

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**ANA PAULA CHIAVERINI PINTO**

**Transformação genética de maracujazeiro (*Passiflora alata* Curtis) para  
resistência ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)**

**Piracicaba  
2010**

**ANA PAULA CHIAVERINI PINTO**

**Transformação genética de maracujazeiro (*Passiflora alata* Curtis) para  
resistência ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)**

Dissertação apresentada ao Centro de  
Energia Nuclear na Agricultura para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências

Área de Concentração: Biologia na  
Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Prof. Dra. Beatriz  
Madalena Januzzi Mendes

**Piracicaba  
2010**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Pinto, Ana Paula Chiaverini

Transformação genética de maracujazeiro (*Passiflora alata* Curtis) para resistência ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) / Ana Paula Chiaverini Pinto; orientador Beatriz Madalena Januzzi Mendes. - - Piracicaba, 2010.

64 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Agrobacterium 2. Genes virais 3. Genética molecular vegetal  
4. Maracujá 5. Melhoramento genético vegetal 6. Organismos geneticamente modificados 7. Plantas transgênicas 8. Potyvirus I. Título

CDU 604.6:634.776.3

## *Dedico*

*Aos meus queridos pais, Meire e Paulo, por acreditarem nos meus sonhos e me ajudar a vivê-los.*

*Ao Raphael pelo apoio, compreensão e carinho.*

*A Deus pela paz nos momentos de angústia,  
esperança nos momentos de descrença e  
força nos momentos de fraqueza.*

**“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.”**

***Albert Einstein***

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Beatriz Madalena Januzzi Mendes (CENA/USP) pela constante presença, orientação e profissionalismo. Sobretudo pelos seus ensinamentos, que me mostraram que a pesquisa científica é baseada em muita dedicação e perseverança.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela oportunidade de cursar o Mestrado em Biologia na Agricultura e Ambiente, especialmente ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal, onde os experimentos foram realizados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Jorge A. Marques Rezende (ESALQ/USP) pela constante ajuda e colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Ricardo Harakava do Instituto Biológico de São Paulo pela atenção e auxílio na resolução de dúvidas.

À Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli (CENA/USP) pela ajuda nesta etapa final do trabalho e pela orientação acadêmica.

Aos técnicos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP), Renata B. Cruz e Marcelo F. Correa, por toda ajuda, disponibilidade e amizade.

Ao João Geraldo Brancalion e à Silvana P. Maziero do Laboratório de Instrumentação e Informática (CENA/USP) pelo suporte nos serviços de editoração gráfica durante todo o curso.

À bibliotecária Marília Henyei (CENA/USP) pela ajuda na revisão das referências e formato final da dissertação.

À equipe da Pós-Graduação, especialmente ao Fábio A. de S. Oliveira, pelo auxílio e atenção.

À bióloga Mônica L. Rossi e Renan M. Packer, do Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas e à secretária Suzineide Maniesco pelo convívio e ajuda.

Aos estagiários do Laboratório de Biotecnologia Vegetal: Sylvia R. Silveira e Tarcísio S. Vasconcellos pelo convívio e amizade.

À minha grande amiga Liliane C. L. Stipp, por sua amizade e colaboração constante durante todo o desenvolvimento do meu trabalho, principalmente na revisão final da dissertação.

Aos meus queridos amigos e amigas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e da pós-graduação, que tornaram esses anos de convívio tão especiais e inesquecíveis. Gostaria de agradecer sinceramente a ajuda e amizade de todos, em especial a(o): Alessandra C. B. de A. Monteiro-Hara, Amancio J. Souza, Andréa D. Koehler, Danielle C. Scotton, Eveline C. da R. Tavano, Fabiana R. Muniz, Flavio Trevisan, Janaynna Barbosa-Mendes, Leonardo Soriano, Luciana Castelotti, Marcelo F. Correa, Renata B. Cruz, Talitha J. Kievitsbosch, Vânia Nakano e Waner F. Júnior.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, muito obrigada!

## RESUMO

PINTO, A. P. C. **Transformação genética de maracujazeiro (*Passiflora alata* Curtis) para resistência ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV).** 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Uma das espécies que atualmente vem despertando interesse econômico por seu elevado valor de mercado é o maracujazeiro doce (*Passiflora alata* Curtis). Entretanto, a cultura é afetada por diferentes doenças que prejudicam a produtividade e a qualidade dos frutos, sendo a doença causada pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) a que mais afeta a cultura do maracujazeiro no Brasil. O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de plantas transgênicas de *P. alata* visando resistência ao CABMV. O processo de transformação genética utilizado foi via *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe EHA105, contendo o cassete de expressão com um fragmento do gene da proteína capsidial do CABMV, numa construção tipo *hairpin* e o gene de seleção *nptII* que confere resistência ao antibiótico canamicina. Para os experimentos de transformação genética foram utilizados como explantes segmentos de hipocótilo e segmentos internodais. Após 2 a 3 dias de co-cultivo em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo acetoseringona (100 mM), os explantes foram transferidos para meio de cultura de seleção e regeneração constituído de sais minerais e vitaminas de MS, suplementado com benzilaminopurina (BAP - 1mg/L) + thidiazuron (TDZ - 0,5 mg/L) + canamicina (100 mg/L) + cefotaxima (500 mg/L) + nitrato de prata (4,0 mg/L), pH 5,8. Após 4 a 6 semanas de incubação, determinou-se o número de explantes responsivos e as gemas adventícias desenvolvidas foram transferidas para meio de cultura de alongamento MSM + GA<sub>3</sub> (1,0 mg/L) + cefotaxima (500 mg/L) + nitrato de prata (4,0 mg/L). As plantas desenvolvidas foram aclimatizadas e analisadas por PCR, utilizando *primers* específicos para a detecção do fragmento do gene da proteína capsidial do CABMV e do gene de seleção (*nptII*). Foram identificadas 47 plantas transgênicas PCR positivas para o gene *nptII*. Até o momento, a integração do gene *nptII* foi confirmada por *Southern blot* em 9 plantas.

**Palavras-chave:** Transgenia. *Agrobacterium*. *Passiflora alata*. *Potyvirus*. *Hairpin*.

## ABSTRACT

PINTO, A. P. C. **Genetic transformation of passionflower (*Passiflora alata* Curtis) for resistance to Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)**. 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

One species that is currently attracting interest due to its high economic value is the sweet passionflower (*Passiflora alata* Curtis). However, the culture is affected by different diseases that harm the productivity and fruit quality. The disease caused by *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) is the one that more affect the culture of passionflower in Brazil. This work aimed to obtain transgenic plants of *P. alata* resistant to the CABMV. The genetic transformation process was via *Agrobacterium tumefaciens*, strain EHA105, containing the expression cassette with a fragment of the coat protein gene of CABMV, in a hairpin construct and the selection gene *nptII*, which confers resistance to the antibiotic kanamycin. In the experiments of genetic transformation hypocotyl segments and internodal segments were used as explants. After 2-3 days of co-cultivation in MS medium (MURASHIGE; SKOOG, 1962) containing acetosyringone (100 mM), the explants were transferred to the selection and regeneration culture medium consisting of mineral salts and vitamins of MS medium supplemented with benzylaminopurine (BAP - 1 mg/L) + thidiazuron (TDZ - 0.5 mg/L) + kanamycin (100 mg/L) + cefotaxime (500 mg/L) + silver nitrate (4.0 mg/L), pH 5.8. After 4-6 weeks of incubation, it was determined the number of responsive explants. Shoots developed were transferred to elongating culture medium MSM + GA<sub>3</sub> (1.0 mg/L) + cefotaxime (500 mg/L) + nitrate silver (4.0 mg/L). The developed plants were acclimatized and analyzed by PCR using specific primers to detect the fragment of CABMV and the selection gene (*nptII*). It was identified 47 transgenic plants PCR positive for the gene *nptII*. Until this moment, the integration of the *nptII* gene was confirmed by Southern blot in 9 plants.

**Keywords:** Transgenic. *Agrobacterium*. *Passiflora alata*. *Potyvirus*. *Hairpin*.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	11
2.1 A cultura do maracujazeiro.....	11
2.2 Cultura de tecidos e transformação genética em <i>Passiflora</i> .....	15
2.3 Transformação genética para resistência a doenças causadas por vírus.	22
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3.1 Material vegetal .....	27
3.2 Construção gênica pCABMV-dsCP .....	27
3.3 Transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	28
3.3.1 Sensibilidade dos segmentos de hipocótilo ao antibiótico canamicina...	28
3.3.2 Manutenção e cultivo da <i>A. tumefaciens</i> .....	28
3.3.3 Inoculação e co-cultivo dos explantes com <i>Agrobacterium</i> .....	29
3.3.4 Seleção, regeneração e alongamento das gemas adventícias.....	29
3.3.5 Aclimatização das plantas.....	30
3.4 Identificação das plantas transgênicas por PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> .....	30
3.5 Análise de <i>Southern blot</i> .....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Avaliação da sensibilidade dos segmentos de hipocótilo ao antibiótico canamicina.....	33
4.2 Transformação genética de <i>Passiflora alata</i> via <i>A. tumefaciens</i> .....	34
4.3 Análise de <i>Southern blot</i> das plantas identificadas como transgênicas pela análise de PCR.....	47
5 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais centros de origem das espécies do gênero *Passiflora*, apresentando um grande potencial para seleção de plantas que possam ser utilizadas, direta ou indiretamente, com o intuito de atender aos mercados de frutas frescas e de suco concentrado. O uso do maracujazeiro também vem se destacando em novos nichos de mercado, como na área de paisagismo e ornamentação e em produtos farmacêuticos e cosméticos.

Dentro do gênero, a espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* é a mais cultivada nos pomares comerciais do país, apresentando importância econômica devido à comercialização dos frutos *in natura* e do suco concentrado. Entretanto, o maracujá doce (*Passiflora alata* Curtis), vem apresentando destaque no cenário nacional, com potencial para atender diferentes nichos de mercado, entre eles: na indústria farmacêutica, em projetos paisagísticos e principalmente no mercado de frutas frescas.

Assim como outras culturas, o maracujá doce é afetado por diversas doenças causadas por bactérias, fungos e vírus, que podem provocar uma redução na produtividade e inviabilizar o cultivo da espécie em determinadas regiões. O “endurecimento dos frutos”, uma das doenças mais importantes da cultura, é causado pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), sendo transmitida por meio de afídeos. As plantas de maracujá doce infectadas pelo vírus apresentam sintomas generalizados de mosaico foliar, com intensidade variável, podendo vir acompanhado de manchas-anelares, bolhas, rugosidade e deformações foliares, além da redução no tamanho dos frutos, tornando as plantas pouco produtivas.

Existem poucas medidas de controle dessa doença, a principal seria o plantio de mudas saudáveis, fiscalizadas e certificadas. Contudo, essa medida não consegue mitigar a ocorrência da doença, devido à alta eficiência do pulgão na transmissão do vírus. Além disso, a relação não-persistente desse vetor com o vírus torna ineficaz o controle químico.

Uma vez que medidas tradicionais de controle de viroses não têm tido sucesso no caso do endurecimento do fruto do maracujazeiro, a alternativa para o controle dessa virose seria a obtenção de plantas resistentes. Desta maneira, uma ferramenta interessante seria a transformação genética que possibilita a introdução e integração de genes ou fragmento de genes do patógeno no hospedeiro, induzindo

a resistência com o próprio genoma viral. Este princípio é conhecido como resistência derivada do patógeno (PDR - pathogen derived resistance), proposto por Sanford e Johnston (1985). Diversos trabalhos já foram relatados utilizando genes virais para obtenção de plantas resistentes (PROVVIDENTI; TRICOLI, 2002; BUKOVINSZKI et al., 2007).

Poucos trabalhos envolvendo transformação genética visando resistência a doenças em maracujazeiro foram relatados. Utilizando o gene *attA*, para resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, plantas transformadas de *P. edulis* f. *flavicarpa* foram obtidas por biobalística (TAKAHASHI, 2002) e via *Agrobacterium tumefaciens*, promovendo resistência a esta bacteriose (MONTEIRO, 2005). Visando a obtenção de plantas resistentes ao CABMV, Alfenas et al. (2005) obtiveram 1 linhagem transgênica apresentando resistência específica ao isolado utilizado (CABMV-MG1), enquanto Trevisan et al. (2006) obtiveram 1 linhagem altamente resistente aos 3 isolados do CABMV testados (SP, RJ e CE).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi a obtenção de plantas transgênicas de *Passiflora alata* utilizando a construção gênica pCABMV-dsCP, contendo fragmentos do gene da proteína capsidial do CABMV na orientação senso e antisenso, separados por um íntron, uma construção do tipo *hairpin*. As plantas foram avaliadas para a confirmação da integração do transgene e identificação de clones resistentes ao CABMV.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A cultura do maracujazeiro

O maracujazeiro pertence à família Passifloraceae, da ordem Passiflorales, que compreende 12 gêneros e aproximadamente 580 espécies, sendo a maioria das espécies descritas originárias da América Tropical (COSTA; MÔRO; OLIVEIRA, 2009). Dessas espécies, mais de 150 são nativas do Brasil, um dos principais centros de diversidade genética dessa família. Aproximadamente 70 espécies apresentam frutos comestíveis e de importância econômica (CUNHA; BARBOSA, 2002).

O gênero *Passiflora* possui três espécies importantes economicamente: *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá amarelo), *Passiflora edulis* (maracujá roxo) e *Passiflora alata* (maracujá doce). Outras espécies de maracujá também são importantes no uso ornamental, como as espécies *Passiflora caerulea* e *P. incarnata* (PEIXOTO, 2005) e na indústria farmacêutica e cosmética, com a extração de compostos contendo propriedades sedativas, antiespasmódicas e antibacterianas (COPPENS et al., 1997).

Atualmente a produção de maracujá vem ganhando importância no Brasil, o que coloca o país numa situação de destaque no cenário internacional. De acordo com ITI tropicals (2007) a produção mundial de maracujá está em torno de 800.000 toneladas, e o Brasil, como primeiro produtor, apresenta aproximadamente uma produção de 615.196 toneladas, com aproximadamente 44.363 ha de área colhida (RUGGIERO, 2000; FNP, 2009). Segundo Lima (2001) o agronegócio do maracujá no Brasil gera anualmente R\$ 500 milhões, emprega 250.000 pessoas e gera de 5 a 6 empregos diretos e indiretos por hectare. O estado da Bahia é o principal produtor, representando 33% da produção nacional, cerca de 200 mil toneladas, seguido do Ceará com uma produção de 101 mil toneladas (FNP, 2009; IBGE, 2007).

O maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), nativo do Brasil, é a mais importante espécie do gênero *Passiflora* cultivada nos países tropicais, correspondendo a 97% da área cultivada. Da produção total comercializada de maracujá amarelo cerca de 60 a 70% é destinada ao mercado das frutas frescas (RUGGIERO, 2000) e o restante é utilizado para produção de suco concentrado.

Recentemente, a espécie *Passiflora alata* (maracujá doce) vem ganhando destaque no mercado de frutas frescas no Brasil e no exterior. É uma espécie também nativa do Brasil e cultivada em todo o território nacional (MELETTI et al., 2003), sendo encontrada também no Peru, Paraguai e Argentina (BERNACCI; MELETTI; SOARES-SCOTT, 2003).

As características do maracujá doce quanto ao tamanho, à coloração externa, ao aroma, à baixa acidez, e às propriedades medicinais e farmacêuticas, com a extração da passiflorina um calmante natural, o torna bastante aceitável pelos consumidores europeus e brasileiros (MANICA, 2005). No entanto, o consumo ainda é limitado, principalmente devido à pequena oferta do produto no mercado. Com a aceitação do produto pelos consumidores e o preço elevado no mercado de frutas frescas, o agricultor tem se sentido atraído a expandir o cultivo de maracujá doce (MELETTI; MAIA, 1999; VASCONCELLOS; CEREDA, 1994). Segundo Lima (2001) o maracujá doce é uma cultura bem aceita pelos pequenos produtores rurais por ser uma atividade que gera renda em áreas relativamente pequenas em comparação com outras culturas, e pode oferecer um rápido retorno dos investimentos.

Em relação aos aspectos econômicos do maracujá doce no Brasil, os dados são muito limitados, tendo em vista sua recente e ainda pequena participação no mercado de frutas frescas (SILVA; RUA, 2007). Atualmente, a maior parte da produção de maracujá doce encontra-se no município de Cajati, localizado no Estado de São Paulo (Vale do Ribeira). Outros Estados como Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia e Pará, têm entrado nesse mercado, contribuindo para expansão da área cultivada com a cultura. De acordo com Maciel et al. (2009) a área cultivada com maracujá doce é estimada em cerca de 1400 ha, ou seja, aproximadamente 3% do total da área com plantios de maracujá.

Segundo Kavati e Piza Junior (2002) o volume de maracujá doce comercializado em São Paulo tem aumentado significativamente desde o início da década de 1980, chegando a 1,7 mil toneladas em 2002, com uma produtividade atingindo o dobro da observada para o maracujá amarelo. No ano de 2006, comercializaram-se no CEAGESP um total de 438.459 caixas de 3,70 kg de maracujá doce. O maior preço do maracujá doce é conseguido com os frutos maiores, de modo geral, em média, uma caixeta contendo 10 frutos custa cerca de US\$ 4,97 o que representa US\$ 0,50/fruto, conferindo ao maracujá doce um dos principais lugares de preço entre as frutas (SILVA; RUA, 2007).

A inexistência de uma cultivar homogênea e produtiva tem sido fator limitante para elevar a qualidade e produtividade da cultura. Do ponto de vista do mercado, segundo Junqueira et al. (2005), a cultivar ideal deve ter frutos grandes apresentando tamanho comercial, de 200 a 300 g, formato piriforme ou ovalado, sem amolecimento apical, resistência mecânica (casca firme), elevada conservação na pós-colheita, elevado rendimento de polpa (superior a 30%), elevado teor de sólidos solúveis totais e sabor doce acidulado, além de alta produtividade, precocidade e resistência a pragas e doenças.

O maracujazeiro é uma planta de fecundação cruzada por excelência, por apresentar elevada taxa de auto-incompatibilidade, também observada em *Passiflora alata* (VASCONCELLOS; BRANDÃO FILHO; VIEITES, 2001). Com isso, Oliveira et al. (1982) observaram que o polimorfismo do maracujazeiro doce resulta em significativas variações no tamanho e formato dos frutos, peso, espessura da casca, coloração, porcentagem de polpa e número de sementes, resultando na perda de identidade genética e ampliação da variabilidade dos pomares. Em contrapartida, de acordo com Faleiro et al. (2005), o maracujazeiro possui variabilidade genética considerável, que deve ser estudada, preservada e utilizada em programas de melhoramento genético.

A expansão da área cultivada, nos últimos anos, e a ausência de tratos culturais adequados, propiciou o aumento dos problemas fitossanitários. Dentre esses problemas, as doenças tornaram-se fator limitante para o cultivo do maracujazeiro, uma vez que a maioria, quando não controlada eficientemente, causa danos irreparáveis na cultura, acarretando prejuízos altíssimos para o produtor (DIAS CARVALHO, 2000; KITAJIMA; REZENDE, 2002). Dados mostram que devido à ocorrência de doenças, de 1990 a 2000, a produtividade média do maracujá amarelo no Brasil diminuiu, passando de 12,5 t/ha para 9,9 t/ha, ou seja, uma redução de 21% (BRASIL, 2002).

A cultura do maracujazeiro é afetada por uma série de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, que exigem medidas imediatas para reduzir perdas e evitar sua disseminação (SANTOS FILHO; LARANJEIRA, 2004; LEÃO et al., 2006). Doenças como antracnose, fusariose, verrugose, bacterioses, diversos vírus, fitoplasma, além de pragas como lagartas, percevejos, moscas das frutas e nematóides, causam prejuízos que, em determinadas condições, são limitantes à

produção (SOUSA; MELETTI, 1997; GOES, 1998; KITAJIMA, 1998; MALAVOLTA JÚNIOR, 1998).

As principais doenças causadas por vírus que infectam a cultura do maracujazeiro são: o endurecimento dos frutos (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV), o mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus* - CMV), a pinta verde (Rhabdovirus), o clareamento das nervuras (Rhabdovirus), o mosaico amarelo (*Passionfruit yellow mosaic virus* - PFYMV) e o mosaico do maracujá roxo (*Purple granadilla mosaic virus* - PGMV). Dentre estes, destaca-se o CABMV, uma espécie do gênero *Potyvirus*, da família *Potyviridae* (NOVAES; REZENDE; KITAJIMA, 2000; NASCIMENTO et al., 2006).

A virose do endurecimento dos frutos é uma das principais doenças do maracujazeiro, podendo atingir rapidamente todas as plantas do pomar em curto espaço de tempo (JUNQUEIRA et al., 2005). Até recentemente, acreditava-se que esta virose era causada pelo *Passion fruit woodiness virus* (PWV), no entanto, estudos com base na seqüência de nucleotídeos da região codificadora da proteína capsidial do genoma do vírus indicaram claramente que a doença é causada por uma estirpe do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (NASCIMENTO et al., 2006; BARROS et al., 2007).

A transmissão natural de *Potyvirus* ocorre por meio de afídeos, principalmente as espécies *Myzus persicae* Sulz. e *Aphis gossypii* Glover, sendo a relação vírus-vetor do tipo não persistente. Este vírus não é transmitido por sementes, porém, a transmissão mecânica pode ser relativamente fácil (NOVAES; REZENDE; KITAJIMA, 2000). Os sintomas apresentados pelo maracujazeiro infectado pelo CABMV de acordo com Junqueira et al. (2005) são caracterizados pela redução do tamanho e deformação da planta, encarquilhamento e formação de mosaico nas folhas. As plantas suscetíveis reduzem consideravelmente sua vida útil e chegam a morrer, devido principalmente ao ataque de patógenos oportunistas.

O controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro tem sido muito difícil. O plantio de novos pomares próximos de pomares abandonados ou antigos, que podem servir como fonte de inóculo, e a dificuldade de controle dos vetores, podem ser considerados os fatores principais para a disseminação da doença. Atualmente, a única maneira de controlar a doença no Brasil é pela utilização de práticas culturais como o uso de mudas sadias para transplante, eliminação de pomares antigos infectados antes da instalação dos novos, evitar cultivo intercalado

com espécies leguminosas, as quais podem ser hospedeiras do vírus, e retirada de plantas doentes até 5 ou 6 meses após o plantio (NOVAES; REZENDE, 2003; ALFENAS et al., 2005; TREVISAN et al., 2006; MACIEL et al., 2009).

Neste contexto, as técnicas de melhoramento vegetal podem contribuir de maneira decisiva para o desenvolvimento e a competitividade da cultura, com a obtenção de variedades que atendam grande parte dos padrões de referência, principalmente no caso de resistência às doenças. Além do melhoramento convencional, a biotecnologia pode contribuir de forma muito eficiente na obtenção de novas variedades, complementando os programas de melhoramento genético.

## **2.2 Cultura de tecidos e transformação genética em *Passiflora***

Muitos estudos têm sido feitos sobre vários aspectos da cultura *in vitro* de maracujá. Esses estudos incluem o desenvolvimento de protocolos para micropropagação de plantas (KAWATA et al., 1995; ISUTSA, 2004), organogênese *in vitro* (DORNELAS; VIEIRA, 1994; BIASI et al., 2000; MONTEIRO et al., 2000; TREVISAN; MENDES, 2005) e cultura de células em suspensão (DORNELAS et al., 1995; OTONI et al., 1995). A disponibilidade destes protocolos permite a aplicação da transformação genética e da hibridação somática no melhoramento genético da cultura.

Os estudos sobre cultura de tecidos em *Passiflora* foram iniciados em meados dos anos 1960 e 1970, com trabalhos de Nakayama e Moran Robles. Nakayama (1966) trabalhou com o cultivo *in vitro* de tecidos de *Passiflora caerulea*, demonstrando que um maior teor de citocinina no meio de cultura seria favorável à proliferação de gemas adventícias, enquanto que o teor de auxina induziria a formação de raízes. Moran Robles (1978) realizou a propagação vegetativa de gemas axilares de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* e *P. mollissima*. No ano seguinte, publicou um estudo demonstrando ser possível a organogênese *in vitro* em segmentos internodais de *Passiflora edulis* em meio de cultura suplementado com 2 mg/L de cinetina (MORAN ROBLES, 1979).

Desde então, um número crescente de trabalhos com *Passiflora* têm sido descritos na literatura, com destaque para os trabalhos de Kantharajah e Dodd (1990) e Drew (1991). Kantharajah e Dodd (1990) descreveram a técnica de micropropagação a partir de explantes nodais de *P. edulis*, mantidos em meio MS

(MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo 1, 2 ou 3 mg/L de benzilaminopurina (BAP). Drew (1991) realizou o cultivo *in vitro* de segmentos nodais e gemas apicais de tecido jovem e adulto. Neste trabalho, explantes de tecido adulto foram utilizados para regeneração *in vitro* de *P. edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa*, e explantes provenientes de tecido jovem foram testados para diversas espécies de *Passiflora*, como: *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. alata*, *P. caerulea*, *P. mollissima*, *P. coccinea*, *P. herbertiana* e *P. suberosa*.

Vários autores relatam o cultivo *in vitro* de espécies de maracujá, utilizando diferentes tipos de explantes. Os explantes podem ser classificados como meristemáticos e não-meristemáticos; como exemplos de explantes meristemáticos utilizados nos trabalhos têm-se os segmentos nodais (KANTHARAJAH; DODD, 1990; DREW, 1991; D'UTRA VAZ et al., 1993); as gemas apicais (SCORZA; JANICK, 1980; DREW, 1991; FARIA; SEGURA, 1997a; JUNGHANS et al., 2002) e os primórdios de brotos (KAWATA et al., 1995). Em trabalhos mais recentes é possível observar a utilização de explantes não-meristemáticos, como discos foliares (MONTEIRO-HARA, 2000; BECERRA; FORERO; GÓNGORA, 2004; TREVISAN; MENDES, 2005), segmentos de hipocótilo (FARIA; SEGURA, 1997b; PINTO, et al., 2009) e segmentos internodais (MORAN ROBLES, 1979; BIASI, et al., 2000; ISUTSA, 2004).

Os primeiros trabalhos envolvendo espécies de *Passiflora* utilizaram os explantes meristemáticos, pela maior facilidade na regeneração de brotos e pouco conhecimento relacionado com a organogênese *in vitro* com outros tipos de explantes. Como já descrito, os trabalhos iniciais de Kantharajah e Dodd (1990) e Drew (1991) foram fundamentais para o entendimento do processo de regeneração *in vitro* em maracujá e a influência de diferentes tipos de reguladores vegetais no meio de cultura como benzilaminopurina (KANTHARAJAH; DODD, 1990), isopenteniladenina (2iP) e ácido indol-acético (IAA) (DREW, 1991).

De maneira geral, os trabalhos realizados com explantes meristemáticos utilizaram como meio de cultura para regeneração de brotos o meio MS ou MS modificado com teores alterados da concentração de  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ , descrito em Faria e Segura (1997a). Trabalhos mais recentes utilizaram principalmente o BAP como regulador vegetal para formação de brotos, esse regulador em alguns trabalhos foi associado com o ácido indol-butírico (IBA) ou ácido indol-acético (KAWATA et al., 1995; FARIA; SEGURA, 1997a) para estimular a regeneração *in vitro*. Dornelas e

Vieira (1994) obtiveram sucesso no estabelecimento *in vitro* de plantas de cinco espécies de *Passiflora* (*P. amethystina*, *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. giberti*, *P. maliformis* e *P. molissima*), por meio de ápices meristemáticos de caule. Os explantes foram cultivados em meio de cultura MS sem adição de hormônios ou água de coco.

Com relação ao processo de enraizamento das plantas regeneradas a partir dos meristemas, vários métodos foram testados, com a utilização do meio de cultura MS com ou sem a presença de reguladores. Kantharajah e Dodd (1990) obtiveram o enraizamento das plantas com a suplementação do meio de cultura MS com ácido naftalenoacético (ANA) e IBA, enquanto Drew (1991) adicionou ao meio de cultura de enraizamento o IAA. Também foi possível obter a formação de raízes no meio de cultura sem reguladores de crescimento, com sucesso na aclimatização das plantas de cerca de 90%, como descrito por Faria e Segura (1997a).

Após alguns trabalhos desenvolvidos, os pesquisadores iniciaram os estudos de cultura de tecidos utilizando novos tipos de explantes, que não apresentassem região meristemática pré-formada. Vários tipos de explantes não-meristemáticos foram utilizados, Dornelas e Vieira (1994) utilizaram explantes cotiledonares, hipocotiledonares e discos de folhas para regeneração de plantas, enquanto Biasi et al. (2000) utilizaram segmentos internodais para organogênese *in vitro* de maracujá amarelo.

Considerando a particularidade de cada trabalho realizado com *Passiflora*, constatou-se a utilização do BAP na maioria dos trabalhos com organogênese *in vitro* para indução de gemas adventícias. Pode-se observar a utilização do meio de cultura MS suplementado somente com BAP (BIASI et al., 2000) ou com BAP em associação com outros reguladores ou substâncias como: ANA, thidiazuron (TDZ), cinetina, AgNO<sub>3</sub> ou água de coco (DORNELAS; VIEIRA, 1994; TREVISAN; MENDES, 2005; BECERRA; FORERO; GÓNGORA, 2004; HALL et al., 2000).

Para estimular o enraizamento nas plantas obtidas a partir dos explantes não-meristemáticos foram utilizados os meios de cultura MS ou ½ MS (com a metade da concentração de sais) sem reguladores vegetais ou o meio de cultura MSM desenvolvido por Monteiro et al. (2000b), com ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) ou água de coco.

A organogênese *in vitro* em *Passiflora* pode ocorrer indiretamente a partir de calos (MOURAD-AGHA; DEXHEIMER, 1979; SCORZA; JANICK, 1980;

KANTHARAJAH; DODD, 1990; MONTEIRO et al., 2000a) ou diretamente do explante (KAWATA et al., 1995; FARIA; SEGURA, 1997a; CANCINO et al., 1998; OTAHOLA, 2000). Dornelas e Vieira (1994) demonstraram a ocorrência de organogênese direta em tecidos cotiledonares, hipocotiledonares e tecidos foliares na presença de citocinina. Da mesma maneira, Biasi et al. (2000) constatou em *P. edulis* f. *flavicarpa* que o desenvolvimento de gemas adventícias nos segmentos internodais ocorreu de maneira simultânea e contínua, com observação de gemas em diversos estádios de desenvolvimento em um mesmo explante, com maior eficiência nos meios de cultura contendo 1,0 mg/L de BAP.

É possível constatar uma variedade de trabalhos com organogênese *in vitro* de *Passiflora*, a partir de explantes foliares, segmentos internodais e hipocotiledonares, onde foi testada a adição de diferentes citocininas no meio de cultura MS, principalmente BAP, cinetina e/ou TDZ (AMUGUNE; GOPALAN; BYTEBIER, 1993; MONTEIRO; RODRIGUEZ; MENDES, 1996; FARIA; SEGURA, 1997b; PASSOS, 1999; BIASI et al., 2000; MONTEIRO et al., 2000b; BECERRA; FORERO; GÓNGORA, 2004; TREVISAN; MENDES, 2005; PINTO et al., 2010).

Um dos procedimentos-consenso é que, para maioria das espécies estudadas não importando o explante, a citocinina foi o indutor de gemas adventícias por excelência na faixa de 0,5 a 2,0 mg/L, conforme demonstrado para *P. edulis* (DORNELAS; VIEIRA, 1994; PASSOS, et al., 2002, TREVISAN; MENDES, 2005), *P. amethystina*, *P. giberti*, *P. maliformis* e *P. molissima* (DORNELAS; VIEIRA, 1994), *P. nitida* (PASSOS, 1999; PASSOS et al., 2002), *P. cincinnata*, *P. setacea* e *P. alata* (PASSOS, et al., 2002; LOMBARDI, 2003; LOMBARDI et al., 2007; PINTO et al., 2010).

De acordo com Isutsa (2004) para proliferação de brotos nos explantes de *P. edulis* var. *flavicarpa* a concentração adequada foi de 0,5 mg/L de BAP, enquanto para *P. edulis* var. *edulis* o meio de cultura contendo uma combinação de BAP com GA<sub>3</sub> apresentou melhor resposta para iniciação e desenvolvimento das gemas adventícias. A adição de BAP e 10% de água de coco no meio de cultura MS para indução de gemas adventícias foi reportado por Dornelas e Vieira (1994) e Hall et al. (2000), que obtiveram resultados positivos na organogênese *in vitro*, com um elevado número de explantes com gemas adventícias. Os autores concordaram que a utilização de água de coco no meio de cultura acarretou em gemas adventícias maiores e com melhor aparência. Monteiro et al. (2000b) obtiveram a regeneração

de plantas de *P. suberosa*, quando cultivados em meio de cultura contendo 0,5 ou 1,0 mg/L de BAP. Em contrapartida, Trevisan e Mendes (2005) demonstraram um número maior de explantes com gemas adventícias no meio de cultura suplementado com TDZ e nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ).

A descrição do meio de cultura de alongamento das gemas adventícias obtidas nos trabalhos com *Passiflora* é bem variável, com trabalhos utilizando o meio de cultura MS e  $\frac{1}{2}$  MS (MS modificado com metade da concentração de sais) na ausência ou presença de reguladores como BAP ou ANA (DORNELAS; VIEIRA, 1994; HALL et al., 2000). E outros trabalhos descrevem a utilização do meio de cultura MSM, desenvolvido por Monteiro et al. (2000b), com a adição de  $\text{GA}_3$  ou água de coco para o alongamento das plantas (MONTEIRO, 2000a; TREVISAN; MENDES, 2005; PINTO et al., 2010). Trevisan e Mendes (2005) relataram que a suplementação do meio de cultura MSM com 10% de água de coco proporcionou um aumento do número de brotos alongados de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*.

Trabalhos relatam que os meios de cultura suplementados com inibidores para bloquear a produção de etileno ou ação do hormônio, interferiram no desenvolvimento de gemas adventícias e plântulas em diversas espécies (PUA; CHI, 1993; PESTANA et al., 1999; MOHIUDDIN et al., 1997). Ludford (1995) demonstrou que o maracujá produzia altos níveis de etileno, que se acumulavam nos frascos de cultura *in vitro* prejudicando o desenvolvimento das plantas. Considerando esses resultados, trabalhos seguintes com *Passiflora* demonstram a importância do uso de inibidores de etileno na cultura de tecidos com essa espécie (FARIA; SEGURA, 1997b; BARBOSA, 1999).

De acordo Trevisan e Mendes (2005) a indução de gemas adventícias em *P. edulis* f. *flavicarpa* foi superior nos tratamentos contendo TDZ com adição de  $\text{AgNO}_3$ , um inibidor da síntese de etileno, promovendo um maior número de explantes, com gemas adventícias mais vigorosas. Faria e Segura (1997b) e Marota et al. (2001) demonstraram que a adição de tiosulfato de prata (STS) ao meio de cultura aumentou significativamente a diferenciação e desenvolvimento de gemas adventícias em *Passiflora*. De maneira semelhante, Reis et al. (2003) mostraram que o acréscimo de um precursor de etileno teve efeito marcante sobre as gemas, inibindo o comprimento e expansão foliar, e em contrapartida, a adição dos inibidores de etileno, o ácido aminoetoxivinilglicina (AVG) e tiosulfato de prata

(STS) estimularam o desenvolvimento e o aumento do número de gemas adventícias por explante.

Outros explantes como cotilédones, embriões zigóticos e endosperma também vem sendo estudados para obtenção da embriogênese somática (MOHAMED; HICKS; BLAKESLEY, 1996; RIBAS et al., 2002; GUZZO et al., 2004; SILVA et al., 2009). Embriogênese somática de *P. cincinnata* foi obtida a partir de embriões zigóticos. As combinações de BAP e 2,4-D foram eficientes para induzir a formação dos embriões, sendo observada com maior intensidade na região cotiledonar do embrião zigótico (SILVA et al., 2009).

Nos trabalhos de isolamento e cultivo de protoplastos os explantes mais utilizados para o isolamento de protoplastos de espécie de *Passiflora* têm sido cotilédones (DORNELAS; VIEIRA, 1993; PASSOS et al., 2004) e folhas recém-expandidas (d'UTRA VAZ et al., 1993; DORNELAS et al., 1995; OTONI, 1995). Nos trabalhos de d'Utra Vaz et al. (1993) e Otoni (1995) foi relatado que os protoplastos isolados do mesófilo possuíam seu rendimento e sua viabilidade reduzidos de acordo com a idade da planta e após a emissão das gavinhas.

Em relação aos estudos morfológicos realizados em *Passiflora*, Appezzato-da-Glória et al. (1999) realizaram cortes histológicos de discos foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa* os quais apresentaram respostas morfogênicas distintas quando cultivados em meio MS contendo 1,0 mg/L BAP ou ANA. Lombardi et al. (2003), analisaram a origem indireta das gemas em discos foliares de *P. cincinnata* Mast. e a origem direta ou indireta a partir de segmentos de raízes.

Fernando et al. (2007) realizaram a indução de gemas adventícias em explantes hipocotiledonares e discos de folha de *P. edulis* f. *flavicarpa*, utilizando 1,0 mg/L de BAP, e analisaram todo o processo de organogênese *in vitro*. Os autores observaram a regeneração direta e indireta de gemas a partir de meristemóides e protuberâncias formadas nas camadas superficiais do explante e recomendam a utilização do hipocótilo como explante para transformação genética via *Agrobacterium*, devido à estabilidade genética na regeneração desse tipo de tecido.

No caso específico de maracujá doce, o primeiro estudo do cultivo *in vitro* foi realizado por Desai e Mehta (1985) com o cultivo de discos foliares de *Passiflora alata*, estudando o efeito da alteração dos níveis de poliaminas durante a morfogênese *in vitro*, com a formação de brotos, raízes e indução de calos.

Trabalhos seguintes com a regeneração *in vitro* de *P. alata* foram realizados por Rodriguez et al. (2007) e Pinto et al. (2010).

Rodriguez et al. (2007) utilizaram como explantes os segmentos nodais e segmentos de folha, nesse trabalho ocorreu a regeneração de plantas somente a partir dos segmentos nodais, enquanto que o material foliar apresentou somente a formação de calos, com ausência de regeneração de plantas.

Em contrapartida, Pinto et al. (2010) obtiveram sucesso na organogênese *in vitro* de maracujá doce com a formação de gemas adventícias em discos foliares e segmentos de hipocótilo, sendo obtidos os melhores resultados na indução de gemas com os segmentos de hipocótilo cultivados em meio de cultura MS suplementado com BAP e TDZ, sob fotoperíodo de 16 h. Nesse trabalho também constatou-se que a adição de  $\text{AgNO}_3$  no meio de cultura foi um fator decisivo para promover a organogênese *in vitro* de *P. alata*. Com relação a regeneração de plantas, Pinto et al. (2010) observaram o desenvolvimento e alongamento de plantas provenientes apenas dos segmentos de hipocótilo. O estudo histológico do processo de organogênese *in vitro* em *P. alata* demonstrou a formação de protuberâncias nos explantes de discos de folha, enquanto que nos segmentos de hipocótilo houve a formação de gemas adventícias com o desenvolvimento de um meristema apical e primórdios foliares. Diferentemente do observado em trabalhos com outras espécies de *Passiflora*, em *P. alata* a adição de  $\text{GA}_3$  no meio de cultura de alongamento acarretou em melhores resultados no desenvolvimento das plantas do que com a adição de água de coco.

Todas as técnicas descritas na cultura de tecidos vegetais têm sido utilizadas como ferramentas auxiliares do melhoramento, como a hibridação somática e transformação genética de maracujazeiro. Diversos trabalhos envolvendo técnicas de transformação genética em *Passiflora* vêm sendo relatados, os quais avaliaram o efeito de antibióticos na regeneração dos explantes, a expressão de genes marcadores e a expressão de genes para resistência a antibióticos (MANDERS et al., 1994; OTONI, 1995b; SILVA, 1998; BRAZ, 1999). Plantas transformadas com a construção antisense do gene *CMe-Aco1*, inibidor da síntese de etileno, que foram obtidas por Quoirin, Winkler e Ayub (2004).

Vários fatores, incluindo o genótipo da planta, o tipo do explante, a concentração da suspensão bacteriana e o tempo de co-cultivo estão relacionados com o sucesso dos trabalhos de transformação genética. O efeito da sonicação em

conjunto com transformação mediada por *Agrobacterium* teve um resultado positivo na expressão transiente do gene com *P. edulis* e *P. mollissima* (CANCINO et al., 1998).

A estabilidade da transformação em *Passiflora* com os genes *nptII* e *uidA* foi descrita por Silva (1998), que utilizou a *A. rhizogenes*. Reis et al. (2007) utilizaram explantes radiculares provenientes de hipocótilo para a obtenção de plantas transformadas de *P. cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa*. Os explantes de hipocótilo foram cultivados com *A. rhizogenes* e a regeneração das plantas ocorreu via embriogênese somática a partir das raízes formadas.

Mais recentemente, foram obtidas plantas transgênicas contendo genes de resistência a doenças. Com *P. edulis* f. *flavicarpa*, a técnica de biobalística foi testada com o objetivo de transferir o gene bactericida *attacinA* (*attA*) dirigido pelo promotor 35S com o objetivo de obter plantas transgênicas resistentes ao *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* (TAKAHASHI, 2002; VIEIRA et al., 2002).

No trabalho realizado por Alfenas et al. (2005) a fim de obter plantas transgênicas de *P. edulis* f. *flavicarpa* resistentes ao endurecimento dos frutos, plantas foram transformadas, via *A. tumefaciens*, com uma construção gênica contendo um fragmento não-traduzível do genoma viral do isolado do vírus CABMV-MG1, contendo dois terços da região codificadora da polimerase viral (N1b) e um terço da região codificadora da proteína capsial (CP).

Trabalhando com as variedades IAC-275 e IAC-277, Trevisan et al. (2006) confirmaram a integração do gene da proteína capsial do CABMV, por *Southern blot*, em 7 linhagens regeneradas de experimentos de transformação genética via *Agrobacterium*. Monteiro-Hara (2010) obteve plantas transgênicas de maracujá amarelo, da variedade FB-100, utilizando duas construções gênicas, uma contendo um fragmento do gene da proteína capsial na orientação antisenso e a outra construção contendo fragmentos senso e antisenso do gene da proteína capsial.

### **2.3 Transformação genética para resistência a doenças causadas por vírus**

A estrutura genômica de plantas pode ser alterada por transformação genética pelo processo de transferência de genes utilizando-se *Agrobacterium tumefaciens*, biobalística e outras técnicas que permitem a integração de parte de um genoma (gene exógeno) em outro genoma. A hipótese de que a resistência a

certo patógeno poderia ser obtida de seu próprio material genético foi denominada resistência derivada do patógeno (PDR), sendo proposta inicialmente por Sanford e Johnston (1985).

A PDR tem sido utilizada principalmente para a obtenção de plantas resistentes a vírus, com a produção de plantas transgênicas contendo genes ou parte do genoma viral. O primeiro relato de plantas transgênicas com resistência derivada do patógeno foi feito com plantas de fumo expressando a proteína capsidial do *Tobacco mosaic virus* (TMV) (POWELL-ABEL et al., 1986). Neste caso, foi observado que o nível de resistência foi proporcional a quantidade de proteína transgênica acumulada e plantas que apresentaram apenas o acúmulo de mRNA do transgene foram suscetíveis ao TMV.

Segundo Santana (2001) e Aragão e Faria (2007) o gene que codifica 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 comparado a outros genes virais. A resistência mediada pelo gene da proteína capsidial consiste na introdução na planta desse gene, do vírus que se pretende inibir. Na planta, a expressão dessa proteína interfere no ciclo replicativo do vírus homólogo (BAULCOMBE, 1996; GOLDBACH; BUCHER; PRINS, 2003).

Entretanto, pesquisas demonstram que nem sempre existe uma correlação entre o nível de expressão da proteína transgênica e o nível de resistência ao patógeno (SANJAYA et al., 2005). Em plantas transformadas com parte do genoma viral, a resistência a doenças é obtida pela expressão da proteína e a 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.

Plantas transformadas com o gene da proteína capsidial já foram descritas para várias 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), batata (*Solanum tuberosum*) com o gene da proteína capsidial do *Lettuce mosaic virus* (LMV) obtendo resistência contra o *Potato virus Y* (PVY) (HASSAIRI et al., 1998; BUKOVINSZKI et al., 2007), abobrinha-de-moita (*Curcubita pepo*) e melancia (*Citrullus lanatus*) para resistência ao *Papaya ringspot virus* e ao *Zucchini yellow mosaic virus* (STIPP, 2009), tomate (*Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker) para resistência ao *Potato spindle tuber*

*viroid* (PSTVd) (SCHWIND et al., 2009) e trevo branco (*Trifolium repens*) para resistência ao *White clover mosaic virus* (WCMV) (LUDLOW; MOURADOV; SPANGENBERG, 2009).

Uma descoberta interessante na história do silenciamento foi a da resposta de silenciamento gênico no nematóide *Caenorhabditis elegans* (FIRE et al., 1998). Esse fenômeno, que se inicia com a introdução de uma fita dupla de RNA (dsRNA) levando à perda da expressão do gene correspondente pela degradação da seqüência específica do RNA, foi chamado interferência de RNA (RNAi).

De acordo com Vendruscolo (2003) o silenciamento gênico, como processo, corresponde a uma interação entre seqüências homólogas de DNA ou RNA. Sabe-se que o RNA está envolvido em dois tipos de silenciamento gênico dependente de homologia (SGDH): PTGS (silenciamento gênico pós-transcricional), onde a degradação de RNAs homólogos no citoplasma levaria a não tradução, e o TGS (silenciamento gênico transcricional) que está relacionado ao bloqueio na transcrição.

O PTGS é considerado um componente do sistema de defesa das plantas contra vírus (BAULCOMBE, 2004; CHELLAPPAN et al., 2004) que pode ser acionado em plantas transgênicas, com construções senso ou antisenso do transgene (CUOZZO et al., 1988; FANG; GRUMET, 1993). O processo de PTGS é iniciado pela presença de RNA de fita dupla (dsRNA), o qual é processado por uma enzima da família das RNase II (DICER) em pequenos fragmentos de 21-26 nucleotídeos de comprimento (siRNAs). Essa enzima é homóloga a RNase III de *E. coli* e apresenta um domínio de ligação a dsRNAs e domínios helicase (BERNSTEIN et al., 2001). Segundo Barbosa e Lin (2004) os pequenos fragmentos de dsRNA, conhecidos como *small interfering RNAs* (siRNAs), correspondem às fitas senso e antisenso do RNA alvo e se associam a proteínas celulares formando um complexo multimérico chamado *RISC* (*RNA Interference Specificity Complex*), o qual transforma o RNA fita simples e degrada o mRNA homólogo (LEE; ROTH, 2003; YU; KUMAR, 2003; LIN et al., 2007).

Uma estratégia para aumentar a eficiência do PTGS e a obtenção de um maior número de plantas transgênicas resistentes, é o uso de construções gênicas que possuem cópias invertidas do transgene, na orientação senso e antisenso, separadas por uma seqüência íntron (CHEN et al., 2004; SUSI et al., 2004). Este tipo de construção gênica facilita a produção de RNA de fita dupla (dsRNA) ou RNA

*hairpin* (hpRNA), em etapas intermediárias do processo de replicação do vírus, acionando PTGS (WESLEY et al., 2001; WATERHOUSE; HELLIWELL, 2003). A estrutura *hairpin* pode induzir o PTGS com aproximadamente 100% de eficiência quando direcionado com viroses ou genes endógenos (SMITH et al., 2000).

Utilizando a construção *hairpin*, Abhary et al. (2006) obtiveram plantas transgênicas de tomate resistentes ao TYLCD (*Tomato yellow leaf curl disease*). As plantas inoculadas com o vírus, não apresentaram sintomas de infecção viral, sendo observada uma correlação entre resistência e acúmulo de siRNAs, comprovando o PTGS. Plantas de cevada transformadas com uma construção *hairpin* mostraram-se extremamente resistentes ao *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV). As plantas foram consideradas resistentes, já que o vírus não foi detectado pelo teste ELISA (WANG; ABBOTT; WATERHOUSE, 2000).

Outro exemplo da ocorrência do PTGS na obtenção de plantas de *Trifolium repens* resistentes ao *White clover mosaic virus* (WCMV) foi relatado por Ludlow; Mouradov e Spangenberg (2009). Os autores relataram que o sucesso do método ocorreu pela presença da dsRNA formada a partir do transgene (hpRNA), e observaram o acúmulo das moléculas de siRNA anterior à inoculação com o vírus, indicando um mecanismo ativo de silenciamento gênico.

Segundo Zerbini et al. (2005) como as medidas tradicionais de controle de viroses não têm tido sucesso no caso do endurecimento dos frutos do maracujazeiro, a alternativa para o controle dessa virose é a obtenção de plantas de maracujazeiro transgênicas expressando porções do genoma viral, a fim de obter resistência pelo mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional.

No caso específico de maracujazeiro alguns trabalhos possuem destaque pelos resultados inovadores e promissores. Como o trabalho de Alfenas et al. (2005) que obtiveram plantas transgênicas de maracujazeiro amarelo expressando um RNAm correspondente a parte dos genes *Nib* e *cp* de um isolado do vírus do endurecimento dos frutos de maracujazeiro (CABMV). A presença do transgene foi confirmada via PCR em 15 das 16 plantas regeneradas, mas apenas uma linhagem apresentou certo grau de resistência ao CABMV, específico para o isolado utilizado (CABMV-MG1), porém, foi suscetível à infecção por outro isolado do vírus. Esse resultado indicou que o espectro da resistência estava relacionado ao número de cópias do transgene e a análise molecular demonstrou que o mecanismo de

resistência foi o silenciamento gênico pós-transcricional que já se encontrava ativo na planta antes da infecção viral.

Outro trabalho importante foi realizado por Trevisan et al. (2006) que utilizaram as variedades IAC-275 e IAC-277, confirmando a integração do gene CP por Southern blot em 7 linhagens regeneradas de experimento de transformação genética via *Agrobacterium*. A análise de transcrição e tradução do gene foi realizada por Northern e Western blot, respectivamente. As linhagens transgênicas foram inoculadas com 3 isolados do CABMV e foi possível identificar 1 linhagem resistente aos 3 isolados testados. Nas análises de Northern e Western blot desta linhagem não foi possível detectar a presença de RNA e da proteína capsial, indicando a ocorrência de silenciamento gênico.

Plantas transgênicas de maracujá amarelo foram obtidas por Monteiro-Hara (2010) utilizando a variedade FB-100. As transformações genéticas foram realizadas via *A. tumefaciens* contendo as construções gênicas pCABMV-asCP ou pCABMV-dsCP. A construção pCABMV-asCP, com um fragmento na orientação antisenso e a construção pCABMV-dsCP, com fragmentos senso e antisenso do gene da proteína capsial, separados por um íntron, numa construção *hairpin*. Foram obtidas 11 plantas positivas para o fragmento antisenso da proteína capsial do CABMV e 2 positivas para o fragmento da construção gênica *hairpin*, a integração dos transgenes foi confirmada por Southern blot em 4 plantas.

Souza, Mendes e Mourão Filho (2007) descreveram que a utilização de técnicas para a indução de silenciamento gênico pós-transcricional, visando a obtenção de plantas transgênicas capazes de suprimir a expressão de genes exógenos, constitui uma importante ferramenta biotecnológica para programas de melhoramento de plantas. Os trabalhos apresentados com *Passiflora* indicam que o uso da PDR é viável para obtenção de variedades de maracujazeiro resistentes ao CABMV.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material Vegetal

Sementes de maracujá doce foram retiradas de frutos maduros, adquiridos no mercado local (Distribuidora *Belle Sampa*), e imediatamente preparadas para semeadura, devido ao curto período de viabilidade das sementes. As sementes foram retiradas dos frutos e escarificadas com areia fina esterilizada. A assepsia das sementes foi realizada em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) em água destilada (1:2), por 20 min. Após a assepsia, as sementes foram lavadas (3x), com água destilada estéril em condições assépticas. Para propiciar a abertura do tegumento e facilitar a germinação, as sementes sofreram um corte lateral e foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), e incubadas a 27 °C, no escuro, durante 30 dias. Após este período, os tubos foram transferidos para condições de fotoperíodo de 16 h de luz, a 27 °C, para o esverdeamento e engrossamento do hipocótilo. Os explantes constituíram-se de segmentos de hipocótilo, de aproximadamente 1 cm.

Plantas mantidas em casa de vegetação, obtidas a partir da germinação das sementes coletadas dos frutos adquiridos no mercado, foram utilizadas como fonte de segmentos internodais. Os segmentos internodais foram retirados da parte superior da planta, de tecidos tenros e verdes, e a assepsia foi realizada em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) em água destilada (1:2), por 20 minutos. Durante a assepsia, os explantes foram mantidos em sonicador (*Bransonic 220*, 50/60 Hz) para auxiliar no processo de assepsia. Após a assepsia, os segmentos foram lavados (3x), com água destilada estéril, em condições assépticas e foram cortados com o auxílio de um bisturi, em segmentos internodais de aproximadamente 1 cm.

#### 3.2 Construção gênica pCABMV-dsCP

Os experimentos de transformação genética foram realizadas com *A. tumefaciens* EHA105, com o plasmídeo pCambia 2201-CABMV (Cambia GPO Box 3200, Camberra ACT 2601, Austrália) contendo um fragmento do gene da proteína capsidial do CABMV (208 pb) numa construção gênica do tipo *hairpin* (Figura 1). Nesse vetor, o gene é dirigido pelo promotor 35S e pelo terminador NOS. O gene de

seleção é o *npII* que codifica a proteína neomicina fosfotransferase II, que confere resistência ao antibiótico canamicina. A construção gênica pCABMV-dsCP foi elaborada por Alessandra Cristina Boffino de A. Monteiro-Hara, com a supervisão do Dr. Ricardo Harakava, do Instituto Biológico de São Paulo.

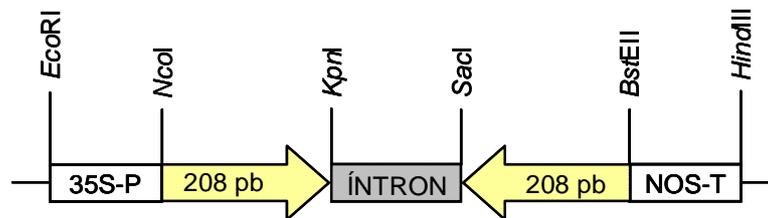


Figura 1 - Esquema do cassete de expressão *hairpin*, contendo o promotor (35S-P), o íntron, o terminador (NOST) e os sítios de restrição para as enzimas, onde foram clonados os fragmentos do gene da proteína capsial do CABMV (208 pb)

### 3.3 Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

#### 3.3.1 Sensibilidade dos segmentos de hipocótilo ao antibiótico canamicina

Para iniciar os experimentos de transformação genética com segmentos de hipocótilo, foi feita a avaliação da sensibilidade destes explantes ao antibiótico canamicina. Os explantes foram cultivados em meio de cultura MS, suplementado com benzilaminopurina (BAP - 1 mg/L) + thidiazuron (TDZ - 0,5 mg/L) + AgNO<sub>3</sub> (4,0 mg/L) + canamicina (0, 50, 100, 150 mg/L). Foram realizadas 4 repetições para cada concentração do antibiótico, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri, contendo 10 explantes. A avaliação foi realizada após 4 semanas de incubação (27 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 16 h de luz), determinando-se o número de explantes com desenvolvimento de gemas adventícias.

#### 3.3.2 Manutenção e cultivo da *A. tumefaciens*

Os isolados de *Agrobacterium* contendo o vetor de expressão são mantidos, à temperatura -80 °C, em solução estoque de glicerol (50%), para conservação a longo prazo. Para uso nos experimentos de transformação genética, a bactéria foi plaqueada em meio de cultura YEP sólido (peptona 10 g/L, extrato de levedura

10 g/L, cloreto de sódio 5 g/L e ágar 10 g/L), suplementado com os antibióticos canamicina (100 mg/L) e rifampicina (50 mg/L), e incubada a 27°C, por um período de 3 dias. Após o crescimento das colônias, uma colônia isolada foi transferida para meio de cultura YEP líquido, suplementado com canamicina (100 mg/L) e rifampicina (50 mg/L), e cultivada por 16 h, em agitador orbital (28 °C/180 rpm). O crescimento da colônia bacteriana foi avaliado em espectrofotômetro (OD 600 nm), considerando-se a cultura adequada para a utilização quando a densidade óptica estivesse entre 0,5 - 1,0 nm. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 5000 rpm, 15 °C, por um período de 15 minutos. O precipitado foi ressuscitado em meio de cultura MS, em um volume adequado para obter uma suspensão de concentração  $5 \times 10^8$  UFC/mL.

### **3.3.3 Inoculação e co-cultivo dos explantes com *Agrobacterium***

Segmentos de hipocótilo ou segmentos internodais (1 cm) foram inoculados com a suspensão bacteriana na concentração de  $5 \times 10^8$  UFC/mL, por um período de 20 minutos. Após a inoculação, os segmentos de hipocótilo foram secos em papel de filtro estéril, e transferidos para placa de Petri (100 x 15 mm) contendo meio de cultura MS suplementado com benzilaminopurina (BAP - 1 mg/L) + thidiazuron (TDZ - 0,5 mg/L) + nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$  - 4,0 mg/L) + acetoseringona (100  $\mu\text{M/L}$ ). A incubação foi realizada em ausência de luz, à temperatura de 24 °C, por um período de 3 dias.

### **3.3.4 Seleção, regeneração e alongamento das gemas adventícias**

Após o período de co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio de cultura de seleção, constituído do meio de cultura MS suplementado com BAP (1 mg/L) + TDZ (0,5 mg/L) + canamicina (100 mg/L) + cefotaxime (500 mg/L) +  $\text{AgNO}_3$  (4,0 mg/L). A incubação foi realizada a  $27 \pm 1$  °C, sob fotoperíodo de 16 h de luz.

A avaliação foi realizada após 4 semanas de incubação, determinando-se o número de explantes responsivos, com auxílio do microscópio estereoscópico. As gemas adventícias desenvolvidas, com folhas de 1 cm, foram transferidas para meio

de cultura de alongamento, constituído de sais minerais de MSM (MONTEIRO et al., 2000b), suplementado com ácido giberélico ( $GA_3$  - 1,0 mg/L) + canamicina (100 mg/L) + cefotaxime (500 mg/L), mantidas sob fotoperíodo de 16 h e temperatura de  $27 \pm 1$  °C, sendo subcultivadas a cada 2 semanas.

Após 8 a 10 semanas, as plantas alongadas foram analisadas por PCR, conforme descrito no item 3.4, e transferidas para meio de enraizamento constituído da metade da concentração dos sais minerais de MSM (MONTEIRO et al., 2000b), suplementado com ácido indolbutírico (IBA - 1mg/L).

### 3.3.5 Aclimatização das plantas

As plantas, com cerca de 3 - 5 cm de altura, foram lavadas em água corrente e transferidas para vasos (0,25 L), contendo substrato (Plantmax - Eucatex). Cada vaso, contendo uma planta, foi coberto com saco plástico transparente, o qual foi retirado gradativamente até a aclimatização das plantas. As plantas foram inicialmente mantidas sob fotoperíodo de 16 h e temperatura de  $27 \pm 1$  °C, sendo posteriormente transferidas para casa de vegetação.

### 3.4 Identificação das plantas transgênicas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

As plantas desenvolvidas foram analisadas por PCR para a identificação inicial das plantas transgênicas. As plantas identificadas como PCR positivas para a presença do fragmento do gene da proteína capsial do CABMV para a construção pCABMV-dsCP ou positivas para o gene de seleção *nptII*, foram aclimatizadas em casa de vegetação. A extração de DNA foi realizada a partir 0,2 g de tecido foliar, utilizando-se o produto comercial DNAzol<sup>®</sup> (Invitrogen).

Para a amplificação do fragmento de aproximadamente 208 pb da construção pCABMV-dsCP, foram utilizados os *primers* 5' - GCTCAGCAAATGGTTTGAAG - 3' e 5' - GTTTTCCACGATGGGCTTG - 3', utilizando-se o programa de 1 ciclo de 2 min a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 58 °C, 30 s a 72 °C, mais 1 ciclo de 4 min a 72 °C.

A amplificação do fragmento do gene de seleção *nptII* (650 pb), foi realizada com os *primers* 5' - ATTCGCCGCCAAGCTCTT - 3' e 5' - GAGGCTATTCGGCTATGACTGG - 3', seguindo o programa de 1 ciclo de 2 min a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 62 °C, 40 s a 72 °C e 1 ciclo de 4 min a 72 °C.

Para o controle positivo das reações foram utilizados plasmídeo purificado contendo a construção pCABMV-dsCP. Como controle negativo, foi utilizado o DNA de plantas não transformadas e água (branco).

A eficiência de transformação (%) foi calculada considerando-se o número total de explantes introduzidos e o número de plantas PCR positivas obtidas em cada experimento.

### **3.5 Análise de *Southern blot***

O DNA total foi extraído pelo 'illustra™ DNA Extraction Kit PHYTOPURE™' (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), a partir de folhas jovens (1,0 g) de plantas aclimatizadas, identificadas como transgênicas por PCR e de plantas não transgênicas, para controle negativo (testemunha). Após a extração, a qualidade do DNA foi avaliada em gel de agarose (0,8%), e a quantificação foi realizada por fluorometria ('Qubit™ Fluorometer' e 'Quant iT™ DNA Assay Kit' - Invitrogen, Carlsbad, USA).

Após a quantificação, 60 a 70 µg de DNA foram submetidos à reação de digestão com a enzima *EcoRI* (16 h, a 37 °C). A enzima de restrição selecionada, *EcoRI*, corta o T-DNA apenas uma vez, fora da região do transgene.

Os fragmentos gerados na digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%), transferidos para membrana de nylon 'Amersham Hybond™ - N<sup>+</sup>' (GE Healthcare) e fixados a 80 °C, por 2 h. A sonda utilizada para a detecção do fragmento antisenso do gene da proteína capsidial do CABMV ou do gene de seleção *nptII* foram preparadas por PCR, conforme descrito no item 3.4.6. Os fragmentos foram purificados com o auxílio do kit 'QIAEX® II Gel Extration' (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) e quantificados por fluorometria.

As sondas foram marcadas com a enzima fosfatase alcalina, com auxílio do kit 'AlkPhos Direct Labelling Reagents' (GE Healthcare). A hibridização foi realizada

a 60 °C, durante 16 h. A reação de detecção foi realizada com auxílio do kit 'CDP - Star™ Detection Reagent' (GE Healthcare), seguindo-se as orientações do fabricante. Após a secagem, a membrana foi transferida para filme plástico e colocada em contato com chapa fotográfica (Hyperfilm™ MP - GE Healthcare) durante 1 a 3 h, dentro do cassete fotográfico (Hypercassette™ - GE Healthcare). Após o período de exposição, a chapa foi tratada com Revelador e Reforçador Kodak GBX (Carestream Health Inc, Rochester, New York, USA), por 4 min, lavada em água (1 min), em seguida transferida para Fixador e Reforçador Kodak GBX (Carestream Health, Inc. Rochester, New York), durante 14 min e novamente lavada em água (1 min).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da sensibilidade dos segmentos de hipocótilo ao antibiótico canamicina

A análise dos dados apresentados na Tabela 1 permite verificar que os segmentos de hipocótilo de *P. alata* se mostraram sensíveis à presença do antibiótico (Figura 2) após 4 semanas de cultivo em meio de cultura MS + BAP (1,0 mg/L) + TDZ (0,5 mg/L), suplementado com diferentes concentrações de canamicina.

Tabela 1 - Avaliação da sensibilidade dos segmentos de hipocótilo de *P. alata* ao antibiótico canamicina após 4 semanas de incubação, em meio de cultura de indução de gemas adventícias (MS + 1,0 mg/L de BAP + 0,5 mg/L TDZ). Média de 4 repetições de cada tratamento

Canamicina (mg/L)	Nº de explantes com gemas / Nº total de explantes
0	7/10
50	0,4/10
100	0/10
150	0/10

Foi possível verificar que o desenvolvimento das gemas adventícias foi inibido totalmente nos explantes cultivados em meio de cultura suplementado com canamicina nas doses de 100 e 150 mg/L (Figuras 2b-c). Na dose mais baixa (50 mg/L), menos de 1% dos explantes apresentaram desenvolvimento de gemas adventícias (Figura 2d) e pode-se verificar que na dose de 150 mg/L houve a ocorrência de necrose acentuada nos explantes. Dessa forma, para os experimentos de transformação genética, o meio de cultura de seleção e regeneração foi suplementado com canamicina, na concentração de 100 mg/L. Esta dose de antibiótico também foi relatada por Trevisan (2005), para discos foliares e por Reis et al. (2007) para explantes de hipocótilo, de *P. edulis*.

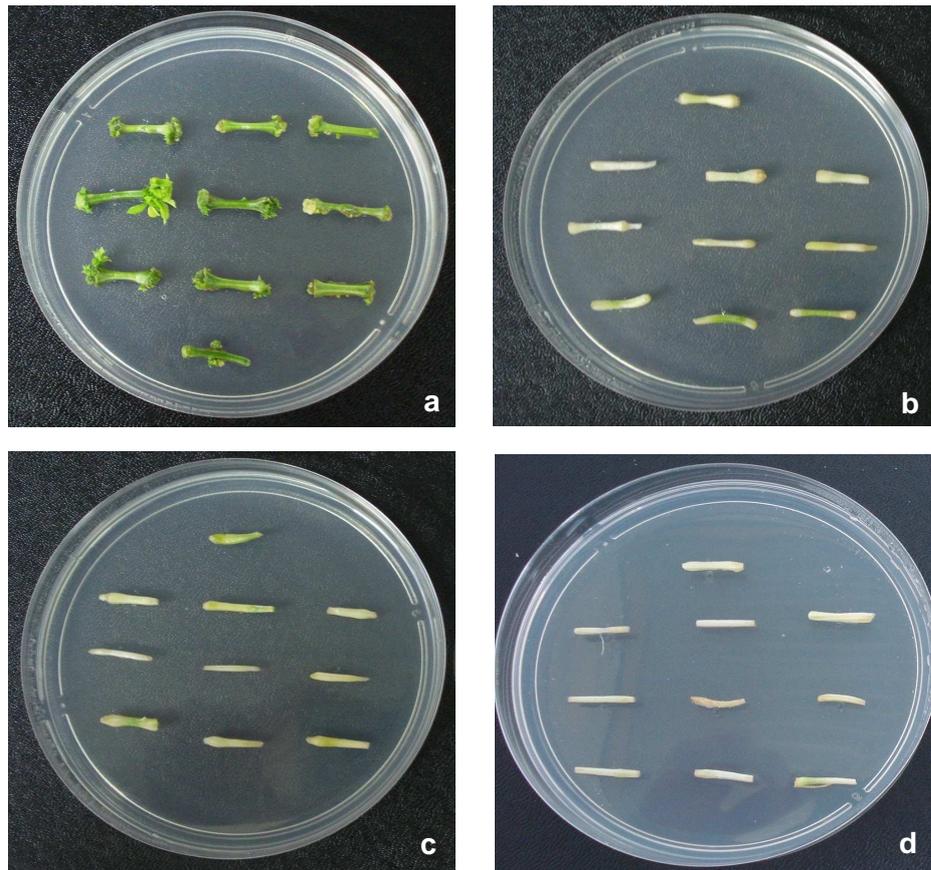


Figura 2 - Avaliação da sensibilidade dos segmentos de hipocótilo de *P. alata* ao antibiótico canamicina após 4 semanas de cultivo em meio de cultura MS acrescido de BAP e TDZ. a) regeneração de gemas adventícias na ausência de antibiótico; b-d) redução ou ausência de indução de gemas adventícias, nos tratamentos com adição de 50 (b), 100 (c), 150 (d) mg/L de canamicina

#### 4.2 Transformação genética de *Passiflora alata* via *A. tumefaciens*

A germinação das sementes *in vitro* para obtenção das plantas para coleta dos segmentos de hipocótilo ocorreu com sucesso, com aproximadamente 70% de porcentagem de germinação. O período de incubação em ausência de luz necessário para germinação *in vitro* e estiolamento do segmento de hipocótilo variou de 30 - 60 dias. Após esse período, os segmentos estiolados foram transferidos para fotoperíodo de 16 h de luz, e apresentaram condições para utilização após 60 dias de incubação (Figura 3a). Desta maneira, foi verificado que para obtenção do segmento de hipocótilo, em condições ótimas para utilização como explante, o

tempo total necessário desde a introdução da semente *in vitro* até a obtenção do segmento de hipocótilo ideal, foi em torno de 3 a 4 meses. Os experimentos de transformação genética utilizando-se os segmentos de hipocótilo não apresentaram problemas em relação à contaminação, confirmando a assepsia deste tipo de explante.

A porcentagem de germinação das sementes em substrato (Figura 3b), em condições de casa de vegetação, foi elevada, cerca de 90%, não havendo dificuldade na obtenção de plantas para coleta dos segmentos internodais. O período verificado para germinação das sementes *ex vitro* foi de aproximadamente 15 a 30 dias, dependendo das condições climáticas durante o processo. Uma variação diária de temperatura em torno de 10 a 20 °C propiciou um aumento significativo na germinação das sementes de maracujá doce. A influência da temperatura na germinação foi confirmada por Osipi e Nakagawa (2005) que obtiveram resultados semelhantes em função das variações de temperatura para a germinação das sementes de maracujá doce. Com isso, foi observado um período em torno de 2 a 3 meses para obtenção dos segmentos internodais nas plantas mantidas em casa de vegetação (Figura 3c).

Com relação aos explantes de segmento internodal foi observado a ocorrência de contaminação nos primeiros experimentos, utilizando-se o método de assepsia tradicional, sem o uso do sonificador. Essa contaminação foi minimizada com a utilização do sonificador durante a assepsia dos explantes, que se mostrou bem eficiente para controlar o desenvolvimento de microorganismos nos experimentos instalados. Nakano (2008) relatou a importância do uso do sonificador para viabilizar o estabelecimento *in vitro* de três cultivares de helicônias devido à redução e controle da contaminação bacteriana com o uso dessa técnica.

Os experimentos de transformação genética foram realizados utilizando-se como explantes o segmento de hipocótilo (Figura 4a) e o segmento internodal (Figura 4d). A utilização *in vitro* do segmento de hipocótilo de maracujá doce foi estudada por Pinto et al. (2010) que obtiveram sucesso na indução de gemas adventícias e no desenvolvimento de plantas a partir desse explante. Estudos anatômicos realizados por Fernando et al. (2007) reforçam a superioridade deste explante para a formação de gemas adventícias e desenvolvimento de plantas, em relação ao disco foliar. O segmento internodal foi adotado mediante trabalhos realizados por Biasi et al. (2000) e Isutsa (2004) que demonstraram a ocorrência de

proliferação de calos e brotos nas extremidades dos explantes e o alongamento das gemas adventícias formadas.



Figura 3 - Obtenção do material vegetal utilizado para coleta de explantes para os experimentos de transformação genética. a) segmento de hipocótilo após 60 dias de incubação sob fotoperíodo de 16 h de luz; b) germinação das sementes de maracujá doce em casa de vegetação para obtenção do segmento internodal; c) planta adulta de maracujá doce com destaque para a parte retirada da planta para obtenção do segmento internodal

Após a inoculação dos explantes em suspensão bacteriana e do co-cultivo, os explantes foram transferidos para fotoperíodo de 16 h de luz, a  $27 \pm 1$  °C. O processo de organogênese *in vitro* ocorreu com sucesso, sendo verificado o início do desenvolvimento das gemas adventícias após 20 dias de incubação e o aparecimento das primeiras folhas nos explantes após 30 a 40 dias (Figura 4b).

Após 40 dias de incubação os explantes que apresentaram folhas com aproximadamente 1 cm de comprimento foram transferidos para meio de cultura de alongamento MSM + GA<sub>3</sub> + cefotaxima + canamicina, permanecendo nesse meio de cultura por cerca de 8 semanas (Figura 4c-f). As plântulas desenvolvidas com aproximadamente 5 cm de altura foram transferidas para meio de cultura de enraizamento MSM + IBA + cefotaxima, e permaneceram nesse meio de cultura por cerca de 30 dias, ou até a visualização do desenvolvimento das raízes.

As plantas desenvolvidas apresentando raízes foram transferidas para vasos de 0,25 L, contendo substrato 'Plantmax' autoclavado. Os vasos foram cobertos com saco plástico, o qual foi retirado gradualmente para adaptação à condição *ex vitro* (Figura 4g). O processo de aclimatização foi de aproximadamente 4 semanas. As plantas que sobreviveram ao processo de aclimatização foram transferidas para vasos de 5 L e mantidas em casa de vegetação (Figura 4h-i).

Considerando todo o processo envolvido para o desenvolvimento de uma planta, desde a obtenção do explante, no caso, do segmento de hipocótilo ou do segmento internodal até a planta propriamente dita, mantida em casa de vegetação, o tempo necessário envolvido nessa atividade foi no mínimo 8 meses, chegando até 10 meses de trabalho.

Desta maneira, durante o desenvolvimento do trabalho foram realizados 24 experimentos de transformação genética, sendo 15 experimentos utilizando-se como explante o segmento de hipocótilo, e 9 experimentos utilizando-se segmento internodal como explante (Tabelas 2 e 3).

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos nos experimentos de transformação genética utilizando-se segmento de hipocótilo como explante. Foram realizados 15 experimentos de transformação genética, totalizando 2956 explantes introduzidos. Após 4 semanas de cada experimento de transformação genética, foi possível verificar o desenvolvimento de gemas adventícias, totalizando 670 explantes responsivos.

Os experimentos de 1 a 4 foram realizados utilizando-se o protocolo original de transformação genética de maracujazeiro, que consistia de tempo de inoculação do explante com a suspensão bacteriana de 15 minutos, 2 dias de co-cultivo e a incubação dos explantes sob fotoperíodo de 16 h de luz. Foi verificada nesses experimentos, a ocorrência de explantes responsivos e a formação de plantas, com exceção do experimento 2.

Entretanto, devido ao baixo número de plantas alongadas iniciou-se a alteração de alguns parâmetros para aumentar a eficiência de transformação nos experimentos seguintes. Assim, a partir do experimento 5 foram utilizados novos parâmetros no processo de transformação genética, como a alteração do tempo de contato do explante com a suspensão bacteriana para 20 minutos, o aumento do período de co-cultivo para 3 dias e suplementação do meio de cultura de co-cultivo com acetoseringona (100 µM/L). Além disso, nos experimentos 5 e 7 foram testados

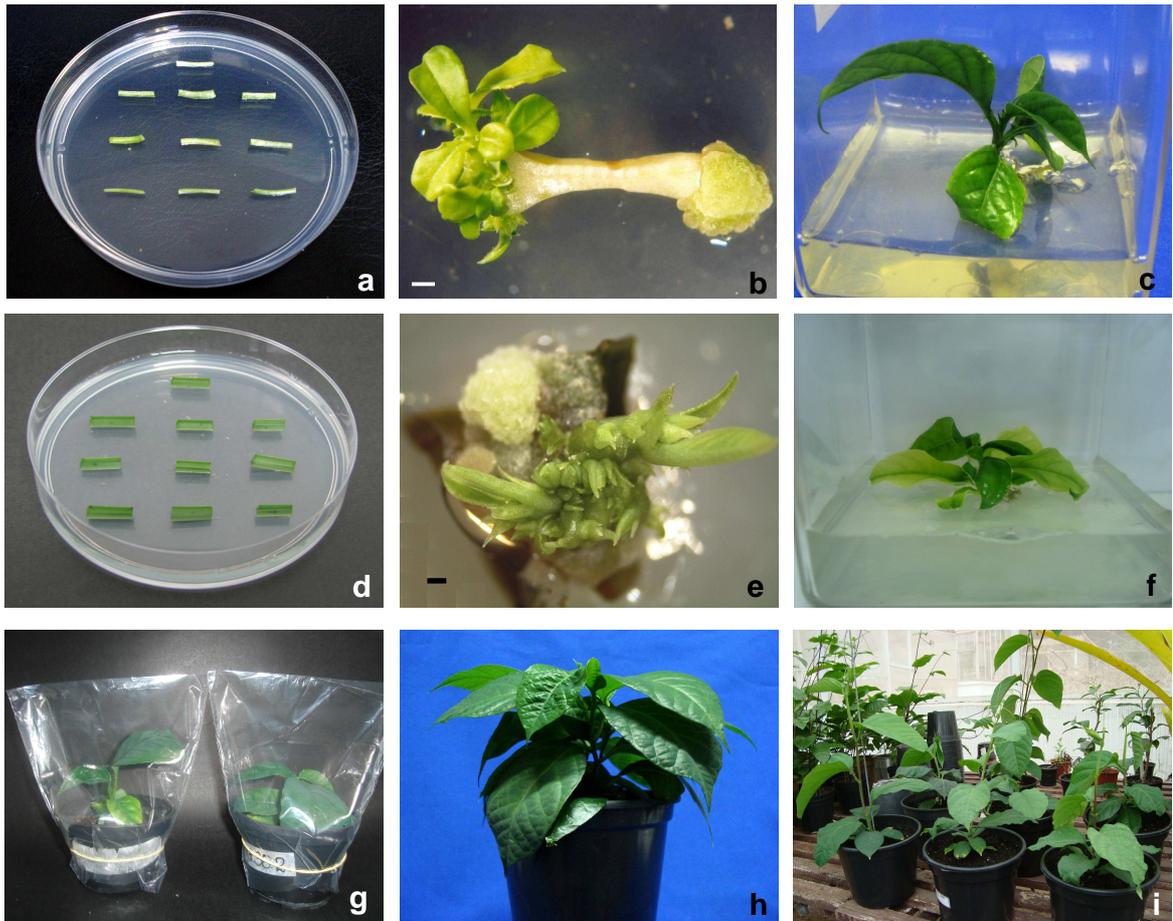


Figura 4 – Organogênese *in vitro* e transformação genética de *Passiflora alata* a partir de segmentos de hipocótilo (a) e segmento internodal (d) cultivados em meio de cultura de seleção e regeneração. b) desenvolvimento das gemas adventícias na extremidade do segmento de hipocótilo após 6 semanas de cultivo em meio de cultura de seleção e regeneração; c) gema adventícia obtida a partir de segmentos de hipocótilo em alongamento em meio de cultura MSM + GA<sub>3</sub> + cefotaxima; e) desenvolvimento de gemas adventícias a partir de segmento internodal, após 4 semanas de cultivo em meio de cultura de seleção e regeneração; f) gema adventícia em alongamento, obtida a partir do segmento internodal; g) aclimatização de plantas; h) planta aclimatizada; i) plantas cultivadas em casa de vegetação. Barras: 1000 µm (b) e 500 µm (e)

Tabela 2 - Transformação genética de *Passiflora alata* via *A. tumefaciens* com o plasmídeo pCambia 2201-CABMV contendo um fragmento do gene da proteína capsidial do CABMV, numa construção tipo *hairpin*, utilizando-se segmento de hipocótilo como explante

Experimento	Nº de explantes com gemas/ Nº total de explantes (%)	Nº de plantas obtidas/ Nº de plantas analisadas	Plantas PCR+		Eficiência de transformação (%) <sup>e</sup>	Plantas aclimatizadas PCR+
			K+	Hp+		
1	37/174 (21,4)	2/2	2	2	1,15	2
2	30/176 (17,0)	0				0
3	71/198 (35,8)	2/2	2	2	1,00	1
4	79/210 (37,6)	2/2	2	2	0,95	
5 <sup>abc</sup>	C: 14/130 (10,7)	3/3	3		2,30	2
	E: 3/120 (2,5)	2/2	2	1	1,66	2
6 <sup>*bc</sup>	31/149 (20,8)	7/7	5	3	3,35	6
7 <sup>*bcd</sup>	C: 15/60 (25,0)	6/6	6	1	10,0	6
	I: 25/60 (41,6)	0				
	E: 7/60 (11,6)	0				
8 <sup>*bc</sup>	50/166 (30,1)	2/2	2		1,20	2
9 <sup>*bc</sup>	45/165 (27,2)	2/1	1		0,60	1
10 <sup>*bc</sup>	63/219 (28,7)	3/1	1		0,45	1
11 <sup>*bc</sup>	28/228 (12,2)	3/-				
12 <sup>*bc</sup>	69/185 (37,2)	0				
13 <sup>*bc</sup>	32/218 (14,6)	0				
14 <sup>*bc</sup>	41/239 (17,1)	5/-				
15 <sup>*bc</sup>	30/199 (15,0)	9/-				
<b>Total</b>	<b>670/2956 (22,6)</b>	<b>48/28</b>	<b>26</b>	<b>11</b>	<b>2,26</b>	<b>23</b>

\*: suplementação do meio de cultura de co-cultivo com acetoseringona (100 µM/L).

a: explantes incubados sob fotoperíodo de 16 h de luz ou na ausência de luz para indução de gemas adventícias; (C: luz; E: escuro). Explantes incubados no escuro por 10 dias, e transferidos para fotoperíodo de 16 h de luz.

b: explantes incubados na suspensão bacteriana por 20 minutos.

c: período de co-cultivo de 3 dias.

d: explantes incubados sob fotoperíodo de 16 h de luz direta, luz indireta ou na ausência de luz, para indução de gemas adventícias; (C: luz direta; I: luz indireta; E: escuro). Explantes incubados no escuro por 10 dias, e transferidos para fotoperíodo de 16 h de luz.

e: eficiência de transformação calculada a partir das plantas analisadas.

-: experimentos em andamento, plantas ainda não analisadas por PCR.

K+: plantas PCR positivas para o gene *npII*.

Hp+: plantas PCR positivas para o fragmento do gene da CP do CABMV.

parâmetros relacionados com a ausência ou presença de luz direta ou indireta durante o processo de seleção e regeneração de gemas adventícias e conseqüentemente a influência na eficiência da transformação genética.

Em todos os experimentos realizados houve a ocorrência de explantes responsivos, como pode ser confirmado na Tabela 2, sendo possível destacar o experimento 7, com cerca de 41,6% de explantes responsivos no tratamento I, que consistiu na incubação dos segmentos de hipocótilo sob luz indireta. Em contrapartida, também foi possível constatar no experimento 7 uma porcentagem baixa de indução de gemas adventícias (11,6%), verificada no tratamento E, que manteve os explantes em ausência de luz nos primeiros dias de incubação.

Com esses resultados, foi possível relacionar a porcentagem de indução de gemas adventícias com a presença ou ausência de luz durante o processo de seleção e regeneração, como pode ser confirmado nos experimentos 5 e 7, em que a ausência de luz nos 10 primeiros dias de incubação acarretou em uma baixa porcentagem de explantes responsivos, com valores de 2,5% e 11,6%, respectivamente.

No restante dos experimentos em que os explantes foram incubados sob fotoperíodo de 16 h de luz, as porcentagens de explantes responsivos foram superiores, como pode ser constatado no experimento 4, em que 37,6% dos explantes foram responsivos e no experimento 12 em que 37,2% dos explantes apresentaram a formação de gemas adventícias.

Foi possível observar a formação de plantas na maioria dos experimentos de transformação genética realizados, utilizando-se o segmento de hipocótilo como explante, com um total de 48 plantas obtidas, como pode ser verificado na Tabela 2. O número de plantas obtidas nos experimentos de transformação genética está relacionado principalmente com o número de gemas adventícias desenvolvidas e alongadas e com a sobrevivência das plantas na fase de aclimatização. Durante a fase de aclimatização, apenas 10 plantas não sobreviveram ao processo. Outro fator que acarreta na perda de plantas já aclimatizadas de maracujá doce é a poda, pois algumas plantas na casa de vegetação não sobreviveram ao processo. A perda de plantas durante a fase de aclimatização também foi observada por Monteiro-Hara (2010) que obteve perdas em torno de 12,5% do número total de plantas obtidas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e por Stipp (2009) em plantas de abobrinha de moita e melancia. Não foram obtidas plantas nos experimentos 2, 12 e 13. Este resultado

provavelmente está relacionado ao baixo número de explantes responsivos e pelo não alongamento das gemas adventícias desenvolvidas.

As plantas obtidas nos experimentos utilizando-se segmento de hipocótilo foram avaliadas por PCR para detecção do gene *nptII* e para detecção do fragmento do gene da proteína capsial do CABMV. Pode-se verificar o desenvolvimento de plantas transgênicas tanto nos experimentos que utilizaram os parâmetros tradicionais da transformação genética de maracujazeiro (experimentos de 1 a 4), como nos experimentos que testaram os novos parâmetros já citados anteriormente (experimentos 5, 6 e 7). Entretanto, foi possível constatar um número maior de plantas desenvolvidas nos experimentos de transformação genética utilizando os parâmetros alternativos, como pode ser verificado a partir do experimento 5.

Também pode-se verificar que a eficiência de transformação foi superior, acima de 2,0%, nos experimentos 5, 6 e 7. A eficiência de transformação genética dos experimentos realizados foi obtida calculando-se o número de plantas PCR positivas pelo número total de explantes introduzidos em cada experimento. Desta maneira, observando a Tabela 2, pode-se confirmar que o uso de novos parâmetros na transformação genética utilizando-se segmentos de hipocótilo foi importante para aumentar o número de plantas transgênicas, ou seja, para aumentar a eficiência de transformação de *P. alata*.

Com relação à influência da presença ou ausência de luz durante a incubação dos explantes, com o número de plantas transgênicas obtidas, foi possível relacionar esses dois fatores observando os resultados obtidos nos experimentos 5 e 7. No experimento 5, a identificação de plantas PCR positivas ocorreu tanto quando os explantes foram incubados sob fotoperíodo de 16 h de luz como em ausência de luz, com eficiência de transformação de 2,3% e 1,66%, respectivamente.

Em contrapartida, o fato não pode ser constatado no experimento 7, pois somente quando os explantes foram incubados sob fotoperíodo de 16 h de luz ocorreu o desenvolvimento de gemas adventícias. No experimento 7, foram identificadas 6 plantas PCR positivas para o gene *nptII* e uma para o fragmento da proteína capsial. O experimento 7 apresentou um eficiência de transformação de 10,0%, sendo a maior porcentagem obtida nos experimentos de transformação genética.

Com isso, conforme verificado no desenvolvimento do protocolo de organogênese *in vitro* (PINTO et al., 2010) pode-se confirmar a importância da

presença de luz durante todo o período de indução das gemas adventícias nos explantes, propiciando um aumento no número de plantas desenvolvidas nos experimentos de transformação genética e conseqüentemente, um aumento da probabilidade do desenvolvimento de plantas transgênicas.

Durante o desenvolvimento do trabalho ocorreram dificuldades para a detecção do fragmento do gene da proteína capsial do CABMV devido a ausência de resultados coerentes como géis de agarose com fragmentos amplificados de tamanho diferente do esperado ou a ausência de amplificação. Como alternativa, foram também utilizados os *primers* específicos para a amplificação do gene de seleção *nptII*. A detecção do gene *nptII* também foi realizada por Quoirin, Winkler e Ayub (2004) para a confirmação da transformação genética em plantas de maracujazeiro contendo a construção antisense do gene *CMe-Aco1*, inibidor da síntese do etileno.

Dessa forma, a identificação das plantas transformadas foi realizada inicialmente utilizando-se os *primers* específicos para a detecção do gene *nptII*. Confirmando-se o resultado com *primers* específicos para a detecção dos fragmento do gene fragmento do gene da proteína capsial do CABMV.

Das plantas obtidas nos experimentos de transformação genética utilizando-se segmentos de hipocótilo, 28 plantas foram analisadas por PCR, resultando em 26 plantas PCR positivas para o gene *nptII* e 11 plantas PCR positivas para o fragmento do gene da proteína capsial do CABMV. Com isso, pode-se observar das 28 plantas analisadas que a maioria foi PCR positiva para o gene *nptII* (92,8%). Algumas plantas ainda serão avaliadas por PCR para a amplificação do fragmento do gene da proteína capsial do CABMV, portanto, o número de plantas transgênicas poderá ser superior ao número obtido até o momento. A Figura 5 corresponde aos géis de agarose obtidos das reações de PCR para a amplificação do fragmento de 650 pb correspondente ao gene *nptII* e para o fragmento de 208 pb do gene da proteína capsial do CABMV.

Os experimentos de transformação genética utilizando segmento internodal como explante confirmaram a eficiência dos novos parâmetros determinados nos experimentos com segmento de hipocótilo e demonstraram a possibilidade do uso desse material vegetal como uma alternativa de explante.

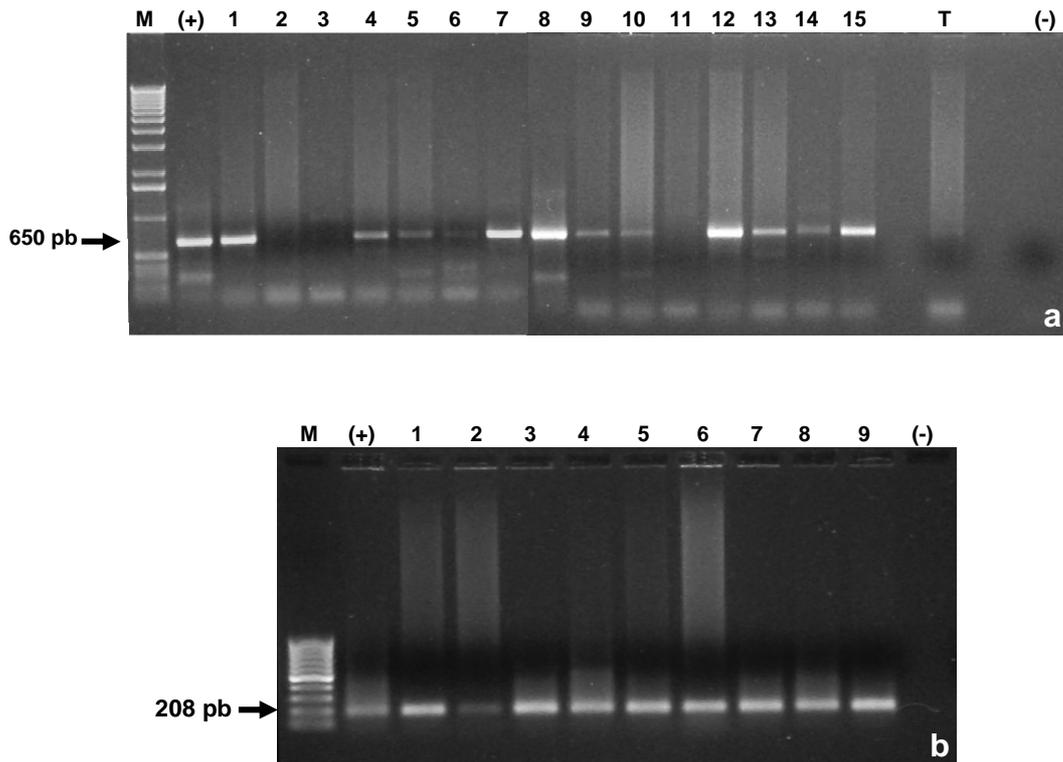


Figura 5 - Análise por PCR das plantas regeneradas nos experimentos de transformação genética de *P. alata* utilizando segmentos de hipocótilo como explantes. a) PCR utilizando *primers* para amplificação do gene de seleção *nptII* (650 pb), M = marcador de 1 Kb (Invitrogen), (+) = controle positivo (planta transgênica de maracujá-azedo com o gene da proteína capsidial e o gene *nptII*, *Southern blot* positivo), 1-15 = plantas analisadas, T = testemunha (planta não-transgênica), (-) = controle negativo (água); b) PCR utilizando *primers* específicos para amplificação do fragmento do gene da proteína capsidial do CABMV (208 pb), M = marcador de 100 pb (Invitrogen), (+) = controle positivo (plasmídeo contendo a construção gênica), 1-9 = plantas analisadas, (-) = controle negativo (água)

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos dos 9 experimentos de transformação genética utilizando-se o segmento internodal, com 425 explantes responsivos de um total de 1668 explantes introduzidos. Dos experimentos realizados pode-se destacar o experimento 2, que apresentou uma porcentagem de 63,6% de explantes responsivos, uma média bem superior a encontrada nos experimentos utilizando-se segmento de hipocótilo.

A utilização do sonicador durante a assepsia dos explantes mostrou-se eficiente tanto na redução da contaminação dos explantes, como no aumento da

resposta de indução de gemas adventícias. Esse fato pode ser confirmado no experimento 1 que mostra uma porcentagem de 39,1% de explantes responsivos com a utilização da sonicação durante a assepsia, enquanto que com o uso do método tradicional de assepsia, observou-se uma porcentagem de 23,3% de explantes responsivos.

Como mostra a Tabela 3, foram obtidas 38 plantas nos experimentos de transformação genética utilizando-se segmento internodal. Não foram obtidas plantas nos experimentos 6, 7 e 8. As plantas obtidas foram avaliadas por PCR, identificando-se 21 plantas positivas, para a amplificação do gene *nptII* (Figura 6). As plantas obtidas nos experimentos de transformação genética utilizando-se os segmentos internodais ainda estão sendo avaliadas por PCR para a amplificação do fragmento do gene da capa protéica do CABMV, por essa razão não há dados na Tabela 3 referentes a esses resultados.

Os experimentos de transformação genética 1, 2 e 3 apresentaram as eficiências de transformação igual ou acima de 2,5%, com a maior porcentagem verificada no experimento 3 (4,0%). As eficiências de transformação observadas individualmente em cada experimento de transformação genética utilizando-se o segmento internodal foram maiores do que nos experimentos utilizando-se o segmento de hipocótilo.

Da mesma maneira, a média da eficiência de transformação genética foi superior utilizando-se o segmento internodal com uma porcentagem de 2,44% comparando-se com os experimentos de transformação utilizando-se o segmento de hipocótilo (2,26%). Valores da eficiência de transformação genética encontrados na literatura são muito variáveis, dependendo de vários fatores, entre eles, da espécie ou variedade e tipo de explante utilizados. Para *P. edulis* f. *flavicarpa*, variedade FB-100, IAC-275 e IAC-277 foram encontrados valores variando de 0,27 a 2,52% para segmentos de hipocótilo (MONTEIRO-HARA, 2010) e para discos foliares, das variedades IAC-275 e IAC-277, de 1,8 e 0,3%, respectivamente (TREVISAN, 2005). A variação da eficiência de transformação genética também pode ser observada em outras espécies frutíferas como melancia (*Citrullus lanatus* cv. 'Crimson Sweet'), de 1,1 a 10,16% (STIPP, 2009) e variedades de laranja doce, como as laranjas 'Hamlin', 'Valência', 'Natal' e 'Pêra' que apresentam eficiência de transformação de 6,2, 5,6, 4,0 e 2,7%, respectivamente (BARBOSA-MENDES, 2007).

Tabela 3 - Transformação genética de *Passiflora alata* via *A. tumefaciens* com o plasmídeo pCambia 2201-CABMV contendo um fragmento do gene da proteína capsidial do CABMV, numa construção tipo *hairpin*, utilizando-se segmento internodal como explante

Experimento <sup>*bc</sup>	Nº de explantes com gemas/ Nº total de explantes (%)	Nº de pl. obtidas/ Nº de pl. analisadas	Nº de plantas PCR+		Eficiência de transformação (%) <sup>d</sup>	Plantas aclimatizadas PCR+
			K+	Hp+		
1 <sup>a</sup>	S: 47/120 (39,1)	3/3	3		2,50	0
	NS: 7/30 (23,3)	2/2	0			
2	89/140 (63,6)	8/8	5		3,57	5
3	50/200 (25,0)	9/9	8		4,00	7
4	43/220 (19,5)	6/5	4		1,81	4
5	95/278 (34,1)	8/2	1		0,35	1
6	33/150 (22,0)	0				
7	28/170 (16,4)	0				
8	19/178 (10,6)	0				
9	14/182 (7,7)	2/-				
<b>Total</b>	<b>425/1668 (29,3)</b>	<b>38/29</b>	<b>21</b>		<b>2,44</b>	<b>17</b>

\*: suplementação do meio de cultura de co-cultivo com acetoseringona (100 µM/L).

a: explantes submetidos durante a assepsia à sonicação (S) ou a ausência de sonicação (NS).

b: explantes incubados por 20 minutos na presença da suspensão bacteriana.

c: período de co-cultivo de 3 dias.

d: eficiência de transformação calculada a partir das plantas analisadas.

-: experimentos em andamento, plantas ainda não analisadas por PCR.

K+: plantas PCR positivas para o gene *npfl*.

Hp+: plantas PCR positivas para o fragmento do gene da CP do CABMV.

Até o momento, após a avaliação das plantas obtidas dos experimentos de transformação genética utilizando-se segmento de hipocótilo e segmento internodal, foi possível verificar um total de 47 plantas transgênicas para a amplificação do gene *nptII* e 11 plantas PCR positivas para o fragmento do gene da proteína capsial do CABMV. As plantas obtidas nos experimentos utilizando-se o segmento internodal serão avaliadas por PCR para a identificação do transgene, na Figura 6 pode-se observar a identificação das plantas transformadas utilizando-se os *primers* específicos para a detecção do gene *nptII*.

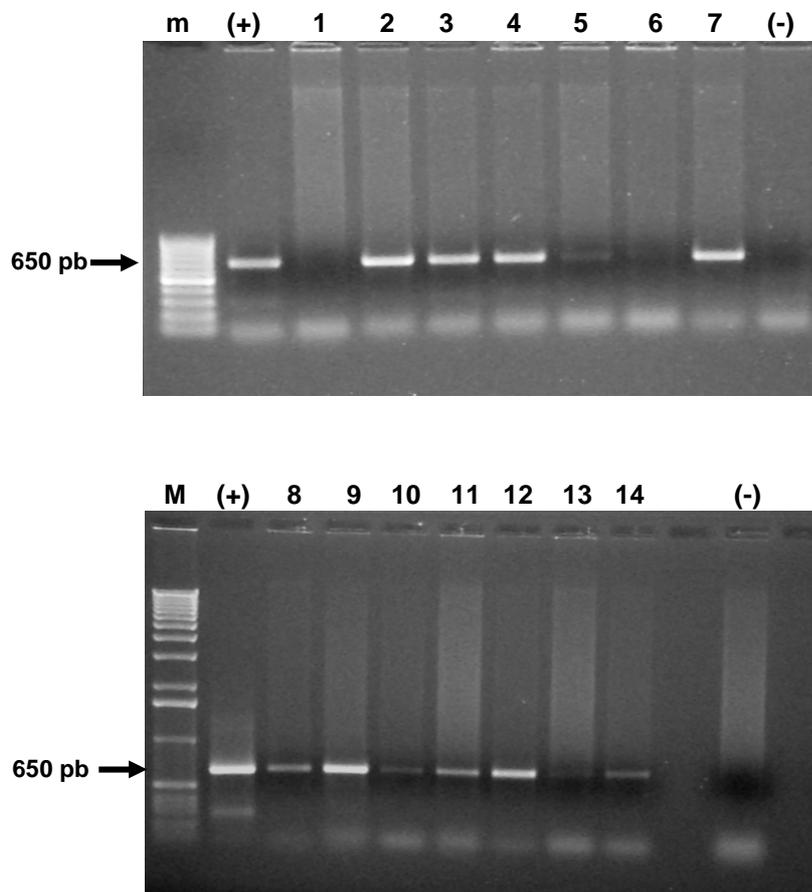


Figura 6 - Análise por PCR das plantas regeneradas nos experimentos de transformação genética de *P. alata* para identificação do fragmento de 650 pb correspondente ao produto amplificado do gene *nptII*. m = marcador de 100 pb (Invitrogen); M = marcador de 1 Kb (Invitrogen); (+) = controle positivo (planta transgênica de maracujá amarelo com o gene da proteína capsial e o gene *nptII*, *Southern blot* positivo); 1 - 14 = plantas analisadas; (-) = controle negativo (água)

Foi realizado o sequenciamento do produto amplificado da reação de PCR de uma planta PCR positiva para o fragmento do gene da proteína capsidial do CABMV. O fragmento foi purificado pelo kit 'QIAEX® II Gel Extration' (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) e quantificado por fluorometria.

A sequência de nucleotídeos obtida (Figura 7a) foi analisada pelo programa BLAST e apresentou 94 - 98% de identidade com a sequência correspondente ao fragmento da CP de diferentes isolados brasileiros do CABMV (Figura 7b).

a)

```
5'- CTCAGCAAATGGTTTGAAGCCATTAAAGAAGAGTACGAGCTGGACGAAGACAAGAT
GGGTGTTATCATGAATGGGTTTCATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAAGTCCACTCTGA
TGTGAATGGAGTGTGGACAATGATGGATGGGGACGAGCAAGTGGAAATTCGCTCAA
GCCATCGTGGAAAA - 3'
```

b)

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">AY433950.1</a>	Cowpea aphid-borne mosaic virus strain CABMV-SP coat protein mRNA	<a href="#">331</a>	331	100%	7e-88	98%
<a href="#">AY253911.1</a>	Cowpea aphid-borne mosaic virus isolate SE1 polyprotein mRNA, parti	<a href="#">331</a>	331	100%	7e-88	98%
<a href="#">AY434454.1</a>	Cowpea aphid-borne mosaic virus strain CABMV-M3 coat protein gene	<a href="#">303</a>	303	100%	2e-79	96%
<a href="#">AY505342.1</a>	Cowpea aphid-borne mosaic virus strain F-144 polyprotein mRNA, par	<a href="#">292</a>	292	100%	3e-76	95%
<a href="#">AY433951.1</a>	Cowpea aphid-borne mosaic virus strain F-101 coat protein mRNA, pa	<a href="#">292</a>	292	100%	3e-76	95%
<a href="#">AY433952.1</a>	Cowpea aphid-borne mosaic virus strain CABMV-M2 coat protein mRN	<a href="#">287</a>	287	100%	2e-74	94%

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Figura 7 - Análise de sequenciamento. a) sequência de nucleotídeos de aproximadamente 200 pb do transgene; b) valores de identidade da sequência de nucleotídeos do transgene com diferentes isolados do CABMV

#### 4.3 Análise de *Southern blot* das plantas identificadas como transgênicas pela análise de PCR

Dentre as plantas identificadas como transgênicas por PCR, 30 plantas foram submetidas à análise por *Southern Blot* para confirmação da integração do transgene e determinação do número de eventos de inserção (Figura 8). O DNA foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI*, cortando o T-DNA uma vez, fora da região do gene de interesse. Devido a dificuldade de detecção do transgene da

construção *hairpin*, optou-se pela realização da análise de *Southern blot* utilizando-se a sonda para detecção do gene de seleção *nptII*.

Das plantas analisadas 16 foram oriundas de experimentos de transformação genética utilizando-se segmento de hipocótilo e 14 foram provenientes de experimentos utilizando-se segmento internodal. As colunas 1, 2, 6, 8, 10, 14, 18, 24 e 26 (Figura 8) representam as plantas obtidas nos experimentos e que apresentaram hibridização com a sonda do gene *nptII* (650 pb) confirmando a integração desse gene.

A maioria das plantas analisadas apresentaram 2 eventos de inserção na digestão realizada com a enzima *EcoRI*, com exceção da planta 8 que apresentou somente 1 evento de inserção do gene *nptII*. Das 9 plantas analisadas que confirmaram a integração do transgene, observou-se que 7 plantas foram provenientes dos experimentos de transformação genética utilizando-se segmento de hipocótilo, e apresentaram 2 eventos de inserção do gene. Somente duas plantas obtidas dos experimentos utilizando o segmento internodal apresentaram a integração do transgene. A planta 8 apresentou somente 1 evento de inserção como observado na Figura 8b, e a planta 26 apresentou dois eventos de inserção do transgene (Figura 8d).

Em maracujazeiro, a análise *Southern blot* de plantas transformadas com o gene da proteína capsidial do CABMV (TREVISAN et al., 2006) mostrou a integração do transgene em 7 das 8 plantas avaliadas. Destas, 3 linhagens transgênicas apresentaram elevado número de eventos de inserção e, 2 plantas com apenas um evento de inserção. Monteiro-Hara (2010) verificou a integração do gene *nptII* em 5 plantas transgênicas, apresentando de 1 a 5 eventos de inserção, obtendo a hibridização da sonda do fragmento antisenso do gene do CABMV em 4 das 5 plantas analisadas, com 1 a 2 eventos de inserção.

As análises de *Southern blot* encontrados na literatura, geralmente relatam a ocorrência de diferentes eventos de inserção no genoma das plantas transformadas, de 1 a 3 cópias (ZHANDONG et al., 2007; BAG; SINGH; JAIN, 2007) e de uma a múltiplas cópias (NEVES-BORGES et al., 2001) apresentando diferentes pesos moleculares. Clarke et al. (2008) observaram que as plantas analisadas apresentaram a integração do transgene com tamanho maior que do T-DNA (inserção completa do T-DNA), como também de fragmentos menores, com inserção

parcial do T-DNA, podendo ser causada pela integração truncada do mesmo (ZHU et al., 2006).

Zanek et al. (2008) verificaram a integridade do transgene e o número de cópias inseridas no genoma de variedades de laranja doce, onde a maioria das linhagens apresentou uma cópia do transgene, enquanto 2 linhagens mostraram a inserção de 2 a 3 cópias. Resultados semelhantes foram obtidos por Muniz (2008) para plantas de laranja 'Valência' contendo o gene da proteína capsidial e da região conservada do CTV (*Citrus tristeza virus*), que apresentaram de 1 a 3 eventos de inserção. Stipp (2009) apresentou resultados de hibridização da sonda dos fragmentos dos genes da capa protéica do ZYMV e PRSV-W em 3 plantas de abobrinha-de-moita com 1 a 2 eventos de inserção.

Pode-se constatar que 21 plantas analisadas não apresentaram a integração do transgene, mesmo sendo PCR positivas para o gene *nptII*. Este fato pode ter ocorrido por diversos fatores que podem estar interferindo na análise por *Southern blot* como: a própria técnica que apresenta certa dificuldade de execução, a ausência de trabalhos com essa espécie reduzindo o número de informações adicionais disponíveis e a possibilidade da ocorrência de uma inserção parcial do vetor de expressão no genoma da planta, impossibilitando assim, a hibridização com a sonda do gene *nptII*.

Novas análises serão realizadas para confirmação da integração do transgene. As plantas transgênicas serão propagadas e avaliadas para resistência ao CABMV.

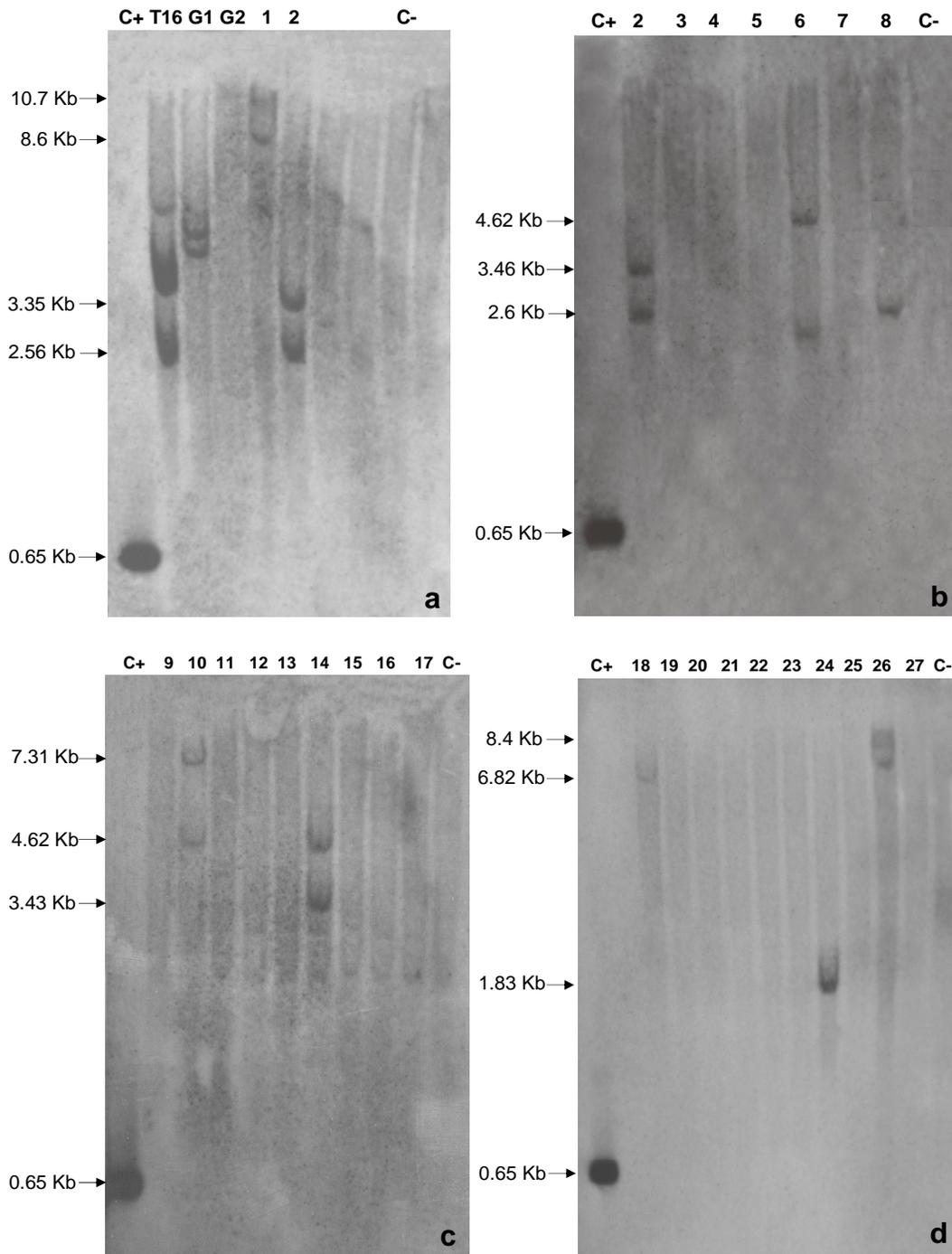


Figura 8 - Análise de *Southern blot* das plantas de *P. alata* provenientes de experimentos de transformação genética. a-d) C+: controle positivo (sonda não marcada), C-: controle negativo (planta não-transgênica), T16: planta transgênica de maracujá amarelo com o gene da capa protéica e o gene *nptII*, *Southern blot* positivo; G1 e G2: plantas PCR positivas para o gene *nptII*. Plantas analisadas: a) 1 e 2; b) 2 a 8; c) 9 a 17 e d) 18 a 27

## 5 CONCLUSÕES

- ✓ A transformação genética de *Passiflora alata* é um processo viável, sendo possível a obtenção de plantas transgênicas.
  
- ✓ Foram obtidas plantas transgênicas de *P. alata* com a construção gênica pCABMV-dsCP contendo um fragmento do gene da proteína capsidial do CABMV.
  
- ✓ O processo de transformação genética de maracujazeiro (*P. alata*) é influenciado pela ausência ou presença de luz e pelo tipo de explante utilizado.

## REFERÊNCIAS

- ABHARY, M.K.; ANFOKA, G.H.; NAKHLA, M.K.; MAXWELL, D.P. Post-transcriptional gene silencing in controlling viruses of the *Tomato yellow leaf curl virus complex*. **Archives of Virology**, New York, v. 151, p. 2349-2363, 2006.
- 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**, Brasília, v. 30, p. 33-38, 2005.
- AMUGUNE, N.O.; GOPALAN, H.N.B.; BYTEBIER, B. Leaf disc regeneration of passion fruit. **African Crop Science Journal**, Kampala, v. 1, p. 99-104, 1993. Disponível em: <http://www.bioline.org.br/request?cs93015>. Acesso em: 16 Jul. 2010.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passion fruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 2007-2013, 1999.
- ARAGÃO, F.J.L.; FARIA, J.C. de. Avanços no desenvolvimento de plantas transgênicas com resistência a doenças no Brasil. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 15, p. 45-68, 2007.
- BAG, S.; SINGH, R.S.; JAIN, R.K. *Agrobacterium* – mediated transformation of groundnut with coat protein gene of *Tobacco streak virus*. **Indian Journal of Virology**, New Delhi, v. 18, p. 65-69, 2007.
- BARBOSA, W.M. **Morfogênese *in vitro* de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada a antibióticos e ao etileno**. 1999. 70 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.
- BARBOSA-MENDES, J.M. **Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *hrpN* (harpina) e avaliação da resistência ao cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)**. 2007. 78 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade São Paulo, Piracicaba, 2007.
- BARBOSA, A.S.; LIN, C.J. Silenciamento de genes com RNA interferência: um novo instrumento para investigação da fisiologia e fisiopatologia do córtex adrenal. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 48, n. 5, p. 612-619, 2004.
- BARROS, D.R.; BESERRA, J.E.A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; PIORIBEIRO, G.; ZERBINI, F.M. Complete genomic sequence of two isolates of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) obtained from different hosts. **Virus Review & Research**, Porto Alegre, v. 12, p. 238-239, 2007.
- BAULCOMBE, D. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1833-1844, 1996.

- BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. **Nature**, London, v. 431, p.356-363, 2004.
- BECERRA, D.C.; FORERO, A.P.; GÓNGORA, G.A. Age and physiological condition of donor plants affect in vitro morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 79, p. 87-90, 2004.
- BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, p. 355-356, 2003.
- BERNSTEIN, E.; CAUDY, A.A.; HAMMOND, S.M.; HANNON, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, London, v. 409, p. 363-366, 2001.
- BIASI, L.A.; FALCO, M.C.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, p. 661-665, 2000.
- BRASIL. Ministério da Integração Nacional. Secretaria de Infra-Estrutura Hídrica. **Maracujá**: Distrito Federal. Brasília, 2002. p. 1-8. (Frutiséries, 2).
- BRAZ, A.S.K. **Clonagem e sequenciamento dos genes da proteína capsidial e da replicase de um Potyvirus causador do endurecimento dos frutos do maracujazeiro, e transformação de maracujá-amarelo com construção derivada desses genes**. 1999. 106 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.
- BUKOVINSZKI, A.; DIVÉKI, Z.; CSÁNYI, M.; PALKOVICS, L.; BALÁZS, E. Engineering resistance to PVY in different potato cultivars in a marker-free transformation system using a 'shooter mutant' *A. tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 26, p. 459-465, 2007.
- CANCINO, G. O.; DAVEY, M. R.; LOWE, K.C.; AND POWER J. B. Shoot regeneration from leaf and root explants of *Passiflora mollissima*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.49, p.65, 1998.
- CHELLAPPAN, P.; MASONA, M.V.; VANITHARANI, R.; TAYLOR, N.J.; FAUQUET, C.M. Broad spectrum resistance to ssDNA viruses associated with transgene-induced gene silencing in Cassava. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 56, p. 601-611, 2004.
- CHEN, Y.; LOHUIS, D.; GOLDBACH, R.; PRINS, M. High frequency induction of RNA-mediated resistance against *Cucumber mosaic virus* using inverted repeat constructs. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 14, p. 215-226, 2004.
- CLARKE, J.L.; SPETZ, C.; HAUGSLIEN, S.; XING, S.; DEES, M.W.; MOE, R.; BLYSTAD, D.R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of poinsettia, *Euphorbia pulcherrima*, with virus-derived hairpin RNA constructs confers resistance to *Poinsettia mosaic virus*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 27, p. 1027-1038, 2008.

COPPENS, D.G.; SEGURA, S.D.; HODSON, de J.E.; GONGORA, G. Les fruits de la Passion. In: CHARRIER, A.; JACQUOT, M.; HAMON, S.; NICOLAS, D. **L'amélioration des plantes tropicales**. Montpellier : CIRAD, 1997. p. 291-312.

COSTA, R.S.; MÔRO, F.V.; OLIVEIRA, J. C. de. Influência do momento de coleta sobre a viabilidade de grão de pólen em maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis). **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p. 956-961, 2009.

CUNHA, M.A.P.; BARBOSA, L.C. Aspectos botânicos. In: LIMA, A.A. **Maracujá produção: aspectos técnicos**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2002. p. 11-14.

CUOZZO, M.; O'CONNEL, W.; KANIEWSKI, R.; FANG, N.; CHUA, H.; TUMER, N. Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the *Cucumber mosaic virus* coat protein or its antisense RNA. **Nature Biotechnology**, London, v. 6, p. 549-557, 1988.

DESAI, H.V.; MEHTA, A.R. Changes in polyamine levels during shoot formation, root formation and callus induction in cultured *Passiflora* leaf discs. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.119, p. 45-53, 1985.

DIAS CARVALHO, M.S. Principais doenças fúngicas e bacterianas do maracujazeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 206, p. 34-38, 2000.

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**, Heidelberg, 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**, Dordrecht, v. 36, p. 211-217, 1994.

DORNELAS, M.C.; TAVARES, F.C.A.; OLIVEIRA, J.C. de; VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* spp. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 15, p. 106-110, 1995.

DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 26, p. 23-27, 1991.

D'UTRA VAZ, F.B.; SANTOS, A.V.P. dos; 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* fv *flavicarpa* Degener.): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 12, p. 220-225, 1993.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro - Desafios da Pesquisa. In: FALEIRO, F.G; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 187-210.

FANG, G.; GRUMET, R. Genetic engineering of potyvirus resistance using constructs derived from the zucchini yellow mosaic virus coat protein gene. **Molecular Plant Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 6, p. 358-367, 1993.

FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, Alexandria, v. 32, p. 1276-1277, 1997a.

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 and Developmental Biology - Plant**, Gaithersburg, v. 33, p. 209-212, 1997b.

FERNANDO, J.A.; VIEIRA, M.L.C.; MACHADO, S.R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. New insights into the *in vitro* organogenesis process: the case of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 91, p. 37-44, 2007.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, London, v. 391, p. 806-811, 1998.

FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS. **Agrianual 2009**. Anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2009. p. 331-376.

GOES, A. de. Doenças fúngicas da parte aérea da cultura de maracujá. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., 1998, Jaboticabal. **Maracujá: do plantio à colheita**. Jaboticabal: Funep, 1998. p. 208-216.

GOLDBACH, R.; BUCHER, E.; PRINS, M. Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. **Virus Research**, Amsterdam, v. 92, p. 207-212, 2003.

GUZZO, F.; CEOLDO, S.; ANDREETTA, F.; LEVI, M. *In vitro* culture from mature seeds of *Passiflora* species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, p. 108-113, 2004.

HALL, R.M.; DREW, R.A.; HIGGINS, C.M.; DIETZGEN, R.G. Efficient organogenesis of a passionfruit hybrid (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 48, p. 673-680, 2000.

HASSAIRI, A.; MASMOUDI, K.; ALBOUY, J.; ROBAGLIA, C.; JULLIEN, M.; ELLOUZ, R. Transformation of two potato cultivars "Spunta" and "Claustar" (*Solanum tuberosum*) with *Lettuce mosaic virus* coat protein gene and heterologous immunity to potato virus Y. **Plant Science**, Limerick, v. 136, p. 31-42, 1998.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**. Maracujá. Brasília, 2007. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=10&i=P>>. Acesso em: 19 ago. 2009.

ISUTSA, D.K. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, p. 395-400, 2004.

ITI Tropicals. **Passion fruit**. 2010. Disponível em: <http://www.passionfruitjuice.com>  
Acesso em: 03 jun. 2010.

JUNGHANS, T.G.; VIDAL, A.M.; SOUZA, A.S. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de maracujazeiro amarelo em função do meio de cultivo e temperatura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Os novos desafios da fruticultura brasileira**; resumos... Belém, 2002. 1 CD-ROM.

JUNQUEIRA, N.T.V.; PEIXOTO, J.R.; BRANCHER, A.; JUNQUEIRA, K.P.; FIALHO, J.F. Melhoramento genético do maracujá-doce. In: MANICA, I.; JOSÉ, A.R.S.; BRUCKNER, C.H.; HOFFMANN, M. (Ed.). **Maracujá-doce**: tecnologia de produção, pós-colheita e mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2005. p. 39-46.

KANTHARAJAH, A.S.; DODD, W.A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). **Annals of Botany**, Oxford, v. 63, p. 337-339, 1990.

KAVATI, R.; PIZA JUNIOR, C.T. **Cultura do maracujá-doce**. Campinas: CATI, 2002. p.10-12. (Boletim Técnico, 244).

KAWATA, K.; USHIDA, C.; KAWAI, F.; KANAMORI, M.; KURIYAMA, A. Micropropagation of passionfruit from subcultured multiple shoot primordia. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 147, p. 281-284, 1995.

KITAJIMA, E.W. Vírus e fitoplasmas do maracujazeiro no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5, 1998, Jaboticabal. **Maracujá**: do plantio à colheita. Jaboticabal: Funep, 1998. p. 230-243.

KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M. Vírus e fitoplasmas em fruteiras tropicais no Brasil. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; MONTEIRO, A.J.A; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa: Editora UFV, 2002. v. 1, p. 619-642.

LEÃO, R.M.K.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; RESENDE, R. de O.; MATTOS, J.K. de A.; MELO, de B. Reação de progênies de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* - cabmv) em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 22, n. 2, p. 87-92, 2006.

LEE, L.K.; ROTH, C.M. Antisense technology in molecular and cellular bioengineering. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 14, p. 505-511, 2003.

LIMA, M.M. **Competitividade da cadeia produtiva do maracujá na região integrada de desenvolvimento do Distrito Federal e Entorno-Ride**. 2001. 182 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2001.

LIN, S.S.; HENRIQUES, R.; WU, H.W.; NIU, Q.W.; YEH, S.D.; CHUA, N.H. Strategies and mechanisms of plant virus resistance. **Plant Biotechnology Report**, New York, v. 1, p. 125-134, 2007.

- LOMBARDI, S.P. **Estudos anatômicos e fisiológicos da organogênese *in vitro* em *Passiflora cincinnata* MAST**. 2003. 60 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- LOMBARDI, S.P.; PASSOS, I.R.S.; NOGUEIRA, M.C.S.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* mast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, p. 239-247, 2007.
- 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.
- LUDLOW, E.J.; MOURADOV, A.; SPANGENBERG, G.C. Post-transcriptional gene silencing as an efficient tool for engineering resistant to white clover mosaic virus in white clover (*Trifolium repens*). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 166, p. 1557-1567, 2009.
- MACIEL, S. da C.; NAKANO, D.H.; REZENDE, J.A.M.; VIEIRA, M.L.C. Screening of *Passiflora* species for reaction to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* reveals an immune wild species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, p. 414-418, 2009.
- MALAVOLTA JÚNIOR, V.A. Bacterioses do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., 1998, Jaboticabal. **Maracujá: do plantio à colheita**. Jaboticabal: Funep, 1998. p. 217-229.
- 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**, Heidelberg, v. 13, p. 697-702, 1994.
- MANICA, I. Maracujá do Brasil. In: MANICA, I.; JOSÉ, A.R.S.; BRUCKNER, C.H.; HOFFMANN, M. (Ed.). **Maracujá-doce: tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2005. p. 11-26.
- MAROTA, W.; OTONI, W.C.; CARNELOSSI, S.E.; AZEVEDO, A.A.; VIERA, G. Rhizogenesis in *in vitro* shoot cultures of passion fruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Deg.) is affected by ethylene precursor and ethylene by inhibitors. **International Journal of Agricultural Science**, New Delhi, v. 7, p. 47-54, 2001.
- MELETTI, L.M.M.; MAIA, M.L. **Maracujá: produção e comercialização**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1999. 62 p. (Boletim Técnico, 181).
- MELETTI, L.M.M.; BERNACCI, L.C.; SOARES-SCOTT, M.D.; FILHO, A. de A.; MARTINS, A.L.M. Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agronômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, p. 275-278, 2003.

MOHAMED, M.E.; HICKS, R.G.T.; BLAKESLEY, D. Shoot regeneration from mature endosperm of *Passiflora foetida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 46, p. 161-164, 1996.

MOHIUDDIN, A.K.M.; CHOWDHURY, M.K.U.; ABDULLAH, Z.C.; NAPIS, S. Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber *in vitro* shoot regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, p. 75-78, 1997.

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 folha. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 4., 1996, Piracicaba. **Resumos...** São Paulo: USP, 1996. v. 1, p. 417.

MONTEIRO, A.C.B. de A.; HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N.; RODRIGUEZ, A.P.M. A novel approach for the definition of the inorganic medium component for micropropagation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Gaithersburg, v. 36, p. 527-531, 2000a.

MONTEIRO, A.C.B. de A.; NAKAZAWA, G.T.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, p. 571-573, 2000b.

MONTEIRO-HARA, A.C.B. de A. **Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora***. Piracicaba. 2000. 82 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

MONTEIRO, M. **Transformação genética de maracujá amarelo visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae***. 2005. 134 f. Tese (Doutorado em Genética) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MONTEIRO-HARA, A.C.B. de A. **Transformação genética de maracujazeiro azedo para resistência ao vírus do endurecimento dos frutos (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV)**. 2010. 76 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MORAN ROBLES, M.J. Multiplication végétative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et de *P. mollissima* Bailey. **Fruits**, Paris, v. 33, p. 693-699, 1978.

MORAN ROBLES, M.J. Potentiel morphogénétique des entrenoeuds de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et *P. mollissima* Bailey en culture *in vitro*. **Turrialba**, San José, v. 29, p. 224-228, 1979.

MOURAD-AGHA, N.; DEXHEIMER, J. Étude ultrastructurale de la différenciation des éléments conducteurs dans une culture de tissu de *Passiflora quadrangularis* L.I. Cals cultivés à l'obscurité. **Cytologia**, Tokyo, v. 44, p. 615-631, 1979.

MUNIZ, F.R. **Caracterização molecular e avaliação da resistência ao vírus da tristeza dos citros (CTV) em plantas transgênicas de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis* L. Osbeck)**. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade São Paulo, Piracicaba, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NASCIMENTO, A.V.S.; SANTANA, E.N.; BRAZ, A.S.K.; ALFENAS, P.F.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G.P.; CARVALHO, M.G. de; ZERBINI, F.M. *Cowpea aphid-bourne mosaic virus* (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Archives of Virology**, New York, v. 151, p. 1797-1809, 2006.

NAKANO, V. A. **Micropropagação de espécies de helicônia, caracterização morfológica e identificação molecular de bactérias contaminantes**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

NAKAYAMA, F. Cultivo *in vitro* de tejidos de *Passiflora caerulea*. **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de la Plata**, Buenos Aires, v. 42, p. 63-74, 1966.

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**, Limerick, v. 160, p. 699-712, 2001.

NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M. Selected mild strains of *Passion fruit woodiness virus* (PWV) fail to protect pre-immunized vines in Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, p. 699-708, 2003.

NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W. Doenças causadas por vírus e fitoplasma em maracujazeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, p. 39-40, 49-51, 2000.

OLIVEIRA, J.C.; SALOMÃO, T.A.; RUGGIERO, C.; ROSSINI, A.C. Variações observadas em frutos de *Passiflora alata* Ait. **Proceedings of the Tropical Region of the American Society of Horticultural Science**, Geneva, v. 25, p. 343-345, 1982.

OSIPI, E.A.F.; NAKAGAWA, J. Efeito da temperatura na avaliação da qualidade fisiológica de sementes do maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryander). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 179-181, 2005.

OTAHOLA, V. Regeneración de plantas de parchita (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) a partir del cultivo *in vitro* de discos de hojas. **Bioagro**, La Rioja, v. 12, p. 71-74, 2000.

OTONI, W.C. **Hibridação, embriogênese somática e transformação genética em espécies de *Passiflora***. 198 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

OTONI, W.C.; CASALI, V.W.D.; CECON, P.R.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. Regeneração de plantas de maracujazeiro (*Passiflora coccinea* Aubl.) a partir de protoplastos derivados de mesófilo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 42, p. 461-468, 1995a.

OTONI, W.C.; CASALI, V.W.D.; CECON, P.R.; MARIA, J.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Influência do antibiótico cefotaxima na cultura de protoplastos derivados de mesófilo de *Passiflora incarnata* L. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 42, p. 507-515, 1995b.

PASSOS, I.R.S. **Comportamento *in vitro* em *Vitis* spp e em *Passiflora nitida* H.B.K.** 112 f. Tese (Doutorado em Genética) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

PASSOS, I.R.S.; MATOS, G.V.C.; SCOTT, M.D.S.; MELETTI, L.M.M.; BERNACCI, L.C.; VIEIRA, M.A.R. Regeneração de plantas via organogênese *in vitro* para cinco espécies de maracujá (*Passiflora* spp.). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 48., 2002, Águas de Lindóia. Águas de Lindóia: SBG, 2002.

PASSOS, I.R.S.; MATOS, G.V.C.; BINSFELD, P.C.; ROSALES, M.B.; SCOTT, M.D.S.; SAWASAKI, H.E.; MELETTI, L.M.M.; BERNACCI, L.C.; SIQUEIRA, W.J. Protoplasts: isolation, culture and plant regeneration in species of the genus *Passiflora*. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOLOGIA CELULAR, 12.; CONGRESSO DA SOCIEDADE IBEROAMERICANA DE BIOLOGIA CELULAR, 9., 2004, Campinas. Campinas, 2004.

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. cap. 18, p. 457-467.

PESTANA, M.C.; LACORTE, C.; FREITAS, V.G.; OLIVEIRA, D.E.; MANSUR, E. *In vitro* regeneration of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through organogenesis: effect of culture temperature and silver nitrate. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Gaithersburg, v. 35, p. 214-216, 1999.

PINTO, A.P.C.; MONTEIRO-HARA, A.C.B. de A.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J. *In vitro* organogenesis of *Passiflora alata*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Gaithersburg, v. 46, p. 28-33, 2010.

POWELL-ABEL, P.P.; NELSON, R.S. de B.; HOFFMAN, 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**, Washington, 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**, Alexandria, v. 37, p. 575-577, 2002.

PUA, E.C.; CHI, G.L. De novo shoot morphogenesis and plant growth of mustard (*Brassica juncea*) in vitro in relation to ethylene. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 88, p. 467-474, 1993.

QUOIRIN, M.; WINKLER, L.M.; AYUB, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) with the *CMe-Aco1* gene. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 632, p. 243-248, 2004.

RAVELONANDRO, 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: plum pox (sharka) model. **Virus Research**, Amsterdam, v. 71, p. 63-69, 2000.

REIS, L.B.; PAIVA NETO, V.B.; PICOLI, E.A.T.; COSTA, M.G.C.; RÊGO, M.M.; CARVALHO, C.R.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C. Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, Gaithersburg, v. 39, p. 618-622, 2003.

REIS, L.B. dos; SILVA, M.L. da; LIMA, A.B.P.; OLIVEIRA, M.L.P. de; PINTO, D.L.P.; LANI, E.R.G.; OTONI, W.C. *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of yellow passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis* f. *flavicarpa*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 738, p. 425-431, 2007.

RIBAS, A.F.; DENIS, F.; QUOIRIN, M.; AYUB, R.A. Misturas vitamínicas na regeneração do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 237-241, 2002.

RODRIGUEZ, M.V.; SEVERÍN, C.R.; GIUBILEO, G.; GATTUSO, M.A.; PULIDO, L.; DI SAPIO, O.A.; GATTUSO, S.J. Cultivo *in vitro* de *Passiflora alata*, una forma de conservación genética. **Actas de Horticultura**, Valencia, v. 48, p. 69-72, 2007.

RUGGIERO, C. Situação da cultura do maracujazeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, p. 5-9, 2000.

SANFORD, J.C.; JOHNSTON, S.A. The concept of pathogen-derived resistance. **Journal of Theoretical Biology**, Amsterdam, v. 113, p. 395-405, 1985.

SANJAYA, V.V.S.; PRASAD, V.; KIRTHI, N.; MAIYA, S.P.; SAVITHRI, H.S.; LAKSHMI SITA, G. Development of cotton transgenic with antisense AV2 gene for resistance against cotton leaf curl virus (CLCuD) via *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, p. 55-63, 2005.

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**. 2001. 75 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

SANTOS FILHO, H.P.; LARANJEIRA, F.F. Doenças do maracujazeiro – doenças causadas por fungos. In: LIMA, A. de A.; CUNHA, M.A.P. da. (Ed.). **Maracujá:**

produção e qualidade na passicultura. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 241-267.

SCHWIND, N.; ZWIEBEL, M.; ITAYA, A.; DING, B.; WANG, M.; KRCZAL, G.; WASSENEGGER, M. RNAi-mediated resistance to *Potato spindle tuber viroid* in transgenic tomato expressing a viroid hairpin RNA construct. **Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 10, p. 459-469, 2009.

SILVA, C. de S.; RUA, P.S. Aspectos econômicos: Mercado Nacional e Internacional. In: LEONEL, S.; SAMPAIO, A.C. **Maracujá-doce**: Aspectos técnicos e econômicos. São Paulo: Fundação Editora da UNESP, 2007. p. 7-24.

SILVA, M.B. **Transformação genética de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener.) mediada por *Agrobacterium tumefaciens***. 1998. 45 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

SILVA, M.L. da; PINTO, D.L.P.; GUERRA, M.P.; FLOH, E.I.S.; BRUCKNER, C.H.; OTONI, W.C. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, p. 47-54, 2009.

SCORZA, S.D.; JANICK, J. *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 105, p. 892-897, 1980.

SMITH, N.A.; SINGH, S.P.; WANG, M.; STOUTJESDIJK, P.A.; GREEN, A.G.; WATERHOUSE, P.M. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. **Nature**, London, v. 407, p. 319-320, 2000.

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

SOUZA, A.J.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F. de A.A. Gene silencing: concepts, applications and perspectives in woody plants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, p. 645-656, 2007.

STIPP, L.C.L. **Transformação genética de abobrinha-de-moita e melancia para resistência ao *Papaya ringspot virus* – type Watermelon e ao *Zucchini yellow mosaic virus***. 2009. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade São Paulo, Piracicaba, 2009.

SUSI, P.; HOHKURI, M.; WAHLROOS, T.; KILBY, N.J. Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 54, p. 157-174, 2004.

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

TREVISAN, F. **Transformação genética de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) para resistência ao vírus do endurecimento dos frutos**. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

TREVISAN, F.; MENDES, B.M.J. Optimization of *in vitro* organogenesis in passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, p. 346-350, 2005.

TREVISAN, F.; MENDES, B.M.J.; MACIEL, S.C.; VIEIRA, M.L.C.; MELETTI, L.M.M.; REZENDE, J.A.M. Resistance to *Passion fruit woodiness virus* in transgenic passionflower expressing the virus coat protein gene. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, p. 1026-1030, 2006.

VASCONCELLOS, M. A. das; CEREDA, E. O cultivo do maracujá doce. In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.). **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista: UESB, 1994. p. 71-83.

VASCONCELLOS, M.A.S.; BRANDÃO FILHO, J.U.T.; VIEITES, R.L. Maracujá-doce. In: BRÜCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 387-408.

VENDRUSCOLO, E.C.G. Silenciamento gênico e transgênicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 31, p. 8-13, 2003.

VIEIRA, M.L.C.; TAKAHASHI, E.K.; FALCO, M.C.; VIEIRA, L.G.; PEREIRA, L.F.P. Direct gene transfer to passion fruit (*Passiflora edulis*) with the *atacin A* gene. In: INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR PLANT TISSUE CULTURE AND BIOTECHNOLOGY CONGRESS, 10., 2002, Orlando. **Proceedings...** Orlando: International Association for Plant Tissue Culture and Biotechnology, 2002. p. 103-A.

WANG, M.B.; ABBOTT, D.C.; WATERHOUSE, P.M. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. **Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 1, p. 347-356, 2000.

WATERHOUSE, P.M.; HELLIWELL, C.A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 4, p. 29-38, 2003.

WESLEY, S.V.; HELLIWELL, C.A.; SMITH, N.A.; WANG, M.; ROUSE, D.T.; LIU, Q.; GOODING, P.S.; SINGH, S.P.; ABBOTT, D.; STOUTJESDIJK, P.A.; ROBINSON, S.P.; GLEAVE, A.P.; GREEN, A.G.; WATERHOUSE, P.M. Construct design for efficient, effective, and high-throughput gene silencing in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 27, p. 581-590, 2001.

YU, H.; KUMAR, P.P. Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 22, p. 167-174, 2003.

ZANEK, M.C.; REYES, C.A.; CERVERA, M.; PEÑA, E.J.; VELÁZQUEZ, K.; COSTA, N.; PLATA, M.I.; GRAU, O.; PEÑA, L.; GARCIA, M.L. Genetic transformation of

sweet orange with the coat protein gene of *Citrus psorosis virus* and evaluation of resistance against the virus. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 27, p. 57-66, 2008.

ZERBINI, F.M.; NASCIMENTO, A.V.S.; ALFENAS, P.F.; TORRES, L.B.; BRAZ, A.S.K.; SANTANA, E.N.; OTONI, W.C.; CARVALHO, M.G. Transformação genética do maracujazeiro para resistência a doenças. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 589-598.

ZHANDONG, Y.; SHUANGYI, Z.; QIWEI, H. High level resistance to *Turnip mosaic virus* in Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson) transformed with the antisense Nlb gene using marker-free *Agrobacterium tumefaciens* infiltration. **Plant Science**, Limerick, v. 172, p. 920-929, 2007.

ZHU, Q.H.; RAMM, K.; EAMENS, A.L.; DENNIS, E.S.; UPADHYAYA, M.N. Transgene structures suggest that multiple mechanisms are involved in T-DNA integration in plants. **Plant Science**, Limerick, v. 137, p.308-322, 2006.