

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MARACUJAZEIRO (*Passiflora edulis* f.
flavicarpa) PARA RESISTÊNCIA AO VÍRUS DO ENDURECIMENTO DOS
FRUTOS**

FLAVIO TREVISAN

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Julho – 2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MARACUJAZEIRO (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) PARA RESISTÊNCIA AO VÍRUS DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS

FLAVIO TREVISAN

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Profa. Dra. **BEATRIZ MADALENA JANUZZI MENDES**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Julho – 2005

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Trevisan, Flavio

Transformação genética de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) para resistência ao vírus do endurecimento dos frutos / Flavio Trevisan. - - Piracicaba, 2005. 64 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005. Bibliografia.

1. Maracujá 2. Mosaico (doenças de planta) 3. Planta transgênica 4. Potyvirus 5. Transformação genética 6. Vírus de plantas I. Título

CDD 634.425

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Olzeno Trevisan e Ildaci B. Trevisan por todo apoio e incentivo aos meus estudos, a minha companheira Áurea Juliana Bombo pelo constante apoio.

À Professora Dra. Beatriz M. J. Mendes (CENA/USP) pela orientação, amizade e pela oportunidade oferecida.

Ao Professor Dr. Francisco de Assis Mourão-Filho (ESALQ/USP) por ter cedido o espaço necessário para a manutenção das plantas em estufas.

À Professora Dra. Maria Lucia C. Vieira, pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Ao Professor Dr. Jorge A. M. Rezende pelo constante apoio e orientação em todas as etapas do projeto.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal/ESALQ, principalmente a Sheila da C. Maciel, pela amizade e auxílio e sugestões durante a realização do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pela amizade, sugestões e auxílio na realização do trabalho, especialmente para Maria Graziela Krug pelo auxílio durante a clonagem do gene e para Fernando A. Azevedo pelo auxílio na realização do Southern Blot.

À FAPESP, pela bolsa de estudo e auxílio financeiro ao projeto de pesquisa.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO	vii
SUMMARY	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 A cultura do maracujazeiro	4
2.2 Endurecimento dos frutos do maracujazeiro.....	6
2.3 Resistência derivada do patógeno.....	9
2.4 Cultura de tecidos “in vitro” e transformação genética em <i>Passiflora</i>	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Material Vegetal	18
3.2 Construção do vetor de expressão.....	18
3.3 Cultura e manutenção dos isolados de <i>Agrobacterium</i>	20
3.4 Efeito do antibiótico cefotaxime na organogênese “in vitro”	22
3.5 Sensibilidade de explantes ao antibiótico canamicina.....	22
3.6 Transformação genética e regeneração de plantas.....	23
3.6.1 Inoculação e co-cultivo com <i>Agrobacterium</i>	23
3.6.2 Seleção e regeneração das plantas.....	23
3.7 Análise das plantas regeneradas.....	24
3.8 Aclimatização e multiplicação das plantas obtidas.....	25

3.9 Análise de Southern blot.....	25
3.10 Análise de Northern blot.....	25
3.11 Análise de Western blot.....	27
3.11.1 Extração da proteína do capsídeo.....	27
3.11.2 Eletroforese da proteína em gel SDS-PAGE.....	27
3.11.3 Reação serológica.....	28
3.12 Avaliação de resistência em plantas transformadas.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Construção do vetor de expressão e transformação genética de bactérias.....	30
4.2 Efeito do antibiótico cefotaxime na organogênese “in vitro”	32
4.3 Sensibilidade de explantes ao antibiótico canamicina	34
4.4 Transformação genética do maracujazeiro e avaliação das plantas regeneradas.....	35
4.5 Análise das plantas transformadas.....	43
4.6 Avaliação de resistência em plantas transformadas.....	46
5 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE ABREVIATURAS

TDZ = Thidiazuron

AgNO₃ = nitrato de prata

BAP = benzilaminopurina

NAA = ácido naftaleno acético

PCR = polymerase chain reaction

PWV = *Passionfruit wodiness virus*

RDP = resistência derivada do patógeno

PTGS = post-transcriptional gene silencing

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MARACUJAZEIRO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) PARA RESISTÊNCIA AO VÍRUS DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS

Autor: FLAVIO TREVISAN

Orientadora: Profa. Dra. BEATRIZ MADALENA JANUZZI MENDES

RESUMO

O objetivo do trabalho foi estudar uma forma alternativa para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro, pela produção de plantas transgênicas contendo o gene da proteína capsial do *Passionfruit woodness virus* - PWV. O vetor de expressão foi construído utilizando-se os plasmídeos pCambia 2300 e pCambia 2301, que contêm o gene de seleção *nptII*, para resistência ao antibiótico canamicina. O plasmídeo pCambia 2301 contém também o gene repórter *uidA* (GUS). Os plasmídeos foram introduzidos em *Agrobacterium tumefaciens*, estirpes EHA 105 e LBA 4404, pelo método do choque térmico. Os explantes para transformação genética constituíram-se de discos de folhas jovens (6 mm de diâmetro), das variedades IAC 275 e IAC 277, coletados de plantas mantidas em sob fotoperíodo de 16 h luz, a 27 °C. Os explantes foram inoculados com suspensão bacteriana (5×10^8 UFC/mL) por 20 min e transferidos para placa de Petri contendo o meio de cultura MS + thidiazuron (TDZ - 0,25 mg/L) + nitrato de prata (AgNO_3 - 4 mg/L) + acetoseringona (1 $\mu\text{M/L}$). O co-cultivo foi realizado à temperatura de 24 °C, em

ausência de luz, por um período de 3 dias. Para seleção e regeneração de plantas os explantes foram transferidos para meio de cultura de seleção MS + TDZ (0,25 mg/L) + AgNO₃ (4 mg/L) + canamicina (100 mg/L) + cefotaxime (500 mg/L). A incubação foi realizada a 27 °C, em ausência de luz, por um período de 4 - 6 semanas. As gemas adventícias desenvolvidas foram transferidas para o meio de cultura MSM + 10% de água de coco e incubadas sob fotoperíodo de 16 h de luz. A transformação genética foi identificada pelo teste histoquímico GUS e por PCR. Obteve-se um total de 22 plantas PCR positivas. Destas, 8 foram analisadas por Southern blot para confirmação da integração do transgene. A transcrição e expressão do transgene foram analisadas por Northern e Western blot, respectivamente. As plantas transgênicas avaliadas foram multiplicadas e inoculadas com 3 diferentes estirpes do PWV. A linhagem T2 apresentou resistência a infecção dos três isolados utilizados.

PASSIONFRUIT GENETIC TRANSFORMATION
(*Passiflora edulis f. flavicarpa*) FOR RESISTANCE TO WOODINESS VIRUS

Author: FLAVIO TREVISAN

Advisor: Prof. Dr. BEATRIZ MADALENA JANUZZI MENDES

SUMMARY

The main purpose of this work was to study an alternative way to control the *Passionfruit woodiness virus* - PWV through the production of transgenic plants which contained the *Passionfruit woodiness virus* coat protein gene. The binary vector was built by using pCambia 2300 and pCambia 2301 plasmids, which contain the selection gene *nptII*. The pCambia 2301 plasmid also contains the reporter gene *uidA* (GUS). The plasmids were introduced into *Agrobacterium tumefaciens*, EHA 105 and LBA 4404 strains, via thermal shock method. The explants for the genetic transformation were young leaf disks (6 mm of diameter) of IAC 275 and IAC 277 varieties, extracted from plants kept under 16 h photoperiod, at 27 °C. The explants were inoculated with a bacterial suspension (5×10^8 UFC/mL) for 20 min and then transferred to Petri dishes containing co-culture medium MS + thidiazuron (TDZ - 0,25 mg/L) + silver nitrate (AgNO_3 - 4 mg/L) + acetosyringone (1 $\mu\text{M/L}$). The co-culture was performed at 24 °C t, in the dark, for a three-day period. For the selection and regeneration of plants, the explants were transferred to the selection culture medium MS + TDZ (0,25 mg/L) + AgNO_3 (4 mg/L) + kanamycin (100 mg/L) + cefotaxime (500 mg/L). The

incubation was performed at 27 °C, in dark, for 4 - 6 weeks. The adventitious buds developed were then transferred to the culture medium MSM + 10% coconut water and kept incubated under 16 h photoperiod. The genetic transformation was identified through GUS and PCR tests. There were 22 PCR positive plants. Out of those, 8 were Southern blot analyzed for the confirmation of transgene integration. The transgene transcription and expression were determined by Northern and Western blot respectively. The transgenic plants were then multiplied and inoculated with 3 different strains of PWV, and the line 2 showed resistance to the three strains used.

1 INTRODUÇÃO

Brasil, Colômbia, Peru e Equador são os maiores produtores de maracujá (Lima, 2002). Os estados brasileiros que se destacam na produção são Pará, Bahia, São Paulo, Sergipe, Ceará, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo e Alagoas, que juntos perfazem 94% da produção brasileira (Lima & Cunha, 2004). No ano de 2002, a área plantada com maracujazeiro no Brasil foi de aproximadamente 34.778 ha, com uma produção aproximada de 478.652 toneladas (FNP, 2005).

O cultivo do maracujazeiro no Brasil em escala comercial iniciou-se a década de 60, com a espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. (Lima, 2002).

O maracujazeiro é suscetível a uma série de doenças destacando-se a fusariose, bacterioses e doenças viróticas (Medina et al., 1980). O endurecimento dos frutos, causado pelo *Passionfruit woodiness virus* (PWV), é uma das doenças mais importantes da cultura do maracujazeiro, apresentando normalmente uma incidência de 100% em pomares de São Paulo, provocando redução na produção, perda de qualidade dos frutos e redução da longevidade do maracujazeiro. No Brasil, essa doença foi observada pela primeira vez em plantios comerciais de maracujá amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa*) e maracujá doce (*P. alata*), no estado da Bahia, no final da década de 70 (São José, 1994), e atualmente encontra-se disseminada por todas as regiões produtoras do país.

O controle desta virose pode ser realizado pela eliminação sistemática das plantas com sintomas e substituição por mudas sadias como feito em Taiwan (Chang et al., 1992). Na Austrália o controle da doença é realizado pela utilização de híbridos de maracujazeiro roxo (*P. edulis*) e maracujazeiro amarelo

(*P. edulis* f. *flavicarpa*), que são tolerantes à doença (Taylor & Greeber, 1973), associadas à infecção com estirpes fracas premunizantes (Simmonds, 1959).

No Brasil, o controle da doença tem sido insatisfatório devido ao tipo de transmissão, não-persistente, o que torna o controle químico do vetor ineficiente. Outro fator relevante é o fato do vírus infectar leguminosas e espécies silvestres de *Passiflora*, as quais funcionam como fontes de inóculo (Costa, 1996). A pré-imunização com estirpes brasileiras fracas do PWV não apresentou resultados promissores (Novaes & Rezende, 2003) e não existem variedades resistentes ao vírus.

Neste cenário difícil para a cultura do maracujazeiro, uma alternativa para o controle do PWV pode ser a utilização de plantas transgênicas, contendo parte do genoma viral. A obtenção de plantas transformadas com genes que codificam proteínas virais, apresentando resistência ao vírus relacionado, já foi descrita para muitas espécies e é conhecida pelo nome de Resistência Derivada do Patógeno (RDP).

A transformação genética de plantas tem como pré-requisito a disponibilidade de um sistema eficiente para regeneração de plantas por cultura de tecidos "in vitro". Os explantes mais utilizados na cultura de tecidos de maracujazeiro têm sido segmento nodal e disco de folha. O processo de regeneração "in vitro" mais usual para a maioria das espécies de maracujazeiro é a organogênese direta ou seja, desenvolvimento de brotações sem a formação de calo (Dornelas & Vieira, 1994).

O primeiro trabalho de transformação genética de maracujazeiro foi realizado por Manders et al. (1994), os quais obtiveram plantas de maracujazeiro transgênicas contendo o gene *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina, via transformação indireta utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. Recentemente Alfenas et al. (2005) relataram a obtenção de uma linhagem transgênica de maracujazeiro contendo 2/3 da região 3' que codifica a replicase viral mais a porção 5' da região que codifica a proteína do capsídeo

viral do PWV, a qual mostrou-se resistente apenas ao isolado doador da seqüência utilizada.

O objetivo deste trabalho foi estudar uma forma alternativa para o controle do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro, pela produção de plantas transgênicas expressando o gene da proteína capsidial do PWV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do maracujazeiro

O maracujazeiro encontra-se distribuído pelos trópicos, com seu principal centro de diversidade genética localizado no centro-oeste brasileiro (Souza & Meletti, 1997). A América do Sul é o centro de origem de 95% das espécies de maracujazeiro, o restante encontra-se distribuído pela Ásia, Austrália e América do Norte (Lima & Cunha, 2004).

O maracujazeiro pertence à ordem *Passiflorales*, tribo *Passiflorae* e família *Passifloraceae*, que contém 18 gêneros e 630 espécies (Lima, 2002). Apesar da grande variedade de espécies dentro do gênero *Passiflora*, poucas são cultivadas em função de suas propriedades alimentícias, ornamentais e medicinais. O uso medicinal, bastante difundido, baseia-se nas propriedades calmantes da passiflorina, um sedativo natural encontrado nos frutos e nas folhas (Souza & Meletti, 1997).

De acordo com Pereira et al. (1971) setenta espécies de maracujazeiro apresentam frutos comestíveis, sendo estas as espécies de maior importância econômica. Apesar desta grande variedade de espécies com frutos comestíveis, os cultivos comerciais brasileiros baseiam-se quase que totalmente em uma única espécie, *P. edulis* f. *flavicarpa*, popularmente denominada de maracujazeiro amarelo ou azedo, que representa 95% dos pomares e é a referência para as estatísticas nacionais de produção, área cultivada e produtividade (Meletti & Bruckner, 2001).

A comercialização do maracujá é realizada na forma de fruto “in natura” e pelo suco concentrado, o qual é o mais importante produto de exportação, embora existam uma série de subprodutos provenientes do maracujá (Manica, 1981).

Os maiores produtores mundiais de maracujá são Brasil, Colômbia, Peru e Equador, sendo os três últimos os maiores exportadores de suco concentrado e polpa de maracujá; os países Africanos (Quênia, Zimbábue, África do Sul e Burundi) são grandes produtores de frutos de cor roxa, enquanto os países americanos (Brasil, Colômbia, Peru e Equador) são produtores de frutos de cor amarela (Lima, 2002).

A cultura do maracujazeiro apresenta grande relevância social, uma vez que esta fruteira é cultivada predominantemente em pequenos pomares (Lima & Cunha, 2004).

A elevação da produtividade e da qualidade dos frutos do maracujazeiro pode ser obtida de maneira relativamente fácil, pela associação da irrigação com a polinização artificial, além de outras tecnologias de produção recomendadas para a cultura. A utilização destas técnicas pode elevar a produtividade dos pomares de 22 t/ha/ano (plantios tradicionais bem conduzidos) para níveis de até 50 t/ha/ano (Meletti & Maia, 1999).

O cultivo do maracujazeiro no Brasil em escala comercial iniciou-se na década de sessenta, com a espécie *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. Além desta, outras espécies são difundidas e comercializadas no Brasil: *P. alata*, *P. quadrangularis*, *P. caerulea* e *P. laurifolia* (Lima, 2002). A cultura adquiriu expressão econômica na década de 80, principalmente pelo incentivo da agroindústria, que estimulou o mercado do produto processado na forma de suco. Em seguida, a crescente demanda no segmento "in natura" ampliou o mercado interno de forma bastante significativa. Assim, a partir de 1986 observou-se incremento constante na área cultivada, resultante da

popularização do consumo de frutas "in natura" junto aos grandes centros (Rizzi et al., 1998).

A década de 90 foi marcada pela valorização do preço da fruta fresca e a modificação do hábito de consumo. Por longo período, cerca de 30% da produção era destinada ao mercado de fruta fresca e 70% para a indústria de sucos. Ocorreu então uma inversão no consumo e por volta de 1998 mais da metade da produção nacional destinava-se ao mercado interno de frutas (Silva, 1998).

O maracujazeiro é hoje a décima quinta espécie frutífera mais cultivada no Brasil (FNP, 2005).

2.2 Endurecimento dos frutos do maracujazeiro

No Brasil, esta doença foi observada pela primeira vez em plantios comerciais de maracujazeiro amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa*) e maracujazeiro doce (*P. alata*), no estado da Bahia, no final da década de 70 (Chagas et al., 1981; Yamashiro & Chagas, 1979), e atualmente encontra-se disseminada por todas as regiões produtoras do país.

O PWV é uma espécie do gênero *Potyvirus*, cujas partículas são do tipo flexuoso, com 670-750 nm de comprimento e 12 nm de diâmetro, apresentando RNA de fita simples e senso positivo. O vírus produz no citoplasma das células infectadas inclusões lamelares típicas de potyvirus (Taylor & Greber, 1973). Seu RNA é constituído de aproximadamente 10.000 nucleotídeos, com uma única seqüência aberta de leitura (ORF), que origina uma única poliproteína com aproximadamente 350 Kda. Essa proteína é processada mediante proteinases contidas na própria poliproteína e subdividida em unidades funcionais (Carrington et al., 1990). Uma característica das proteínas produzidas pelos potyvirus é o seu caráter multifuncional, uma vez que praticamente todas as

proteínas com funções já determinadas atuam em mais de um processo no ciclo de infecção viral (Zerbini & Zambolin, 1999).

No Brasil, há relatos de incidência do PWV variando de 60% a 80% em plantios comerciais na região da Serra da Ibiapaba, no Estado do Ceará (Bezerra & Lima, 1992). Em São Paulo, estudos realizados por Gioria et al. (2000) indicaram que a incidência média do PWV foi de 71,8%, variando de 55,5% a 84,5% nos pomares analisados.

Os isolados virais brasileiros relacionados com a doença do endurecimento dos frutos do maracujazeiro foram considerados pertencentes a espécies PWV, com base em características serológicas e biológicas (Inoue et al., 1995; Costa 1996). Entretanto, um estudo de sequenciamento de nucleotídeos do gene que codifica a proteína capsial do PWV de diferentes isolados brasileiros, conduzido por Santana (2001), mostrou que estes apresentaram uma alta homologia entre si, e maior homologia com o *Cowpea aphid born mosaic virus*, do que com o *Passionfruit woodiness virus* da Austrália, mostrando que os isolados brasileiros do PWV não pertencem a mesma espécie que os australianos.

Os principais sintomas apresentados pelo vírus do endurecimento do fruto do maracujazeiro são: mosaico foliar, com intensidade variável podendo ser acompanhado de manchas anelares, bolhas, rugosidades e deformações no limbo foliar; as plantas apresentam um retardamento no crescimento e os internós se mostram mais curtos; no fruto observa-se um espessamento e endurecimento no pericarpo e redução na cavidade da polpa, além de deformidades e redução considerável do tamanho (São José, 1994). A temperatura influencia diretamente a intensidade dos sintomas, sendo estes mais pronunciados nas épocas frias do ano (Ruggiero et al., 1996).

Mesmo pertencendo a espécies diferentes, segundo São José (1994) os sintomas causados pelos isolados brasileiros do PWV são muito semelhantes àqueles descritos na Austrália, onde o vírus foi primeiramente relatado em 1953.

No campo a transmissão natural do PWV ocorre por meio de afídeos. As espécies *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *A. solanella*, *Toxoptera citricidus*, *Uroleucon ambrosiae* e *Uroleucon sonshii* já foram relatadas como vetores (Costa et al., 1995), sendo que a relação vírus-vetor é do tipo não persistente (Taylor & Greber, 1973). O vírus não é transmitido por sementes, mas pode ser transmitido por enxertia e também mecanicamente (Ruggiero et al., 1996).

Os prejuízos ocasionados pelo PWV na cultura do maracujazeiro são queda de produtividade, produção de frutas sem valor comercial e redução na vida econômica do pomar. Em São Paulo, estudos quantitativos sobre o efeito do PWV no desenvolvimento e na produção do maracujazeiro foram realizados em plantas inoculadas com 5 estirpes do PWV, de diferentes origens, em condições de casa de vegetação e os resultados mostraram redução na área foliar da ordem de 50%, quando comparadas com plantas sadias da mesma idade. Quanto ao efeito do vírus na produção, os autores constataram que plantas inoculadas aos 2, 4, 6 e 8 meses após o transplante, em condições de telado em campo (Vera Cruz, SP), tiveram produções médias de 2,4; 3,4; 6,9 e 12,9 kg, respectivamente, na colheita durante 5 meses (Gioria et al., 2000).

O controle desta virose pode ser realizado pela eliminação sistemática das plantas com sintomas e substituição por mudas sadias, como é feito em Taiwan (Chang et al., 1992). Entretanto espécies silvestres de *Passiflora* e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) constituem-se um reservatório natural do vírus (Taylor & Greber, 1973), o que torna esse tipo de controle dispendioso e a erradicação do vírus impossível.

Na Austrália, o controle tem sido realizado pela utilização de híbridos de maracujazeiro roxo (*P. edulis*) e maracujazeiro amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa*), que são tolerantes a doenças (Taylor & Greber, 1973), associados à pré-imunização com isolados fracos (Simmonds, 1959). A utilização de híbridos de maracujazeiro roxo e maracujazeiro amarelo não é relatada no Brasil, uma vez que os frutos destes apresentam o inconveniente da coloração arroxeadada e um tamanho reduzido, não sendo atrativos ao consumidor brasileiro.

No Brasil, tentativas de pré-imunização com seis estirpes brasileiras fracas do PWV foram realizadas por Novaes & Rezende (2003), porém os resultados não foram promissores, pois não houve a promoção de resistência contra a infecção por estirpes comuns. Aparentemente, essa falha na proteção está associada a baixa concentração e/ou distribuição irregular das estirpes fracas do vírus na planta.

A utilização de inseticidas no controle dos vetores responsáveis pela transmissão do vírus do endurecimento dos frutos não é realizada devido ao tipo de transmissão não persistente, uma vez que o sucesso no controle de viroses é normalmente obtido quando a relação de transmissão é do tipo persistente, sendo o controle químico normalmente ineficiente em viroses transmitidas de forma não persistente (Perring et al., 1999).

A exploração da variabilidade genética de espécies de *Passiflora* poderia contribuir para o estabelecimento de cultivares resistentes. Há relatos de fontes de resistência em espécies não comerciais (*P. suberosa*), mas os programas de melhoramento convencionais são dificultados por características de auto-incompatibilidade, incompatibilidade cruzada e esterilidade masculina (Costa, 1996).

Diante deste cenário problemático para o controle desta fitovirose uma opção é a utilização de plantas transgênicas, contendo parte do genoma viral. A obtenção de plantas de maracujazeiro contendo parte do genoma viral do PWV foi relatada por Alfenas et al., (2005).

2.3 Resistência derivada do patógeno

A biologia molecular e as técnicas da engenharia genética tornaram possível a utilização de novos mecanismos para a obtenção de plantas resistentes a patógenos. A hipótese de que a resistência a um certo patógeno pode ser obtida de seu próprio material genético é denominada resistência

derivada do patógeno (RDP) e teve o seu conceito teórico proposto por Sanford & Johnston (1985).

A transformação genética de plantas com diferentes partes do genoma viral pode conferir resistência ao vírus da qual a seqüência foi derivada ou a vírus relacionados. A vantagem desse sistema é que genes virais com potencial para conferir resistência são mais fáceis de serem isolados e clonados do que genes de resistência derivados de plantas (Grumet, 1990).

O primeiro relato de plantas transgênicas com resistência derivada do patógeno foi feito com plantas de fumo expressando a proteína do capsídeo do *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Powell et al., 1986).

Dentre as estratégias utilizadas na obtenção de plantas transformadas com parte do genoma viral podemos citar a utilização do gene que codifica para a proteína do capsídeo, o gene da replicase viral, o gene que codifica para proteínas envolvidas no movimento do vírus na planta, o uso do RNA antisense, o uso de RNA satélite e o uso RNA defectivo interferente (Torres et al., 1999). Destes, o gene que codifica para a proteína capsidial tem sido o mais utilizado, em parte por ser a primeira estratégia descrita e também por fornecer amplo espectro de resistência, quando comparada a outros genes virais (Santana, 2001).

Resultados de diferentes trabalhos são contraditórios quando correlacionam o grau de expressão da proteína do capsídeo viral em plantas geneticamente modificadas, e o grau de resistência adquirido. Em alguns casos parece ocorrer uma correlação direta entre concentração da proteína funcional do capsídeo viral e eficiência de proteção obtida (Resende, 1994). Como exemplo cita-se o caso de plantas de tomateiro onde a expressão de baixo nível de proteína da capa protéica do CMV resultou em suscetibilidade à infecção, enquanto aquelas com alto nível dessa proteína apresentaram resistência (Kaniewski & Lawson, 1998). Porém a necessidade da expressão da proteína intacta não foi verificada em plantas de tabaco transformadas com as duas proteínas do capsídeo do *Andean potato mottle virus* (APMoV). Neste caso as

plantas com baixo nível de expressão do transgene apresentaram uma maior resistência (Neves–Borges et al., 2001).

Em plantas de *Nicotiana benthamiana* transformadas com o gene n do *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) a resistência foi obtida sob as duas condições, linhagens com alto nível de expressão da proteína do capsídeo viral apresentaram resistência parcial, via atraso no desenvolvimento de sintomas, enquanto linhagens com baixo nível do transcrito apresentaram resistência total (Vaira et al., 1995).

Essa falta de correlação entre o nível de expressão de proteínas virais e a resistência adquirida em plantas transgênicas indica que possivelmente existe mais de um mecanismo governando a resistência. A resistência em plantas transgênicas transformadas com parte do genoma viral pode ser obtida pela expressão da proteína viral e interferência desta em alguma etapa da infecção viral ou pela ativação do mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (Pos-transcriptional gene silencing - PTGS) responsável pela degradação do RNA viral.

Resistência mediada pela capa protéica (CP) é o termo utilizado para se referir a resistência obtida pela expressão do gene do capsídeo de vírus em plantas transgênicas (Resende, 1994). Register & Beachy (1988) propuseram que a resistência derivada do patógeno proveniente da expressão do gene do capsídeo viral é efetivada pela inibição do desencapsulamento do vírus nas células inicialmente infectadas. Wilson & Watkins (1986) em experimentos "in vitro" demonstraram que a expressão da proteína do capsídeo viral pode bloquear o desencapsulamento.

Entretanto, a resistência derivada do patógeno proveniente da expressão do gene do capsídeo do *Potato virus X* (PVX) é efetiva tanto contra a partícula viral como contra o RNA isolado, indicando que outros processos podem estar relacionados com a promoção de resistência (Hemenway et al., 1988).

De maneira geral as plantas que apresentam resistência mediada pela expressão da proteína viral não são resistentes à inoculação com alta concentração da partícula viral e ao RNA isolado.

O silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) é o outro mecanismo pelo qual a resistência pode ser obtida em plantas transgênicas. Esse fenômeno ocorre no RNA e pode apresentar o potencial de suprimir o acúmulo de RNA que possua uma seqüência homóloga a do gene silenciado (Baulcombe, 1996). O PTGS é um mecanismo de degradação de RNA dirigido por seqüências específicas e é considerado responsável por imunidade à infecção em muitas plantas transgênicas que contêm genes virais (Mitter et al., 2001). Esse mecanismo foi primeiramente relatado em plantas transgênicas de petúnia, quando a introdução de um transgene levou a inativação do transgene e de genes endógenos homólogos, fenômeno denominado de co-supressão (Napoli et al., 1990). A redução nos níveis de mRNA detectados após a ativação do PTGS não está relacionada com a diminuição na taxa de transcrição, e sim com a degradação do mRNA formado (De Carvalho et al., 1995). O silenciamento ocorre pela degradação do RNA mensageiro e não afeta a transcrição do *locus* gênico envolvido (Yu & Kumar, 2003).

A infecção de um vírus em plantas pode disparar o mecanismo de PTGS. A indução do silenciamento por meio da replicação viral foi denominada *virus induced gene silencing* (VIGS) (Kumagai et al., 1995) e é considerado um mecanismo natural de resistência a viroses em plantas.

Em plantas o silenciamento do RNA não está associado apenas ao mecanismo de defesa, mas também participa na regulação da expressão de genes endógenos em uma grande variedade de processos durante o desenvolvimento vegetal (Yu & Kumar, 2003).

O PTGS não é totalmente efetivo, alguns vírus codificam proteínas capazes de suprimi-lo, é o caso do *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) que foi capaz de superar a resistência por PTGS em tabaco (Mitter et al., 2003). Em outro exemplo plantas transgênicas de tabaco (*N. benthamiana*), apresentando PTGS,

voltaram a expressar o gene silenciado quando inoculadas com o *Cucumber mosaic virus* (CMV) ou o *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) (Simon-Mateo et al., 2003).

A habilidade de alguns vírus de plantas em suprimir o PTGS é provavelmente um mecanismo de contra-defesa ao mecanismo de resistência de plantas a vírus via PTGS (Mitter et al., 2001).

Em alguns casos plantas transgênicas expressando o gene viral e não resistentes apresentam após a inoculação um fenótipo conhecido como recuperação. Esse fenótipo é função do acionamento do PTGS. Simon-Mateo et al. (2003) obtiveram em tabaco (*N. benthamiana*), expressando a proteína Nib mutante do *Plum pox virus* (PPV), o fenótipo de recuperação após a inoculação com o PPV.

Nem todos os genes virais são capazes de induzir a resistência via expressão da proteína. Mlotshwa et al. (2002) relatam um aumento na severidade dos sintomas inoculando plantas de tabaco (*N. benthamiana*), transformadas com o gene “helper component – proteinase (HC-Pro)”, com o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). A resistência foi obtida apenas nas plantas que apresentaram baixa concentração de RNA transcrito, ou seja, pelo PTGS.

Estudos demonstram que a introdução do gene do capsídeo viral em plantas pode conferir resistência não apenas ao isolado do vírus doador do gene, mas também a outros isolados e mesmo a espécies relacionadas. É o caso de plantas de tabaco expressando os genes do capsídeo do *Watermelon mosaic virus* (WMV) (sin. *Watermelon mosaic virus – 2*) e do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), que mostraram algum grau de resistência quando inoculadas com o WMV e mais outros seis *Potyvirus*: *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Potato y virus* (PYV), *Pea mosaic virus* (PeaMV), *Clover yellow vein virus* (CYVV), *Pepper mottle virus* (PeMV) e *Tabacco etch virus* (TEV) (Namba et al., 1992).

No caso do *Potyvirus* causador do endurecimento dos frutos de maracujazeiro, Yeh & Chu (1996), em Taiwan, demonstraram que a expressão do gene da proteína capsidial, em plantas de *N. benthamiana*, conferia resistência à infecção com o PWV e duas outras linhagens apresentavam atraso no aparecimento dos sintomas. No Brasil, Alfenas et al. (2005) produziram plantas transgênicas de maracujazeiro expressando um mRNA correspondente a parte dos genes *nib* e *cp* de um isolado do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro, proveniente de Minas Gerais. Destas plantas apenas uma linhagem apresentou certo grau de resistência ao PWV, específica para o isolado utilizado, não conferindo um amplo espectro de proteção.

A obtenção de plantas transformadas com proteínas de capsídeo virais apresentando resistência a vírus já foi descrita para muitas espécies, como ameixeira *Prunus domestica* para o *Plum pox virus* (PPV) (Ravelonandro et al., 2000), abóbora (*Cucurbita pepo*) para o *Squash mosaic virus* (SqMV) (Provvidenti & Tricoli, 2002), videira (*Vitis sp.*) para o *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) (Mauro et al., 1995) e batata (*Solanum tuberosum*) com a proteína do capsídeo viral do *Lettuce mosaic virus* (LMV) obtendo resistência contra o *Potato virus Y* (PVY) (Hassairi et al., 1998).

Plantas transgênicas com resistência a vírus já foram liberadas comercialmente em outros países. Em 1995, uma variedade de abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* L.) transgênica, denominada *Freedom II*, resistente ao *Zucchini yellow mosaic virus* e ao *Watermelon mosaic virus* foi aprovada para comercialização nos Estados Unidos (Tricoli et al., 1995). Esta parece ter sido a primeira planta transgênica resistente a vírus liberada comercialmente. Em 1998, duas variedades de mamoeiro (*Carica papaya* L.) transgênicas resistentes ao *Papaya ringspot virus* – type P foram liberadas para comercialização no Hawaii, USA (Manshardt, 1998).

2.4 Cultura de tecidos “in vitro” e transformação genética em *Passiflora*

Um dos pré-requisitos para o uso da tecnologia de transferência de genes em espécies vegetais é a disponibilidade de um sistema eficiente de regeneração de plantas a partir da cultura de tecidos.

A técnica de cultura de tecidos têm sido estudada para diversas espécies de maracujazeiro, tanto na micropropagação pela cultura de segmento nodal e internodal (Biasi et al., 2000), como na morfogênese pelo cultivo de discos de folha (Vestri et al., 1990; Kawata et al., 1995) segmentos de cotilédone (Dornelas & Viera, 1994) e segmentos de hipocótilo (Monteiro, 2005). Com o objetivo de auxiliar programas de melhoramento genético, a cultura de protoplastos (d’Ultra Vaz et al., 1993; Dornelas & Vieira, 1993) que permite a obtenção de híbridos somáticos (Dornelas et al., 1995; Otoni et al., 1995), e a transformação genética (Manders et al., 1994; Hall et al., 2000; Takahashi, 2002; Alfenas et al., 2005; Monteiro, 2005) também tem sido utilizados.

As espécies do gênero *Passiflora* têm se mostrado responsivas ao cultivo “in vitro”, tendo-se obtido sucesso na formação de gemas adventícias em *P. edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. mollissima*, *P. giberti*, *P. amethystina* e *P. caerulea* (Moran Nobles, 1978; Vestri et al., 1990; Dornelas & Vieira, 1994); na regeneração de plantas a partir de protoplastos de *P. edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. amethystina*, *P. cincinnata* (d’Ultra Vaz et al., 1993; Dornelas & Vieira, 1993), além da produção de híbridos somáticos entre *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. incarnata*, por eletro fusão (Otoni et al., 1995), e entre *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. alata*, *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. amethystina*, *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. cincinnata*, *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. giberti* e *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. coccinea*, por fusão química (Dornelas et al., 1995).

Independentemente do explante utilizado, sabe-se que a suplementação do meio de cultura com citocininas favorece a organogênese (Apezato-da-Gloria et al., 1999; Dornellas & Vieira, 1994; Monteiro et al., 1996; Biasi et al., 2000), enquanto que a suplementação do meio de cultura com auxinas (ácido

naftalenoacético), mesmo em combinação com citocininas, promove a diminuição na formação de gemas e o estímulo à formação de calos e raízes (Dornellas & Vieira, 1994; Appezzato-da-Gloria et al., 1999).

A organogênese no maracujazeiro também pode ser obtida com o uso da difeniluréia thidiazurom (TDZ), um composto que apresenta efeito semelhantes a citocinina, conforme relatado por Trevisan & Mendes (2005), que obtiveram o desenvolvimento de gemas adventícias em discos de folha cultivados em meio de cultura suplementado com 0,25 mg/L de TDZ.

O maracujazeiro é uma espécie que produz alta taxa de etileno, um regulador vegetal gasoso (Ludford, 1995). Em cultura de tecidos a produção em excesso de etileno pode levar ao acúmulo do regulador nos frascos de cultura, dificultando o desenvolvimento dos explantes e a morfogênese “in vitro” (Roustan et al., 1992). A influência da presença de etileno no cultivo “in vitro”, diminuindo a taxa de regeneração de plantas tem sido verificada em diversas espécies como amendoim (Pestana et al., 1999), maracujazeiro (Faria & Segura, 1997), melão (Routan et al., 1992) e caupi (Brar et al., 1999). O uso de inibidores da ação de etileno como nitrato de prata (Roustan et al., 1992; Brar et al., 1999), ou de inibidores da biossíntese do etileno, como cloreto de cobalto (Brar et al., 1999), na composição do meio de cultura de tecido, pode favorecer a morfogênese, aumentando a taxa de regeneração de plantas. Em maracujazeiro, a utilização de inibidores da ação de etileno, tiosulfato de prata (Faria & Segura, 1997) e nitrato de prata (Trevisan & Mendes, 2005) apresentaram efeitos favoráveis ao cultivo “in vitro”.

A caracterização morfológica e histológica do desenvolvimento de culturas “in vitro” de maracujazeiro, incubado em meio de cultura suplementado com BAP, indicou que aos 14 dias de cultura ocorre a formação de centros meristemáticos e aos 28 dias a formação de gemas adventícias nestes centros (Appezzato-da-Gloria et al., 1999). A formação de embriões somáticos em estágio inicial de desenvolvimento foi observada associada a gemas adventícias em meio de cultura suplementado com BAP ou TDZ (Monteiro-

Hara, 2000). O estudo da organogênese em meio de cultura suplementado com BAP e água de coco (5%), associado à análise histológica das estruturas regeneradas permitiu observar que parte destas são primórdios foliares e não possuem meristema apical (Takahashi, 2002).

A disponibilidade de protocolos eficientes de cultura de tecidos em maracujazeiro permite a utilização de técnicas de transformação genética visando à introdução de genes de interesse agrônômico. A transformação genética de maracujazeiro foi relatada com a introdução do gene *attA* via transformação direta, biobalística (Takahashi, 2002), e via *Agrobacterium* (Monteiro, 2005). Já Alfenas et al. (2005) obtiveram plantas transgênicas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, contendo parte do genoma do PWV, e obtiveram certo nível de resistência apenas ao isolado doador da seqüência utilizada na transformação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Sementes de maracujá azedo (*P. edulis* f. *flavicarpa*), das variedades IAC-277 (“in natura”) e IAC-275 (indústria), obtidos junto ao Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), foram germinadas em bandejas plásticas contendo substrato (Plantmax - hortaliças), em ambiente com luz e temperatura controladas (16 h de luz / $27 \pm 1^\circ\text{C}$). As plantas obtidas foram mantidas neste mesmo ambiente e utilizadas como fonte de explantes. Os explantes constituíram-se de discos de folhas jovens (6 mm), extraídos com o auxílio de um vazador de rolha e foram incubados com a face adaxial em contato com o meio de cultura. A assepsia das folhas foi realizada em solução de hipoclorito de sódio (0,5%), por 20 min. Após a assepsia as folhas foram lavadas (3x) com água destilada autoclavada, em condições assépticas.

3.2 Construção do vetor de expressão

O cassete de expressão constituiu-se do promotor CaMV35S duplicado, do gene que codifica a proteína do capsídeo do PWV, isolado São Paulo, e do terminador NOS. O gene da proteína capsidial do PWV foi clonado no Laboratório de Virologia, do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola - ESALQ/USP, sob a supervisão do professor Dr. Jorge A. M. Rezende.

Os vetores utilizados para construção do vetor binário contendo o gene de interesse foram os plasmídeos pCambia 2300 e pCambia 2301, ambos contendo o gene de seleção *npII* (resistência ao antibiótico canamicina), como marcador para a bactéria e para a planta. O plasmídeo pCambia 2301 também contém o gene repórter *uidA* (GUS). Estes plasmídeos são vetores binários e contém as bordas esquerda e direita da região de transferência do plasmídeo de *Agrobacterium tumefaciens*. Os plasmídeos pCambia 2300 e pCambia 2301 contidos em *Escherichia coli* estirpe JM 109, foram obtidos no Departamento de Genética - Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas - Professora Dra. Maria L. C. Vieira, ESALQ/USP.

A extração dos plasmídeos foi realizada com auxílio do kit de extração “Wizard Preps DNA Purification Systems (Promega Madison, USA)”, seguindo-se as orientações do fabricante. Posteriormente, os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* (Promega), em reação simultânea, seguindo-se as instruções do fabricante. Os plasmídeos digeridos foram separados dos fragmentos liberados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, em tampão 0,5x TBE, a 2,8 V/cm, e purificados com auxílio do kit “QIAquick Gel Extraction” (Qiagen Chatsworth, USA), seguindo-se as orientações do fabricante. Os vetores digeridos e purificados foram quantificados em gel de agarose. A reação de ligação foi realizada na proporção de 3:1 inserto vetor (ng), 2 μ L do tampão (5x) e 1 μ L de T4 DNA ligase, para um volume final de 20 μ L, mantida a 15 °C, por 16 h.

Após a reação de ligação os plasmídeos foram inseridos em *E. coli* JM 109, pelo método de “choque térmico” (Brasileiro & Carneiro, 1998). As colônias bacterianas foram selecionadas em meio de cultura YEP (peptona 10 g, extrato de levedura 10 g, NaCl 5 g, agar 10 g), contendo o antibiótico canamicina (100 mg/L).

Para análise dos transformantes bacterianos, as colônias obtidas foram individualizadas e analisadas por PCR, utilizando-se “primers” específicos para detecção do gene da capa protéica do PWV, P1 = 5' – GGAGCTCATGTCTGA

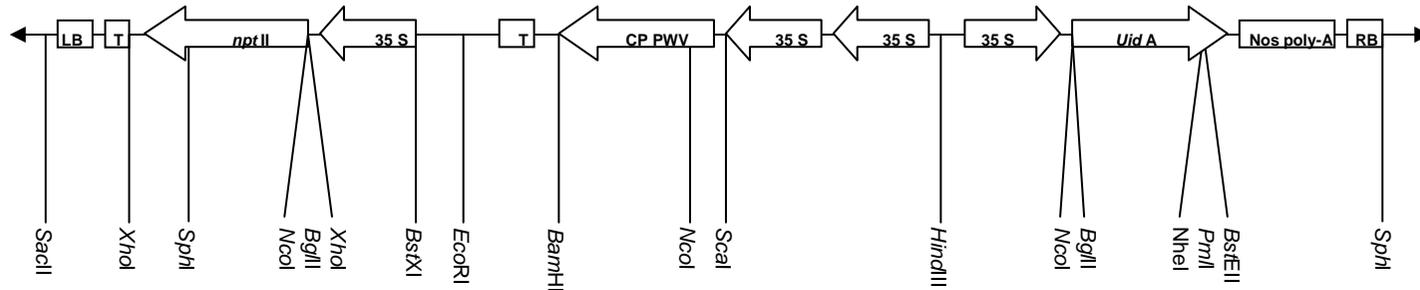
TG(G/A)AA(A/G)GGACAA - 3' e P2 = 5' – GGGATCCTCACTGCCCCATGCGTCA T - 3'. As reações de PCR foram realizadas com o programa 2 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 1 min a 52 °C, e 1 min a 72 °C, mais um ciclo de 1 min a 72 °C. As reações de PCR foram conduzidas em termociclador PTC-100 (MJ Research).

As colônias selecionadas tiveram seu plasmídeo extraído e digeridos com enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, para confirmação da ligação. Os plasmídeos foram renomeados para pCambia 2300-PWV e pCambia 2301-PWV, e inseridos em duas estirpes de *Agrobacterium*, EHA-105 (Hood et al., 1993) e LBA-4404 (Hoekema et al., 1983), pelo método de “choque térmico” (Brasileiro & Carneiro, 1998). A Figura 1 mostra um esquema da região de transferência dos vetores binários pCambia 2300-PWV e pCambia 2301-PWV. As colônias transformadas foram selecionadas em meio de cultura YEP, contendo 50 mg/L canamicina + 50 mg/L rifampicina. A análise das colônias obtidas foi realizada por PCR como descrito anteriormente. As colônias transformadas foram cultivadas em meio de cultura YEP, suplementado com o antibiótico de seleção, e armazenadas em glicerol (50%), a - 80°C.

3.3 Cultura e manutenção dos isolados de *Agrobacterium*

O cultivo de *Agrobacterium* estirpes EHA-105 e LBA-4404, para a realização dos experimentos de transformação genética de maracujazeiro, realizou-se em meio de cultura YEP, suplementado com canamicina (50 mg/L) e rifampicina (50 mg/L). O inóculo, obtido a partir de uma colônia isolada, foi transferido para meio de cultura YEP líquido suplementado com canamicina (50 mg/L) e rifampicina (50 mg/L), incubando-se por 16 h, em agitador orbital (28 °C/180 rpm). A absorbância foi medida em OD 600, sendo utilizada a faixa de leitura entre 0,5 e 1 nm. A suspensão bacteriana foi centrifugada (5000 rpm/15 min, 15 °C), e o precipitado formado resuspendido em meio de cultura MS, na concentração de 5×10^8 UFC/mL.

a) T-DNA do pCambia 2301-PWV (7532 pb)



b) T-DNA do pCambia 2300-PWV (4653 pb)

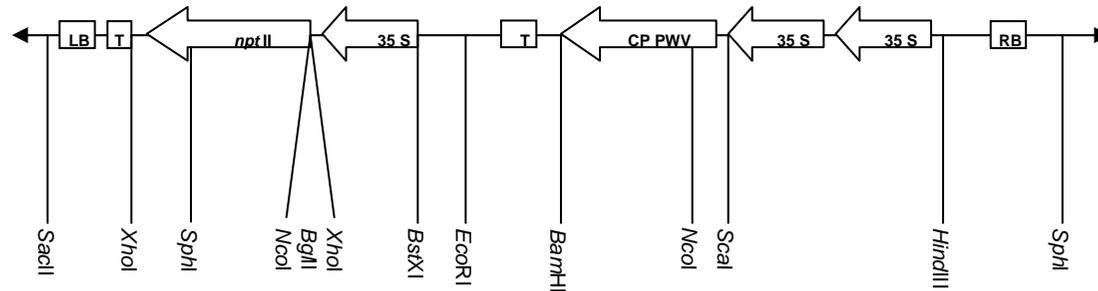


Figura 1- Esquema da região de transferência (T-DNA) dos vetores binários. a) pCambia 2301-PWV; b) pCambia 2300-PWV. LB: borda esquerda, T: NOS-TER sinal de término de expressão, 35S: Promotor constitutivo CaMV-35S, *nptII*: região codificadora do gene *nptII*, CP-PWV: região codificadora da proteína do capsídeo do PWV, *uidA*: região codificadora do gene repórter *uidA*, Nos poly-A: sinal de término de expressão, RB: borda direita

3.4 Efeito do antibiótico cefotaxime na organogênese “in vitro”

O antibiótico cefotaxime é normalmente utilizado em experimentos de transformação genética via *Agrobacterium* durante a etapa de seleção, com a função de controlar a multiplicação da *Agrobacterium*. O objetivo do experimento foi avaliar o efeito da presença do antibiótico cefotaxime no meio de cultura, e o seu efeito sobre a organogênese em maracujazeiro.

Os explantes constituíram-se de discos de folhas jovens, coletados de maracujazeiro variedades IAC-275 e IAC-277. Esses foram incubados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com TDZ (0,25 mg/L) + AgNO₃ (4 mg/L) + cefotaxime (0, 250 e 500 mg/L). O material foi incubado no escuro, por um período de 4 semanas, à temperatura de 27°C. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 4 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri (100 x 15 mm), contendo 10 explantes.

A avaliação foi realizada com o auxílio do microscópio estereoscópico, determinando-se o número de explantes que apresentaram o desenvolvimento de gemas adventícias.

3.5 Sensibilidade de explantes ao antibiótico canamicina

O antibiótico canamicina é um dos agentes seletivos mais utilizados em experimentos de transformação genética de plantas. Em maracujazeiro normalmente a dose de 100 mg/L é observada como suficiente para reprimir indução de brotações. O objetivo do experimento foi selecionar uma dose de canamicina capaz de inibir a regeneração de brotos nas variedades IAC-275 e IAC-277.

Os explantes constituíram-se de discos de folhas jovens coletados de maracujazeiro variedades IAC-275 e IAC-277, os quais foram incubados em

meio de cultura MS, suplementado com TDZ (0,25 mg/L) + AgNO₃ (4 mg/L) + canamicina (100, 125 e 150 mg/L). O material foi incubado no escuro, por um período de 4 semanas, à temperatura de 27 °C. O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso, com 5 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri (100 x 15 mm), contendo 10 explantes.

A avaliação foi realizada com o auxílio do microscópio estereoscópico, determinando-se o número de explantes que apresentaram o desenvolvimento de gemas adventícias.

3.6 Transformação genética e regeneração de plantas

3.6.1 Inoculação e co-cultivo com *Agrobacterium*

Discos de folha coletados de folhas jovens (6 mm) foram inoculados com a suspensão bacteriana na concentração de 5×10^8 UFC/mL por um período de 20 min. Após a inoculação, os discos de folha foram secos em papel de filtro autoclavado, e incubados em placa de Petri (100 x 15 mm) contendo o meio de cultura MS + TDZ (0,25 mg/L) + AgNO₃ (4 mg/L) + acetoseringona (100 µM/L), em ausência de luz, à temperatura de 24 °C, por um período de 3 dias. O nitrato de prata foi esterilizado por filtração (0,22 µm) e adicionado ao meio de cultura após a autoclavagem.

3.6.2 Seleção e regeneração das plantas

Após o co-cultivo os explantes foram transferidos para meio de cultura de seleção, constituído do meio de cultura MS suplementado com TDZ (0,25 mg/L) + AgNO₃ (4 mg/L) + canamicina (100 mg/L) + cefotaxime (500 mg/L), incubado no escuro, à temperatura de 27 °C. A avaliação foi realizada após 4 semanas, determinando-se o número de explantes que desenvolveram gemas

adventícias. Estas permaneceram no meio de cultura de seleção por um período de 4 a 6 semanas, sendo posteriormente transferidas para o meio de cultura MSM (Monteiro, 2000) suplementado com água de coco (10%) + cefotaxime (500 mg/L) para alongamento e enraizamento. Tanto o alongamento quanto o enraizamento foram realizados em frascos tipo “Magenta”, contendo tampas ventiladas (vented lids/Sigma), sendo que a troca de meio de cultura foi realizada em intervalos de 15 dias.

Visando avaliar os fatores que influenciam a eficiência do processo de transformação genética foram realizados diferentes experimentos, de acordo com: 1) discos de folhas foram inoculados com as diferentes estirpes de *Agrobacterium* (EHA-105 ou LBA-4404); 2) discos de folhas foram co-cultivados nas temperaturas de 24 °C ou 27 °C; 3) suplementação da suspensão bacteriana utilizada para inoculação dos explantes e do meio de cultura de co-cultivo com acetoseringona (0 e 100 µM/L); 4) suplementação do meio de cultura de seleção com de cefotaxime (500 mg/L) ou timetin (300 mg/L), mantendo a mesma concentração durante as etapas de alongamento e enraizamento; 5) suplementação do meio de cultura de co-cultivo e seleção com TDZ (0,25 mg/L) ou BAP (1 mg/L); 6) suplementação do meio de cultura de seleção com o antibiótico canamicina (100, 125 ou 150 mg/L).

3.7 Análise das plântulas regeneradas

As plântulas regeneradas foram avaliadas por PCR e pelo teste histoquímico GUS. Para realização do teste histoquímico GUS, segmentos das plântulas desenvolvidas foram incubados em solução X-GLUC (Jefferson, 1987), durante 12 h, no escuro, à temperatura de 37 °C. A avaliação do teste foi realizada com o auxílio do microscópio estereoscópico, observando-se a presença de coloração azulada no tecido analisado.

Para detecção do gene da proteína capsial do PWV, a extração de DNA foi realizada pelo método de Doyle & Doyle (1990) e as reações de PCR

foram conduzidas em termociclador PTC-100 (MJ Research), utilizando-se "primers" específicos para a detecção do gene que codifica para a proteína do capsídeo do PWV, P1 = 5' – GGAGCTCATGTCTGATG(G/A)AA(A/G)GGACAA - 3' e P2 = 5' – GGGATCCTCACTGCCCATGCGTCAT - 3', gerando a amplificação de um fragmento de 850 pb. As reações de PCR foram realizadas com o programa 2 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 1 min a 52 °C, e 1 min a 72 °C, mais um ciclo de 1 min a 72 °C.

O cálculo da eficiência de transformação foi realizado considerando-se o número total de explantes de cada variedade introduzidos por experimento.

3.8 Aclimatização e multiplicação das plantas obtidas

Após o enraizamento as plântulas foram transferidas para vasos de 0,25 L contendo substrato (Plantmax - hortaliças) autoclavado, cobertas com saco plástico e incubadas sob fotoperíodo de 16 h de luz, à temperatura de 27 °C. A retirada do saco plástico foi gradual por um período de 30 dias. Terminado o período de aclimatização as plantas foram transferidas para vasos de 5 L e transferidas para casa de vegetação.

A multiplicação das plantas transgênicas obtidas foi realizada por estaquia. As estacas, coletadas das plantas matrizes, foram incubadas em uma solução de 50 mg/L de ácido indolbutírico (IBA), por um período de 20 minutos. Após este tratamento as estacas foram plantadas em vasos de 1 L e mantidas em casa de vegetação.

3.9 Análise de Southern blot

O DNA total foi extraído de folhas de plantas PCR positivas aclimatizadas, utilizando o produto comercial DNazol (Invitrogen Carlsbad, USA), seguindo as orientações do fabricante. Um total de 20 µg de DNA foi submetido a reação de digestão com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III e os

fragmentos gerados foram separados em um gel de agarose (1%) por eletroforese, transferidos para membrana de nylon Hybond-N⁺ (Amersham Pharmacia Biotech Little Chalfont, England) e fixada a 80 °C, por 2 h. As enzimas *Bam*HI e *Hind*III possuem um único sítio de reconhecimento dentro do T-DNA e fora da região do gene que codifica a proteína do capsídeo do PWV.

A sonda do gene da proteína capsidial do PWV foi preparada por PCR. O fragmento amplificado de 850 pb, correspondente ao gene do capsídeo do PWV, foi submetido a um gel de eletroforese 1%. O fragmento foi purificado com o auxílio do kit “QIAquick Gel Extraction” (Qiagen Chatsworth, USA) e submetido à marcação com auxílio do Kit “Gene Images™ Random Primer Labelling Module” (Amersham Biosciences Little Chalfont, England), seguindo-se as orientações do fabricante.

A detecção da sonda marcada foi realizada com o auxílio do kit “Gene Images CDP-STAR detection module” da (Amersham Biosciences Little Chalfont, England), através da sensibilização da chapa de raio X, de acordo com as instruções do fabricante.

3.10 Análise de Northern blot

O RNA total foi extraído de folhas de plantas PCR positivas aclimatizadas, utilizando o produto comercial TRIzol (Invitrogen Carlsbad, USA), seguindo as orientações do fabricante. Um total de 15 µg de RNA foram separados em eletroforese em gel denaturante de agarose, sendo posteriormente transferido por capilaridade para membrana de nylon Hybond-N⁺ (Amersham Pharmacia Biotech Little Chalfont, England), em SSC 10x, e imobilizado em luz ultravioleta, conforme descrito por Sambrook et al (1989).

A sonda do gene da capa protéica do PWV foi preparada por PCR e o fragmento amplificado de 850 pb correspondente à parte do gene do capsídeo do PWV, foi submetido a um gel de eletroforese 1% e purificado com o auxílio do kit “QIAquick Gel Extraction” (Qiagen Chatsworth, USA) e submetido à

marcação com auxílio do Kit “Gene Images™ Random Primer Labelling Module” (Amersham Biosciences Little Chalfont, England), seguindo-se as orientações do fabricante.

A detecção da sonda marcada foi realizada com o auxílio do “CDP-STAR detection system” da (Amersham Biosciences Little Chalfont, England), através da sensibilização da chapa de raio X, de acordo com as instruções do fabricante.

3.11 Análise de Western blot

3.11.1 Extração da proteína do capsídeo

Folhas de plantas PCR positivas foram maceradas em tampão 0,5 M TRIS (pH 6,8) na proporção de 0,5 g de tecido para 500 µL de tampão. Em seguida foi adicionado igual volume de tampão de dissociação (0,5 M TRIS, pH 6,8; dodecil sulfato de sódio (SDS) 3,8%; 2-mercaptoetanol 10%; azul de bromofenol 0,1%; glicerol 19%). A desnaturação da proteína do capsídeo foi realizada incubando-se as amostras em água fervente, por 5 min.

A análise da proteína do capsídeo foi feita por eletroforese, em gel de poliacrilamida contendo SDS. A identificação da proteína foi feita pela reação serológica, após transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose (Conci, 1999).

3.11.2 Eletroforese da proteína em gel SDS-PAGE

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo (SDS-PAGE), utilizando-se um aparelho “Bio Rad Mini Protean II”. O gel de separação constitui-se de acrilamina 12,5%, água destilada 32%, 1,5 M TRIS 25% (pH 8,8), SDS 0,1%, APS 0,1% e TEMED 0,05%, e o gel de empilhamento de acrilamina 4%, água destilada 72%, 1,0 M TRIS 12,5% (pH

6,8), SDS 0,1%, APS 0,1% e TEMED 0,076%. Cada canaleta do gel recebeu 10 μ L da amostra a ser analisada. Uma das canaletas recebeu 8 μ L do marcador de proteínas Full Range Rainbow, com peso molecular na faixa de 10 a 250 kDa (Amersham Life Science). Foi efetuada a eletroforese por 20 min, a 95 V. Em seguida a voltagem foi elevada para 125 V. A corrida foi interrompida quando as amostras alcançaram o final do gel.

3.11.3 Reação serológica

As proteínas separadas no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, empregando-se tampão de transferência (TRIS 0,3%, glicina 1,5%, metanol 20%). A transferência foi feita em um aparelho “BioRad Mini Trans-blot Cell”, por 90 min, a 0,25 mA. A membrana contendo as proteínas das amostras foi submetida a uma reação serológica, com antissoro contra a proteína capsidial do PWV. Inicialmente a membrana foi lavada por 2 a 3 min com TBS (0,002 M TRIS, pH 7,4; 0,15 M NaCl)/Tween 20 (0,05%). Em seguida foi incubada em TBS contendo 7,5% de leite em pó desnatado, por 30 min, à temperatura ambiente. A membrana foi transferida para uma suspensão de anticorpo policlonal específico contra o vírus testado, diluído 1:1.000 em TBS-Tween, contendo leite em pó desnatado 7,5%, e incubada sob agitação constante, durante 3 a 4 h, à temperatura ambiente. A membrana foi lavada por 2 a 3 min, 3 vezes consecutivas, com TBS. A seguir foi incubada por 2 a 3 h, sob agitação constante, à temperatura ambiente, em uma solução contendo imunoglobulina G (IgG) conjugada com fosfatase alcalina (Sigma A-8025), diluída 1:32.000 em TBS. Depois deste período a membrana foi lavada 3 vezes em TBS-Tween, durante 2 a 3 min cada vez. E posteriormente adicionado substrato “Nitro blue tetrazolium / 5-bromo-4-cloro-3-indoly” (NBT/BCIP) diluído em tampão fosfatase alcalina. A reação foi paralizada através da lavagem da membrana com água destilada.

3.14 Avaliação de resistência em plantas transformadas

Para determinação da pressão de inóculo de PWV a ser utilizada em experimentos de inoculação das plantas transgênicas obtidas, foi realizado um teste que constituiu-se na inoculação de mudas de maracujazeiro não transformados com diferentes diluições do isolado PWV-SP: 1:50, 1:100 e 1:200 (peso:volume) em três volumes de aplicação: 50 µL, 100 µL e 200 µL. Os inóculos foram obtidos pela maceração de folhas infectadas em almofariz, em presença de tampão fosfato de potássio (0,02 M, pH 7,0), suplementado com sulfito de sódio (0,02 M). As inoculações foram feitas nas folhas das plantas testes, previamente polvilhadas com carbureto de silício. O inóculo na concentração e volume selecionados foi aplicado sobre as folhas com auxílio de micropipeta e com o dedo indicador realizou-se a inoculação por fricção. Em seguida as folhas foram lavadas para retirar o excesso de abrasivo.

Para inoculação das linhagens transgênicas obtidas três isolados do vírus foram selecionados, PWV-SP, PWV-RJ e PWV-CE. Os clones obtidos foram submetidos a 3 inoculações sucessivas, de modo que fosse verificada a resistência em diferentes pressões de inóculo, em cada inoculação duas folhas foram inoculadas utilizando-se o volume e concentração determinados em cada folha. A primeira inoculação foi realizada com 50 µL da diluição 1:200, a segunda com 100 µL da diluição 1:100 e a terceira com 200 µL da diluição 1:50. Para cada inoculação foi realizado um controle da infectividade do inóculo com plantas não transformadas e sadias.

Para avaliar se as plantas obtidas apresentaram imunidade ao vírus, as linhagens T1, T2, T3.1, T3.2, T4, T5, T6 e T7 foram enxertadas em plantas de maracujazeiro infectadas com o isolado PWV-SP. Foram realizados duas enxertias para cada linhagem.

A avaliação das plantas inoculadas foi realizada após 20 dias de inoculação, com base na observação dos sintomas nas folhas das plantas infectadas e o intervalo entre as inoculações foi de aproximadamente 25 dias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma série de experimentos foram realizados no intuito de avaliar fatores que influenciam a eficiência do processo de transformação genética. Entretanto a baixa eficiência na regeneração de gemas adventícias ou no alongamento das gemas obtidas, não permitiu a obtenção de plantas transgênicas e conseqüentemente, a avaliação dos diferentes tratamentos testados foi prejudicada.

Assim os dados dos experimentos: discos de folhas co-cultivados nas temperaturas de 24 °C ou 27 °C; suplementação da suspensão bacteriana utilizada para inoculação dos explantes e do meio de cultura de co-cultivo com acetoseringona 0 e 100 µM/L; suplementação do meio de cultura de seleção com 500 mg/L de cefotaxime ou 300 mg/L de timetin; suplementação do meio de cultura de co-cultivo e seleção com 0,25 mg/L de TDZ ou 1 mg/L de BAP; suplementação do meio de cultura de seleção com 100, 125 ou 150 mg/L do antibiótico canamicina, não serão apresentados devido ao grande número de resultados negativos

4.1 Construção do vetor de expressão e transformação genética de bactérias

Os plasmídeos pCambia 2300 e pCambia 2301 foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, promovendo a linearização do plasmídeo e a liberação de um fragmento de 51 pb, correspondente ao sítio de múltipla clonagem. Os plasmídeos linearizados e o cassete de expressão do gene que

codifica a proteína do capsídeo do PWV foram utilizados na reação de ligação. O plasmídeo contendo o inserto foi então utilizado diretamente para transformação de *E. coli* JM 109, pelo método do “choque térmico”. As colônias transformadas foram identificadas por PCR. A Figura 2a mostra a amplificação de um fragmento de 850 pb, correspondente ao gene que codifica a proteína do capsídeo do PWV, confirmando a transformação genética de *E. coli*.

As colônias selecionadas por PCR tiveram seus plasmídeos digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, para a confirmação da inserção do gene. A Figura 2b mostra um gel de agarose evidenciando dois fragmentos um de 1839 pb, correspondente ao inserto contendo o gene do capsídeo do PWV, e um de 8691 pb correspondente ao plasmídeo pCambia 2300 linearizado. Após a confirmação da inserção do cassete de expressão os plasmídeos foram renomeados como pCambia 2300-PWV e pCambia 2301-PWV. Os plasmídeos contendo o gene que codifica a proteína do capsídeo do PWV foram utilizados para a transformação genética de *Agrobacterium*, estirpes EHA-105 e LBA-4404, pelo método do “choque térmico”. A Figura 2c mostra a identificação por PCR das colônias de *Agrobacterium* transformadas. As colônias transformadas foram cultivadas em meio de cultura YEP, suplementado com o antibiótico de seleção específica, e armazenadas em glicerol (50%), a - 80°C.

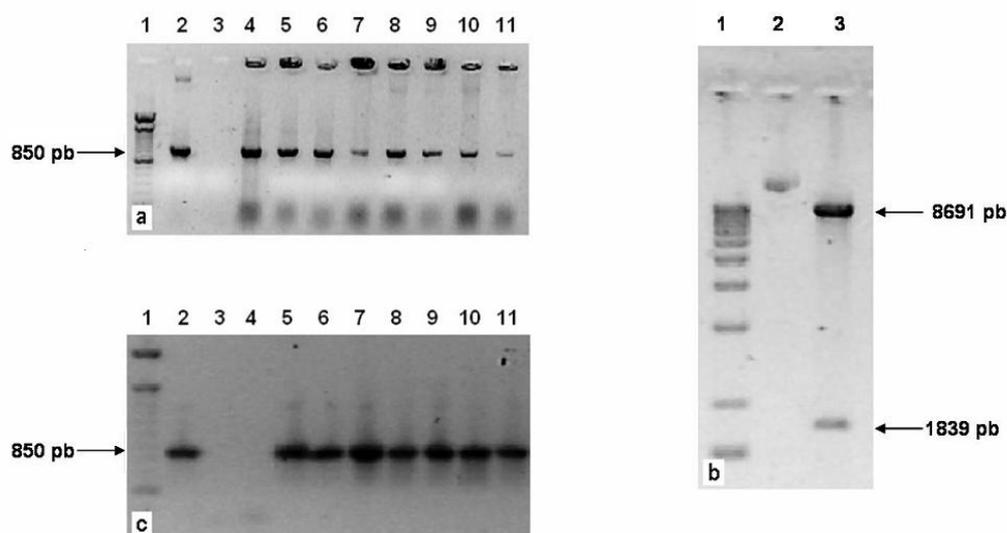


Figura 2 - Confirmação da clonagem do vetor binário e transformação genética de bactérias. a) Amplificação por PCR de fragmentos (850 pb) correspondente ao gene que codifica a proteína do capsídeo do PWV, em colônias de *E. coli* JM 109 confirmando a transformação com o vetor binário com o gene de interesse. 1: marcador molecular de 100 pb; 2: controle positivo (inserto); 3: controle negativo (célula competente de *E. coli* JM 109); 4 - 11: colônias transformadas com o vetor binário contendo o cassete de expressão; b) Análise do plasmídeo recombinante pCambia 2300-PWV. 1: marcador molecular de 1 Kb; 2: plasmídeo pCambia 2300-PWV; 3: plasmídeo pCambia 2300-PWV digerido com *EcoR* I e *Hind* III; c) Amplificação por PCR de fragmentos (850 pb) correspondente ao gene que codifica a proteína do capsídeo do PWV, de colônias de *Agrobacterium*. 1: marcador molecular de 100 pb; 2: controle positivo (inserto); 3: controle negativo (célula competente de *Agrobacterium*); 4: colônia de EHA-105 não transformada; 5 - 7: colônias de *Agrobacterium* EHA-105 transformadas; 8 - 11: colônias de *Agrobacterium* LBA-4404 transformadas

4.2 Efeito do antibiótico cefotaxime na organogênese “in vitro” de maracujazeiro

Em experimentos de transformação genética via *Agrobacterium*, após a inoculação e co-cultivo da bactéria com os explantes, estes são transferidos para um meio de cultura de seleção e regeneração, o qual é suplementado com antibiótico para controle da *Agrobacterium* (Torres et al., 1999). Os antibióticos mais utilizados para controlar a multiplicação de *Agrobacterium* são cefotaxime, carbenicilina e ampicilina.

Os antibióticos utilizados para o controle da *Agrobacterium* no meio de cultura podem influenciar o desenvolvimento normal dos explantes. Sarma et al. (1995) observaram efeitos deletérios como a redução na maturação de embriões somáticos de *Picea sitchensis* na presença de antibióticos como cefotaxime e carbenicilina. Em *Triticum aestivum*, a presença de cefotaxime estimula o crescimento inicial de calo, e os calos cultivados com cefotaxime são mais organogênicos (Raymond & Lesley, 1986). Pius et al. (1993) observaram em *Pennisetum americanum* estímulo no crescimento de calo e regeneração de plantas na presença do antibiótico cefotaxime. Em maracujazeiro d' Utra Vaz et al. (1993) constataram que a presença do antibiótico cefotaxime foi indispensável para sustentar a divisão celular em experimentos com protoplastos.

A fim de avaliar o efeito do antibiótico cefotaxime na organogênese "in vitro" de maracujazeiro, o meio de cultura para indução de gemas adventícias foi suplementado com diferentes concentrações do antibiótico, avaliando-se o número de explantes com gemas, após 4 semanas de incubação. A Tabela 1 mostra que a concentração de 250 mg/L de cefotaxime estimulou o desenvolvimento de gemas adventícias em discos de folhas de maracujazeiro nas duas variedades testadas. Esse estímulo na organogênese pode estar associado ao alto número de gemas escapes observados em experimentos de transformação genética de maracujazeiro.

Tabela 1. Organogênese “in vitro” de maracujazeiro, em meio de cultura de indução suplementado com o antibiótico cefotaxime (mg/L). (média de 4 repetições)

Variedade Cefotaxime	Nº de explantes com gemas / Nº total de explantes	
	IAC-275	IAC-277
0	5,2/10 a	3,5/10 a
250	9,5/10 b	9,25/10 b
500	7,7/10 ab	3,7 a
Desvio padrão	0,3098	0,3843
CV	11,07	16,23

Dados transformados para $(x + 0,5)^{1/2}$. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p = 0,05$).

4.3 Sensibilidade de explantes ao antibiótico canamicina

Em experimentos de transformação genética a integração do transgene ocorre normalmente em associação com um gene de seleção, o qual é responsável pela seleção das células transformadas. O gene que codifica a proteína neomicina fosfotransferase II (*npII*), que confere resistência ao antibiótico canamicina, é o gene de seleção mais utilizado em experimentos de transformação genética (Brasileiro & Dusi, 1999).

A seleção de plantas transgênicas em experimentos de transformação genética com maracujazeiro tem sido feita com o antibiótico canamicina (Manders et al., 1994; Alfenas et al., 2005) e com o herbicida fosfinotricina (Takahashi, 2002; Monteiro, 2005). O antibiótico canamicina tem sido utilizado em concentrações de 75 – 150 mg/L e o processo de transformação genética esta sempre associado ao desenvolvimento de plantas escapes.

O objetivo deste experimento foi avaliar a sensibilidade de explantes foliares das variedades de maracujazeiro IAC-275 e IAC-277 ao antibiótico canamicina e definir a concentração de canamicina a ser utilizada em experimentos de transformação genética. A Tabela 2 mostra que a dose de 100

mg/L de canamicina foi suficiente para inibir o desenvolvimento de gemas adventícias em discos de folha das variedades testadas, tendo sido a concentração escolhida para os experimentos de transformação genética.

Tabela 2. Sensibilidade dos explantes de maracujazeiro à presença do antibiótico canamicina (mg/L), utilizado em meio de cultura para indução de gemas adventícias. (média de 5 repetições)

Canamicina	Variedade	Nº de explantes com gemas / Nº total de explantes	
		IAC-275	IAC-277
0		3,2/10 a	5,4/10 a
100		0/10 b	1/10 b
125		0/10 b	0/10 b
150		0/10 b	0/10 b
	Desvio padrão	0,2531	0,1645
	CV	25,36	14,17

Dados transformados para $(x + 0,5)^{1/2}$. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p = 0,01$).

4.4 Transformação genética do maracujazeiro e avaliação das plantas regeneradas

Inicialmente os experimentos de transformação genética foram realizados com duas estirpes de *Agrobacterium*, EHA-105 e LBA-4404, a fim de verificar a existência de afinidade das estirpes com a espécie em estudo. A Tabela 3 mostra dados de 4 experimentos realizados com as duas estirpes de *Agrobacterium* em paralelo, podendo-se verificar a baixa eficiência da estirpe LBA-4404 em promover o desenvolvimento de gemas adventícias em experimentos de transformação genética de maracujazeiro.

Nos experimentos realizados com *Agrobacterium* estirpe LBA-4404 apenas 6 explantes, da variedade IAC-277, apresentaram o desenvolvimento de gemas adventícias. Cinco plântulas foram regeneradas e destas nenhuma

foi identificada como transgênica. Nos experimentos realizados com *Agrobacterium* estirpe EHA-105 pôde-se verificar o desenvolvimento de um maior número de gemas adventícias. Foram introduzidos 220 explantes da variedade IAC 275 obtendo-se 38 plântulas regeneradas e destas nenhuma foi identificada como transgênica. O número de explantes introduzidos da variedade IAC-277 foi de 210, permitindo a regeneração de 64 plântulas, das quais duas foram identificadas como transgênicas e a eficiência de transformação foi de 3,3% (experimento 2, Tabela 3). Nos experimentos realizados foi possível observar a regeneração de escapes, gemas adventícias não transformadas.

As Figuras 3a e 3b mostram a atividade do gene *uidA* em discos de folha transformados com *A. tumefaciens* estirpes EHA-105 e LBA-4404 respectivamente, após três dias de co-cultivo, mostrando uma maior área com atividade do gene *uidA* nos explantes inoculados com EHA-105.

Os resultados obtidos indicam que o uso da estirpe EHA-105 favoreceu o desenvolvimento de gemas adventícias em experimentos de transformação genética.

Os experimentos relatados na Tabela 4 tiveram como objetivo apenas a obtenção de plantas transgênicas. Foram realizados 10 diferentes experimentos, obtendo-se 14 plantas PCR positivas (Figura 3g), sendo 9 da variedade IAC-275, obtidas nos experimentos 2, 5, 7 e 8, os quais apresentaram eficiência de transformação de 0,6%, 0,9%, 1,7%, 0,6%, respectivamente; e 5 da variedade IAC-277 obtidas nos experimentos 3, 5, 7 e 9, os quais apresentaram eficiência de transformação de 1,5%, 0,5%, 0,5%, 0,4%, respectivamente.

Tabela 3. Transformação genética de discos de folha de maracujazeiro, variedades IAC-275 e IAC-277, utilizando-se as estirpes EHA-105 e LBA-4404 de *A. tumefaciens*, contendo o plasmídeo pCambia 2301-PWV

Experimento	Variedade	Nº de explantes com gemas / Nº total de explantes		
		Testemunha	EHA-105	LBA-4404
1	IAC-275	5/50	13/60 (0/3)*	0/60
	IAC-277	12/50	20/60 (0/4)	2/60 (0/0)
2	IAC-275	23/50	7/70 (0/0)	0/90
	IAC-277	38/50	13/60 (2/2)	0/80
3	IAC-275	26/40	15/40 (0/10)	0/50
	IAC-277	33/40	19/40 (0/8)	3/50 (0/5)
4	IAC-275	36/40	3/50 (0/0)	0/50
	IAC-277	30/40	12/50 (0/5)	1/50 (0/0)

*(Plântulas PCR positivas / Plântulas regeneradas)

Tabela 4. Transformação de discos de folhas de maracujazeiro, variedades IAC-275 e IAC-277, com a estirpe EHA-105 de *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o plasmídeo pCambia 2300-PWV

Experimento	Variedade	Nº de explantes com gemas / Nº total de explantes		Eficiência de transformação (%)
		Testemunha	EHA-105	
1	IAC-275	25/40	30/180 (0/26)*	-
	IAC-277	30/40	21/180 (0/6)	-
2	IAC-275	25/40	26/150 (1/6)	0,6%
	IAC-277	30/40	37/140 (0/15)	-
3	IAC-275	20/40	37/140 (0/19)	-
	IAC-277	27/40	25/130 (2/9)	1,5%
4	IAC-275	37/40	19/190 (0/14)	-
	IAC-277	33/40	23/230 (0/11)	-
5	IAC-275	5/30	22/220 (2/9)	0,9%
	IAC-277	0/10	15/180 (1/2)	0,5%
6	IAC-275	4/30	12/320 (0/0)	-
	IAC-277	3/30	34/320 (0/0)	-
7	IAC-275	30/40	20/170 (3/13)	1,7%
	IAC-277	29/40	3/170 (1/2)	0,5%
8	IAC 275	8/30	49/430 (3/7)	0,6%
9	IAC 277	17/30	54/230 (1/3)	0,4%
10	IAC 277	10/30	14/450 (0/1)	-

* (Plântulas PCR positivas / Plântulas regeneradas)

A literatura (Manders et al., 1994) e o teste de sensibilidade realizado com as variedades IAC-275 e IAC-277 (Tabela 2) indicam concentrações de 75 - 100 mg/L de canamicina como suficiente para inibir totalmente a regeneração de brotos em discos de folhas de maracujazeiro, entretanto um grande número de gemas escape foi obtido durante os experimentos de transformação genética de maracujazeiro.

De acordo com Park et al. (1998), o alto número de plantas escape pode ser justificado pelo fato da resistência nas células transformadas ocorrer pela capacidade da enzima transgene em detoxificar o antibiótico no meio de cultura, o que poderia promover a não seleção nos tecidos adjacentes aos tecidos transformados.

A Tabela 5 mostra dados de 3 diferentes experimentos de transformação genética, nos quais utilizou-se a concentração de 150 mg/L de canamicina no meio de cultura de seleção. Foram obtidas 6 plantas transgênicas, destas, 5 eram da variedade IAC-275 (experimento 1, eficiência de transformação 1,8%). Foi identificada apenas uma planta transgênica para a variedade IAC-277, (experimento 3, eficiência de transformação de 0,3%).

Tabela 5. Transformação genética de discos de folhas de maracujazeiro, variedades IAC-275 e IAC-277, com *Agrobacterium tumefaciens* estirpe EHA-105 contendo o plasmídeo pCambia 2300-PWV, em meio de seleção suplementado com canamicina (150 mg/)

Experimento	Variedade	Nº de explantes com gemas / Nº total de explantes		Eficiência de transformação (%)
		Testemunha	Canamicina	
1	IAC-275	0/30	30/270 (5/21)*	1,8%
	IAC-277	1/30	4/270 (0/0)	-
2	IAC-275	21/30	2/140 (0/0)	-
	IAC-277	26/30	2/100 (0/0)	-
3	IAC-277	19/40	10/340 (1/2)	0,3%

*(Plântulas PCR positivas / Plântulas regeneradas)

Em resumo, dentro dos experimentos realizados um total de 22 plantas transgênicas foram identificadas por PCR. A Tabela 3 relata a obtenção de duas plantas transgênicas para a variedade IAC-277 em experimentos de transformação genética com *A. tumefaciens* estirpe EHA-105, contendo o vetor binário pCambia 2301-PWV. As Tabelas 4 e 5 relatam a obtenção de 14 e 6

plantas transgênicas respectivamente, em experimentos de transformação genética com *A. tumefaciens* estirpe EHA-105, contendo o vetor binário pCambia 2300-PWV. Um total de 10.910 discos de folha foram introduzidos, destes 946 apresentaram regeneração de gemas adventícias, 211 plântulas foram regeneradas, destas 22, 14 da variedade IAC 275 e 8 da variedade IAC-277 tiveram a inserção do gene confirmada por PCR.

O desenvolvimento das gemas adventícias em maracujazeiro ocorre em tufos, na extremidade de corte do disco foliar, sendo difícil a individualização das gemas. Assim, a transferência para o meio de cultura de alongamento foi feita com um segmento do explante original contendo um tufo de gemas. Dentre os explantes responsivos, a qualidade das gemas regeneradas nos experimentos de transformação genética variaram desde gemas pequenas e pouco desenvolvidas (Figuras 3c e 3e) até gemas grandes e bem desenvolvidas (Figuras 3d e 3f).

O alongamento das gemas adventícias e o seu desenvolvimento em plântulas não ocorreu conforme previsto, a obtenção de plantas transgênicas foi dificultada pela baixa eficiência no alongamento das gemas adventícias obtidas. Dentro de um mesmo explante observaram-se gemas em diferentes estágios de desenvolvimento, competindo entre si, desta forma gemas transformadas pouco desenvolvidas poderiam estar sendo inibidas por gemas escapes mais vigorosas.

Outro problema é que nem todas as estruturas regeneradas podem ser realmente gemas adventícias. Segundo Takahashi et al. (2002) em um estudo de indução por organogênese associado à análise histológica das estruturas regeneradas foi possível observar que uma parte das estruturas são primórdios foliares e não possuem meristema apical.

A Figura 3h mostra uma plântula transformada durante a etapa final de alongamento, entretanto muitas estruturas regeneradas identificadas como transgênicas por PCR não resistiram ao processo de alongamento e morreram.

A baixa eficiência no alongamento de gemas obtidas em experimentos de transformação genética de maracujazeiro constituiu-se o principal problema observado durante o desenvolvimento do projeto.

As plantas transgênicas foram transferidas para vasos de 0,25 L contendo substrato (Plantmax - hortaliças) autoclavado. Os vasos foram cobertos com saco plástico (Figura 3i), o qual foi retirado gradualmente para adaptação das plantas a condição "ex vitro". Todas as 22 plântulas alongadas e identificadas por PCR como transgênicas foram aclimatizadas para condições de casa de vegetação com sucesso.

Após a aclimatização as plantas foram transferidas para vasos de 5 L e mantidas em casa de vegetação (Figura 3j).

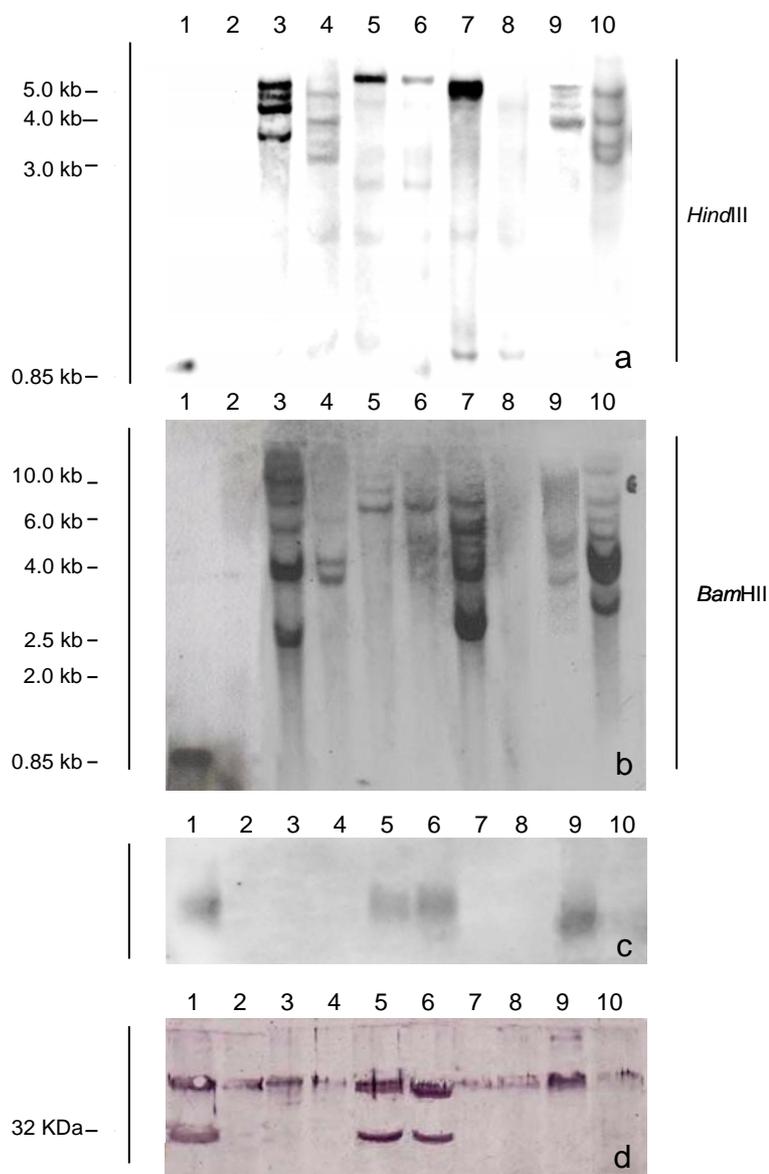


Figura 4 - Análise das plantas transgênicas de maracujazeiro. a) Southern blot com a enzima *Hind*III, 1: Controle positivo (sonda não marcada), 2: Controle negativo (planta não transformada); 3-10: Amostras analisadas. b) Southern blot com a enzima *Bam*HI, 1: Controle positivo (sonda não marcada), 2: Controle negativo (planta não transformada); 3-10: Amostras analisadas. c) Northern blot, 1: controle positivo (planta infectada com o PWV); 2: controle negativo (planta sadia, não transgênica); 3-10: Amostras analisadas. d) Western blot, 1: controle positivo (planta infectada com o PWV); 2: controle negativo (planta sadia, não transgênica); 3-10: Amostras analisadas

4.5 Análise das plantas transformadas

Dentre as plantas identificadas como transgênicas por PCR, 8 foram submetidas à análise de Southern blot para confirmação da integração do transgene e determinação do número de eventos de inserção (Figuras 4a e 4b). As colunas 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 da Figura 4 representam, respectivamente, as linhagens T1, T2, T3.1, T3.2, T4, T5, T6, T7. As Figuras 4a e 4b permitem verificar duas plantas (T1 e T7) com múltiplos eventos de inserção, a planta T4 apresentou múltiplos eventos de inserção na digestão realizada com a enzima *Bam*HI. Problemas na digestão com a enzima *Hind*III ou na hibridação da sonda não permitiu identificar com precisão o número de eventos de inserção. As plantas T3.1 e T3.2 (Colunas 5 e 6) são provenientes do mesmo evento de transformação e apresentam apenas 1 evento de inserção. As plantas T2 e T6 (Colunas 4 e 9) apresentam 3 eventos de inserção e a planta T5 (Coluna 8) não apresentou hibridização com a sonda do gene da capa protéica do PWV.

A análise do Southern blot permitiu confirmar a inserção do gene em 6 diferentes linhagens de maracujazeiro regeneradas em experimentos de transformação genética. Dentre estas, 3 linhagens apresentaram múltiplos eventos de inserção do transgene. Este não é um padrão esperado em experimentos de transformação genética via *Agrobacterium* (Brasileiro & Carneiro, 1998). Entretanto, a falta da análise de Southern blot em outros trabalhos de transformação genética de maracujazeiro realizados até o momento não permite uma conclusão sobre as características do processo de transgenia na espécie.

A análise de Northern blot (Figura 4c) foi realizada para as linhagem T1, T2, T3.1, T3.2, T4, T5, T6 e T7, tendo-se constatado a presença de RNA mensageiro somente para as linhagens T3.1, T3.2 e T6 (Colunas 5, 6 e 9).

A expressão do gene que codifica para a proteína da capa protéica do PWV foi avaliada nas mesmas 8 plantas por Western blot, a análise da Figura 4d mostra plantas com expressão da proteína da capa protéica do PWV, as

plantas T3.1 e T3.2 (Colunas 5 e 6) apresentaram um alto nível de expressão da proteína, as plantas T1, T4, T5, T6 e T7 não apresentaram um nível de expressão detectável.

Tendo em vista que as plantas T3.1 e T3.2 pertencem ao mesmo evento de transformação e que a planta T5 não é uma linhagem transformada, obteve-se apenas uma linhagem apresentando expressão do gene do capsídeo do PWV, e 5 linhagens transformadas nas quais a expressão da proteína do capsídeo do PWV não foi identificada.

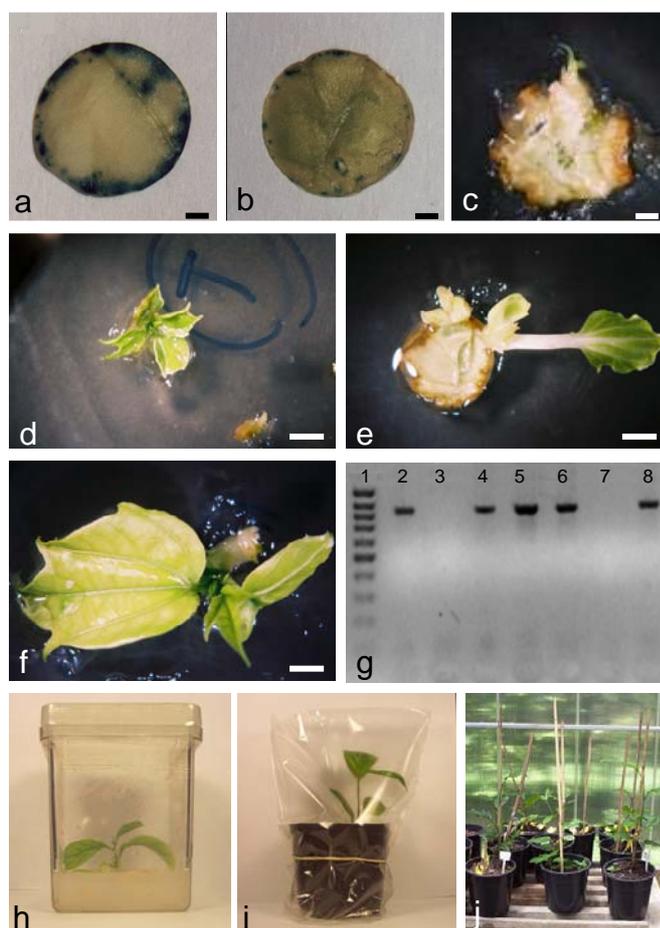


Figura 3 - Cultura de tecidos e transformação genética de maracujazeiro. a) Disco de folha de maracujazeiro IAC-277 co-cultivado por 3 dias com *Agrobacterium* estirpe EHA-105 contendo o plasmídeo pCambia 2301-PWV, testado para atividade do gene *uidA*. b) Disco de folha de maracujazeiro IAC-277 co-cultivado por 3 dias com *Agrobacterium* estirpe LBA 4404 contendo o plasmídeo pCambia 2301-PWV, testado para atividade do gene *uidA*. c) Gema adventícia desenvolvida em disco de folha de maracujazeiro IAC-277, após 30 dias de incubação. d) Gema adventícia desenvolvida em disco de folha de maracujazeiro IAC 275, após 30 dias de alongamento. e) Gema adventícia desenvolvida em disco de folha de maracujazeiro IAC 277, após 30 dias de incubação. f) Gema adventícia desenvolvida de disco de folha de maracujazeiro IAC 275, após 30 dias de alongamento. g) Amplificação por PCR do fragmento (850 pb) correspondente ao gene que codifica a proteína capsidial do PWV. 1: marcador molecular de 100 pb; 2: controle positivo (pCambia 2300-PWV); 3: controle negativo; 4, 5, 6 e 8: plantas transformadas; 7: planta não transformada. h) Plântula transformada em alongamento em frasco tipo "Magenta". i) Planta transgênica em processo de aclimatização. j) Plantas transgênicas aclimatizadas mantidas em casa de vegetação. Barras: a, b, c = 1 mm; d, e, f = 2 mm

4.6 Avaliação de resistência em plantas transformadas

No intuito de verificar qual a pressão de inóculo mínima do PWV para promover a infecção em plantas de maracujazeiro, testou-se diferentes concentrações de inóculo. A análise do experimento para determinação da pressão de inóculo indicou que o volume de 100 µL na concentração de 1:200 (peso/volume) do isolado PWV-SP foi a menor dose capaz de infectar todas as amostras.

Para verificar se a transformação genética com o gene que codifica para a proteína do capsídeo do PWV seria capaz de conferir resistência ao endurecimento dos frutos, as plantas T1, T2, T3.1, T3.2, T4, T6 e T7 foram inoculadas com três diferentes isolados do vírus, o isolado doador da seqüência utilizada em transformação de maracujazeiro, o PWV-SP e os isolados PWV-RJ e PWV-CE. A Tabela 6 mostra o resultado do experimento de inoculação com os diferentes isolados. As plantas não transformadas desenvolveram sintomas evidentes de mosaico e deformação foliar, por volta dos 20 dias após a inoculação com os 3 isolados (Figura 5a). A linhagem T2 apresentou resistência total aos 3 isolados (Figura 5b), as linhagens T1, T6 e T7 apresentaram resistência a baixas concentrações do isolado SP mas não aos isolados RJ e CE. A Figura 5c mostra a linhagem transgênica T1 com sintomas de infecção após a inoculação com uma alta concentração (1:50) do isolado PWV-SP.

A fim de verificar se as plantas transgênicas regeneradas apresentavam imunidade ao PWV, ramos das linhagens transgênicas foram enxertadas em plantas infectadas com o PWV, todas as linhagens enxertadas, inclusive a T2 (Figura 5d) que apresentou resistência a inoculação do PWV, apresentaram o desenvolvimento de sintomas indicando que a resistência obtida não é função de imunidade e sim resistência à infecção.

Tabela 6. Inoculação das linhagens transgênicas com 3 diferentes concentrações dos isolados SP, RJ e CE do PWV

Linagem	T1	T2	T3.1	T3.2	T4	T6	T7	C**	C	C
Dosagem										
PWV-SP										
1ª Inoc. (1:200)	0/4*	0/7	1/5	0/4	0/4	0/2	0/6	3/3	-	-
2ª Inoc. (1:100)	0/4	0/7	3/5	2/4	1/4	0/2	0/6	-	1/3	-
3ª Inoc. (1:50)	4/4	0/7	5/5	4/4	4/4	1/2	5/6	-	-	4/5
PWV-RJ										
1ª Inoc. (1:200)	0/3	0/3	0/3	0/4	0/6	0/3	0/6	1/3	-	-
2ª Inoc. (1:100)	1/3	0/3	3/3	1/4	5/6	1/3	1/6	-	3/3	-
3ª Inoc. (1:50)	3/3	0/3	3/3	3/4	6/6	3/3	6/6	-	-	5/5
PWV-CE										
1ª Inoc. (1:200)	0/3	0/3	0/3	0/5	0/4	1/3	0/8	1/3	-	-
2ª Inoc. (1:100)	1/3	0/3	0/3	1/5	2/4	2/3	2/8	-	1/2	-
3ª Inoc. (1:50)	3/3	0/3	2/3	5/5	4/4	3/3	6/8	-	-	5/5

*Plantas com sintomas/plantas inoculadas

**Controle de inóculo, planta não transformada.

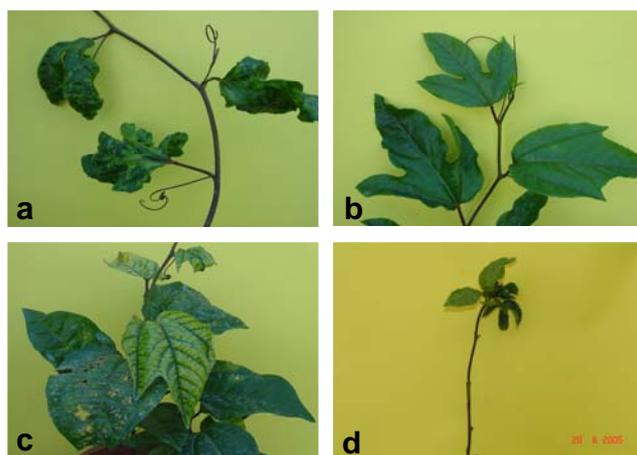


Figura 5- Sintomas de plantas inoculadas. a) Planta não transformada apresentando sintomas de infecção. b) Linhagem transgênica T2 inoculada com PWV não apresentando sintomas de infecção. c) Linhagem transgênica T1 inoculada com PWV apresentando sintomas de infecção. d) Linhagem transgênica T2 enxertada em maracujazeiro infectado com o PWV, apresentando sintomas de infecção

Como relatado anteriormente, na linhagem T2 não foi constatada a presença do RNA mensageiro e a proteína capsidial do PWV não foi detectada (Figuras 3c e 3d) e esta linhagem apresentou resistência aos 3 isolados do vírus utilizados nos experimentos para avaliação da resistência (Tabela 6). Entretanto, a linhagem T2 em uma análise anterior de Western blot (dados não relatados) apresentou a expressão da proteína do capsídeo do PWV ao mesmo tempo essa linhagem apresentou-se susceptível a infecção do isolado PWV-SP (dados não relatados).

Essa falta de correlação entre dados anteriores e dados recentes sugere a hipótese de que a resistência na linhagem T2 se deve a ativação do mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional.

5 CONCLUSÕES

- É possível obter plantas transgênicas de maracujazeiro pela inoculação de discos de folhas, com *Agrobacterium*.
- A avaliação da resistência ao PWV realizada com 7 linhagens transgênicas obtidas mostrou que a linhagem T2 apresentou resistência aos 3 isolados utilizados nos experimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, P.F.; BRAZ, A.S.K.; TORRES, L.B.; SANTANA, E.N.; NASCIMENTO, A.V.S. do; CARVALHO, M.G. de; OTONI, W.C.; ZERBINI, F.M. Transgenic passionfruit expressing RNA derived from *Cowpea aphid-borne mosaic virus* is resistant to passionfruit woodiness disease. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.1, p.33-38, 2005.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. Anatomical studies of in vitro organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.2007-2013, 1999.
- BAULCOMBRE, D.C. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. **The Plant Cell**, v.8, p.1833-1844, 1996.
- BEZERRA, D.R.; LIMA, J.A. Avaliação da incidência do vírus do endurecimento dos frutos do maracujá na Serra da Ibiapaba Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 25., Gramado, 1992. **Resumos**. *Fitopatologia Brasileira*, v.17, p.155, 1992.
- BIASI, L.A.; FALCO, M.C.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passionfruit. **Sciencia Agricola**, v.57, p.661-665, 2000.

- BRASILEIRO, A.C.M., CARNEIRO, V.T.C.C. **Manual de Transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 309p.
- BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1999. 6, p.679-735: Transformação genética de plantas/cap.6.
- BRAR, M.S.; MOORE, M.J.; AL-KHAYRI; J.M.; MORELOCK, T.E.; ANDERSON, E.J. Ethylene inhibitors promote in vitro regeneration of cowpea (*Vigna unguiculata* L.). **In vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, v.35, p.222-225, 1999.
- CARRINGTON, J.C.; FREED, D.D., OH, C.S. Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. **EMBO Journal**, v.9, p.1347-1353, 1990.
- CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T.; GAMA, M.I.C.S.; YAMASHIRO, T. Grave moléstia em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Estado da Bahia, causado por um isolado do vírus do "woodiness" do maracujá. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.259-268, 1981.
- CHANG, C.A. Characterization and comparison of Passion fruit mottle virus, a newly recognized potyvirus, with Passionfruit woodiness virus. **Phytopathology**, v.82, n.12, p.1358-1363, 1992.
- CHANG, C.A.; LIN, Y.D.; LIN, H.H. Utilization of virus-free passionfruit seedling control passionfruit virus disease in Taiwan. **Proceeding of disease and pest control without pesticide**. P.349-359, 1992.

- CONCI, V.L. Técnicas serológicas. In: DOCAMPO, D.M.; LENARDÓN, S.L. (Ed) **Métodos para detectar patógenos sistêmicos**. Córdoba: IFFIVE; INTA; JICA, 1999. cap. 2 p.23-39.
- COSTA, A.F. Comportamento de *Passiflora* spp. diante do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro e a relação entre nutrição mineral e a interação vírus - *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Viçosa, 1996. 129p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa.
- COSTA, A.F.; BRÁS, A.S.K.; CARVALHO, M.G. Transmissão do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (VEFM) por afídeos (Hemíptera – Aphididae). **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.376, 1995. (Suplemento)
- DE CARVALHO NIEBEL, F.; FREDO, P.; VAN MONTAGU, M.; CORNELISSEN, M. Post-transcriptional cosuppression of beta-1,3-glucanase genes does not affect accumulation of transgene nuclear mRNA. **Plant Cell**, v.7, p.347-358, 1995.
- DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, v.13, p.103-106, 1993.
- DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, p.211-217, 1994.
- DORNELAS, M. C., TAVARES, F. C. A. ; OLIVEIRA, J. C. ; VIEIRA, M. L. C. . Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* spp. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 106-110, 1995.

- DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-18, 1990.
- d' UTRA VAZ, F.B., DOS SANTOS, A.V.P., MANDERS, G., COCKING, E.C., DAVEY, M.R., POWER, J.B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener.): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, v.12, p.220–225, 1993.
- FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. In vitro control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **In vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, v.33, p.209-212, 1997.
- FNP Consultoria & Comércio. **Agriannual 2005: Anuário estatístico da agricultura brasileira**. São Paulo: Argos Comunicação, 2005. 520p.
- GIORIA, R.; BOSQUE, G.G.; REZENDE, J.A.M.; AMOEIM, L.; KITAJIMA, E.W. Incidência de viroses de maracujazeiro na Alta Paulista-SP e danos causados pelo *Passion fruit woodiness virus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.182-189, 2000.
- GRUMET, R. Genetically engineered plant virus resistance, **HortScience**, v.25, n.5, p.508-513, 1990.
- HALL, R.M.; DREW, R.A.; HIGGINS, C.M.; DIETZGEN, R.G. Efficient organogenesis of an Australian passionfruit hybrid (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. **Australian Journal of Botany**, v.48, p.673-680, 2000.

- HASSAIRI, A.; MASMOUDI, K.;ALBOUY, J.; ROBAGLIA, C.; JULLIEN, M.; ELLOUZ, R. Transformation of two potato cultivars "Spunta"ad "Claustar" (*Solanun tuberosum*) with *Lettuce mosaic virus* coat protein gene and heterologous immunity to potato virus Y. **Plant Science**, v. 136, p.31-42, 1998.
- HEMENWAY, C.L.; FANG, R.X.; KANIEWSKI, W.K.; CHUA, N.H.; TUMER, N.E. Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA, **EMBO Journal**, v.7, p.1273-1280, 1988.
- HOEKEMA, A.; HIRSCH, P. R.; HOOYKAAS, P.J.J.; SCHILPEROORT, R.A.A. Binary plant vector strategy based on separation vir and T-region of *Agrobacterium tumefaciens* ti-plasmid. **Nature**, v. 303, p. 179-180, 1983.
- HOOD, E.E.; GELVIN, S.B.; MELCHERS, L.S.; HOEKEMA, A. New *Agrobacterium* helper plasmid for gene transfer into plants. **Transgenic Reserch**, v.2, p.208-218, 1993.
- INOUE, A.K.; MELLO, R.N.; NAGATA, T.; KITAJIMA, E.W. Characterization of *Passionfruit woodiness virus* isolates from Brasília and surrounding region, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.479-485, 1995.
- JEFFERSON, R. A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.5, p.387-405, 1987.
- KANIEWSKI, W.; LAWSON, C. Coat protein and replicase-mediated resistance to plant viruses. In: HADIDI, A.; KHETARPAL, R.K.; KOGANEZAWA, H. (Ed.). **Plant virus disease control**. St. Paul, Minnesota: APS Press, 1998. p.65-78.

- KAWATA, K., USHIRA, C., KAWAI, F., KANAMORI, M., KURIYAMA, A.
Micropropagation of passionfruit from subcultured multiple shoot primordia.
Journal of Plant Physiology, v.147, p.281-284, 1995.
- KUMAGAI, M.H.; DONSON, J., DELLA-CIOPPA, G., HARVEY, D.; HANLEY, K.;
GRILLE, L.K. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-
derived RNA. **Proceeding National Academic Sciencia USA**, v.92, p.1679-
1683, 1995.
- LIMA, A. de A. **Maracujá produção aspectos técnicos**. Brasília DF: Embrapa
Informação Tecnológica, 2002. 104p.
- LIMA, A. DE A., CUNHA, M. A. P. **Maracujá: Produção e qualidade na**
Passicultura. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004,
396p.
- LUDFORD, P.M. Postharvest hormone changes in vegetables and fruit. In:
DAVIES, P.J. (Ed.). **Plant hormones**. Dordrecht: Kluwer, Academic
Publishers, 1995. p.725-750.
- MANDERS, G.; OTONI, W.C; D'UTRA-VAZ, F.B.; BLACKHALL, N.W.; POWER,
J.B.; DAVEY, M.R. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* f.
flavicarpa Degener.) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**,
v.13, p.697-702, 1994.
- MANICA, I. **Fruticultura tropical - maracujá**. São Paulo: Editora Agronômica
Ceres, 1981. 151p.

- MANSHARDT, R.M. **'UH Rainbow' papaya**. Honolulu, HI: University of Hawaii College of Tropical Agriculture and Human Resources, 1998. 2p.
- MAURO, M.C.; TOUTAIN, S.; WALTER, B.; PINCK, L.; OTTEN, L.; COUTOS-THEVENOT, P.; DELOIRE, A.; BARBIER, P. High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene. **Plant Science**, v. 112, p.97-106, 1995.
- MEDINA, J.C.; GARCIA, J.L.M.; LARA, J.C.C.; TOCCHINI, R.P.; HASHIZUME, T.; MORETTI, V.A.; CANTO, W.L. **Maracujá da cultura ao processamento e comercialização**. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 1980, 207p.
- MELETTI, L.M.M.; BRUCKNER, C.H. Melhoramento genético. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M.C. **Maracujá: Tecnologia de Produção, Pós-colheita, Agroindústria e Mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 345-386.
- MELETTI, L.M.M.; MAIA, M.L. **Maracujá: Produção e comercialização**. Campinas: Instituto Agronômico, 1999. 62p.
- MITTER, N.; SULISTYOWATI, E.; DIETZGEN, R.G. Cucumber mosaic virus infection transiently breaks dsRNA-induced transgenic immunity to Potato virus Y in tobacco. **Molecular Plant Microbe Interaction**. v.16, n.10, p.936-944, 2003.
- MITTER, N.; SULISTYOWATI, E.; GRAHAM, M.W.; DIETZGEN, R.G. Suppression of gene silencing: a threat to virus-resistant transgenic plants?. **Trends in plant Science**, v.6 n.6, p.246-247, 2001

- MLOTSHWA, S.; VEVER, J.; SITHOLE-NIANG, I.; PRINS, M.; VAN KAMMEN, A.B.; WELLINK, J. Transgenic plants expressing HC-Pro show enhanced virus sensitivity while silencing of the transgene results in resistance. **Genes**, v.25, n.1, p.45-57, 2002.
- MONTEIRO-HARA, A. C. B. de A. Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora*. Piracicaba, 2000. 82p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MONTEIRO, A.C.B. de A.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Organogênese *in vitro* de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) a partir de discos de folhas. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 4., Piracicaba, 1996. **Resumos**. São Paulo: USP, 1996, v.1, p.417.
- MONTEIRO, A.C.B. de A.; HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N.; RODRIGUES, A.P.M. Anovel approach for the definition of the inorganic medium component for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**. v.36, p.527-531, 2000.
- MONTEIRO, M. Transformação genética de maracujá amarelo visando resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae*. Piracicaba, 2005. 134p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MORAN, M.J. Multiplication végétative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et de *P. mollissima* Bailey. **Fruits**, v.33, p.693-699, 1978.

- MURASHIGE, T.Q.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-479, 1962.
- NAMBA, S.; LING,K.; GONSALVES C.; SLIGHTOM, J.L.; GONSALVES, D. Protection of transgenic plants expressing the coat protein gene of *Watermelon mosaic virus II* or *Zucchini yellow mosaic virus* against six potyviruses. **Phytopatology**, v. 82, n.9, p.940-946, 1992.
- NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-supresion of homologous gene in trans. **Plant Cell**, v.2, p.279-289, 1990.
- NEVES–BORGES, A.C.; COLLARES, W.M.; PONTES, J.A.;BREYNE, P.; FARINELLI, L.; OLIVEIRA, D.E. Coat protein RNAs-mediated protection against *Andean potato mottle virus* in transgenic tobacco. **Plant Science**, v.160, p.699-712, 2001.
- NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M. Selected mild strains of *Passionfruit woodiness virus* (PWV) fail to protect pre-immunized vines in Brasil. **Scientia Agricola**, v.60, p.699-708, 2003.
- NOVAES, Q.S.; FREIRAS-ASTUA, J.; SÃO JOSÉ, A.R.; YUKI, V.A.; KITAJIMA, E.W., REZENDE, J.A.M. Infecção mista de maracujazeiro com *Passion fruit woodiness virus* e begomovirus no estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**. v.27, p.648, 2002.

- OTONI, W.C.; BLACKHALL, N.W; d` ULTRA VAZ, F.B.; CASALI, V.W.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Somatic hybridization of the *Passiflora* species, *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener. and *P. incarnata* L. **Journal of Experimental Botany**. v.46, p.777-785, 1995.
- PARK, S.H.; ROSE,S.C.; ZAPATA, C.; SRIVATANAKUL, M.; SMITH, R.H. Cross-protection and selectable marker genes in plant transformation. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v.34, p.117-121, 1998.
- PEREIRA, A. L. C.; CAMPACCI, C. A.; CIANCIULLI, P. L. Maracujá: seu cultivo, espécies e moléstias. In: Congresso BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, Campinas, 1971. **Anais**. Campinas: SBF, 1971. p.641-658.
- PERRING, T.M.; GRUENHAGEN, N.M.; FARRAR, C.A. Managment of plant viral diseases through chemical control of insect vectors. **Annual Review of Entomology**, v.44, p.457-481, 1999.
- PESTANA, M.C.; LACORTE, C.; FREITAS, V.G.; MANSUR, E. In vitro regeneration of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through organogenesis: efect of culture temperature and silver nitrate. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v.35, p.214-216, 1999.
- PIUS, J.; GEORGE, L.; EAPEN, S.; RAO, P.S. Enhanced plant regeneration in pearl millet (*Pennisetum americanum*) by ethylene inhibitors and cefotaxime. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.52, p.91-96, 1993.

- POWELL, P.A.; NELSON, R.S.; HOFFMANN, B.D.N.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T.; BEACHY, R.N. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. **Science**, v.232, p.738-743, 1986.
- PROVVIDENTI, R.; TRICOLI, D. M. Inheritance of resistance to *Squash mosaic virus* in a squash transformed with the coat protein gene of pathotype 1. **HortScience**, v. 37, n.3, p.575-577, 2002.
- RAVELONANDO, M.; SCORZA, R.; CALLAHAN, A.; LEVY, L.; JACQUET, C.; MONSION, M.; DAMSTEEGT, V. The use of transgenic fruit trees as a resistance strategy for virus epidemics: the plum pox (sharka) model. **Virus Research**, v.71, p.63-69, 2000.
- RAYMOND, J.M.; LESLEY A. B. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L. Em. Thell). **Plant Science**, v.46, p.217–223, 1986.
- REGISTER III, J.C.; BEACHY, R.N. Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. **Virology**, v.166, p.524-532, 1988.
- RESENDE, R. O. Perspectivas de plantas transgênicas no controle de fitoviroses. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: Gráfica e Editora Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família, 1994. v.2, p.123-152: Perspectivas de plantas transgênicas no controle de fitoviroses.

- RIZZI, L.C.; RABELLO, L. A.; MOROZINI FILHO, W.; SAVASAKI, E.T.; KAVATI, R. **Cultura do maracujá azedo**. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, SAA, 1998. 23 p.
- ROUSTAN, J.P.; LATCHE, A.; FALLOT, J. Enhancement of shoot regeneration from cotyledons of *Cucumis melo* by AgNO₃, an inhibitor of ethylene action. **Journal of Plant Physiology**, v.140, p.485-488. 1992.
- RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A.R.; VOLPE, C.A.; OLIVEIRA, J.C.DE; DURIGAN, J.F.; BAUMGARTNER, J.G.; SILVA, J.R. DA; NAKAMURA, K.; FERREIRA, M. E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V.DE P. **Maracujá para exportação aspectos técnicos da produção**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. p.64.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. MANIATIS, T. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 815p.
- SANFORD, J.C.; JOHNSTON, S.A. The concept of parasite-derived resistance – deriving resistance genes from the parasite's own genome. **Journal of Theoretical Biology**, v.113, p.395-405, 1985.
- SANTANA, E.N. Caracterização de isolados brasileiros de *Potyvirus* causadores de endurecimento dos frutos do maracujazeiro e avaliação de plantas transgênicas de maracujá-amarelo expressando RNAs virais. Viçosa, 2001. 75p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.
- SÃO JOSÉ, A. R. **Maracujá produção e mercado**, Vitória da Conquista: Universidade Estadual da Bahia, 1994. 255p.

SARMA, K.S.; EVANS, N.E.; SELBY, C. Effectt of carbenicillin and cefotaxime on somatic embryogenesis of Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). **Journal of Experimental Botany**, v.46, p.1779–1781, 1995.

SILVA, J.R. Situação da cultura do maracujazeiro na região central do Brasil. In: RUGGIERO, C. (Coord.) SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, 5, Jaboticabal, 1998. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 1998. p.18-19.

SIMON-MATEO, C.; LOPEZ-MOYA, J.J. GUO, H.S.; GONZALEZ, E.; GARCIA, J.A. Suppressor activity of potyviral and cucumoviral infections in potyvirus-induced transgene silencing. **Virology**, v.84, p.2877-2883, 2003.

SIMMONDS, J.H. Mild strain protection as a means of reducing losses from the Queensland woodiness virus in the passion vine. **Queensland Journal of Agricultural Science**, v.16, p.371-380, 1959.

SOUZA, J.S.I. DE; MELETTI, L.M.M. **Maracujá, espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ, 1997. v.3, 179p.

TAKAHASHI, E. K. Transferência do gene *atacina* A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística. Piracicaba, 2002. 137p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

TAYLOR, R. H.; GREBER, R. S. Passionfruit woodiness virus. CMI/AAB, **Description of Plant Viruses** n. 122, 1973.

- TREVISAN, F.; MENDES, B.M.J. Optimization of *in vitro* organogenesis in passionfruit (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*). **Scientia Agricola**. v.62, n.4, July/Aug. 2005. /No prelo/
- TRICOLI, D.M.; CARNEY, K.J.; RUSSELL, P.F.;McMASTER, J.R.; GROFF, D.W.; HADDEN, K.C.; HIMMEL, P.T.; HUBBARD, J.R.; BOESHORE, M.L.; REYNOLDS, J.F.; QUEMADA, H.D. Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus protein gene constructs for resistance to cucumber mosaic virus, watermelon mosaic virus 2, and/or zucchini yellow mosaic virus. **Bio/Technology**, v.13, p.1458-1465, 1995.
- TRIGIANO, R.N. ; GRAY,D.J. **Plant development and biotechnology**. London: CRC Press, 2005. 358p.
- TORRES, C.A.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Serviço de Produção de Informação - SPI, 1999, v.2, p. 864.
- VAIRA, A.M.; SEMERIA, L.; CRESPI, S.; LISA, V.; ALLAVENA, A.; ACCOTTO, G.P. Resistance to tospoviruses in *Nicotiana benthamiana* transformed with the n gene of tomato spotted wilt virus:correlation between transgene expression and protection in primary transformants. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.8, p.66-73, 1995.
- VESTRI, F.; SCHIFF, S.; BENNICI, A. In vitro shoot regeneration in *Passiflora coerulea*. **Acta Horticulturae**, v.280, p.105-106, 1990.

- YAMASHIRO, T.; CHAGAS, C.M. Ocorrência de grave virose em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) no Estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5, Pelotas, 1979. **Anais**. Pelotas: SBF, 1979. p.915-917.
- YEH, S.D., CHU, F.H. Production and evaluation of transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of Passionfruit woodiness virus. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.37, p.181-190, 1996.
- YU, H.; KUMAR, P.P. Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA. **Plant Cell Rep**, v.22, p.167-174, 2003.
- WILSON, T.A.; WATKINS, P.A.C. Influence of exogenous viral coat protein on cotranslational disassembly of tobacco mosaic virus. **Virology**, v.149, p.132-135, 1986.
- ZERBINI, F.M.; ZAMBOLIM E.M. A família *Potyviridae* – Parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.7, p.1-66, 1999.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)