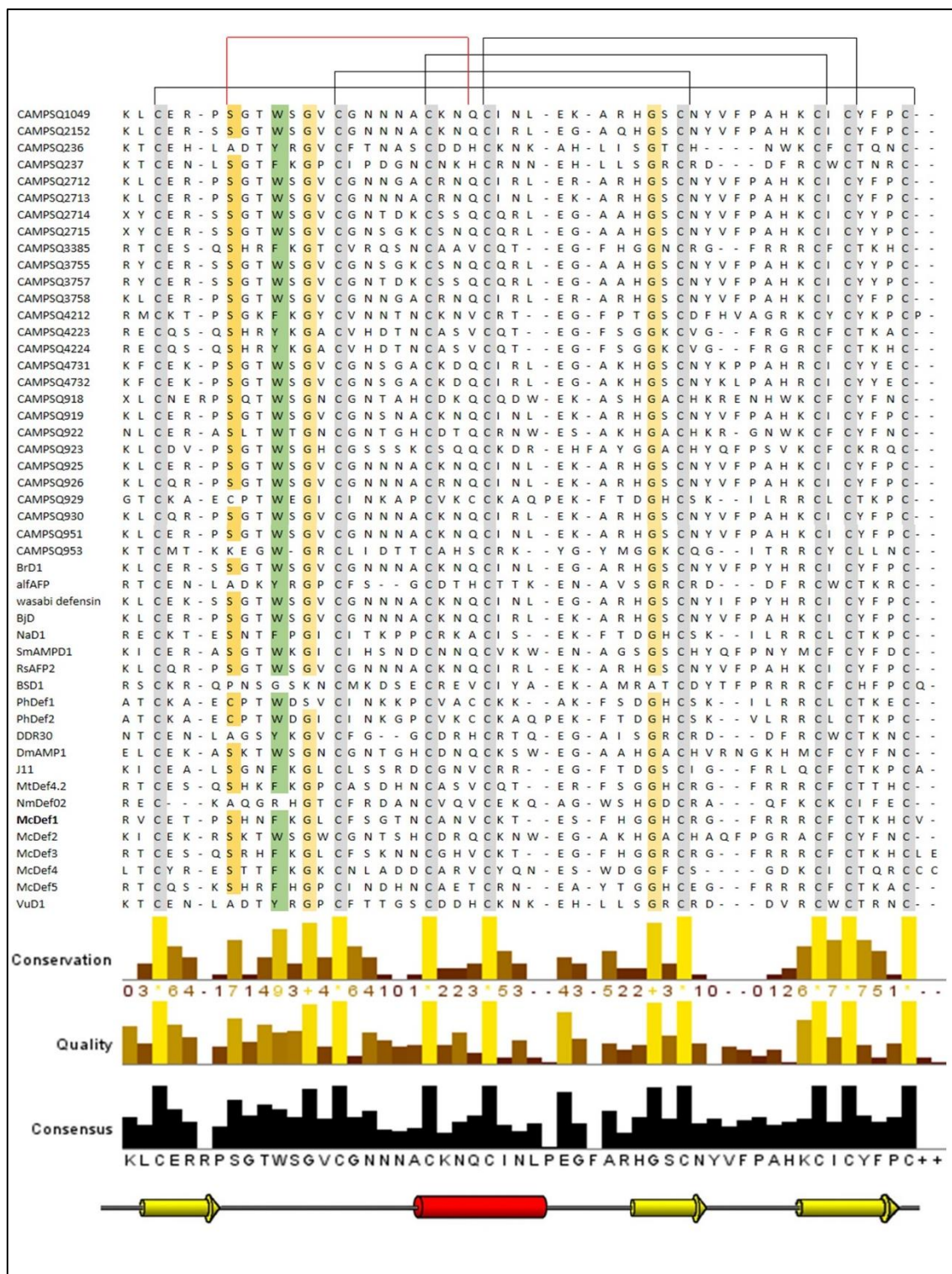
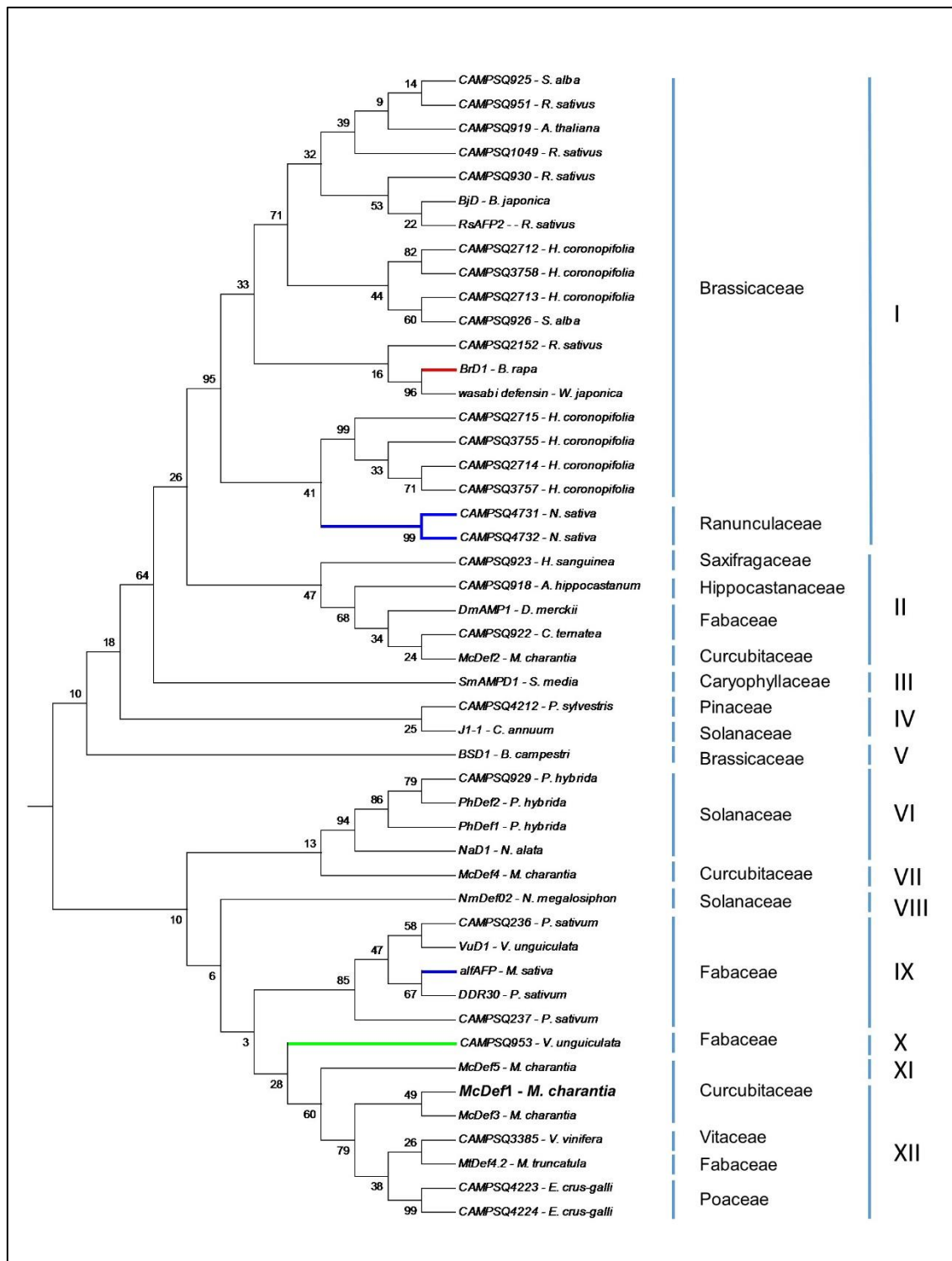


Figura 6: Árvore fenética das 48 seqüências de defensina utilizadas no alinhamento, gerado pelo método de neighbor-joining, sendo o teste de confiabilidade dos nós realizado pelo método de bootstrap com 1000 replicações. As linhas de cor azul representam as defensinas com função antifúngica e antibacteriana, as de coloração vermelha, indicam as defensinas com atividade inseticida, a de cor verde representa defensina com atividade antibacteriana e as demais representam defensinas com apenas atividade antifúngica comprovada. A defensina candidata *McDef1* utilizada na transformação, está destacada em negrito com o nome da espécie de origem, *Momordica charantia*.



c. Transformação direta do feijão-caupi via biobalística

Inicialmente foram bombardeados 230 embriões em quatro eventos distintos. Devido à formação excessiva de calos no processo da regeneração *in vitro* dos embriões, a concentração de BAP foi reduzida de 2,5 mg/L para 1,5 mg/L. Após ajuste do protocolo, 880 embriões foram bombardeados com o vetor pAHASMCDEF1 realizados em 12 eventos, dos quais aproximadamente 75% dos embriões necrosaram, devido à ação do herbicida Imazapyr, enquanto 11,3% tiveram contaminação endógena com fungos.

Todos os eventos resultaram em plântulas transferidas para meio de enraizamento, o qual ocorre de três a quatro semanas após o bombardeamento, quando as plântulas desenvolveram as primeiras folhas. Um total de 124 plântulas foram transferidas para meio de enraizamento, das quais 40 foram transferidas para solo. Foi extraído o DNA das 40 plantas transferidas para solo, sendo realizadas as amplificações por PCR para confirmar se o DNA exógeno se incorporou ao genoma do vegetal. Destas, sete apresentaram o DNA exógeno, com fragmento de 685 pb do gene *Atahas* (Figura 7). Portanto a eficiência da transformação genética, representada pela razão do número de plantas transformadas pelo total de embriões utilizados foi de 0,80%.

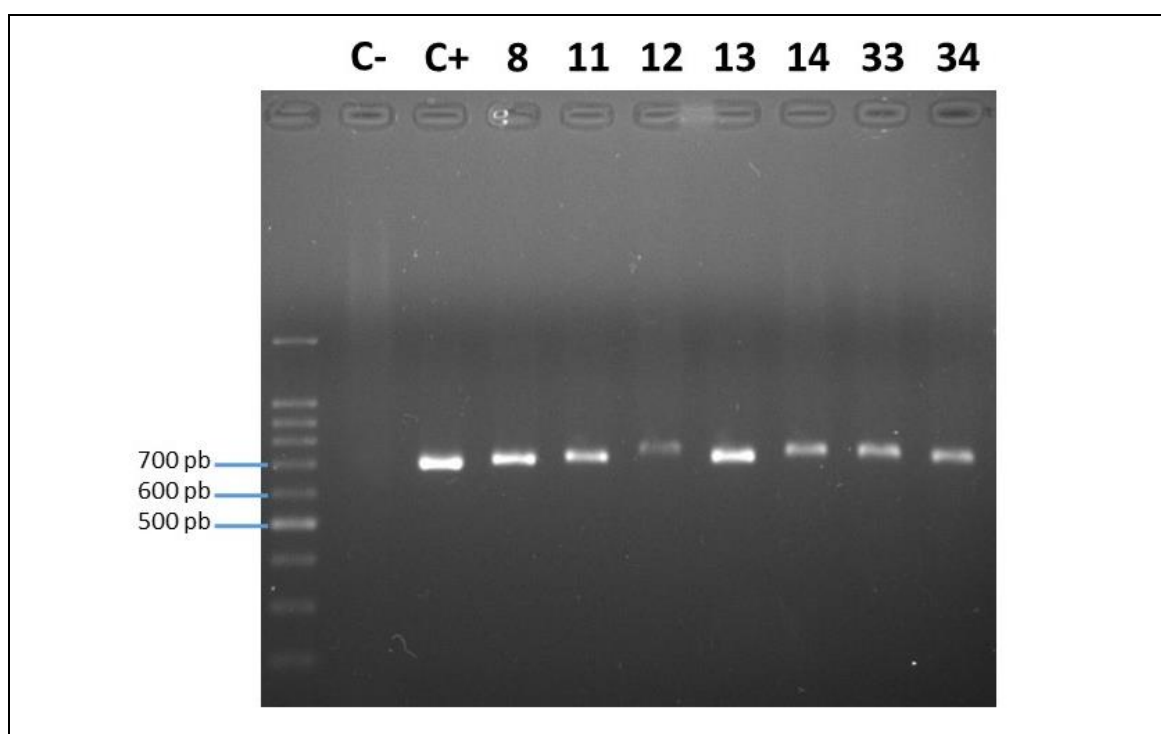


Figura 7: Produtos da PCR das plantas transformadas de feijão-caupi em gel de agarose. A linha C- representa o controle negativo, que corresponde ao DNA da cv. Boca Negra não transformada. A linha C+ corresponde ao controle positivo, representado pela amplificação do vetor pAHASMCDEF1. As linhas 8, 11, 12, 13, 14, 33 e 34 correspondem às sete plantas transformadas em eventos distintos.

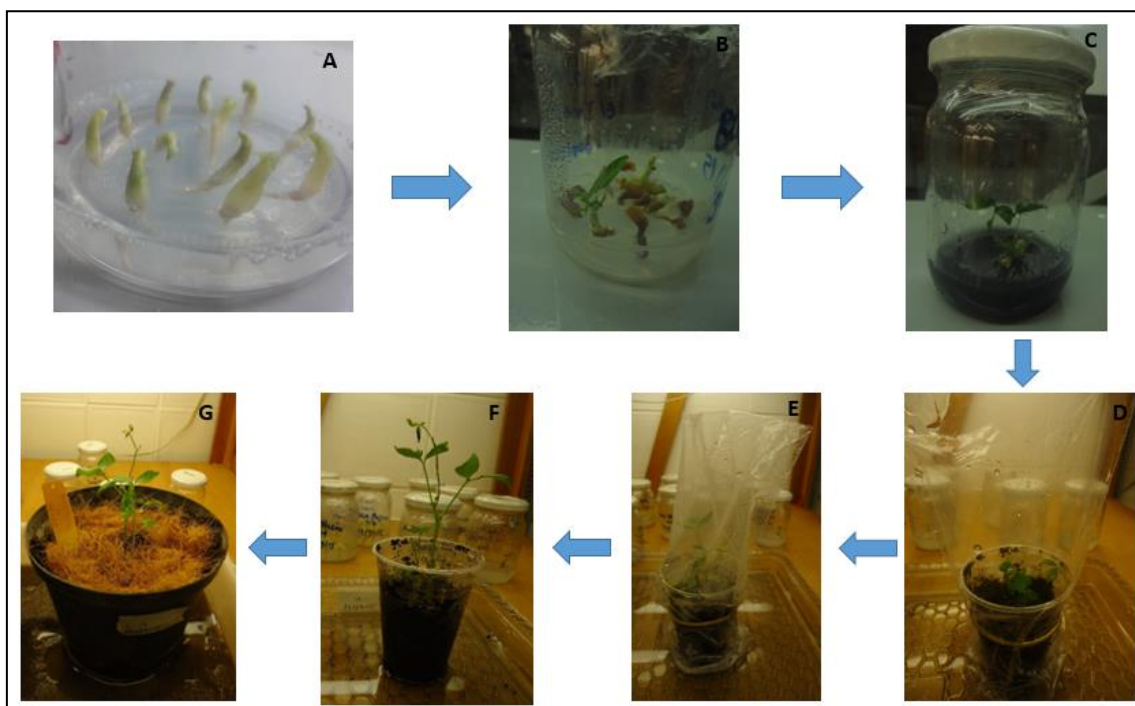


Figura 8: Etapas da cultura de tecidos após o bombardeamento dos embriões de feijão-caupi. A – Embriões em meio MS com 250 nM do agente de seleção Imazapyr. B – Plântula com cerca de 3 a 4 semanas de desenvolvimento, com o surgimento das primeiras folhas. Neste momento o vegetal está apto para a transferência para o meio de enraizamento. C – Plântula em meio MS de enraizamento com carvão ativado 3 g/L. Após o desenvolvimento das raízes (cerca de uma a duas semanas neste meio), a plântula está apta para a transferência para o solo. D – Planta no período de aclimação, em solo com a cobertura da bolsa plástica. E – Remoção do elástico após uma semana de crescimento com a bolsa plástica. F – Após mais uma semana ocorre a remoção da bolsa plástica. G – Por fim, a planta é transferida para pote de 5 dm³ com composto orgânico até o período reprodutivo.

4. DISCUSSÃO

Através da ferramenta HMMer foram mineradas 10 prováveis defensinas do transcriptoma de *M. charantia*. Destas, apenas cinco defensinas possuíam domínio completo e apresentaram a conservação das oito cisteínas, da serina da posição 8 que é conservada na maioria das defensinas vegetais (Lay and Anderson 2005), do aminoácido aromático na posição 11, e das glicinas nas posições 13 e 34 (Portieles et al. 2010). O agrupamento da árvore fenética onde a defensina McDef1 encontra-se inserida inclui defensinas com atividades antifúngicas *in vivo* e/ou *in vitro* reportadas. A defensina de *Medicago truncatula* denominada MtDef4.2, foi utilizada na transformação de *Arabidopsis thaliana*, onde foram geradas plantas com elevada resistência contra o fungo *Hyaloperonospora arabidopsidis* Noco2. Porém com baixa resistência a *Fusarium graminearum*, tanto em testes na casa de vegetação, quanto em ensaios de campo (Kaur et al. 2012).

Por sua vez, para as defensinas CAMPSQ3385 da espécie *V. vinifera*, CAMPSQ4223 e CAMPSQ4224 da espécie *E. crus-galli*, foram reportadas atividades antifúngicas *in vitro* contra *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. solani*, *Diplodia maydis*, *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea* e *V. dahliae*, com ótimos valores de MIC (Minimum Inhibitory Concentration; De Beer and Avivier 2008; Odintsova et al. 2008). Todas as defensinas presentes nos agrupamentos

próximos a McDef1 possuem atividade antifúngica, indicando o que foi previsto nas análises *in silico* através do algoritmo ClassAMP (<http://www.bicnirrh.res.in/classamp/>).

Em relação à ancestralidade, a defensina de *M. charantia* se agrupou com algumas espécies de grupos taxonômicos distantes, como as CAMPSQ4223 e CAMPSQ4224 de *E. crus-galli*, uma espécie da família Poaceae (Monocotyledoneae). Isso ocorre devido ao fato de que defensinas apresentam forte adaptabilidade aos organismos patogênicos, o que caracteriza genes de evolução rápida, sofrendo inúmeras mutações a fim de manter um fenótipo adaptado, sendo submetido ao processo de evolução convergente devido à pressão de patógenos semelhantes em espécies não relacionadas (Semple et al. 2006). De forma semelhante ao que ocorre com outros genes de defesa, apresentam um agrupamento fenético refletindo adaptações funcionais que frequentemente fogem ao padrão observado em genes filogeneticamente informativos (Wanderley-Nogueira et al., 2012; Wanderley-Nogueira et al., no prelo).

Em relação as análises fenéticas, as quatro defensinas do grupo VI, de espécies da família Solanaceae, com bootstrap de 94% (Figura 6), caracterizam-se por serem defensinas que possuem a cauda C-terminal, que lhes confere funções semelhantes (Gaspar et al. 2014). As defensinas do grupo IX foram agrupadas no mesmo ramo na análise fenética com valores de *bootstrap* de 85%, sendo todas da família Fabaceae, indicando conservação entre elas. Já o grupo I foi constituído por 20 defensinas, das quais 18 pertencem à família Brassicaceae e duas da família Ranunculaceae, com menor similaridade, as quais foram agrupadas no mesmo ramo com valor de bootstrap de 95%. Apenas a defensina BSD1 de *B. campestris* (família Brassicaceae) permaneceu fora do grupo I. Portanto, considera-se mais adequada a utilização da árvore fenética em relação à árvore filogenética, visto que: (i) as sequências de defensinas são pequenas, (ii) compartilham apenas alguns resíduos de aminoácidos conservados; (iii) possuem múltiplas substituições para o mesmo sítio, refletindo as semelhanças estruturais das sequências (Thomma et al. 2002) e (iv) não apresentam evolução constante, sofrendo pressão da coevolução patógeno hospedeiro (Wanderley-Nogueira et al., 2012; Wanderley-Nogueira et al., no prelo).

A produção de feijão-caupi transgênico através da técnica de biobalística tem tido maior sucesso em ensaios recentes, superando algumas dificuldades nas primeiras tentativas de transformação via biobalística realizadas por Kononowicz e colaboradores (1997) e Ikea e colaboradores (2003). O primeiro estudo não reportou a transmissão do transgene para a progênie e no caso do segundo todas as sementes geradas pelas plantas transformadas mostraram-se inviáveis. A partir do protocolo estabelecido por Ivo e colaboradores (2008) foi possível o desenvolvimento de feijão-caupi aplicado ao melhoramento, com a transmissão estável do transgene. Citadin e colaboradores (2013) desenvolveram feijão-caupi resistente ao herbicida Imazapyr, já que nas plantações da África ocorre uma grande perda de produtividade devido às ervas daninhas. Azevedo (2013) desenvolveu plantas de feijão-caupi superexpressando uma defensina da própria espécie (*Vigna unguiculata*), que estão sendo testadas contra fungos e vírus patogênicos (Azevedo, comunicação pessoal). Cruz e Aragão (2014) produziram plantas transformadas portadoras de um transgene baseado no silenciamento dos vírus CPSMV e CABMV via RNA de interferência. Em contrapartida, no presente trabalho, foram obtidas plântas de feijão-caupi transgênico portadora de uma defensina de *M. charantia*, que através das análises *in silico* demonstrou um elevado potencial antifúngico. As plantas transformadas serão multiplicadas até a geração T3 para obtenção de linhagens homozigotas, a serem testadas contra fungos fitopatógenos, como *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum destructivum*

O'Gara (antracnose), que podem acarretar perdas de até 50% da produção (Obi and Barriuso-Vargas 2014).

A taxa de escape (plantas que passaram pelo regime de seleção, mas não foi detectado a presença do transgene) foi de 82,5%, compatível com os resultados de Ivo *et al.* (2008), que utilizou uma concentração do Imazapir de 200 nM. Para tentar reduzir a taxa de escape, estes autores aumentaram a concentração do Imazapyr para 300 nM, porém ocorreu uma redução drástica do número de plantas regeneradas e nenhuma transgênica foi obtida, motivo pelo qual este procedimento não foi adotado no presente estudo.

A eficiência da transformação do presente estudo (0,80%), foi semelhante aos trabalhos prévios de transformação de feijão-caupi via biolística, como o de Ivo *et al.* (2008), Azevedo (2013) e Cruz e Aragão (2014), com taxas de transformação de 0,90%, 0,54% e 1,04%, respectivamente. A baixa eficiência de transformação do feijão-caupi deve-se a dois fatores: (1) dificuldade de isolamento do embrião sem danos; (2) alta recalcitrância da espécie, quando comparada com outras leguminosas, como soja e feijão-comum, cuja eficiência de transformação chega a 9% e 2,7%, respectivamente (Rech *et al.* 2008). Vale salientar ainda que tanto a entrega do transgene quanto o sucesso do cultivo de embriões *in vitro*, imprescindíveis para o êxito do processo de transformação, são genótipos dependentes (Ivo *et al.* 2008; Cruz and Aragão 2014), não havendo ainda registro de uso da cv. Boca Negra para trabalhos de transformação.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Através das análises *in silico*, defensinas do transcriptoma da *M. charantia* foram mineradas com sucesso, devido à conservação de aminoácidos específicos, principalmente os oito resíduos de cisteína. A defensina candidata foi confirmada pelo alinhamento múltiplo e a predição da atividade antifúngica das análises *in silico*, corroborada pelo agrupamento no fenograma com defensinas antifúngicas com atividades *in vitro* e/ou *in vivo* previamente descritas. Pela metodologia de biobalística, foram transformadas sete plantas de feijão-caupi com o gene da defensina McDef1. A próxima etapa envolve a avaliação dos níveis de expressão do gene inserido via RT-qPCR (Real-Time quantitative PCR), além da submissão das plantas transformantes a estresses bióticos com fungos patógenos desta espécie, que são as principais causas de perda de produtividade nas regiões de maior produção desta cultura. Pelo menos um candidato deverá ser selecionado para posteriores testes em campo experimental.

6. REFERÊNCIAS

- Abdallah NA, Shah D, Abbas D, Madkour M (2010) Stable integration and expression of a plant defensin in tomato confers resistance to *Fusarium* wilt. *GM Crops* 5: 344-350. doi: 10.4161/gmcr.1.5.15091.
- Almeida MS, Cabral KM, Zingali RB, Kurtenbach E (2000) Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. *Arch Biochem Biophys*, 378(2):278-86, doi:10.1006/abbi.2000.1824.

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410.
- Altschul SF, Koopin EV (1998) Iterated profile searches with PSI-BLAST – a tool for discovery in protein databases. *Trends Biochem. Sci.* 23: 444–447. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01298-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01298-5).
- Anuradha TS, Divya EK, Jami ESK, Kirti EPB (2008). Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Rep* 27: 1777–1786. doi: 10.1007/s00299-008-0596-8.
- Azevedo HMA (2013) Aplicações biotecnológicas em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] visando a obtenção de tolerância a estresses bióticos e abióticos. Tese, Universidade Federal de Pernambuco.
- Aragão FJL, Rech EL (1998) Isolamento de Vetores para Transformação Direta. In: Brasileiro ACM, Carneiro V TC (eds). *Manual de Transformação Genética de Plantas*, 1rd edn. Embrapa, Brasília, pp 17–33.
- Bakshi S, Sadhukhan A, Mishra S, Sahoo. Improved L (2011) Agrobacterium-mediated transformation of cowpea via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports*, 30:2281–2292, doi: 10.1007/s00299-011-1133-8.
- Barbosa PKA (2008) Análise transcricional de *Vigna unguiculata* infectada por Potyvírus (CABMV) através de LongSAGE. In: Congresso Brasileiro de Genética, 54, Salvador-BA, p 246.
- Benko-Iseppon AM, Winter P, Huettel B, Staginnus C, Muehlbauer FJ, Kahl G (2013) Molecular markers closely linked to fusarium resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis-related genes located on *Arabidopsis* chromosomes 1 and 5. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 379–386, doi: 10.1007/s00122-003-1260-x.
- Chen SC, Liu AR, Zou ZR (2006) Overexpression of glucanase gene and defensin gene in transgenic tomato enhances resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Russia J. Plant Physiol* 53: 756–763, doi: 10.1134/S1021443706050116.
- Choi MS, Kim YH, Park HM, Seo BY, Jung JK, Kim ST, Kim MC, Shin DB, Yun HT, Choi IS, Kim C, Lee JY (2009) Expression of BrD1, a Plant Defensin from Brassica rapa, Confers Resistance against Brown Planthopper (*Nilaparvata lugens*) in Transgenic Rices. *Mol. Cells*, 28:131–137, doi: 10.1007/s10059-009-0117-9.
- Citadin CT, Cruz ARR, Aragão FJL (2013) Development of transgenic imazapyr-tolerant cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Cell Reports*, 32: 537–543, doi: 10.1007/s00299-013-1385-6.
- Cruz ARR, Aragão FJL (2014) RNAi-based enhanced resistance to Cowpea severe mosaic virus and Cowpea aphid-borne mosaic virus in transgenic cowpea. *Plant Pathology*, 63: 831–837, doi: 10.1111/ppa.12178.
- Darwish NA, Khan RS, Ntui VO, Nakamura I, Mii M (2014) Generation of selectable marker-free transgenic eggplant resistant to *Alternaria solani* using the R/RS site-specific recombination system. *Plant Cell Rep*, 33: 411–421, doi: 10.1007/s00299-013-1541-z.
- de Beer A, Vivier MA (2008) Vv-AMP1, a ripening induced peptide from *Vitis vinifera* shows strong antifungal activity. *BMC Plant Biol*, 8:75, doi: 10.1186/1471-2229-8-75.
- de Beer A, Vivier MA (2011) Four plant defensins from an indigenous South African Brassicaceae species display divergent activities against two test pathogens despite high sequence similarity in the encoding genes. *BMC Res Notes*, 4:459, doi: 10.1186/1756-0500-4-459.
- Fang J, Chao CT, Roberts PA, Ehlers JD (2007) Genetic diversity of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] in four West African and USA breeding programs as determined by AFLP analysis. *Genet Resour Crop Evol*, 54: 1197–1209, doi: 10.1007/s10722-006-9101-9.
- FAOSTAT (2014). Food and Agriculture Organization, Statistics Division. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acessado em 08 de janeiro de 2016.

- Franco OL, Murad AM, Leite JR, Mendes PA, Prates MV, Bloch C Jr (2006) Identification of a cowpea gamma-thionin with bactericidal activity. *FEBS J*, 273(15):3489-3497, doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05349.x.
- Frota KGM, Soares RAM, Arêas JAG (2008) Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. *Ciênc Tecnol Aliment*, 28: 470-476, doi: 10.1590/S0101-20612008000200031.
- Gao Ai-Guo, Hakimi SM, Mittanck CA, Wu Y, Woerner BM, Stark DM, Shah DM, Liang J, Rommense CMT (2000) Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat. Biotechnol*, 18: 1307–1310, doi:10.1038/82436.
- Gaspar YM, McKenna JA, McGinness BS, Hinch J, Poon S, Connelly AA, Anderson MA, Heath RL (2014) Field resistance to *Fusarium oxysporum* and *Verticillium* in transgenic cotton expressing the plant defensin NaD1. *Journal of Experimental Botany*, 65:1541–1550, doi:10.1093/jxb/eru021.
- Ghag SB, Shekhawat UKS, Ganapathi TR (2012) Petunia Floral Defensins with Unique Prodomains as Novel Candidates for Development of *Fusarium* Wilt Resistance in Transgenic Banana Plants. *PLoS ONE*, 7: e39557, doi:10.1371/journal.pone.0039557.
- Ghag SB, Shekhawat UKS, Ganapathi TR (2014) Transgenic banana plants expressing a *Stellaria media* defensin gene (Sm-AMP-D1) demonstrate improved resistance to *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 119: 247–255, doi: 10.1007/s11240-014-0529-x.
- Grover JK, Yadav SP (2004) Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 93: 123–132, doi: 10.1016/j.jep.2004.03.035.
- Ikea J, Ingelbrecht I, Uwaifo A, Thottappilly G (2003) Stable gene transformation in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) using particle gun method. *Afr J Biotechnol*, 8: 211-218, doi: 10.5897/AJB2003.000-1044.
- Ivo NL, Nascimento CP, Vieira LS, Campos FA, Aragão FJb (2008) Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. *Plant Cell Rep*, 27: 1475-1483, doi: 10.1007/s00299-008-0573-2.
- Jha S, Tank HG, Prasad BD, Chattoo BB (2009) Expression of Dm-AMP1 in rice confers resistance to *Magnaporthe oryzae* and *Rhizoctonia solani*. *Transgenic Res*, 18: 59-69, doi: 10.1007/s11248-008-9196-1.
- Kanzaki H, Nirasawa S, Saitoh H, Ito M, Nishihara M, Terauchi R, Nakamura I (2002) Overexpression of the wasabi defensin gene confers enhanced resistance to blast fungus (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice. *Theor. Appl. Genet*, 105: 809–814, doi: 10.1007/s00122-001-0817-9.
- Kaur J, Thokala M, Seilaniantz AR, Zhao P, Peyret H, Berg H, Pandey S, Shah JJD (2012) Subcellular targeting of an evolutionarily conserved plant defensin MtDef4.2 determines the outcome of plant–pathogen interaction in transgenic *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology*, 13: 1032–1046, doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00813.x.
- Khan RS, Nishihara M, Yamamura S, Nakamura I, Mii M (2006) Transgenic potatoes expressing wasabi defensin peptide confer partial resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Biotechnology*, 23:179-183, doi: 10.5511/plantbiotechnology.23.179.
- Khan RS, Nakamura I, Mii M (2011) Development of disease-resistant marker-free tomato by R/RS site-specific recombination. *Plant Cell Rep*, 30:1041-1053, doi: 10.1007/s00299-011-1011-4.
- Kononowicz AK, Cheah KT, Narasimhan ML, Murdock LL, Shade RE, Chrispeels MJ, Filippone E, Monti LM, Bressan RA, Hasegawa PM (1997) Development of transformation system for cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Adv. Cowpea Res*, 361-371.
- Kovaleva V, Kiyamova R, Cramer R, Krynytskyy H, Gout I, Filonenko V, Gout R (2009) Purification and molecular cloning of antimicrobial peptides from Scots pine seedlings. *Peptides*, 30: 2136-2143, doi: 10.1016/j.peptides.2009.08.007.

- Lacerda AF, Vasconcelos EAR, Pelegrini PB, Sa MFG (2014) Antifungal defensins and their role in plant defense. *Frontiers in Microbiology*, 5:116, doi: 10.3389/fmicb.2014.00116.
- Lay FT, Brugliera F, Anderson MA (2003) Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. *Plant Physiol*, 131(3):1283-1293, doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.102.016626>.
- Lay FT, Anderson MA (2005) Defensins – components of the innate immune system in plants. *Curr. Protein Pept. Sci*, 6: 85–101, doi: 10.2174/1389203053027575.
- Li Z, Zhou M, Zhang Z, Ren L, Du L, Zhang B, Xu H, Xin Z (2011) Expression of a radish defensin in transgenic wheat confers increased resistance to *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia cerealis*. *Funct Integr Genomics*, 11: 63-70, doi: 10.1007/s10142-011-0211-x.
- Mishra S, Behura R, Awasthi JP, Dey M, Sahoo D, Bhowmik SSD, Panda SK, Sahoo L (2014) Ectopic overexpression of a mungbean vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene (VrNHX1) leads to increased salinity stress tolerance in transgenic *Vigna unguiculata* L. Walp. *Mol Breeding*, v. 34, p. 1345–1359, doi: 10.1007/s11032-014-0120-5.
- Ntui VO, Thirukkumaran G, Azadi P, Khan RS, Nakamura I, Mii M (2010) Stable integration and expression of wasabi defensin gene in "Egusi" melon (*Colocynthis citrullus* L.) confers resistance to *Fusarium* wilt and *Alternaria* leaf spot. *Plant Cell Rep*, 29: 943-954, doi: 10.1007/s00299-010-0880-2.
- Obi VI, Barriuso-Vargas JJ (2014) Situation of biofungicides reconnaissance, a case of anthracnose disease of cowpea. *American Journal of Plant Sciences*, 5: 1202-1211, doi: 10.4236/ajps.2014.59133.
- Odintsova TI, Rogozhin EA, Baranov Y, Musolyamov AKh, Yalpani N, Egorov TA, Grishin EV (2008) Seed defensins of barnyard grass *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. *Biochimie*, 90(11-12):1667-1673, doi: 10.1016/j.biochi.2008.06.007.
- Osborn RW, De Samblanx GW, Thevissen K, Goderis I, Torrekens S, Van Leuven F, Attenborough S, Rees SB, Broekaert WF (1995) Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett*, 368(2):257-262, doi:10.1016/0014-5793(95)00666-W.
- Park HC, Kang YH, Chun HJ, Koo JC, Cheong YH, Kim CY, et al. (2002) Characterization of a stamen-specific cDNA encoding a novel plant defensin in *Chinese cabbage*. *Plant Mol. Biol.*, 50: 57–68, doi: 10.1023/A:1016005231852.
- Pelegrini PB, Lay FT, Murad AM, Anderson MA, Franco OL (2008) Novel insights on the mechanism of action of alpha-amylase inhibitors from the plant defensin family. *Proteins*, 73(3):719-29, doi: 10.1002/prot.22086.
- Petersen TN, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*, 8: 785–786, doi:10.1038/nmeth.1701.
- Popelka JC, Gollasch S, Moore A, Molvig L, Higgins TJV (2006) Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny. *Plant Cell Rep*, 25: 304-312, doi: 10.1007/s00299-005-0053-x.
- Portieles R, Ayra C, Gonzalez E, Gallo A, Rodriguez R, Chacón O, López Y, Rodriguez M, Castillo J, Pujol M, Enriquez G, Borroto C, Trujillo L, Thomma BPHJ, Hidalgo OB (2010) NmDef02, a novel antimicrobial gene isolated from *Nicotiana megalosiphon* confers high-level pathogen resistance under greenhouse and field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 8: 678–690, doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00501.x.
- Porto WF, Fensterseifer GM, Franco OL (2014) In silico identification, structural characterization, and phylogenetic analysis of MdesDEF-2: a novel defensin from the Hessian fly, *Mayetiola destructor*. *J Mol Model*, 20: 2339, doi: 10.1007/s00894-014-2339-9.
- Rech EL, Vianna GR, Aragão FJL (2008) High efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nat Protoc*, 3: 410–418, doi:10.1038/nprot.2008.9.

Rogozhin EA, Oshchepkova YI, Odintsova TI, Khadeeva NV, Veshkurova ON, Egorov TA, Grishin EV, Salikhov SI (2011) Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. seeds. *Plant Physiol Biochem*, 49(2):131-137, doi: 10.1016/j.plaphy.2010.10.008.

Semple CA, Gautier P, Taylor K, Dorin JR (2006) The changing of the guard: Molecular diversity and rapid evolution of beta-defensins. *Mol. Diversity*, 10: 575-584, doi: 10.1007/s11030-006-9031-7.

Seo HH, Park S, Park S, Oh BJ, Back K, Han O, Kim JI, Kim YS (2014) Overexpression of a Defensin Enhances Resistance to a Fruit-Specific Anthracnose Fungus in Pepper. *PLoS One*, 9(5): e97936. doi:10.1371/journal.pone.0097936 4.

Singh BB, Ehlers JD, Sharma B, Freire-Filho FR (2002) Recent progress in cowpea breeding. In: *Proceedings of World Cowpea Conference III*, 3, IITA, Ibadan, Nigeria, p. 22–40. In: Fatokun CA, Tarawali AS, Singh BB, Kormawa PM, Tamo M (eds). *Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production*. Ibadan: IITA, pp 22-40.

Sjahril R, Chin DP, Khan RS, Yamamura S, Nakamura I, Amemiva Y (2006) Transgenic *Phalaenopsis* plants with resistance to *Erwinia carotovora* produced by introducing wasabi defensin gene using *Agrobacterium* method. *Plant Biotech*, 23:191-194, doi: 10.5511/plantbiotechnology.23.191.

Terras FR, Torrekens S, Van Leuven F, Osborn RW, Vanderleyden J, Cammue BP, Broekaert WF (1993) A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Lett*, 316(3):233-40, doi:10.1016/0014-5793(93)81299-F.

Terras FR, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Torrekens S, Van Leuven F, Vanderleyden J, et al. (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*, 7(5):573-588, doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.7.5.573>.

Thomma BPHJ, Cammue BPA, Thevissen K (2002) Plant defensins. *Planta*, 216:193–202, doi: 10.1007/s00425-002-0902-6.

Vasavirama K, Kirti PB (2012) Increased resistance to late leaf spot disease in transgenic peanut using a combination of PR genes. *Funct Integr Genomics*, 12: 625-634, doi: 10.1007/s10142-012-0298-8.

Wanderley-Nogueira AC, Soares-Cavalcanti NM, Belarmino LC, Bezerra-Neto JP, Kido EA, Pandolfi V, Abdelnoor R, Bineck E, Carazzole MF, Benko-Iseppon AM (2012) An overall evaluation of the Resistance (*R*) and Pathogenesis Related (*PR*) superfamilies in soybean, as compared with *Medicago* and *Arabidopsis*. *Genetics and Molecular Biology*, 35(1): 260-271, doi: 10.1590/S1415-47572012000200007.

Wanderley-Nogueira AC, Kido EA, Bezerra-Neto JP, Araújo FT, Amorim LLB, Crovella S, Benko-Iseppon AM (2016) Plant Elite Squad: first defense line and resistance genes – identification, diversity and functional roles. *Current Protein and Peptide Science*, no prelo.

Wang YP, Nowak G, Culley D, Hadwiger LA, Fristensky B (1999) Constitutive expression of pea defensin gene DRR206 confers resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in transgenic canola (*Brassica napus*). *Mol. Plant. Microbe Interact*, 12: 410–418, doi: 10.1094/MPMI.1999.12.5.410.

Weising K, Nybom H, Wolf K, Meyer W (1995) *DNA fingerprinting in plants and fungi*. Boca Raton: CRC Press.

Wheeler TJ, Eddy SR (2013) Nhmmer: DNA Homology Search With Profile HMMs. *Bioinformatics*, 29: 2487-2489, doi: 10.1093/bioinformatics/btt403.

Zhu YJ, Agbayani R, Moore PH (2007) Ectopic expression of *Dahlia merckii* defensin DmAMP1 improves papaya resistance to *Phytophthora palmivora* by reducing pathogen vigor. *Planta*, 226: 87–97, doi: 10.1007/s00425-006-0471-1.

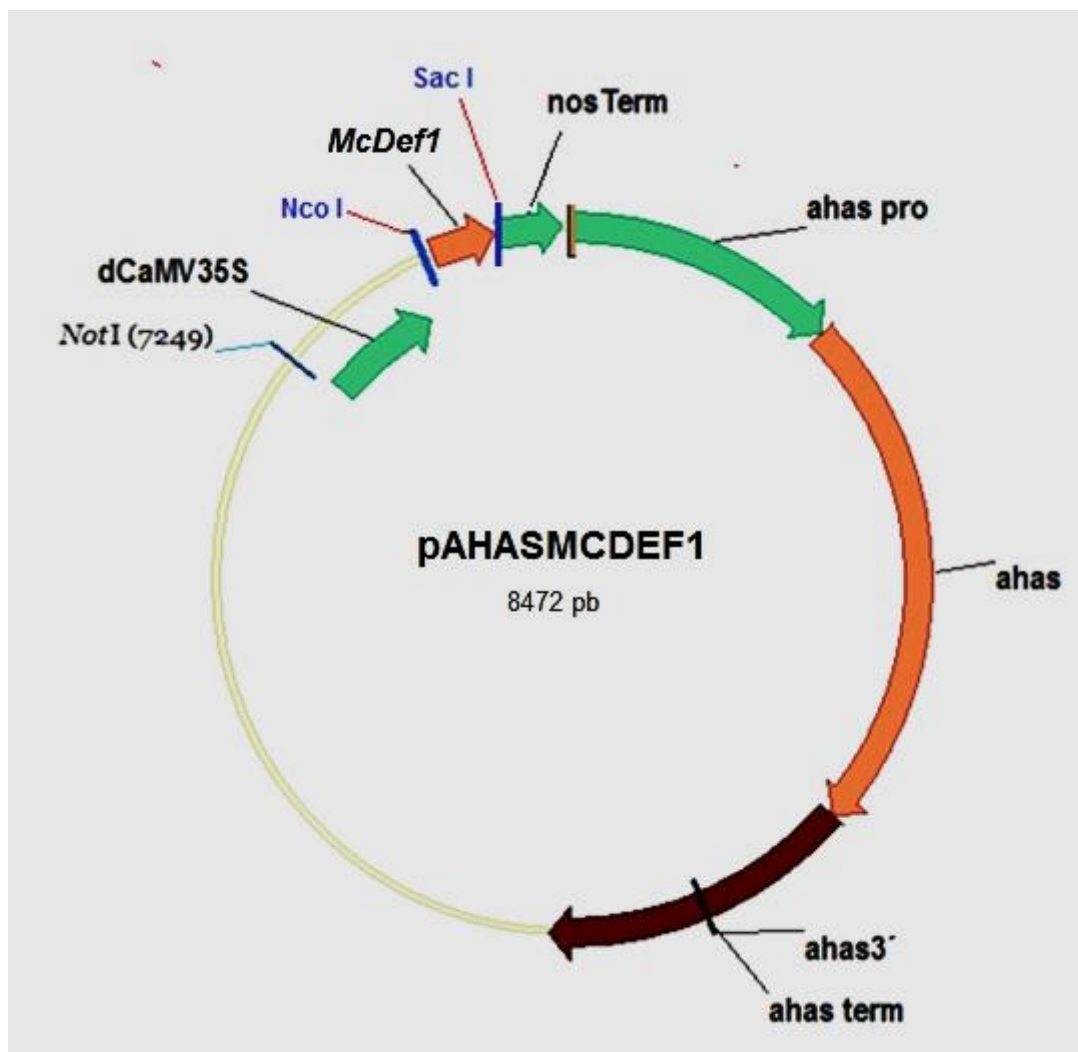
7. CONCLUSÕES GERAIS

- As análises *in silico* realizadas neste estudo através do HMMER revelam que nos bancos de dados de nucleotídeos e de proteínas da espécie de *Momordica charantia* existem 10 sequências de defensinas.
- As análises fenéticas mostraram que a defensina candidata se agrupou com outras sequências de defensinas com atividades antifúngicas, o que deu suporte aos resultados obtidos através das análises *in silico* da predição da atividade antimicrobiana.
- O processo de transformação via biolística com a utilização do herbicida Imazapyr mostrou-se eficiente, assim como descritos por trabalhos prévios usando a mesma metodologia.
- O processo de transformação de feijão-caupi ainda apresenta uma eficiência muito baixa, sendo uma metodologia de difícil replicação, necessitando de ensaios com muitas amostras e mão-de-obra altamente especializada.

8. ANEXOS

Anexo I

Figura 1: Vetor pAHASMCDEF1 com destaque para o gene de interesse, defensina de *M. charantia* (McDef1), e o gene *Atahas*, marcador de seleção, evidenciando os principais sítios de restrição.



Anexo II

Resumo apresentado no XX Encontro de genética do nordeste (Engene), fazendo jus a menção honrosa.

Seleção de genes candidatos com atividade antimicrobiana da espécie *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) para utilização em transformação vegetal

Cavalcanti-Ferreira, JD^{1,2*}; Belarmino, LC¹; Arruda, HMA¹; Benko-Iseppon, AM¹.

¹Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, UFPE, Recife, PE.

²Mestrando do programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, UFPE, Recife, PE.

*jdiogocavalcantif@yahoo.com.br

Palavras-chave: Bioinformática, transgênico, peptídeo antimicrobiano, melhoramento genético, defensina.

A agricultura é afetada por fatores ambientais, incluindo estresses bióticos que reduzem a produtividade e a qualidade da colheita, uma vez que as plantas podem ser atacadas por diversos agentes patogênicos. Para resistir aos ataques de agentes microrganismos, os vegetais desenvolveram estratégias moleculares de defesa largamente conservadas, cujos elementos e intensidade podem variar de acordo com a espécie ou genótipo de uma espécie. Desse ponto de vista, o Melão-de-São-Caetano ou melãozinho (Cucurbitaceae, *Momordica charantia*) destaca-se por sua ampla utilização na medicina popular, apresentando atividades antimicrobianas cientificamente comprovadas. Em vista do potencial desta espécie o presente projeto objetivou selecionar um peptídeo antimicrobiano a partir de seu transcriptoma, para uso na transformação genética do feijão-caupi (Fabaceae, *Vigna unguiculata*). Após análises *in silico*, foram identificadas 10 sequências que possivelmente codificam peptídeos da família das defensinas. Após BLASTx observou-se que destas, duas apresentavam alinhamento incompleto, enquanto o programa ORF-Finder, seguido do BLASTp apontou três outras sequências sem ORF ou alinhadas parcialmente com uma pequena região codificante de defensina. As cinco sequências restantes foram submetidas ao programa SignalP 4.1 para averiguar a presença de peptídeo sinal, encontrado em apenas duas das sequências, que foram testadas para a predição de atividade antimicrobiana, cujos peptídeos maduros contêm 57 e 48 aminoácidos. A análise possibilitou a seleção de um gene/proteína para construção do vetor de transformação, considerando a sequência denominada DefMC (Defensina de Melão de São Caetano) cuja ORF contém 280 pb, elevada similaridade com a defensina antifúngica J1-2-like de *Cucumis sativus* e uma concentração de transcritos 73,58 vezes maior do que a outra sequência. A elaboração do mapa do plasmídeo foi realizada a partir do vetor comercial pBlueScript SK+ (Stratagene), sendo o gene de interesse introduzido sob controle do promotor constitutivo CaMV 35S (*Cauliflower Mosaic Virus*) no sítio de restrição NcoI e SacI. As próximas etapas encontram-se em andamento incluindo o isolamento de embriões para cultivo *in vitro* e bombardeamento genético da construção vetorial desenhada.

Agência financiadora: FACEPE, CAPES, CNPq.

Anexo III

Instruções para autores: Genetics and Molecular Biology

SUBMISSION OF PAPERS

There is a publication charge for manuscripts once they are accepted. For price information, exemptions and waiver policies, please consult the journal homepage <http://www.gmb.org.br>.

1. Manuscripts must be submitted through our online submission platform hosted at: <http://mc.manuscriptcentral.com/gmb>

The cover letter should be addressed to:

Carlos C. F. Menck, Editor-in-Chief, Genetics and Molecular Biology

2. For submission the following instructions must be observed:

- The manuscript must be submitted by the Corresponding Author. This is the person who will also check the page proofs, and arranges for any payment that may incur during the editorial process.
- Entering the following metadata is required: (i) the manuscript title, (ii) a short running title (max. 35 characters), (iii) the Abstract, and (iv) up to five keywords. All these items must be exactly the same as those figuring in the first two pages of the manuscript file. Furthermore, a cover letter addressed to the Editor is required. It must be edited by the corresponding author inserted within the reserved data field.
- Statements are required informing that the data have not been published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. Furthermore, possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must also be disclosed.
- The names of all co-authors, including institutional affiliations and e-mail addresses must be entered, as contact information for the Editorial Office.
- In the referee suggestions field, up to five reviewer names can be entered by the author(s); valid e-mail contact addresses for these are required, in case they are selected by the editor. These suggestions can be made separately as preferred and not-preferred reviewer(s).
- Files must be uploaded separately and identified according to file types. The main text file must include references and, if applicable, figure legends, which must be typed on a separate page following the References and Internet Resources sections. Each table, figure and element containing supplementary material must be saved and uploaded in a separate file. Formats for text and tables are Word or RTF in Windows platform. Figures should be in TIFF or JPEG formats (see detailed instructions in 3.1.h).
- Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

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

Special attention should be given to the structuring of the manuscript and correct language usage. These are important factors in the smooth running of the editorial and peer-review process, and can result in faster publication.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page.

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

a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province, and country; different affiliations indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of up to 35 characters (including spaces); up to five key words; the corresponding author's name, full postal, and email address.

b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **The text** must be as succinct as possible. *Text citations*: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use *et al.* List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al.* should not be used). *Numbers*: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. *Binomial Names*: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately following the References Section, not in the text.

The text includes the following elements:

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

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

Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Statistical analyses should be presented as complete as possible, i.e. not only *P*-values should be shown, but also all other test variables required for full appreciation of the results by the reviewers and readers. Comments on relevance of results are appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

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

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

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

e) **The References Section**: References must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by *et al.* Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>).

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to information obtained from individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript under consideration. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

Sample journal article citation:

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

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

Sample book citation:

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

Sample chapter-in-book citation:

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

Sample electronic article citation:

Gotzek D, Ross KG (2009) *Current status of a model System: The gene Gp-9 and its association with social organization in fire ants*. *PLoS One* 4:e7713.

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

Sample Internet resource citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2009)

LEM Software, http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm (September 4, 2009)

g) **Tables:** must be in Word format prepared with the table tool (do not use space bar or tabulator). A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript letters. Tables that are to appear in the printed version must be saved in Word format and not as figures, so that they can later be fitted during typesetting. Each table must be saved and uploaded as a separate file.

h) **Figures** must be numbered consecutively using Arabic numerals. Images should be in TIFF or JPEG format. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require grayscale resolution yielding 300 dpi, color figures should be at 600 dpi. These resolutions refer to the output size of the file, that is the size in which it will appear printed in the journal; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations are accepted. Each figure/panel must be saved and uploaded as a separate file. When uploading, identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure.

Figure legends must be included at the end of the main text file and should be typed on a new page.

i) **Nomenclature:** Taxonomic names should be in accordance with current international standards. For rules concerning gene names and gene symbols, please see separate Instruction form.

j) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases and accession numbers must be provided upon acceptance of the article. Failure to do so will inadvertently delay publication.

k) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) **Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a statement in the text that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments

involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must be uploaded during manuscript submission.

m) **Supplementary Material:** Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the published version, can be submitted as Supplementary Material. At publication, this material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text file. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement:

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

- *Table S1 – < short title >*
- *Figure S1 – < short title >*

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

3.2 Short Communications

Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications;

- should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited;
- should include an Abstract;
- but no further subdivision, with introduction, material and methods, results and discussion; all in a single section and without headers.
- up to four items (tables and/or figures) may be submitted;

Note: The title page, abstract and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see instructions in item 3.1.m.

3.3 Letters to the Editor

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

3.4 Review Articles

Review Articles are welcome. The Editor must be contacted prior to submission. Please, provide an Abstract and a list of your recent publications in the area.

3.5 Book Reviews

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

3.6 History, Story and Memories

These are accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Articles accepted for publication

Once an article is accepted, the Editorial Office will send it to copy editor for language and technical corrections. If major corrections were proposed, the manuscript with the highlighted corrections will be returned to the

corresponding author for approval. The final version approved by the authors must be free of any text/correction markings when returned to the Editorial Office.

After typesetting, page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from typesetting errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

Together with the proofs, a form of consent to publish and transfer of copyright is sent to the corresponding other. The latter will have sign this form, also on behalf of any co-authors, and send it by fax to the Editorial Office.

5. Reprints

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

Anexo IV

Instruções para autores: *Plant Cell Reports*

Plant Cell Reports

Editors-in-Chief: G. **Hahne**; J.R. **Liu**
ISSN: 0721-7714 (print version)
ISSN: 1432-203X (electronic version)

Instructions for Authors

TYPES OF ARTICLES

The journal publishes original and focus articles, reviews and opinion papers.

Information for Review Authors

Plant Cell Reports publishes timely reviews on major developments in all areas of plant cell biology.

Prospective authors may provide a short outline (one or two pages) of the proposed review.

The general instructions for authors should be used for all technical aspects of manuscript preparation. The "Materials and methods" and "Results" sections are not needed, but please give an introduction before proceeding to the details and use informative headings for the different parts of your review.

Reviews should not be longer than seven printed pages, including references, tables, and figures (approx. 21 manuscript pages, or 5,000 words).

Review Authors will not be charged for printing essential color figures.

Information on Focus contributions

Focus articles are short commentaries, methods, or opinion papers of no more than 1000 words and 5 references, max. one figure or table. Focus articles do not have an abstract or a Key Message.

Biographical summary

Authors of Reviews and Guest Editorials are invited to supply a brief biographical summary (between 50 and 100 words) and a black and white glossy photograph, passport-sized.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

AUTHOR CONTRIBUTION STATEMENT

Authors must provide a short description of the contributions made by each listed author (please use initials). This will be published in a separate section in front of the Acknowledgments.

- Example: AM and DB conceived and designed research. AM and BB conducted experiments. GR contributed new reagents or analytical tools. AM and GR analyzed data. AM wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Note by the editors:

Please be aware that changes to the list of authors are not possible after final acceptance of the manuscript.

The International Committee of Medical Journal Editors has advice on what constitutes proper authorship:

- ICMJE advice

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Important note:

- Please limit the title to 20 words.

KEY MESSAGE

- Please summarize the main achievement of your manuscript beyond the meaning of the manuscript title. This "Key Message" may not contain more than 30 words, and is essential for original research papers only. It is not needed for Reviews and Opinion Papers.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Genus and species names should be in italics.

Quantitative RT PCR

For quantitative RT PCR, also known as real time- RT PCR experiments special attention should be paid to the following: "Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments" (MIQE) guidelines (Clin Chem [2009] 55: 611-622; BMC Mol Biol [2010] 11:74) should be considered.

Issues of particular importance noted are using the appropriate samples and sample sizes for the experimental objective, the appropriate internal control gene(s) for the gene(s) of interest, and the appropriate statistical analyses.

See also in this journal "Keeping qRT-PCR rigorous and biologically relevant" (Volume 34, Issue 1, pp 1-3)

Authors must deposit new nucleotide sequences to GenBank prior to submitting a paper for publication. An accession number must be given in the manuscript for new genomic DNA, complementary DNA, RNA and other nucleotide sequences discussed in the manuscript.

- Download

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 2 kB)

Important note:

- Please always give a minimum of 15 authors.

TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

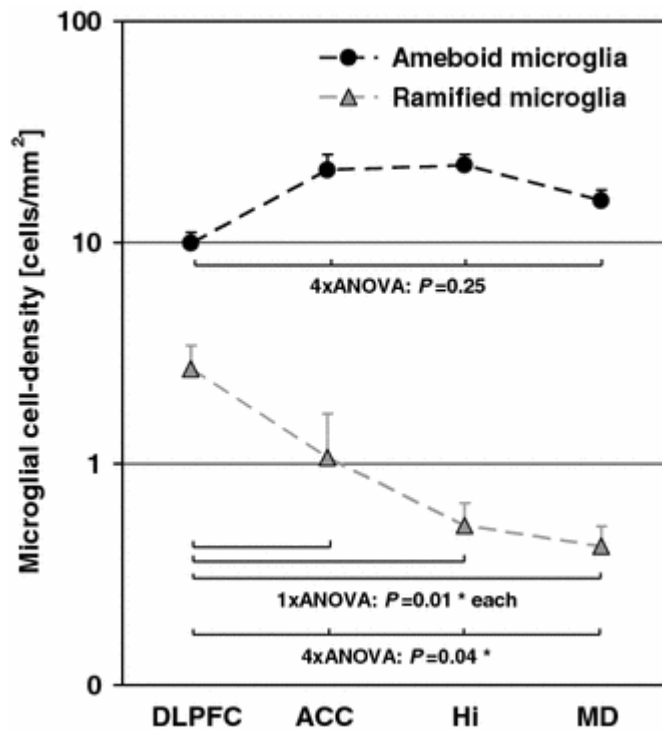
ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

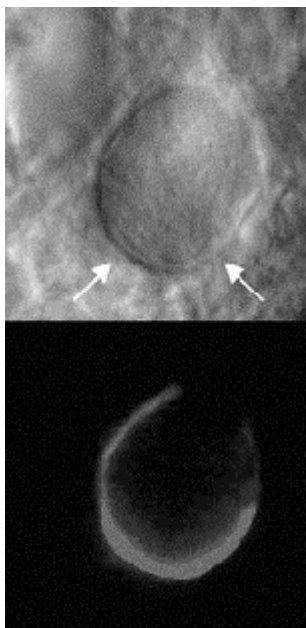
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

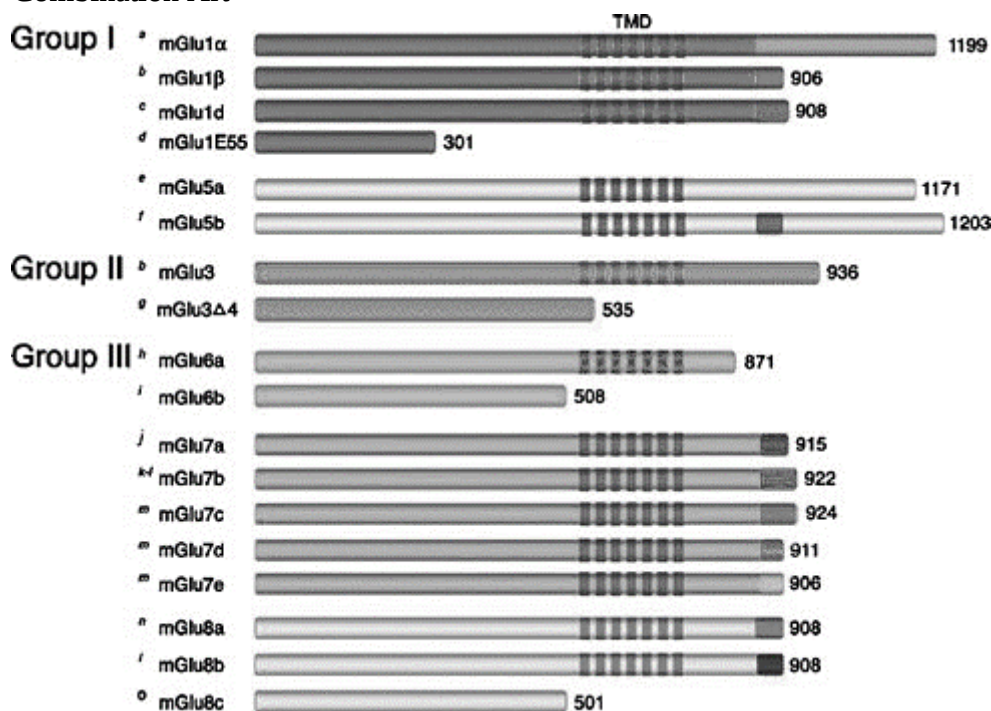
Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

IMAGE MANIPULATION

This journal follows the recommendations formulated by the

- Rockefeller University Press
- No specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced.
- Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if they are applied to the whole image and as long as they do not obscure, eliminate, or misrepresent any information present in the original, including the background.
- The grouping of images from different parts of the same gel, or from different gels, fields, or exposures must be made explicit by the arrangement of the figure (e.g., dividing lines) and in the text of the figure legend.
- If the original data cannot be produced by an author when asked to provide it, acceptance of the manuscript may be revoked.

Please read PCR's free Focus paper on

- "Images and imagination: the role of figures in plant cell and molecular biology publications" by C. Neal Stewart Jr.

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

- Submission
Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

- Audio, Video, and Animations
Always use MPEG-1 (.mpg) format.
- Text and Presentations
Please note that PDF-files are not allowed for submission.
- Spreadsheets
Spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).
- Specialized Formats
Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.
- Collecting Multiple Files
It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.
- Numbering
If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.
- Captions
For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.
- Processing of supplementary files
Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.
- Accessibility
In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that
The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct. Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ("plagiarism"). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

- Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.
- The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

- [here](#):

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws. Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in:

- Edanz English editing for scientists

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

- 理文编辑

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

- エダンズグループジャパン

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및 신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

- Edanz Editing Global