**RESISTÊNCIA À BACTERIOSE CAUSADA POR *Xanthomonas axonopodis*
pv. *passiflorae* EM MARACUJÁ AMARELO VIA EXPRESSÃO DA
PROTEÍNA HETERÓLOGA ATACINA A**

ADRIANO PEREIRA DE CASTRO
Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Profa. Dra. **MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia, Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Março – 2005

ERRATA

RESISTÊNCIA À BACTERIOSE CXAUSADA POR *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* EM MARACUJÁ AMRELO VIA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA HETERÓLOGA ATACINA A

<i>Página</i>	<i>item</i>	<i>linha</i>	<i>onde se lê</i>	<i>leia-se</i>
1	1	3° Par. 2ª L	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium solanum</i>
2	1	2° Par. 3ª L	patógeno doença	doença
35	2.7	2° Par. 2ª L	ou indiretamente	direta ou indiretamente
44	3.2	2° Par. 9ª L	este segundo ensaio	um segundo ensaio
54	3.7.1.1		Método do DNazol	DNazol
60	3.7.3	1° Par. 2ª L	pulso de centrífuga	pulso na centrífuga
60	3.7.3	2° Par. 1ª L	Procedeu-se nova	Procedeu-se a uma nova
62	3.8.1	2° Par. 2ª L	RNA foi misturado	RNA foram misturados
81	4.3.2	Figura 12	0,1 mg.L ⁻¹ (A) e níveis de clorose sob 0,3 (B); 0,4 (C); 0,5 (D) e 0,6 (E) mg.L ⁻¹	0,0 mg.L ⁻¹ (A) e níveis de clorose sob 0,1 (B); 0,3 (C); 0,5 (D) e 0,7 (E) mg.L ⁻¹
88	4.4	Figura 17	Transfecção	Transformação
96	4.6.3	2° Par. 3ª L	hidrolisado por completo	hidrolisado pela enzima Bam HI
100	4.7.2	2° Par. 4ª L	metodologia é análoga à	metodologia se assemelha à
128	5	3° Par. 3ª L	ordem de 1,5%	ordem de 0,13%
128	5	4° Par. 1ª L	plantas transgênicas para	plantas para resistência

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

Castro, Adriano Pereira de

Resistência à bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em maracujá amarelo via expressão da proteína heteróloga atacina A / Adriano Pereira de Castro. - Piracicaba, 2005.

163 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.
Bibliografia.

1. Bacteriose vegetal 2. Maracujá 3. Melhoramento genético vegetal 4. Proteína de planta 5. Resistência genética vegetal 6. Transformação genética 7. Variedade vegetal 8. *Xanthomonas* I. Título

CDD 634.425

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

Meus pais Emílio e Dulce Lea,

minhas irmãs Daniele e Larissa,

meus avós Jairo (*in memorian*) e Esmeralda, José e Teresinha,

meus familiares,

Com amor,

Dedico

“Destruam as cidades e conservem os campos, as cidades ressurgirão,

Destruam os campos e conservem as cidades, estas sucumbirão”

Abraham Lincoln

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos que de uma forma direta ou indiretamente tornaram possível a realização desta tese e, especialmente:

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), particularmente ao Departamento de Genética.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão das bolsas de estudo durante o curso.

À Profa. Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira pela orientação, confiança, sugestões e apoio durante toda a etapa de realização deste trabalho.

Aos Professores Dra. Beatriz Appezzato da Glória, Dr. Márcio de Castro Silva-Filho, Dr. Carlos Alberto Labate, Dra. Beatriz Mendes, Dr. Ricardo Victoria por colocarem seus laboratórios à disposição para realização de parte da tese.

Aos Professores Dr. Cláudio Lopes Souza-Júnior, Dr. Jorge Alberto Rezende, Dr. Lázaro Peres pelas valiosas sugestões e discussões constantes, durante todas as fases do trabalho.

Ao Professor Dr. Isaias Olívio Geraldi, um excelente coorientador, pelas valiosas sugestões e discussões constantes, apoio e amizade.

Ao colega, Dr. Esteban Gonzáles, pelas constantes sugestões, críticas a amizade.

Aos companheiros do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelo incentivo e apoio constante nessa nossa caminhada.

Aos funcionários do Departamento de Genética pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos, minha família em Piracicaba, em especial: amigos da República Deus Quis, companheiros das rodas de Capoeira, amigos do Perna de Futebol Clube, companheiros do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas, pela constante amizade e apoio que foram para mim, um estímulo e um exemplo a seguir.

À secretária Leila pela dedicação ao seu trabalho, pela eficiência e paciência, e principalmente pelo apoio constante.

À Soraya pela amizade, companheirismo, paciência e carinho que me dedicou durante grande parte desta etapa da minha vida.

À Viviane Oliveira e Carolina Morgante, pela ajuda constante, fundamentais para o sucesso deste trabalho de tese.

À minha família pela amizade, amor, compreensão e carinho que sempre me dedicou.

A DEUS por tudo.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 A cultura do maracujá no Brasil.....	4
2.2 Aspectos botânicos biologia da reprodução de Passiflora.....	8
2.3 Aspectos fitossanitários, com ênfase à bacteriose do maracujazeiro...	11
2.4 Melhoramento e recursos genéticos.....	16
2.4.1 Melhoramento genético visando à resistência a doenças.....	22
2.5 Transformação genética de plantas.....	25
2.6 Condições de cultura de tecidos e agentes seletivos como pré-requisito para transformação de plantas.....	30
2.7 Riscos associados á transgenia.....	35
2.8 Controle da bacteriose do maracujazeiro via transgenia.....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 Material vegetal.....	42
3.2 Explantes vegetais e condições de cultura.....	43
3.3 Otimização da dosagem de fosfinotricina para a seleção <i>in vitro</i> de brotos transgênicos.....	44
3.4 Obtenção de plantas transgênicas.....	46
3.4.1 Cultura bacteriana.....	46
3.4.2 Vetor de transformação.....	46
3.4.3 Extração e quantificação plasmidial.....	47
3.4.4 Biobalística.....	50
3.5 Ensaio histoquímico de GUS.....	52
3.6 Obtenção de iniciadores para a amplificação do fragmento do gene <i>att A</i>	53
3.7 Confirmação molecular da transgenia.....	54

3.7.1 Extração de DNA genômico.....	54
3.7.1.1 Método do DNazol.....	54
3.7.1.2 Método CTAB.....	55
3.7.2 PCR.....	57
3.7.3 “Southern blot” e hibridização molecular.....	57
3.8 Análise da expressão transgênica.....	61
3.8.1 Extração de RNA total.....	61
3.8.2 RT-PCR.....	62
3.9 Aclimação e estaqueamento das plantas transgênicas putativas e matrizes FB-100.....	64
3.10 Ensaio com o herbicida glufosinato de amônio para seleção <i>in vivo</i> ...	65
3.10.1 Otimização da dose ideal de pulverização do herbicida.....	65
3.10.2. Otimização da dose ideal de pincelamento do herbicida.....	67
3.11 Coleta e isolamento dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> a campo.....	70
3.12 Bioensaios.....	71
3.12.1 Obtenção das mudas FB-100, FB-200 e Sul Brasil e inoculação com <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	72
3.12.2 Bioensaio com folhas destacadas de plantas transgênicas.....	75
3.12.3 Bioensaios com plantas transgênicas e matrizes.....	75
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
4.1 Material vegetal.....	76
4.2 Explantes vegetais e condições de cultura.....	76
4.3 Otimização da dosagem de fosfinotricina para a seleção <i>in vitro</i> de brotos transgênicos.....	79
4.3.1 Primeiro ensaio.....	79
4.3.2 Segundo ensaio.....	80
4.3.3 Terceiro ensaio.....	81
4.4 Obtenção de plantas transgênicas.....	87
4.5 Ensaio histoquímico de GUS.....	93
4.6 Confirmação da transgenia.....	94
4.6.1 Extração de DNA.....	94
4.6.2 Confirmação via PCR.....	94
4.6.3 “Southern blot” e hibridização molecular.....	96
4.7. Análise da expressão do transgene.....	100
4.7.1 Extração de RNA total.....	100
4.7.2 RT-PCR.....	100
4.8 Aclimação e estaqueamento das plantas transgênicas putativas e matrizes FB-100.....	101
4.9 Ensaio <i>in vivo</i> com o herbicida glufosinato de amônio.....	103
4.9.1 Pulverização do herbicida.....	103
4.9.1.1 Primeiro ensaio.....	103
4.9.1.2 Segundo ensaio.....	105
4.9.2 Pincelamento do herbicida.....	108
4.9.2.1 Primeiro ensaio.....	108

4.9.2.2 Segundo ensaio.....	110
4.10 Coleta e isolamento dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> a campo.....	114
4.11 Bioensaio.....	115
4.11.1 Obtenção das mudas FB-100, FB-200 e Sul Brasil.....	115
4.11.2 Inoculação das plantas de maracujá.....	116
4.11.3 Bioensaio com folhas destacadas de plantas transgênicas.....	121
4.11.4 Bioensaio com as plantas transgênicas e matrizes.....	123
4.12 Considerações finais.....	126
5 CONCLUSÕES.....	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130

RESISTÊNCIA À BACTERIOSE CAUSADA POR *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* EM MARACUJÁ AMARELO VIA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA HETERÓLOGA ATACINA A

Autor: ADRIANO PEREIRA DE CASTRO

Orientadora: Profa. Dra. MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA

RESUMO

O Brasil é o principal produtor de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). A fruta é consumida *in natura* ou destinada à industrialização de suco. Preferencialmente, o mercado europeu adquire o suco concentrado. Contudo, a expansão da cultura é limitada pela falta de recursos técnico-científicos para superar problemas fitossanitários. Uma das principais doenças, a bacteriose provocada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, é caracterizada pelo aparecimento de lesões nas folhas e frutos. Em condições de ataque severo, há grande desfolha, redução da frutificação, podendo ocorrer morte das plantas. Procedimentos de seleção genética do maracujazeiro têm sido conduzidos no Brasil visando à obtenção de variedades mais produtivas e resistentes, mas os resultados são modestos e, além disso, não há fonte de resistência ou tolerância à *X. axonopodis* pv. *passiflorae* bem caracterizada na espécie comercial. A idéia básica que fundamenta esta tese é trazer para a planta, via transgenia, uma proteína do sistema imunológico de certos insetos com função antibacteriana, a atacina. Esta proteína tem ação contra o grupo das Gram-negativas, dentre elas *Xanthomonas axonopodis*. O vetor de

transformação pCambia, carregando o cassete de expressão contendo o gene da atacina A (*attA*) e o gene *bar*, que confere resistência a fosfinotricina, ambos dirigidos pelo promotor 35 S, foi usado em ensaios de transformação por biobalística. Cerca de 6000 explantes foliares da variedade FB-100 foram bombardeados e cultivados em meio seletivo com fosfinotricina (0,1 mg.L⁻¹). Oitenta plantas foram recuperadas *in vitro*, das quais 50 amplificaram, por PCR, um fragmento (500 pb) do gene *attA*. A confirmação molecular foi feita por *Southern blot*, sendo que oito plantas mostraram integração do transgene. A taxa de transformação foi de 1,5%. Bioensaios das plantas transgênicas e de suas matrizes contra *X. axonopodis* pv. *passiflorae* mostraram que a atacina A foi capaz de reduzir os sintomas da doença. A redução da área de lesão variou entre os transformantes. Em paralelo, estudos sobre a resposta de três populações de maracujá ao herbicida Finale, cujo princípio ativo é o glufosianto de amônio, foram conduzidos visando esclarecer sobre o uso deste herbicida em condições de campo e, também, para a seleção *in vivo* de transgênicos putativos.

RESISTANCE TO BACTERIOSIS CAUSED BY *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* IN YELLOW PASSION FRUIT VIA EXPRESSION OF THE HETEROLOGOUS PROTEIN ATTACIN A

Author: ADRIANO PEREIRA DE CASTRO

Advisor: Profa. Dra. MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA

SUMMARY

Brazil is the leading producer of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.), which is consumed *in natura* or destined for juice production. European market preferentially acquires the concentrated juice. However, the expansion of the crop has been held back by the lack of technical and scientific research to overcome phytosanitary problems. One of the main diseases, the bacterial spot, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, is characterized by damage to leaves and fruits. A severe attack causes significant leaf fall, a drop in fruit production and may kill the plant. Genetic selection trials have been conducted in Brazil, aimed at producing varieties with increased resistance and yield. However, the results have been unsatisfactory and, furthermore, there is not a well-characterized source of resistance to *X. axonopodis* pv. *passiflorae* in *P. edulis* f. *flavicarpa*. The basic idea of this thesis is to use transgenic techniques to incorporate a gene that encodes a protein (attacin) with antibacterial properties, derived from the immune system of some insects. This protein acts against the Gram-negative group, including *Xanthomonas axonopodis*. The pCambia transformation vector, carrying the attacin A (*attA*) gene and the *bar* gene, conferring resistance to

phosphinothricin, both driven by the 35 S promoter, was used in biolistic transformation experiments. About 6000 leaf explants from the FB-100 variety were bombarded and cultivated in a selective medium containing phosphinothricin (0.1 mg.L^{-1}). Eighty plants were recovered *in vitro*, including 50 that amplified, by PCR, a fragment (500 bp) of the *attA* gene. Molecular confirmation was carried out by Southern blot analysis and eight plants showed the transgene integration. The transformation ratio was 1.5 %. A bioassay of transgenic plants and their donor plants against *X. axonopodis* pv. *passiflorae* showed that *attA* expression was capable of decreasing the disease symptoms. The decrease in the damaged area varied among the transformants. In addition, studies on the response of three passion fruit populations to the herbicide Finale®, which the active ingredient is glufosinate-ammonium, were conducted to shed light on the use of this herbicide under field conditions and to select putative transgenics *in vivo*.

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio da cultura do maracujá tem certa expressão na economia brasileira, pois cria empregos no meio rural, para a produção de frutos, e urbano, em decorrência da industrialização do suco concentrado. Os mercados destes produtos têm crescido e a produção é substancialmente maior àquela de décadas anteriores. Também, por se tratar de fruta exótica, desperta interesse do mercado internacional, gerando divisas para o país pela exportação do suco. A espécie mais utilizada nos plantios comerciais brasileiros é *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg., ou maracujá amarelo, destinado ao consumo *in natura* e à indústria.

Entretanto, na última década, têm ocorrido grandes flutuações na área plantada, na produção e no preço do maracujá. Também é comum, em todas as regiões de cultivo, o caráter itinerante da cultura: surgem os primeiros plantios, ocorre enorme ascensão e, num período variando de três a cinco anos, eles praticamente desaparecem. Pode-se afirmar que isso se deve, principalmente, a problemas sanitários, que diminuem a longevidade e a produtividade dos pomares, contribuindo para aumentar os custos de produção e a falta de variedades resistentes e adaptadas às condições regionais com aptidão para os mercados de fruta fresca e de suco.

Das doenças que atacam o maracujá amarelo, três se destacam: (i) a fusariose, ou murcha, causada por *Fusarium oxysporium* f. *passiflorae*, que afeta o sistema radicular e é caracterizada por uma rápida murcha, seguida de colapso e morte das plantas em qualquer fase de seu desenvolvimento; (ii) a virose, causada pelo vírus do endurecimento do fruto (ou PWV, da sigla inglesa)

provoca sintomas de mosaico, frutos deformados e com a casca endurecida; (iii) a bacteriose, ou mancha oleosa, provocada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, caracteriza-se pelo aparecimento de pequenas lesões nas folhas mais internas da planta, com aspecto oleoso, translúcido e um halo amarelado. Em condições de ataque severo da bactéria, as folhas secam e caem, ocasionando grande desfolha em cultivos, o que reduz drasticamente a frutificação, e pode causar a morte da planta.

As variedades comerciais são suscetíveis à *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e a incorporação da resistência genética é a alternativa mais promissora para o controle desse patógeno doença, pois não implica no aumento do custo da produção e em danos ambientais. Apesar da falta de estudos sobre o controle genético da resistência à bacteriose no maracujá amarelo, as primeiras avaliações de populações segregantes para a doença indicam que a herança é quantitativa, o que requer um programa de seleção em longo prazo (Matta, 2005).

Os avanços nas técnicas de transformação de plantas têm permitido a geração de plantas resistentes a doenças via transgenia. Proteínas ou peptídeos exógenos podem ser expressos em plantas transgênicas e, assim, introduzir fontes de resistência, ou mesmo complementar os mecanismos naturais de defesa (Daring, 1996). No caso específico do maracujazeiro, a transgenia se mostra como alternativa de transferência de genes de resistência, os quais podem ser oriundos de diferentes organismos.

O gene *attA*, clonado por um grupo sueco (Kang et al, 1996), codifica para uma proteína bactericida em insetos, a atacina, e foi cedido ao Departamento de Genética da ESALQ através do IAPAR (Londrina, PR). A construção do cassete de expressão foi realizada por Takahashi (2002).

A idéia que motivou o presente trabalho é que a expressão da proteína heteróloga atacina A deve levar à produção de plantas de maracujá resistentes. Sendo assim, esta tese teve como meta produzir plantas transgênicas, via

biobalística, e realizar bioensaios para testar o efeito da atacina A contra isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do maracujá no Brasil

Entre os setores do sistema agroalimentar brasileiro, o de frutas constitui-se, atualmente, como um dos mais promissores. Mudanças nos padrões de demanda, tanto em nível doméstico quanto no exterior, acompanhadas por progresso tecnológico, têm permitido o crescimento do mercado de frutas e derivados a taxas superiores aos dos demais produtos alimentares (Lima & Cunha, 2004).

Neste cenário, a cadeia frutícola surge como um importante instrumento para promover o desenvolvimento de diversas regiões brasileiras, pois permite a obtenção de maior renda por área cultivada, tornando mais viáveis os sistemas produtivos baseados em pequenas e médias propriedades. Enquanto um hectare plantado com grãos gera um retorno médio de 100 a 200 dólares, um hectare de frutas pode alcançar valores entre 3.000 a 6.000 dólares, dependendo da fruta selecionada e dos preços vigentes. Adicionalmente, enquanto um hectare de grãos gera menos que um emprego direto, o de frutas pode gerar de dois a seis (Savitci et al., 1994).

O maracujá é comercializado sob duas formas: fruta fresca e suco concentrado. O suco de maracujá tem se mantido em terceiro lugar entre os sucos produzidos no Brasil, atrás dos de laranja e caju (Bruckner e Picanço, 2001).

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, seguido dos seguintes países: Colômbia, Peru, Equador, África do Sul, Austrália, Sri Lanka, Nova Guiné, Havaí e Taiwan. No Brasil, a cultura tomou grande impulso a partir de 1970, quando se expandiu para a região Norte e Nordeste para atender à demanda das indústrias de suco concentrado para exportação (Chagas, 1991).

O suco da fruta já ocupou o segundo lugar na pauta das exportações brasileiras de sucos, que movimentam um mercado mundial de 5,0 bilhões de dólares/ano. A maior parte do suco é exportada na forma concentrada (50°Brix) e congelada (-18°C), acondicionado em tambores de 230 kg (Leite et al., 1994). Também existe comércio para o suco engarrafado pronto para o consumo, com concentração de 14°Brix.

Os mercados consumidores do suco de maracujá brasileiro são o europeu (Países Baixos) e os EUA, que absorvem cerca de 90% das exportações. O mercado internacional de maracujá é considerado emergente, necessitando apenas de uma garantia de continuidade de fornecimento ao longo dos anos (Ruggiero et al., 1996; Lima & Cunha., 2004).

A cadeia produtiva de maracujá tem certa expressão na economia brasileira, pois cria empregos no meio rural (produção) e urbano (indústria), gerando divisas por meio de exportação de suco. Os mercados de suco e fruta fresca têm crescido e a produção, embora estagnada nos últimos anos, é substancialmente maior àquela de décadas anteriores (Aguilar & Santos, 2001). A área plantada no país em 2002 foi de 34.800 ha com uma produção de 478.650 t/ano (IBGE, 2004) (Figura 1), o que corresponde a 50% da produção mundial (FAEMG, 2005).

Embora esteja distribuída em todas as regiões do país, a produção mostra uma alta concentração regional, ou seja, no Sudeste e Nordeste; os percentuais da produção estão distribuídos entre as regiões Norte (7,37%), Nordeste (53,53%), Sudeste (31,70%), Centro-Oeste (4,39%) e Sul (3,02%). O

estado de São Paulo é o terceiro maior produtor, com uma produção anual superior a 70.800 t, correspondente a 15,15% do total do país (Agrianual, 2004).

Figura 1 - Produção brasileira de maracujá amarelo de 1982 a 2002. Fontes: Leite et al. (1994); Agrianual (2004); IBGE (2004)

O destino da produção varia de acordo com a região, porém verifica-se, ao longo das últimas duas décadas, uma inversão: o mercado da fruta fresca que absorvia, aproximadamente, 30% da produção nacional hoje absorve mais da metade (Ruggiero & Oliveira, 1998). De acordo com estimativas da AFRUVEC (Associação dos Fruticultores da Região de Vera Cruz) baseadas na safra 1995/96, aproximadamente 70% da produção paulista de maracujá foi destinada ao consumo *in natura* e o restante à indústria de processamento. Já na região de Araguari-MG, onde 65% do suco de maracujá engarrafado e vendido no Brasil são produzidos, a situação é inversa e, cerca de 35% da produção são destinados ao mercado de fruta fresca (Silva, 1998).

A produtividade dos pomares brasileiros de maracujá é bastante variável; a média nacional está em torno de 10 t/ha/ano. Essa média é considerada baixa e se deve a não utilização da tecnologia de produção recomendada para a

cultura. Em pomares semicomerciais ou naqueles em que os produtores cultivam maracujá para consumo próprio, muito comuns na região Norte e Centro-Oeste do país, a produtividade é ainda menor. Já em pomares com melhor nível tecnológico, tem-se conseguido elevar a produtividade, em virtude da adoção de práticas culturais importantes (Melleti & Maia, 1999). Essas práticas consistem na utilização de variedades melhoradas, adubações parceladas e mais equilibradas, polinização manual, tratos culturais adequados e o controle de pragas e moléstias. Na maioria dos pomares, o uso das recomendações tem sido parcial, limitado pela pequena disponibilidade de capital ou por determinados hábitos locais. Nesses casos, a produção média é de 15 a 20 t/ha/ano. A produtividade brasileira no ano de 2002 foi de 14 ton/ha/ano, 40% maior que a média nacional histórica, enquanto a produtividade no Havaí é de 45 t/ha/ano (IBGE, 2004).

O maracujá é mais um dos produtos no qual a elevação da produtividade e da qualidade pode ser altamente compensadora. A associação da irrigação com a polinização artificial, por exemplo, pode elevar a produtividade dos pomares de 22 ton/ha (plantios tradicionais bem conduzidos) para 45 ton/ha. Em pomares que utilizam sementes melhoradas geneticamente, além da tecnologia de produção recomendada para a cultura, a produtividade tem alcançado níveis de 50 ton/ha/ano (Melleti & Maia, 1999). Assim, considera-se que, em alguns casos, a adoção dessas técnicas permite triplicar o lucro do produtor.

Apesar disso, a cultura do maracujazeiro no Brasil apresenta alguns entraves que têm restringido o seu desenvolvimento. É comum o caráter itinerante da cultura: surgem os primeiros plantios, ocorre enorme ascensão e, num período variando de três a cinco anos, eles praticamente desaparecem (Ruggiero et al., 1996; Silva, 1998). Isto se deve (i) a problemas sanitários, alguns sem controle químico, que diminuem a longevidade e a produtividade dos pomares, contribuindo para aumentar os custos de produção; (ii) à falta de

variedades adaptadas às condições regionais com aptidão para o mercado de fruta fresca; (iii) à falta de planejamento no dimensionamento dos plantios e na comercialização da produção; (iv) à competição com outros produtos e a políticas de mercado adotadas no País (FRUPEX, 1996).

A área plantada e a produção flutuam de acordo com os preços pagos ao produtor. Têm-se observado, na última década, grandes oscilações na produção e no preço do maracujá (Agrianual, 2004). Todos estes fatores contribuem para que a sustentabilidade da cultura seja frágil nas condições de produção brasileiras. É de extrema importância o fornecimento de garantias à produção, como a oferta de variedades resistentes às principais doenças, maior estabilidade nos preços através da organização dos produtores em cooperativas e associações e, também, uma política agressiva na exportação da produção brasileira.

2.2 Aspectos botânicos e biologia da reprodução de *Passiflora*

As Passifloraceae estão largamente distribuídas pelos trópicos. Há cerca de 600 espécies, a maioria habita a América tropical e é nativa no Brasil. Grande parte dos autores considera que esta família é composta por 12 gêneros (Pádua, 2004). Destes, o gênero *Passiflora* é o que apresenta o maior número de espécies (cerca de 400), com 90% delas originárias das Américas. Há, portanto, ampla variabilidade genética a ser conhecida, conservada e convenientemente utilizada em programas de melhoramento genético (Inglez de Souza & Melletti, 1997).

As plantas da família Passifloraceae apresentam-se na forma de trepadeiras vigorosas. As folhas podem ser arredondadas ou partidas, com bordos serrados. Nota-se uma variação muito grande no tamanho e forma das folhas, sendo as basais bem maiores que as folhas dos ramos terminais e

florais (Jorgensen et al., 1984). As flores são de tamanho e forma variada, apresentando-se grandes e em forma de tubo (subgêneros *Passiflora* e *Tacsonia*) ou pequenas (subgênero *Decaloba*) (Jorgensen et al., 1984). Ainda com relação às flores, estas mostram ampla gama de coloração, podendo ser encontradas em tons de branco, laranja, vermelho, roxo, amarelo e azul. Os frutos são arredondados ou alongados de coloração esverdeada, amarelada, alaranjada ou com manchas verde-claras. As sementes são achatadas e pretas, envolvidas por um arilo gelatinoso de coloração amarelada translúcida.

Muitas das espécies do gênero *Passiflora* são cultivadas pelas suas propriedades alimentícias, ornamentais ou medicinais, mas, principalmente, pela qualidade de seus frutos. O valor ornamental é conferido pelas variações das folhagens e belas flores, que exercem atração devido ao seu tamanho, exuberância de cores e originalidade de formas. Os frutos, além de consumidos *in natura*, são usados na confecção de sucos, doces, refrescos e sorvetes. O uso medicinal, bastante difundido, baseia-se nas propriedades calmantes da passiflorina, sedativo natural encontrado nos frutos e nas folhas (Inglez de Souza & Melleti, 1997).

A origem da forma *flavicarpa* de *Passiflora edulis* (o maracujá amarelo) é pouco compreendida, podendo ter sido derivada de cruzamento de *P. edulis* (maracujá-roxo) com alguma espécie relacionada, ou de mutação em *P. edulis*, conforme postularam Pepe & Degener, citados por Martin & Nakasone (1970). De acordo com Carvalho-Okano & Vieira (2001), *P. edulis* foi descrita em 1818 por Sims e em 1872 por Masters e a forma *flavicarpa* foi proposta em 1933 por Degener. O autônimo, *P. edulis* f. *edulis* (maracujá roxo) foi automaticamente adotado, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica.

As plantas do gênero *Passiflora* apresentam flores grandes, vistosas e protegidas na base por brácteas foliares. O cálice, tubuloso, é herbáceo ou subcarnoso, com cinco pétalas oblongas, membranáceas ou coriáceas. A corola tem cinco pétalas, do tamanho das sépalas ou pouco menores que

estas, livres ou levemente concrecidas na base e inseridas no bordo do tubo calicinal. A coroa é formada por um a cinco verticilos, inserida na base do tubo calicinal e composta por filamentos com diversas cores vivas e atraentes (Bruckner, 2002). No centro da flor, localiza-se o androginóforo colunar bem desenvolvido. O ovário é globoso, unilocular, com placentação parietal e multiovulado. Os estiletes, em número de três, são livres ou conectados na base, com estigmas capitados. O androceu é formado por cinco estames, com filetes livres inseridos abaixo do ovário e anteras dorsifixas e versáteis (Bruckner, 2002).

A polinização do maracujazeiro é feita por insetos, sendo a mamangava (*Xylocopa* spp.) o principal agente polinizador (Akamine & Girolami, 1959). As flores abrem-se uma única vez, iniciando-se por volta das 12 h, e fecham-se à noite. As plantas necessitam de dias longos para florescer, ou seja, fotoperíodos superiores a 11 h. O maracujazeiro é uma alógama obrigatória (May & Spears Jr., 1988) e a eficiência da polinização é um dos fatores que mais influenciam sua frutificação.

A polinização cruzada é condicionada pelo fenômeno da auto-incompatibilidade: o pólen de uma planta é incapaz de fertilizar suas flores e diferentes plantas podem ou não ser compatíveis entre si. A fertilização requer a presença de diferentes genótipos para o sistema de auto-incompatibilidade (Bruckner et al., 1995) e de insetos polinizadores (Akamine & Girolami, 1959; Camillo, 1987). Em plantios comerciais é também realizada a polinização manual (Grisi Jr., 1973).

A auto-incompatibilidade do maracujazeiro é do tipo esporofítica (Bruckner et al., 1995) e há um loco gametofítico associado ao sistema esporofítico (Suassuna et al., 2003). A reação de incompatibilidade ocorre no estigma (Rêgo et al., 2000). A auto-incompatibilidade é um mecanismo que induz à alogamia e que mantém um alto grau de heterozigose nas populações.

As características do sistema reprodutivo dos maracujazeiros dificultam a realização de autofecundações e hibridações, o que torna alguns procedimentos de seleção para fins de melhoramento laboriosos e complexos. Se praticada artificialmente, a autofecundação deve levar à forte depressão por endogamia.

2.3 Aspectos fitossanitários, com ênfase à bacteriose do maracujazeiro

Das doenças do maracujazeiro, três se destacam:

(i) a fusariose ou murcha, provocada por *Fusarium oxysporium* f. *passiflorae*, doença que ocorre no sistema radicular é caracterizada por uma rápida murcha seguida de colapso e morte das plantas em qualquer fase de seu desenvolvimento;

(ii) a virose, causada pelo vírus do endurecimento do fruto (ou PWV, da sigla inglesa), que provoca sintomas de mosaico, frutos deformados e com a casca endurecida;

(iii) a bacteriose ou mancha oleosa, provocada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, que se caracteriza por manchas oleosas angulares nas folhas e nos frutos, podendo ocorrer de forma localizada ou sistêmica.

A princípio, a bacteriose do maracujazeiro pode ser diagnosticada pelo aparecimento de pequenas lesões nas folhas mais internas da planta, com aspecto oleoso, translúcido e um halo amarelado. Posteriormente, as lesões adquirem coloração marrom, forma irregular e aspecto deprimido na face inferior da folha, podendo coalescer e atingir todo o limbo foliar. Em condições de ataque severo, as folhas secam e caem, ocasionando grande desfolha. Verifica-se também que a infecção ocorre nos bordos foliares e caminha pelas nervuras, uma vez que a bactéria é sistêmica, até atingir o pecíolo das folhas.

As nervuras adquirem uma coloração avermelhada (Leite Jr, 2002; Liberato, 2002; Junqueira et al., 2003).

A infecção, segundo Pio-Ribeiro & Mariano (1997), pode avançar através dos feixes vasculares dos pecíolos e ramos, provocando caneluras longitudinais e seca progressiva desses órgãos a partir das suas extremidades. Isso ocasiona a murcha e a queda das folhas e reduz drasticamente a frutificação, podendo até causar a morte da planta. Nos feixes vasculares, por meio de corte transversal e compressão, observa-se típica exsudação bacteriana. Oliveira et al. (1987) detectaram plantas com infecção sistêmica que apresentavam intensa necrose vascular em raízes, associada à presença de exsudação bacteriana. No entanto, estes autores não observaram anormalidade na região do colo das plantas, as quais apresentavam amarelecimento lento e progressivo das folhas e dos ramos ponteiros, evoluindo para intensa desfolha e definhamento.

Nos frutos, os sintomas da doença caracterizam-se pelo aparecimento de pequenas lesões aquosas e de coloração verde escura que, ao evoluírem, adquirem aspecto oleoso e coloração parda. Forma-se, em seguida, uma crosta dura que pode recobrir diversas manchas originalmente isoladas. Esse fato pode ser verificado recortando-se a camada superficial endurecida e observando-se, logo abaixo, a região das manchas originais pardo-claras que se aprofundam até atingir a polpa (Pereira, 1969). Estas lesões, quando atingem a polpa dos frutos, inviabilizam a sua comercialização (Informe Agropecuário, 2000). Dias & Takatsu (1990) relatam que essa doença desempenha papel fundamental na morte precoce do maracujazeiro amarelo. Souza & Melletti (1997) confirmam que esta é uma das doenças mais severas, principalmente se associada à antracnose.

A primeira constatação da doença no Brasil se deu em 1967, em São Paulo. Atualmente, ocorre também nos seguintes estados: Mato Grosso, Pará, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe,

Bahia, Distrito Federal, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Paraná e Santa Catarina (Dias & Takatsu, 1987; Liberato et al., 1993; Peruch et al, 1997; Trindade et al., 2000; Tassa & Duarte, 2001).

O agente causador da bacteriose foi descrito originalmente como *Xanthomonas passiflorae* (Pereira, 1969). Mais tarde, Dye et al. (1980) passaram a denomina-lo *X. campestris* pv. *passiflorae* e, finalmente, Gonçalves & Rosato (2000) propuseram sua reclassificação como *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Neste patovar, predominam linhagens de colônia amarelada, entretanto, já foram observadas estirpes sem pigmentação (Almeida et al., 1994), bem como algumas produtoras de pigmento escuro.

Essa bactéria apresenta variabilidade com relação à virulência (Dias & Takatsu, 1988; Fogaça-Miranda, 2004) e no padrão de restrição do DNA plasmidial, mas não com relação a testes bioquímicos, fisiológicos e à serologia (Wendland et al., 1996; Beriam et al., 1998). Nakatani (2001) identificou ampla variabilidade genética entre os isolados por meio de marcadores moleculares RAPD. Posteriormente, a autora realizou testes de patogenicidade em uma população de maracujá amarelo, com os cinco isolados mais geneticamente divergentes, e encontrou variabilidade também na patogenicidade.

Xanthomonas axonopodis pv. *passiflorae* é baciliforme, Gram-negativa, móvel por um único flagelo polar, sem formação de esporos ou cápsulas e mede de 0,5 a 1,5 µm. É aeróbia estrita e forma colônias características com nuances amarelo-brilhantes, circulares, convexas, salientes, translúcidas, com bordos regulares e viscosas. As células apresentam crescimento ótimo a 27°C (Fogaça-Miranda, 2004) e sobrevivem em restos culturais do hospedeiro infectado, sendo o período de sobrevivência reduzido com o enterro das plantas mortas (Schuster & Coyne, 1977). Esta bactéria pode ser encontrada em fase epifítica e/ou endofítica em plantas hospedeiras ou não, multiplicando-se sem causar doença (Beattie & Lindow, 1995).

A bactéria penetra através dos estômatos e/ou por ferimentos da planta, colonizando os espaços intercelulares do tecido foliar, bem como dos tecidos vasculares. Nas mudas, o período de incubação é de cinco dias a 25°C e de 15 dias a 20°C (Peruch et al., 1997). A disseminação da doença a longa distância ocorre por meio de mudas infectadas e de sementes contaminadas. A disseminação dentro da lavoura se dá por escorrimento e respingos de água, pela chuva, irrigação ou orvalho, e pela ação do vento e dos insetos, como *Diabrotica speciosa* (vaquinha ou brasileirinho) e *Lagria vilosa* (besouro Idiamim), que se alimentam de folhas lesadas pela bactéria. Nos frutos, acredita-se que a bactéria penetra diretamente via lenticelas e também por ferimentos provocados pelo fungo *Cladosporium herbarum*, causador da verrugose. Pragas pequenas como tripses e coleópteros, que visitam as flores durante a antese e ali permanecem por alguns dias nos restos florais, também são capazes de promover a entrada da bactéria.

A bacteriose ocorre, preferencialmente, em condições de alta temperatura (35°C) e umidade e em plantas com distúrbios nutricionais. As medidas de controle preventivo, como a produção de mudas saudáveis, poda de limpeza e uso de quebra ventos, não são soluções definitivas para o problema. São recomendadas pulverizações semanais com fungicidas cúpricos e antibióticos. Porém, o controle químico da doença não é eficaz e é uma prática bastante onerosa ao produtor e prejudicial ao ambiente (Embrapa-Reunião Técnica, 1998).

Uma vez instalada no pomar, a bacteriose torna-se uma doença de difícil controle. O manejo integrado da doença, que compreende o controle cultural, químico e genético, tem sido a maneira mais eficiente de prevenir e conviver com a doença. Recomendam-se as seguintes medidas:

- a) instalar novos plantios em locais onde a doença não tenha ocorrido;

- b) não instalar plantios próximos a pomares contaminados, pois existe a possibilidade da disseminação da bactéria por insetos;
- c) utilizar sementes sadias, de procedência conhecida;
- d) no caso de não se conhecer a origem das sementes, proceder ao seu tratamento com água aquecida (termoterapia) a 50°C durante 30 a 60 minutos;
- e) realizar adubações equilibradas, evitando-se o excesso de nitrogênio, que estimula a emissão de novas brotações e retarda a maturação, tornando as plantas mais suscetíveis à bactéria;
- f) manifestada a doença, proceder ao tratamento com produtos bactericidas ou bacteriostáticos.

Outras medidas gerais de prevenção são: implantar quebra-ventos, evitar o trânsito no pomar logo pela manhã, desinfetar implementos, canivetes, tesouras de poda e limpar as mãos com soluções alcoólicas (Malavolta Junior, 1998). O melhor controle químico pode ser obtido mediante produtos à base de cobre, aplicados no início do aparecimento dos sintomas e em horários não muito quentes. As aplicações podem ser alternadas com produtos bactericidas (Tabela 1). Ressalta-se que, no caso de infecção sistêmica, o uso de fungicidas protetores é ineficiente.

Tabela 1. Produtos indicados para o controle da bacteriose do maracujazeiro (Lima & Cunha, 2004).

Ingrediente ativo	Produto comercial	Formulação (g. i.a./L)	Fabricante	Carência (dias)
Oxicloreto de Cobre	Cobox	PM 500	BASF	7
	Cupravit azul	PM 350	Bayer	7
	Cupravit verde	PM 500	Bayer	7
	Fungarum	PM 350	Giulini	7
	Reconil	PM 350	Novartis	7
Terramicina	Recop	PM 500	Novartis	7
	Agrimicina	PM 500	Pfizer	7

g.i.a/L – gramas de ingrediente ativo por litro de calda

PM – pó molhável

Os problemas fitossanitários comprometem de maneira drástica a produção brasileira e, conseqüentemente, a sustentação do agronegócio do maracujá. O caráter itinerante da cultura compromete o sistema de distribuição e comercialização, já que as indústrias beneficiadoras não acompanham a migração dos produtores, o que onera ainda mais a produção. É de fundamental importância a resolução destes problemas pelo desenvolvimento de variedades resistentes às principais doenças com oferta urgente aos produtores.

2.4 Melhoramento e recursos genéticos

Os trabalhos de melhoramento genético do maracujazeiro ainda são escassos no Brasil. As primeiras variedades tornaram-se disponíveis ao produtor no ano de 1998. Dentre elas, pode-se citar a seleção Maguary, a população Sul Brasil e o composto IAC-27. Estas variedades já representam

consideráveis avanços em termos de produção e qualidade de frutos, todavia, são suscetíveis às doenças da cultura.

Como o fruto do maracujá é a parte comercial da planta, a busca por maior quantidade, qualidade e uniformidade de frutos tem sido o foco do melhoramento genético da cultura no Brasil. As populações selecionadas para o mercado *in natura* mostram frutos grandes e ovais e de boa aparência, a fim de conseguir classificação comercial apropriada, e são resistentes ao transporte e à perda de qualidade durante o armazenamento e comercialização. Quando destinada à indústria, a variedade foi selecionada para produzir fruto com maior rendimento de suco, maior acidez, coloração constante e alto teor de sólidos solúveis.

Dentre as *Passifloras* já estudadas, foram observadas grandes variações intra e interespecíficas para florescimento, produtividade, resistência a pragas e moléstias, tolerância ao frio e, principalmente, para características dos frutos. Isso permite e justifica a intensificação dos programas de melhoramento genético, especialmente de maracujá amarelo, o que pode resultar em ganhos de seleção.

Um programa de melhoramento bem estruturado deve contar com o suporte de um banco de germoplasma, composto pelo maior número possível de acessos, incluindo espécies relacionadas. A diversidade existente entre e dentro de espécies de *Passiflora* tem sido pouco estudada e necessita ser caracterizada para ser aproveitada em programas de melhoramento. O Brasil possui condição privilegiada quanto aos recursos genéticos de *Passiflora*, uma vez que o maior centro de dispersão geográfica do maracujá localiza-se no Centro-Norte do país. Os índios da bacia do Rio Negro foram os responsáveis iniciais pela sua utilização, disseminação e domesticação. Até mesmo a denominação da fruta, maracujá, derivada de “marakuia”, é de origem tupi-guarani e significa “alimento em forma de cuia” (Miranda-Fogaça, 2004).

A preservação de germoplasma de *Passiflora* é feita por meio de plantas vivas, em bancos específicos e em coleções de trabalho localizados em diversas instituições de pesquisa brasileiras e estrangeiras (Ferreira & Oliveira, 1991; d' Eeckenbrugge et al., 2003). Os campos são reinstalados periodicamente, quando há necessidade de rejuvenescimento dos estoques, conforme a espécie em questão (Bruckner et al., 2002). Existem outras metodologias de conservação de germoplasma de *Passiflora* sendo usadas, como a conservação *in vitro* (Vieira, 2000), em menor escala, e a manutenção na forma de sementes em câmaras frias e secas (Ferreira, 2003).

A transferência de materiais genéticos de uma região para outra, seguida pela recombinação natural entre as plantas, resultou no surgimento de “variedades” ou “tipos” adaptados às condições edafoclimáticas locais (Oliveira et al., 1994), conhecidas por uma infinidade de nomes populares nas diferentes regiões geográficas (Inglez de Souza & Melleti, 1997). Esses maracujazeiros, a maioria do tipo amarelo, têm alta variabilidade, grandes diferenças na capacidade produtiva e, principalmente, variações nas características dos frutos (Oliveira, 1980). Apesar desta ampla variabilidade genética a ser explorada, há poucos programas continuados de melhoramento genético que contribuíram significativamente para o aumento da resistência, qualidade e produtividade da cultura. Na realidade, a cultura tem tido apoio ou interesse muito precário das instituições públicas e privadas do país, por razões que não cabem aqui discutir.

Alguns estudos sobre espécies silvestres têm acenado com contribuições ao melhoramento, pois há espécies com resistência a patógenos, maior longevidade e adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, maior concentração de componentes químicos interessantes para a indústria farmacêutica e outras potencialidades, quase todas ainda inexploradas. Entre estas, destacam-se *P. setacea*, *P. cincinnata*,

P. incarnata, *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. nítida* e *P. quadrangularis* (Melleti, 2003; Fischer, 2003).

Uma estratégia que pode ser usada para o melhoramento de maracujá é a hibridação interespecífica. *P. edulis* tem sido considerada um bom genitor, segundo Oliveira e Ruggiero (1998), por apresentar florescimento abundante e ininterrupto durante vários meses. Além disso, diferentemente da maioria das espécies de *Passiflora*, apresenta boa germinação e as sementes permanecem viáveis por quase um ano.

Contudo, a hibridação interespecífica para introgressão de genes de resistência ao maracujá comercial é de pouca aplicação prática. Entre os descendentes, de maneira geral, foi relatada esterilidade masculina parcial, problemas de desenvolvimento, baixa viabilidade polínica, dificuldade de florescer (Melleti & Bruckner, 2001) e alta variação morfológica nos frutos, os quais, normalmente, são intermediários entre as duas espécies e sem características comerciais desejáveis (Priolli, 1991). Para recuperar as características agronômicas favoráveis do híbrido, são necessárias várias gerações de retrocruzamento com o genitor comercial.

O material conhecido como Maguary teve sua origem em um lote de plantas oriundas de pomares comerciais existentes no triângulo mineiro, inicialmente mantido sob polinização aberta. Esses pomares, por sua vez, foram formados com sementes oriundas de Votuporanga, a primeira região produtora de maracujá com destaque em São Paulo, por volta de 1971. A este material foram adicionados outros acessos vindos do Nordeste brasileiro, acessos silvestres e acessos com características comerciais desejáveis, ambos da Unesp/Jaboticabal. Em seguida, foram adicionados acessos oriundos de outros países produtores (Peru, Colômbia, Costa Rica, Taiwan, Austrália, Venezuela e África do Sul), bem como de outros estados que se destacavam, ou seja, Bahia, Paraíba, São Paulo e Rio de Janeiro, (Piza Júnior, 1998).

Em 1986, num trabalho das equipes técnicas das empresas Bioplanta e Maguary, foram novamente identificadas plantas-elite nos pomares comerciais da região do triângulo mineiro, as quais foram multiplicadas por estaquia e avaliadas experimentalmente (Piza Junior, 1998). Deste trabalho, resultaram 48 clones escolhidos pela produtividade, teor de sólidos solúveis totais (SST), acidez e coloração de polpa, rendimento em suco, tolerância à antracnose e à bacteriose (Piza Junior, 1998; Maluf et al., 1989). O material genético propagado como seleção Maguary inclui plantas muito vigorosas, de alto rendimento em suco, teor de acidez de 3,5% e de 14,5° Brix, adequados ao processamento industrial, com polpa de coloração amarela forte a alaranjada (Piza Junior, 1998). Todavia, não apresenta níveis de resistência desejáveis ao ataque severo de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e tampouco ao PWV, doenças que prejudicam drasticamente a cultura nos dias atuais, de acordo com Rezende¹.

Já a população conhecida como Sul Brasil tem sua origem em 1980, quando o Sr. Katsuyoshi Murata deu início a um trabalho que tinha por objetivo obter um clone produtor de frutos grandes para o mercado de frutas frescas. O mesmo visava exclusivamente ao mercado *in natura*, incluindo plantas provenientes do Vale do Ribeira, em São Paulo, e do Pará, produtoras de frutos grandes, mas com polpa clara (Piza Junior, 1998). K. Murata ainda realizou cruzamentos com plantas originárias da empresa Maguary, que produziam frutos pequenos, mas com polpa alaranjada. Esses trabalhos continuaram até 1986, quando um lote foi transferido para Marília, SP, sob a responsabilidade do Eng. Agr. Fumio Matsuda. Cultivados no espaçamento de 5 x 5 m, estes pomares produziram, em média, 6,5 caixas do tipo “K” por planta por ano (Piza Junior, 1998). Os frutos representavam o melhor padrão do mercado, com 10 cm de comprimento e 7 cm de largura, com peso médio de 300 g. Estas

¹ REZENDE, J. Comunicação pessoal, 2004

medidas caracterizavam o fruto denominado Extra AAA, segundo a classificação do mercado atacadista.

A variedade Sul Brasil apresenta frutos próprios para produtores-elite que abastecem nichos especiais de mercado. No entanto, a seleção para aumentar o fruto comprometeu a tolerância a moléstias. A alta susceptibilidade dificultou a manutenção dos pomares em regiões com doenças.

Por último, o composto IAC-27, teve sua origem primária a partir de 19 progênies de polinização aberta, pré-selecionadas em pomares comerciais de São Paulo, Maranhão e Bahia, e algumas introduções provenientes da Austrália e Colômbia, recebidas da Embrapa (Cenargen). Todas as progênies foram submetidas a dois ciclos de seleção massal. As melhores em produtividade, peso e tamanho dos frutos, coloração de polpa e SST foram cruzadas entre si, recombinadas na forma de híbridos intravarietais F_1 e F_2 e também retrocruzadas com o melhor progenitor de frutos grandes e alongados dentre elas. As oito melhores combinações resultantes foram testadas em competição nos campos experimentais do Instituto Agrônomo por três anos consecutivos e as quatro que mais se destacaram constituíram o composto IAC-27 (Melletti & Maia, 1999).

Após quatro ciclos de seleção, observou-se que produtividade, tamanho, peso dos frutos e número de sementes/fruto apresentaram incrementos de até 100%. Nesta etapa, ainda não se pensava em selecionar frutos para cada segmento de mercado, uma vez que a total ausência de cultivares e a necessidade dos produtores de atenderem a vários tipos de mercado com frutos de diferentes padrões não permitiam tamanha especificação. O composto IAC-27 veio a oferecer um incremento médio em produtividade, alcançando 20 a 25 t/ha/ano em pomares conduzidos com um grau médio de tratos culturais adequados e polinização manual complementar. Este material genético, contudo, não apresenta resistência à virose e à bacteriose porque não foi

selecionado com esta finalidade, sendo afetado por patógenos, geralmente a partir do segundo ano de produção.

Mais duas gerações de retrocruzamento nesse programa resultaram em novos e efetivos ganhos genéticos para os caracteres qualidade de fruto e produtividade. Obtiveram-se, assim, as três primeiras variedades de maracujá amarelo do país, com garantia de origem, denominadas IAC-273, IAC-275 e IAC-277. Elas foram lançadas pelo Instituto Agrônomo em 1999, e a produtividade média alcançada por essas variedades do IAC foi de 45 a 50 t/ha/ano, em condições de sequeiro, com polinização manual complementar (Melletti, 1999).

Apesar dessas iniciativas, o melhoramento do maracujazeiro no Brasil é considerado incipiente. Na maioria das vezes, a pesquisa encontra-se na fase de caracterização do germoplasma visando à obtenção de variedades tolerantes às moléstias e mais produtivas, seleção de porta-enxertos, incluindo (ou não) uma etapa de hibridação interespecífica.

2.4.1 Melhoramento genético visando à resistência a doenças

Desde o momento em que o homem passou a domesticar as plantas, esta atividade nem sempre resultou só em progresso. No processo de produzir alimentos e matérias-primas para atender às necessidades básicas das sociedades, o homem passou a ser o maior responsável pelo desequilíbrio ambiental. No lugar da vegetação que se desenvolveu por séculos ou milênios, a substituição da diversidade natural de plantas, em milhares ou milhões de hectares por uma ou poucas espécies, tornou inevitável o surgimento de pragas e doenças de plantas. A monocultura tomou o lugar de ecossistemas levando à conseqüente perda de biodiversidade local e à incidência de pragas e patógenos, que encontram nas plantas alimento farto e condição de

reprodução. Fatos importantes da saga do homem frente às doenças de plantas foram revistos por Bergamin Filho & Kimati (1997).

Estima-se que 24% da produção agrícola mundial sejam perdidos devido a doenças (Silva-Filho & Falco, 2001). Os atuais métodos de proteção das lavouras permanecem restritos ao uso de agroquímicos. Entretanto, a necessidade do desenvolvimento de uma agricultura mais “amigável”, com menor consumo de energia, menor contaminação dos trabalhadores e dos mananciais hídricos, baixos efeitos residuais nos alimentos e menor toxicidade tem proporcionado a busca de novas tecnologias para a obtenção de resistência às doenças. A estratégia mais eficaz e econômica de controle de doenças é a utilização de cultivares geneticamente resistentes, porém nem sempre a solução é tão simples.

O desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças segue os mesmos procedimentos de um programa de melhoramento convencional, com a diferença de que, a cada etapa do melhoramento, são realizadas inoculações artificiais ou exposição das populações ou linhagens em avanço de gerações aos patógenos específicos para os quais se quer selecionar resistência. O processo passa pela seleção de plantas resistentes em meio a uma população suscetível e evolui para cruzamentos específicos para agregação desta característica em cultivares já melhoradas. No melhoramento para resistência a doenças, o que há de particular é a ênfase que é dada à escolha específica de pelo menos um genitor, que deve ter a(s) fonte(s) de resistência à doença e a avaliação da reação das progênies frente aos patógenos.

A resistência do hospedeiro tem sido usada para o controle de doenças de plantas apesar da existência de grande variabilidade na agressividade do patógeno. A diversidade genética do patógeno é um complicador ao desenvolvimento de resistência durável no hospedeiro. Assim, utilizar isolados mais agressivos possibilita uma clara distinção entre genótipos com diferentes graus de resistência (Mello et al., 1996; Birch et al., 1997; Nakatani, 2001).

Em relação à bacteriose ou crestamento bacteriano do maracujazeiro, estudos iniciais têm sido feitos para a caracterização da variabilidade do patógeno e de *Passiflora*. A variabilidade quanto à resistência à bacteriose foi verificada entre espécies e dentro do maracujá amarelo (Kuroda, 1981; Barbosa, 1995; Leite et al., 1999; Nakatani, 2001; Fogaça-Miranda, 2003). Resistência à *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foi encontrada em *P. setacea*, *P. giberti*, *P. foetida*, *P. laurifolia* e *P. maliformis* (Kuroda, 1981; Barbosa, 1995; Fisher, 2003). Rodrigues Neto et al. (1984) consideram como resistentes as espécies *P. mollissima*, *P. cincinnata* e *P. foetida*, enquanto *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. edulis* foram consideradas suscetíveis, sendo *P. alata* e *P. quadrangularis* altamente suscetíveis. Kuroda (1981) relata como resistente à bacteriose *P. maliformis*, medianamente resistente *P. edulis*, e suscetíveis *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata*. Contudo, a hibridação interespecífica para transferência de genes de resistência ao maracujá comercial não tem apresentado resultados satisfatórios (Melleti & Bruckner, 2001).

Outra estratégia utilizada foi a hibridação somática, pela fusão de protoplastos. Esta estratégia tem-se constituído em uma alternativa para vencer as barreiras de incompatibilidade entre espécies do gênero *Passiflora* (Dornelas, 1995). Ao contrário da hibridação sexual interespecífica, na hibridação somática, os genitores contribuem com lotes diplóides de cromossomos. Isso possibilita o pareamento entre os cromossomos homeólogos das espécies envolvidas no processo de fusão, o que pode levar à introgressão gênica. No caso do maracujazeiro, híbridos somáticos envolvendo algumas espécies já foram obtidos, como exemplo: entre *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. incarnata* (Otoni et al., 1995), *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. alata*, *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. cincinnata*, *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. amethystina* e *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. giberti* (Dornelas, 1995). Estes híbridos foram estudados com relação à viabilidade polínica, resistência a doenças (Barbosa & Vieira, 1997) e características de frutos visando a sua utilização como porta-enxertos, como é

feito em *Citrus*, por exemplo. No caso, os porta-enxertos híbridos se prestam ao controle de doenças de solo.

O desafio para o melhoramento da passicultura nacional é a obtenção de variedades produtivas e resistentes à bacteriose e à virose. A seleção e a hibridação devem ser intensificadas, aliando-se métodos de biotecnologia aos programas de melhoramento, que deve ser um processo evolucionário e contínuo. Pesquisas em áreas correlatas devem ser executadas de modo integrado ao melhoramento.

Neste contexto, uma série de estudos vem sendo realizados no Departamento de Genética da ESALQ visando contribuir com o entendimento da herança da resistência à *Xanthomonas* e à melhoria da produção de maracujá amarelo. A identificação de QTL (locos de caracteres quantitativos) relacionados ao controle da bacteriose e à produção de frutos, realizada por diferentes técnicas de mapeamento genético, pode vir a colaborar com os programas de seleção (Carneiro et al., 2002; Lopes, 2003; Matta, 2005). Também, a geração de plantas transgênicas resistentes à bacteriose tem sido buscada via inserção e expressão do gene *attA* que codifica uma proteína bactericida da família das atacinas (Castro et al., 2004; Monteiro, 2005).

2.5 Transformação genética de plantas

Há muitos anos, plantas cultivadas vêm sendo manipuladas geneticamente pelo homem, por meio do melhoramento convencional ou clássico. Neste processo, características fenotípicas de interesse são combinadas em progênies por meio de cruzamentos controlados, com o apoio de técnicas estatísticas. Atualmente, o melhoramento de plantas pode recorrer às modernas técnicas de engenharia genética para buscar e expressar genes

oriundos de fontes alternativas, e não ficar restrito àquelas do “pool” gênico da espécie em estudo.

A biotecnologia vegetal é uma extensão do melhoramento convencional de plantas. Ela pode ser considerada como uma nova maneira de promover, de forma mais precisa, uma atividade que o homem iniciou há, aproximadamente, 10 mil anos: selecionar tipos com características superiores (Bórem, 1998). A engenharia genética e o melhoramento convencional de plantas se complementam e, com isso, novos cultivares têm sido gerados, pois a introdução de genes por métodos diretos e indiretos vem sendo realizada com sucesso (veja revisões em Quecini & Vieira, 2001; Silva Filho & Falco, 2001).

As chamadas plantas transgênicas são aquelas que tiveram introduzido em seu genoma um ou mais novos genes, pela engenharia genética. A concepção destas plantas envolve o isolamento ou a clonagem do gene de interesse, a “engenharia” do gene, a transformação da célula ou tecido da planta receptora e, finalmente, a seleção e a regeneração da planta e a fixação da característica desejada (Lajolo & Nutti, 2003).

Basicamente, a primeira geração de plantas transgênicas está relacionada à melhoria de características agrônômicas, ou seja, resistência a insetos e doenças e tolerância a herbicidas. A capacidade de variedades transgênicas em aumentar a sua produtividade com redução dos custos de produção tem sido demonstrada nos casos de plantas resistentes a vírus, insetos e herbicidas, em que a taxa de aumento na produção é da ordem de 5 a 10% para alguns herbicidas, podendo chegar a 40% (Herrera-Estrella, 1999).

Uma nova geração de plantas transgênicas (segunda geração) deve começar a despontar no mercado, resultado do seqüenciamento de genes e genomas de espécies cultivadas. Os produtos em desenvolvimento visam à: qualidade de diferentes óleos; alteração da composição nutricional de alimentos, particularmente dos níveis de proteína, aminoácidos essenciais e outros micronutrientes; tolerância a estresses bióticos e abióticos (seca,

salinidade, metais pesados, altas e baixas temperaturas, etc) e; tempo maior de conservação pós-colheita.

Finalmente, a terceira geração de plantas transgênicas, com previsão para entrar no mercado em meados da próxima década, tem como objetivos a alteração da arquitetura de plantas, a manipulação da época e tempo de florescimento, aumento da eficiência fotossintética, melhoria na assimilação de nutrientes, a concepção de produtos de interesse industrial (plástico biodegradável, lubrificantes industriais, matéria-prima para detergentes, enzimas de interesse industrial, etc) ou farmacêutico (vacinas, hormônios, anticorpos, fatores de coagulação, entre outros), ou seja, uso das plantas como biorreatores (Vasil, 2003).

Dunwell (2000) fez uma revisão sobre o crescente uso comercial de culturas transgênicas. Desde a primeira planta transgênica comercialmente produzida, o tomate “*Flavr Savr*”, em 1994, modificado para reduzir níveis da enzima poligalacturonase, registra-se uma massiva expansão da agricultura transgênica, particularmente com milho, soja, canola e algodão (Figura 2).

Figura 2 - Padrões de adoção global em (%) dos principais cultivos transgênicos em 2003. Fonte: James (2003)

Na América do Norte, variedades transgênicas ocupam a maior parte da área plantada (42,8 milhões de ha ou 63% da área total destinada à agricultura) (James, 2003). As plantas transgênicas cultivadas possuem genes de resistência a herbicida (*pat* ou *bar*, *aroA*, *Epsps*, *csr1-1*, *bxn*, *psbA*) e a insetos (*cryIA*, B, C, *cryIIA*, B, *cryIIIA*, B, *cryIVA*, B, C, D, *hut*), características que promovem um benefício econômico significativo para o agricultor (Silva-Filho et al., 2001; Takahashi, 2002).

Atualmente, 18 países cultivam áreas superiores a 50 mil hectares com transgênicos. Em 2004, a área com transgênicos continuou crescendo pelo oitavo ano consecutivo, 20% a mais que no ano de 2003, sendo a área global estimada em 81 milhões de hectares, incluindo uma estimativa provisória e conservadora de cinco milhões de hectares de soja geneticamente modificada no Brasil (James, 2005). Estima-se que a área total com transgênicos tenha sido cultivada por 8,25 milhões de agricultores, ao passo que em 2003 eram 7 milhões. Estes números refletem a velocidade com que a tecnologia tem sido adotada em todo o mundo. Para se ter uma idéia da assimilação da tecnologia pelos produtores, basta observar os dados de expansão da área total nos últimos oito anos. Um aumento de 48 vezes (Figura 3) é observado e algumas projeções indicam que, no final desta década, 15 milhões de agricultores plantarão 150 milhões de hectares em cerca de 30 países.

Figura 3 - Área global com cultivos transgênicos, de 1996 a 2004. Fonte: James (2005)

No Brasil, a discussão não se restringe ao fato de o país adotar ou banir a tecnologia dos transgênicos, e sim como adotá-la. Existem diversos grupos de pesquisa desenvolvendo plantas transgênicas direcionadas para resolver problemas da nossa agricultura. O país, no ano passado, assumiu a posição de quarto maior produtor de transgênicos, sendo responsável por 6% de todo o volume da produção, seguindo os EUA, a Argentina e o Canadá (James, 2005). A expectativa é que com a regulamentação e liberação de outras cultivares geneticamente modificadas, haja um incremento considerável da agricultura transgênica.

Plantas transgênicas podem ser obtidas via *Agrobacterium* ou por transferência direta de DNA à célula vegetal. Neste último caso, o DNA pode ser introduzido via biobalística ou eletroporação. A escolha do método de transformação depende, basicamente, dos sistemas de cultivo *in vitro* disponíveis para a espécie em estudo. Tecido íntegro e protoplastos provenientes de tecido foliar podem ser utilizados como fonte de material vegetal para a transformação direta do maracujá. Em condições adequadas de cultura, os protoplastos podem reconstituir suas paredes, regenerando um calo que origina uma nova planta (Birgouin et al., 1979; Fungaro & Vieira, 1989).

A chamada biolística ou biobalística consiste no bombardeamento de micropartículas recobertas por DNA. Estas são aceleradas a velocidades supersônicas (cerca de 1500 km/h) em direção a um tecido alvo, de modo que esta velocidade faça com que as partículas penetrem no tecido e promovam uma integração estável do DNA (Christou, 1990). As micropartículas, geralmente de tungstênio ou ouro, são recobertas com DNA e introduzidas na célula alvo por aceleração que é provida por explosão química, pressão de gases, tais como Hélio ou CO₂, ou por uma explosão elétrica. Nestes sistemas, a aceleração é proveniente da onda de choque gerada pela ruptura de uma membrana e não pelo impacto direto do gás ou da força elétrica sobre a membrana macrocarreadora. Os equipamentos mais eficientes e seguros para

essa aceleração são os que utilizam gás Hélio a alta pressão (Klein et al., 1987) ou os elétricos (Christou et al., 1988).

Segundo Potrikus (1990), as principais vantagens da biobalística são: (i) facilidade de manuseio; (ii) o fato de um tiro ter capacidade de atingir várias células; (iii) a universalidade do tecido alvo; (iv) a capacidade das partículas atingirem até as camadas mais profundas de células. É importante ressaltar que, pelo fato desse método permitir o uso de diferentes tecidos, o seu sucesso depende estritamente da habilidade das células do tecido alvo em proliferar e dar origem a uma planta fértil.

2.6 Condições de cultura de tecidos e agentes seletivos como pré-requisitos para transformação de plantas

Para gerar plantas transgênicas, é necessário que as células ou tecidos transformados sejam regenerados em brotos que expressem o gene introduzido. Portanto, é de fundamental importância a existência de um protocolo eficiente de regeneração.

A morfogênese vegetal é um processo complexo, em que a definição de forma e função dos tecidos da planta depende da habilidade da célula em se dividir e diferenciar. Para uma célula entrar em divisão, manter-se competente para proliferação, tornar-se quiescente, expandir e diferenciar-se, ou entrar em apoptose, há vários sinais envolvidos, entre eles, hormônios, nutrientes, luz e temperatura.

In vitro, células diferenciadas podem desdiferenciar-se para induzir à formação de embriões somáticos, brotos adventícios, ou raízes adventícias (Sugiyama, 2000). A morfogênese *in vitro* é dependente de vários fatores tais como: (i) fonte, tamanho e idade do explante; (ii) condição fisiológica do órgão doador; (iii) condição ambiental na qual a planta doadora é mantida; (iv) o

genótipo da planta (Takahashi, 2002). Estes fatores devem ser estudados visando uma maior eficiência no processo de regeneração.

Segundo Vieira & Carneiro (2004) há muitos relatos na literatura sobre a regeneração de plantas a partir de fontes variadas de explantes de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Basicamente, ocorre regeneração via organogênese estimulada por uma citocinina (Tabela 2).

Tabela 2. Cultura de tecidos de *P. edulis* f. *flavicarpa*

Explante	Tipo e [] do fitorregulador*	Referência
Segmento internodal	4,4 - 17,7 μ M BA	Biasi et al., 2000
Disco foliar	0,0 – 5,3 μ M BA	Otahola,, 2000
Segmento nodal	BA e CIN (várias []'s)	Cancino et al., 1998
Hipocótilo	5 μ M BA + 2 μ M IAA	Faria & Segura, 1997a
Ápice caulinar	2 – 20 μ M BA + 2 μ M IAA	Faria & Segura, 1997b
Primórdio foliar	1,0 μ M BA + 1,0 μ M IBA	Kawata et al., 1995
Cotilédone	8,88 μ M BA + 10% H ₂ O coco coco	Dornelas & Vieira, 1994

* BA (6-benzilaminopurina); CIN (cinetina); IAA (ácido indolacético); IBA (ácido indolbutílico). Fonte: Vieira & Carneiro (2004).

Estudos com discos foliares de maracujá sugerem que a organogênese *in vitro* é direta, sendo caracterizada pela formação de gemas adventícias e estruturas globulares ou protuberâncias (Fernando, 2004). As observações anatômicas e ultra-estruturais dos explantes foliares cultivados em meio MSB(A) + 1,0 mg.L⁻¹ de BA, indicam que alguns centros meristemáticos que não se diferenciam em gemas continuam seu desenvolvimento formando as protuberâncias. Estas estruturas são constituídas por diferentes tipos de células: periféricas com características meristemáticas e células centrais de caráter parenquimático. Somente as células periféricas são capazes de originar

gemas adventícias. O ideal no processo de transformação por biobalística é que as micropartículas recobertas com DNA atinjam as regiões meristemáticas, capazes de regenerar plantas transgênicas sem a presença de quimeras. Portanto, é interessante transformar os discos foliares quando os mesmos têm protuberâncias com um grau de desenvolvimento apenas inicial. Nesta situação, a presença de células parenquimáticas é pequena e a região periférica da protuberância, contendo células competentes, já está relativamente desenvolvida.

Um outro requisito essencial é o estabelecimento do agente seletivo adequado e a determinação da concentração na qual a célula transformada será selecionada. Agente e concentração devem permitir somente o crescimento de células/ tecidos transformados e evitar o escape dos não transformados. Por outro lado, a dosagem não pode ser excessiva a ponto de evitar também o crescimento dos explantes transformados (Takahashi, 2002).

Agentes tóxicos externos, como antibióticos, herbicidas e drogas foram os primeiros marcadores a serem desenvolvidos. Posteriormente, foram explorados agentes não tóxicos como substratos para o desenvolvimento *in vitro* ou que induzam ao crescimento e à diferenciação dos tecidos transformados.

Novas estratégias têm sido buscadas, como o uso de marcadores seletivos que alteram processos fisiológicos que controlam o desenvolvimento do tecido (Miki & McHugh, 2004).

Como a geração de plantas transgênicas é bastante laboriosa, envolve altos custos e é difícil para boa parte das espécies, características de ordem prática determinam a escolha do marcador seletivo. Embora, nenhum efeito ambiental negativo tenha sido relatado pelo uso de agentes seletivos, há um consenso de que genes que conferem resistência a antibióticos usados para o controle de doenças humanas não devem ser empregados na seleção *in vitro* (Miki & McHugh, 2004).

Entre as estratégias disponíveis para a eliminação de genes seletivos das construções, as mais efetivas e viáveis são:

a) a co-transformação com genes de interesse e com o gene seletivo seguida de sua eliminação em populações segregantes;

b) a utilização de recombinases sítio-específicas, sob o controle de promotores induzidos, para a excisão dos genes marcadores da planta transgênica depois da seleção.

Os genes que conferem resistência a antibióticos são de origem bacteriana e quando expressos sob promotores eucarióticos têm sido efetivos. Os representantes da principal classe de antibióticos, os aminoglicosídeos, são amplamente empregados em transformação de plantas. O mais conhecido é a canamicina, que é largamente aplicada como agente seletivo em experimentos de transformação. Outros são: gentamicina, geneticina, neomicina, paromicina e higromicina (Wilmink & Dons, 1993; Miki & McHugh, 2004).

A canamicina é empregada no tratamento de diversas infecções humanas. Existe a suposição de que as pessoas que venham a consumir plantas transgênicas portadoras de genes que conferem resistência à canamicina também possam ganhar resistência a medicações ingerindo esse alimento. Esta resistência ocorreria através da indução de mutações em bactérias endofíticas presentes no organismo humano e seleção dessas bactérias resistentes ao antibiótico. Atualmente, os cientistas estão de posse de citações técnico-científicas que afastam essa possibilidade, bem como de meios técnicos que conduzem à remoção desses genes antes de a planta vir a ser adotada comercialmente. Todavia, em face dessa preocupação, se tem dado preferência à seleção sem o emprego de antibióticos. Trata-se de colocar em prática a precaução, bastante comum em meio aos melhoristas de plantas transgênicas e não transgênicas (Valois, 2003).

Herbicidas têm sido utilizados com uma frequência cada vez maior. Os genes de resistência originam-se de vários organismos, incluindo bactérias e plantas e os mecanismos pelos quais estes genes atuam foram revisados por Comai & Satalker (1986).

A L-phosphinothricin (PPT), também conhecida como glufosinato de amônio ou fosfinotricina, é um análogo de glutamato e atua como um inibidor competitivo de enzima glutamina sintetase (GS). Esta enzima está envolvida na assimilação de amônia e tem uma função chave na regulação do metabolismo de nitrogênio (De Block et al., 1987). A inibição da enzima causa acúmulo de NH_4^+ na célula. Este acúmulo, mais do que a falta de glutamina, causa a morte das células (Tachibana et al., 1986 a, b). A PPT é sintetizada quimicamente (Basta Hoescht AG; Finale Bayer CropScience) ou por fermentação de *Streptomyces hygroscopicus* (Herbiace, produzido por Meji Seika Ltda). Este último, também chamado de Bialophos, é um composto tri-peptídeo que consiste de PPT e dois resíduos alanina que são removidos da célula de planta por peptidases (De Block et al., 1987).

A resistência a herbicidas é conferida por fosfinotricina-N-acetiltransferase (PAT), que inativa PPT por acetilação, usando acetil coenzima A como cofator. Dois genes similares codificam para PAT: *bar*, isolado de *Streptomyces hygroscopicus* (Murakami et al., 1986; Thompson et al., 1987) e *pat* isolado de *S. viridochromogenes* (Wohleben et al., 1988).

Ao consultar os artigos publicados no ano de 2002, constata-se que o gene de resistência ao agente seletivo PPT, *bar*, foi o mais utilizado dentre os que conferem resistência a herbicidas. Nos anos de 2001 e 2002, 327 eventos foram listados no banco de dados de ensaios de campo com transgênicos nos Estados Unidos: percebe-se que uma grande diversidade de companhias e pesquisadores tem empregado o gene *bar* ou *pat* como estratégia para a seleção de transgênicos (Miki & McHugh, 2004).

Plantas transgênicas com os genes *pat* ou *bar* têm sido declaradas seguras por agências regulatórias governamentais de vários países que indicam a liberação irrestrita dessas plantas para o consumo humano e alimentação animal. Dentre as plantas transgênicas portadoras deste gene estão: o milho, o arroz, a soja, a chicória e a beterraba, todas aprovadas para comercialização (Miki & McHugh, 2004).

2.7 Riscos associados à transgenia

A história mostra que mudanças ou alterações nos padrões alimentícios, ou diretamente nos alimentos, causaram preocupação pública. Foi o caso do enlatamento, da pasteurização, da comercialização da margarina, do milho híbrido, do uso da irradiação e das microondas e parece também ser o caso dos alimentos geneticamente modificados (IFT, 2000).

A biossegurança é uma área da ciência surgida no século passado voltada para o controle e a minimização de riscos advindos da prática de diferentes tecnologias biológicas, seja em laboratório, ou quando aplicada ao ambiente. A biossegurança estuda os impactos decorrentes da biotecnologia na saúde humana e animal e no ambiente, sendo regulada, em vários países, por um conjunto de leis, procedimentos ou diretivas específicas (Borém, 2001).

No Brasil, foram estabelecidas normas de biossegurança para regular o uso da engenharia genética e a liberação no ambiente de organismos geneticamente modificados (OGM). Essas normas estão reguladas pela Lei no. 8974, sancionada em 5 de janeiro de 1995. Pela medida provisória número 1015, de 29 de maio de 1995, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio foi implementada. Cabe à CTNBio a elaboração de normas de biossegurança relacionadas com organismos transgênicos. Dentre outras atribuições da CTNBio estão a autorização e fiscalização de laboratórios e

experimentos de campo com OGM e a solicitação de estudos relacionados à segurança ambiental e alimentar de todo e qualquer produto transgênico. Vale ressaltar que os procedimentos e mecanismos adotados pela CTNBio são rígidos e competentes, inclusive servindo de modelo para outros países (Valois et al., 1999). Depois de passar por um verdadeiro imbróglio jurídico, a lei de biossegurança foi recentemente aprovada no país.

A concepção dos OGM está fundamentada na tecnologia do DNA recombinante que permite a transferência de novos genes, alterando, portanto, a sua composição. Essa alteração envolve efeitos intencionais, relacionados à característica do gene introduzido, e efeitos não-intencionais (previsíveis ou não), decorrentes dessa inserção ou da manipulação conduzida (por exemplo, alteração de uma via metabólica ou de um composto químico). Os riscos potenciais estão associados ao novo DNA introduzido e ao seu produto ou a efeitos não-intencionais, decorrentes da introdução e expressão no genoma deste novo gene (efeito pleiotrópico) e eventuais mutações (Lajolo & Nutti, 2003).

A simples ingestão de DNA adicional não é considerada perigosa, já que DNA/RNA são ingeridos normalmente na dieta. Os produtos da expressão podem ser tóxicos, ter ação antinutricional ou causar algumas mudanças no valor nutricional do alimento. Podem ocorrer também efeitos não-intencionais. Uma alteração no genoma não é perceptível com facilidade e pode levar a mudança na expressão enzimática, logo, nos fluxos de diversas vias metabólicas ainda não conhecidas. Além disso, a inserção do transgene nos cromossomos pode alterar a expressão de outros genes; por exemplo, reativação de genes silenciados por processos evolutivos, os quais ativados, passariam a produzir substâncias indesejáveis (Lajolo & Nutti, 2003).

Efeitos adversos da expressão ou escape do gene no ambiente, como o aumento da capacidade invasora da espécie receptora, os efeitos nocivos sobre

insetos não-alvo e o fluxo gênico, também devem ser considerados e avaliados pela CTNBio (Borém, 2001).

Em 20 anos de agricultura transgênica (1994 a 2004), em milhões de hectares, sob as mais diversas condições ambientais em vários países em todo o planeta, nenhuma limitação à saúde humana ou ao ambiente foi identificada. Tudo indica que o processo seletivo colocado em prática tem sido seguro, eficiente e eficaz. Acredita-se que os eventuais riscos sejam controláveis, e os benefícios sejam maiores do que eventuais riscos. Aliás, os benefícios para a sociedade advindos da redução do uso de defensivos químicos que contaminam o homem, o ambiente e deixam resíduos nos alimentos, o aumento da produtividade e a produção de alimentos mais saudáveis são apenas algumas oportunidades criadas pelas variedades geneticamente modificadas. Passada a resistência inicial, os transgênicos tornar-se-ão parte integrante e natural da mesa, do vestuário e dos fármacos do homem (Valois, 2003).

2.8 Controle da bacteriose do maracujazeiro via transgenia

Os avanços nas técnicas de cultura *in vitro* e transformação e o no entendimento da interação patógeno-hospedeiro têm permitido a geração de plantas resistentes a doenças. Proteínas ou peptídeos exógenos são expressos e, assim, introduzem novas fontes de resistência ou complementam mecanismos naturais de resistência (During, 1996). Teoricamente, genes de várias fontes (fungos, bactérias, plantas e animais) podem ser usados e, após sua transferência, tornam-se ativos em um organismo ou tecido, ou são expressos em determinada fase de desenvolvimento do OGM.

Jaynes et al. (1987, 1993) e propuseram o uso de genes que codificam proteínas com atividade antimicrobiana, encontradas em insetos, visando à produção de plantas resistentes a bactérias. Os insetos têm um sistema de

defesa contra bactérias e parasitas: seu sistema imunológico baseia-se em polipeptídios com função antibacteriana, como, por exemplo, a proteína atacina. Após a injeção de bactérias em pupas de *Hyalophora cecropia* em estado de diapausa, pelo menos 15 proteínas foram produzidas na hemolinfa dos insetos (Boman & Hultmark, 1987; Hultmak et al., 1980). Estas proteínas, originalmente nomeadas como proteínas imunológicas P1-P9, são uma parte importante do sistema de defesa de insetos (Faye et al., 1975, Boman et al., 1981). Três tipos de proteínas antibacterianas foram identificados: as atacinas (P5, A-F), as cecropinas (P9, A-F) e a lisozima (P7) (Dickinson et al., 1988). Proteínas similares à atacina também foram encontradas em outros insetos, como *Drosophila melanogaster* (Flyg et al., 1986) e *Sarcophaga peregrina* (Ando et al., 1987).

Atacinas têm ação bacteriostática em bactérias do grupo das Gram-negativas (Hultmark et al., 1983, Engstrom et al., 1984, Ando et al., 1988), como *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas maltophilia* (Hultmark et al., 1993), *Erwinia amylovora* (Norelli et al., 1993) e *Xanthomonas axonopodis* (Chen et al., 1996; Boscariol, 2004).

Os genes de atacina foram isolados de *Hyalophora cecropia* – *attE* (Sun et al., 1991), *Drosophila melanogaster* – *attA* (Asling et al., 1995) e *Tricloplusia ni* – *attA* (Kang et al., 1996).

O gene *attA* de *T. ni* possui, na sua seqüência 1601 pb, dois introns e um peptídeo sinal, possuindo padrões similares aos de *H. cecropia*. Em nível de nucleotídeos e de peptídeos, a atacina A mostra alta homologia com a forma acídica da atacina de *H. cecropia*, com 63% de identidade com a parte madura da proteína (Kang et al., 1996).

Seis atacinas foram purificadas, divididas em duas diferentes formas, quatro básicas (A-D) e duas ácidas/neutras (E-F), com pesos moleculares variando de 20 a 23 kDa (Hultmark et al., 1983). As seqüências primárias das duas formas apresentam 80% de similaridade. A diferença de potencial

isoelétrico entre as duas formas é explicada pelas quantidades diferentes de ácido aspártico nos peptídeos (Engstrom et al, 1984). Todas as seis proteínas são originárias de dois únicos genes, apresentando variações nas extremidades C-terminal e N-terminal. Por exemplo, dos dois cDNAs de atacina clonados de *H. cecropia*, o correspondente à atacina E (184 aminoácidos) codifica uma proteína com 188 aminoácidos que inclui o tetrapeptídeo (Ser-Lys-Tyr-Phe) na extremidade C-terminal. As diferenças entre as proteínas se devem a um processamento pós-traducional.

A ação da atacina A contra *E. coli* consiste em um aumento contínuo da permeabilidade e na inibição da síntese de proteínas da membrana externa na fase de transcrição, inibindo o crescimento bacteriano. Ficou evidenciado por Nystrom et al. (1992) que uma LPS (lipo-proteína solúvel) presente na membrana assume o papel de receptor para a atacina A, que não precisa entrar na célula bacteriana para manifestar sua toxicidade.

As atacinas ligam-se diretamente aos lipolissacarídeos da membrana externa de *E. coli*, desorganizando a membrana e levando à maior permeabilidade. A ligação desta proteína também causa a inibição da síntese de várias proteínas específicas da membrana externa, provavelmente através de inibição por "feedback", limitando a bactéria de restaurar a função da membrana (Carlsson et al., 1991, 1998). Possíveis danos na membrana interna da bactéria são efeitos subseqüentes da atacina A, que tem a habilidade de interferir, especificamente, na síntese de proteínas da membrana externa, sem penetrar no citoplasma.

O cDNA que codifica a atacina E foi ligado a promotores de plantas e usado na transformação genética de maçã (Norelli et al., 1993). Cultivares suscetíveis apresentaram grande redução dos sintomas quando inoculadas com *Erwinia amylovora*, agente causal da escaldadura da macieira. Algumas dessas plantas foram inoculadas em campo e houve redução dos sintomas da

ferrugem da ordem de 50%, quando comparadas a plantas controle (Norelli et al., 1996).

É sabido que a maioria das proteínas relacionadas à patogênese (PRs), fitoalexinas e outras proteínas de defesa são encontradas no espaço intercelular ou apoplasto, onde bactérias fitopatogênicas se multiplicam antes de atacar as células do hospedeiro (Alfano & Collmer, 1996; Bogs et al., 1998). Desta maneira, é importante que a proteína heteróloga antibacteriana introduzida na planta transgênica seja destinada ao apoplasto para que seus efeitos sejam pronunciados.

Isso foi confirmado por Ko et al. (2000). Em seu trabalho, foram construídos vetores de transformação que possuíam ou não uma seqüência de direcionamento para o espaço intercelular fusionado ao gene *attE*. O autor transformou plantas de maçã com os diferentes vetores e verificou, através de bioensaios de inoculação com *E. amylovora*, a resposta da planta à presença da bactéria. As plantas transformadas com o vetor contendo o gene *attE* fusionado ao peptídeo sinal (SP – peptídeo sinal da proteína relacionada à patogênese 1b de tabaco), mostraram menor nível de atacina em comparação àquelas que receberam o gene sem o SP. No entanto, as plantas transformadas com o vetor contendo o SP mostraram menos sintomas da doença do que aquelas que receberam a construção sem o peptídeo de direcionamento. Esses dados indicam que o SP da proteína 1b de tabaco foi capaz de direcionar a atacina para o espaço intercelular, sugerindo que a proteína secretada no apoplasto é mais efetiva na redução da infecção quando comparada à presença da atacina dentro da célula.

Estudos de homologia do gene *attA*, através do alinhamento de seqüências de nucleotídeos pela análise de BLAST, detectaram haver uma seqüência de direcionamento endógena, nativa em *attA* (Boscariol et al., 2004; Monteiro, 2005). Esta seqüência foi fusionada ao gene *gfp* (*green fluorescent protein*) que codifica uma proteína fluorescente verde e inserida em células

epidérmicas de cebola, a título de modelo. Observou-se que esta seqüência de direcionamento foi responsável por encaminhar a *gfp* para o meio extracelular, supostamente onde a bactéria se acumula *in vivo*. Este resultado foi importante por mostrar a presença da proteína atacina no apoplasto e, assim, aumentar as chances de controle do desenvolvimento populacional bacteriano em plantas infectadas.

Boscariol et al. (2004) demonstraram que plantas transgênicas de *Citrus sinensis* cv. Hamilin, transformadas com o gene *attA*, mostraram significativa redução de sintomas (60 a 88%) e, também, atraso no seu aparecimento quando inoculadas com *X. axonopodis* pv. *citri*. Estes resultados mostraram a eficiência da atacina A no controle da doença causada por *X. axonopodis* pv. *citri*, o que sugere perspectivas de uso para o controle da bacteriose do maracujá.

Considerando a importância da bacteriose do maracujazeiro para os produtores e para a indústria beneficiadora dos frutos, torna-se imprescindível a busca por cultivares que apresentem tolerância ou resistência a esse agente causal, o que se constitui no principal objetivo deste estudo. A transgenia apresenta-se como um caminho viável em maracujazeiro para a obtenção de cultivares resistentes. Justificam a escolha desse caminho a existência de: (i) protocolos eficientes de cultura de tecidos para a *P. edulis* f. *flavicarpa*; (ii) genes de resistência a bactérias Gram-negativas já clonados e disponíveis em nosso laboratório e; (iii) resultados científicos que demonstram a eficiência da atacina A no controle de *Xanthomonas*. O gene *attA* foi doado ao Departamento de Genética da ESALQ pelo IAPAR, especificamente, pelo Dr. Luis Gonzaga Vieira, a quem foi cedido o referido gene pelo grupo sueco que procedeu a sua clonagem (Asling et al., 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Três populações de maracujá amarelo foram empregadas neste trabalho: população Sul Brasil, FB-100 e FB-200.

A população Sul Brasil é um material que tem servido de base para alguns programas de melhoramento genético, principalmente no que se refere às características de tamanho de fruto. Com relação à bacteriose, a população Sul Brasil tem se mostrado suscetível a isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Fogaça-Miranda, 2003). As plantas da população Sul Brasil foram aqui utilizadas em bioensaios de resistência à *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. As sementes, provenientes da região de Vera Cruz, SP, foram fornecidas pelo Prof. Jorge Alberto M. Rezende (ESALQ/USP) e pela cooperativa AFRUVEC (Associação dos Fruticultores da Região de Vera Cruz).

As variedades FB-100 e FB-200 foram desenvolvidas pela empresa Flora Brasil, da região de Araguari, MG, e resultam do programa de melhoramento genético da empresa Maguary. Suas principais características são a rusticidade e a estabilidade de produção. Possuem um alto rendimento de suco (superior a 42%), Brix acima de 14,5 e potencial produtivo de 50 ton por hectare (Melletti, 2003). Neste estudo, a variedade FB-100 foi escolhida visando à produção de plantas transgênicas devido a sua superioridade agronômica e suscetibilidade à bacteriose. Mais de 500 plântulas foram germinadas e cultivadas *in vitro*. As populações FB-100 e FB-200 foram também empregadas nos estudos de

resistência à *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. As sementes de ambas, FB-100 e FB-200, foram cedidas pelo Eng. Agrônomo José Rafael da Silva.

As sementes da população FB-100 destinadas para o cultivo *in vitro* foram desinfetadas por imersão em uma solução de benomyl 1,0 g/L (p/v), durante 12 h sob agitação. Em seguida, foram esterilizadas por imersão em álcool 70% (v/v) por 40 segundos e em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% (v/v) contendo duas a três gotas de Tween 80, por 30 minutos. Lavagens sucessivas com água destilada, deionizada e esterilizada foram realizadas antes da inoculação.

As sementes foram escarificadas com bisturi e inoculadas em tubos de cultura (24 X 85 mm; 30 mL) contendo 10 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com metade da sua concentração original de sais e vitaminas, acrescido de sacarose (15 g/L) e phytigel 0,18% (p/v). A germinação foi feita a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

3.2 Explantes vegetais e condições de cultura

A eficiência da técnica de transformação de plantas depende da capacidade de regeneração do explante utilizado. Os parâmetros, fonte e idade de explante e meio de cultura foram avaliados para a população Sul Brasil por Takahashi (2002). O explante que apresentou um maior potencial de regeneração foi disco foliar (0,7 cm de diâmetro), excisado de folhas com três dias de idade. O meio de cultura ideal para a regeneração a partir dos discos foliares é constituído de sais e vitaminas do meio MS acrescido 3% de sacarose, $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BA (6-benzilaminopurina) e 5% de água de coco, designado MSB(A).

Devido à inclusão da variedade FB-100 neste estudo, tornou-se necessária a otimização do meio de cultura para a regeneração dos discos

foliares oriundos desta população. Foi realizado um experimento no qual se variou a dosagem de BA (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹) e a posição do disco foliar em contato com o meio (abaxial ou adaxial).

O experimento foi conduzido em placas de petri (9 X 1,5 cm; 50 mL), em delineamento inteiramente casualizado, contendo três repetições. Cada parcela do experimento foi composta por uma placa contendo dez discos foliares, totalizando 300 discos. As placas foram mantidas no escuro por sete dias e, após este período, transferidas para luz branca fluorescente (25 µmol.m⁻².s⁻¹) a 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16 h. As análises foram efetuadas aos 15, 30 e 45 dias de cultura, sob lupa e as estruturas fotografadas. Em cada avaliação, foram contados: o número de explantes cloróticos e de explantes que apresentavam expansão e/ou brotos, ou seja, regeneração. Este segundo ensaio foi constituído dos mesmos tratamentos, mas com um número maior de repetições visando precisar as avaliações sobre o efeito hormonal, sendo mantida a posição abaxial do tecido foliar. Foram usadas cinco repetições para as concentrações de BA, totalizando 250 discos. Procederam-se às mesmas avaliações, nas mesmas idades de cultura.

3.3 Otimização da dosagem de fosfinotricina para a seleção *in vitro* de brotos transgênicos

Para a seleção de brotos transgênicos putativos dentre os brotos regenerantes, é necessária a utilização de um agente seletivo. Neste trabalho, foi usado como agente seletivo o herbicida Finale (Bayer), cujo princípio ativo é a fosfinotricina ou glufosinato de amônio. Para a determinação da dosagem correta do herbicida Finale, foram feitos três ensaios em que foram avaliadas dosagens de 0,0 a 10,0 mg.L⁻¹. Alíquotas de 5 mg.L⁻¹ foram filtro-esterilizadas e

o herbicida adicionado quando a temperatura do meio MSB(A) estava em torno de 45°C.

O experimento foi conduzido em placas de petri (9 X 1,5 cm; 50 mL), em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Cada parcela foi composta por uma placa contendo dez discos foliares. As placas foram mantidas no escuro por sete dias e, após esse período, transferidas para luz branca fluorescente ($25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 h.

No primeiro ensaio, foram testadas as dosagens 0,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg de fosfinotricina por litro de MSB(A). Um total de 25 placas e 250 explantes constituiu o experimento. Devido à morte de todos os discos foliares já na dosagem de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$, procedeu-se a um segundo ensaio com as dosagens 0,0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,25 e 2,50 mg de fosfinotricina por litro de MSB(A). Um número de 55 placas e 550 explantes constituiu o experimento. Um último ensaio visando à determinação da dosagem ótima tornou-se necessário: foram testadas as dosagens 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0 mg de fosfinotricina por litro de MSB(A). Um número de 55 placas e 550 discos foliares constituiu este ensaio final. As placas foram mantidas sob as mesmas condições de cultura descritas para o primeiro ensaio e procedeu-se ao mesmo esquema de avaliação.

As análises foram efetuadas aos 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo, sob lupa e as estruturas fotografadas. Em cada avaliação, foi contado o número de explantes cloróticos e de explantes sobreviventes. Dentre os sobreviventes, foram discriminados os explantes que apresentavam expansão e/ou presença de brotos.

3.4 Obtenção de plantas transgênicas

3.4.1 Cultura bacteriana

Foi utilizada a linhagem JM 109 (Yanisch-Pearson et al., 1985) de *Escherichia coli*, transformada com o vetor pCatt3300 (Figura 5). As cepas foram cultivadas e mantidas em placa de petri (10 cm), contendo meio LB sólido (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% de NaCl, 1,6% de ágar bacteriológico) acrescido do agente seletivo canamicina (50 µg/mL), a uma temperatura de 4°C, no escuro.

3.4.2 Vetor de transformação

O plasmídeo usado nos ensaios de transformação direta de plantas da população FB-100 abriga um cassete de expressão (Figura 4) que foi inserido no vetor de multiclonagem pCambia 3300 (Cambia GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Austrália), conforme descrito em detalhes por Takahashi (2002), responsável pela construção. O referido cassete contém o gene *bar* dirigido pelo promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor e o gene *attA* dirigido pelo mesmo promotor duplicado, ambos seguidos pelo terminador 35S.

Figura 4 – Cassete de expressão contendo os genes *attA* e *bar* dirigidos pelo promotor constitutivo 35S

3.4.3 Extração e quantificação plasmidial

O método utilizado para o isolamento e purificação de DNA plasmidial baseia-se na lise alcalina das células, proposto originalmente por Birboim & Doly (1979).

Colônias isoladas da linhagem JM 109 de *E. coli*, previamente transformadas com o vetor pCattA3300, foram inoculadas com o auxílio de palitos esterilizados, em dois tubos contendo 3 mL de LB líquido acrescido de 50 µg/mL de canamicina. Os tubos permaneceram sob agitação (180 rpm), durante 8 h, à temperatura de 37°C. Após esta etapa, foram retirados 300 µL da solução bacteriana de cada tubo e transferidos para dois novos tubos com 3 mL de LB líquido acrescido do agente seletivo. Novamente, os tubos permaneceram sob agitação (180 rpm) por 8 h, à temperatura de 37°C. Por fim, fez-se nova inoculação de 300 µL de solução bacteriana em dois erlenmeyers contendo 125 mL de LB líquido com canamicina. Os erlenmeyers permaneceram mais 12 a 16 h sob 180 rpm, a 37°C. Estas etapas foram realizadas com o objetivo de estimular o crescimento bacteriano, garantindo

que a extração plasmidial fosse realizada a partir de células vivas e que, supostamente, não tivessem sofrido cura plasmidial.

Para a extração, foi empregado o Kit MaxiPrep QuiaFilter (Qiagen), que é baseado em uma modificação do protocolo de lise alcalina. A parte inicial de subcultivos bacterianos é a mesma do protocolo descrito por Birboim & Doly (1979). Inicia-se o protocolo adicionando RNase, na quantidade de 100 µg/mL, no tampão PI. As soluções PI e PIII devem ser mantidas em gelo durante toda a extração. Distribuiu-se a solução bacteriana em duas garrafas de 250 mL (125 mL em cada) e realizou-se uma centrifugação a 7000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso com a ajuda de um “vortex” em 10 mL do tampão PI contendo RNase. Os conteúdos das duas garrafas foram misturados e transferidos para um tubo tipo “Falcon” de 50 mL. Adicionaram-se mais 10 mL de tampão PII, inverteu-se o tubo quatro a seis vezes suavemente e incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos. Enquanto isso, foi preparado o aparato fornecido pelo Kit da Qiagen, usado para filtrar o precipitado formado por restos de células bacterianas, proteínas, DNA genômico e detergente. Foram adicionados 10 mL do tampão PIII. Misturou-se por inversão quatro a seis vezes e o conteúdo do tubo foi imediatamente transferido para a seringa e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. Foi observada a formação de um precipitado. Enquanto isso, a coluna de extração foi equilibrada por adição de 10 mL do tampão QBT. Após 10 minutos, procedeu-se a filtração lenta do conteúdo. Uma solução de aproximadamente 25 mL, contendo os plasmídeos, preencheu a coluna de extração. Por gravidade, esta solução passou pela coluna contendo uma resina que adsorve DNA. A coluna foi então lavada com 30 mL do tampão QC por duas vezes visando à limpeza do DNA plasmidial que foi eluído através da adição de 15 mL do tampão QF. A solução contendo os plasmídeos foi coletada em um outro tubo “Falcon”. O DNA foi então precipitado pela adição de 10,5 mL de isopropanol e centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado com cuidado e o precipitado foi lavado com etanol 70% por duas

vezes. As etapas seguintes foram: centrifugar, descartar o sobrenadante e secar o precipitado ao ar. Após a secagem, o DNA foi ressuspensionado em tampão TE e mantido à temperatura de -20°C.

Nos experimentos de transformação via biobalística, recomenda-se o uso de 1 a 2 µg de DNA por ensaio. Portanto, várias quantificações de DNA plasmidial foram realizadas por duas técnicas: eletroforese em gel de agarose e espectrofotometria.

A quantificação de DNA plasmidial em gel de agarose é baseada na leitura da fluorescência emitida na presença de luz ultravioleta, que é induzida pela intercalação de brometo de etídeo na dupla fita de DNA. A fluorescência é proporcional à concentração de DNA.

O gel usado foi preparado em tampão TBE (10,8 g Tris base; 5,4 g ácido bórico; 4 mL EDTA 500 mM; para 1 L de solução) contendo 1% (p/v) de agarose. A intensidade do campo elétrico foi de 4,0 V/cm. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídeo (10 mg/mL) e visualizados sob luz UV. Procedeu-se à comparação das intensidades das bandas e a determinação da concentração de cada amostra, usando como padrão DNA do fago lambda (λ) em diferentes concentrações.

Outra técnica utilizada para a quantificação de DNA plasmidial foi a espectrofotometria. A estimativa da concentração de DNA baseia-se na transmitância da amostra e na absorbância medida no aparelho. Estes dois parâmetros variam dependendo da composição de cada amostra. A estimativa por espectrofotômetro, medida pela absorbância das bases a 260 nm, consiste num método simples, rápido e com certa precisão que depende da pureza do DNA. Para a quantificação, as leituras foram feitas a 260 e 280 nm. O DNA foi diluído 100 vezes em água mQ. Um µL foi então diluído em 300 µL de água mQ (capacidade da placa de cristal do espectrofotômetro). Cada amostra foi lida três vezes e a concentração calculada segundo a fórmula:

$$[\text{DNA}] = 10 \times \text{OD } 260$$

3.4.4 Biobalística

Foi usado o equipamento PDS 1000/He (Bio Rad), empregando gás Hélio à alta pressão como gerador de onda de choque para aceleração de micropartículas, detalhadamente descrito por Kikkert (1993).

A precipitação do DNA sobre as micropartículas de tungstênio M10 (Sylvania) foi realizada pelo método CaCl_2 /espermidina descrito em Smith et al. (1992). A umidade relativa do ar foi inferior a 40% e o vácuo na câmara do aparelho foi superior a 65 mm de Hg.

A otimização dos parâmetros físico-biológicos envolvidos na técnica de transformação genética por biobalística foi previamente realizada para a cultura do maracujá (Takahashi, 2002). Parâmetros físicos, como a pressão de gás Hélio em combinação com distâncias de vôo das micropartículas, foram avaliados usando-se a expressão transiente de *uidA*. Os parâmetros de distâncias entre o disco de ruptura e o macrocarreador e entre a membrana macrocarreadora e a tela de retenção foram fixados em 6,35 mm e 10 mm, respectivamente. As condições que resultaram em níveis mais elevados de expressão transiente foram 800/6,5 (psi de gás Hélio/cm de distância de vôo dos microprojéteis) e explante do tipo disco foliar com três dias de idade para a população Sul Brasil (Takahashi, 2002).

Neste trabalho, os ensaios de bombardeamento foram realizados com a variedade FB-100, *à priori*, usando-se discos foliares e o meio de cultura MSB(A). Os discos foliares foram excisados de folhas com aproximadamente três dias de idade e cultivados por um dia em MSB(A), sendo 20 o número total de explantes por placa (9 X 1,5 cm; 50 mL). A origem de cada disco foliar foi anotada pela identificação da planta doadora. Marcou-se no fundo da placa,

dividida em quadrantes, o código da planta doadora. No dia seguinte, os explantes foram levados à sala de biobalística e bombardeados. Posteriormente, foram transferidos (dez por placa) para MSB(A) onde permaneceram por dez dias na luz ($25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Em seguida, foram transferidos para meio MSB(A)F contendo $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ do agente seletivo fosfinotricina (Finale[®]).

Com base no resultado da otimização das condições de cultura para a população FB-100, alterou-se o sistema de cultivo até então usado. Após a excisão dos discos foliares, os mesmos foram cultivados em MS + $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BA + 5% de água de coco solidificado com 0,6% de ágar. Este procedimento manteve-se até a etapa de cultivo em meio seletivo, na qual os explantes foram transferidos para o mesmo meio contendo $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de fosfinotricina.

Uma contribuição importante ao protocolo de obtenção de plantas transgênicas por biobalística surgiu de parceiros de estudos da cultura de tecidos do maracujazeiro, quais sejam: a doutoranda Juliana Aparecida Fernando e sua orientadora Profa. Beatriz Appezzato da Glória. Com base nestes estudos, envolvendo a população FB-100, sugere-se que a organogênese *in vitro* é direta, sendo caracterizada pela formação de gemas adventícias e estruturas globulares ou protuberâncias (Fernando, 2004). O bombardeamento dos discos foliares foi realizado com quatro a seis dias de cultivo. Com essa alteração, esperava-se um aumento na taxa de recuperação de brotos transgênicos e que a presença de quimeras fosse minimizada.

Os discos foliares foram cultivados por cinco dias em MSB(A), antes da transformação. Devido à expansão foliar que ocorre nesta fase, houve uma adaptação no sentido de deixar espaço entre os explantes para que o seu desenvolvimento não fosse inibido e, no momento da transformação, os discos foram centralizados nas placas. O número de discos por placa foi reduzido de 20 para 16, já que neste novo esquema, os explantes possuíam um diâmetro

maior, fruto da sua expansão. Após o bombardeamento, os discos foram cultivados por mais cinco dias e depois transferidos para MSB(A)F.

Com 50 a 70 dias de cultivo em MSB(A)F, os explantes que apresentaram a formação de brotos foram retirados das placas e transferidos para frascos de vidro (9,0 x 6,0 cm) contendo MSB(A)F. Esta transferência teve por objetivo aumentar o espaço físico disponível e a quantidade de O₂ visando à maximização do desenvolvimento da parte aérea do broto sem retirá-lo do meio seletivo. Foram realizadas subculturas a cada 20 dias.

Após 30 dias de cultivo em MSB(A)F, os explantes que apresentaram brotos foram individualizados e subcultivados em meio para enraizamento (1/2 MS + 1,5% de sacarose). Após a rizogênese, cada broto individualizado foi transferido para frascos maiores (12,5 x 6,0 cm) em MS completo, onde foi cultivado e posteriormente clonado.

Foram feitas avaliações de dez ensaios de bombardeamento (denominados A, B, C, D, E, F, G, H, I e J), e as seguintes características foram avaliadas a cada cinco dias: (i) resposta morfogênica; (ii) presença de clorose e necrose nos discos. Cada um desses ensaios foi formado por 24 placas com oito discos cada. As avaliações foram feitas sob lupa, com o objetivo de determinar o comportamento e o desenvolvimento dos explantes em meio seletivo com o avanço do tempo.

Ao todo foram bombardeados **5992** discos foliares em **30** ensaios de transformação por biobalística.

3.5 Ensaio histoquímico de GUS

Verificou-se o funcionamento adequado do equipamento de biobalística e de todas as variáveis físicas e biológicas envolvidos no processo de transformação a cada 500 explantes bombardeados, pela análise da expressão

transiente do gene *uidA*. De cada ensaio de transformação, foram selecionados 48 discos, ao acaso.

Nas ocasiões em que se realizou o monitoramento do processo de transformação, foi praticado o co-bombardeamento. Ambos os plasmídeos pCatt3300 e pCambia1301 foram co-precipitados sobre as micropartículas de tungstênio. O plasmídeo 1301 possui o gene *uidA*. O protocolo de precipitação dos plasmídeos sobre as micropartículas está descrito no item 3.4.4.

Os explantes foram analisados para detecção histoquímica da atividade da enzima β -glucuronidase 24 h após o bombardeamento, conforme descrito por Jefferson et al. (1987). O tecido foi infiltrado por vácuo durante cinco minutos com o tampão de reação contendo o substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronídeo (X-Gluc) (Chemica Alta DTD), preparado de acordo com McCabe et al. (1998), adicionado de 20% de metanol (v/v), a fim de suprimir a atividade de β -glucuronidasas endógenas (Kosugi et al., 1990). Após incubação por 16 h a 37°C, os pigmentos do tecido foram removidos por lavagens sucessivas com etanol 70% (v/v) e os explantes observados sob lupa.

3.6 Obtenção de iniciadores para a amplificação do fragmento do gene *attA*

Dois pares de iniciadores, desenhados para o gene da atacina A (Takahashi, 2002), que amplificam fragmentos de 350 e 500 pb, foram sintetizados pela empresa Invitrogen Life Technologies™. Estes iniciadores foram usados em reações em cadeia da polimerase (PCR) para comprovar a transgenia das plântulas obtidas. As seqüências F (“forward”) e R (“reverse”) de cada par são:

ATA 1 (F) – 5' GCT GTT CAG CTA GCC AGT CC 3' (350 pb)

ATA 2 (R) – 5' TTT GGG AAG TCA GGC ATG TT 3' (350 pb)

ATA 3 (F) – 5' ACA TCA GCG CTA AAG CCT TC 3' (500 pb)

ATA 4 (R) – 5' GTC GTG GGA CTA CGG AAC AC 3' (500 pb)

3.7 Confirmação molecular da transgenia

3.7.1 Extração de DNA genômico

3.7.1.1 Método do DNAzol

O reagente DNAzol (Invitrogen®) é composto por uma solução lítica detergente-guanidina que hidrolisa o RNA e permite a precipitação seletiva do DNA. O protocolo de extração é rápido e permite o isolamento de DNA genômico a partir de tecidos vegetais. Esta metodologia foi empregada para os ensaios da PCR.

De cada planta, foi pulverizado o tecido foliar (0,1 g) em N líquido em almofariz de porcelana e macerado com auxílio de um bastão. Após a obtenção de um pó congelado, este foi removido para um tubo de 1,7 mL e 300 µL de DNAzol foram acrescentados. Os tubos foram misturados várias vezes por inversão e incubados a 25°C por 5 minutos. Foram adicionados a cada tubo 300 µL de clorofórmio. Procedeu-se a mistura por inversão e a nova incubação (25°C, 5 minutos). Realizou-se uma centrifugação (12.000 g, 10 minutos), o sobrenadante foi transferido para novos tubos e o DNA foi precipitado com a adição de 225 µL de etanol absoluto. Os tubos permaneceram por 5 minutos à temperatura ambiente e depois foram centrifugados (5.000 g, 4 minutos). O sobrenadante foi descartado e uma solução de lavagem (1: 0,75 DNAzol: etanol absoluto) foi adicionada. As amostras foram agitadas em um “vortex” e

incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas (5.000 g, 4 minutos). O sobrenadante foi descartado, adicionaram-se 300 µL de etanol 75% e procedeu-se a uma centrifugação a 5.000 g por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e os resíduos de etanol eliminados, limpando-se a parte interna dos tubos. Para secagem do DNA, os tubos foram mantidos abertos por 15 a 20 minutos. O DNA foi então ressuspendido em TE (70 µL).

3.7.1.2 Método CTAB

A extração do DNA das plantas transgênicas putativas e das matrizes da população FB-100 foi realizada a partir de folhas frescas de plantas adultas. O método CTAB (Murray & Thompson, 1980), com modificações, foi usado por levar à extração de grandes quantidades de ácido nucléico para realizar o “Southern blot”.

De cada planta, foi pulverizado o tecido foliar (2 g) em N líquido e macerado. Ainda no almofariz, para evitar oxidação da amostra, foram adicionados 9 mL de tampão CTAB contendo 10 µL de β-mercaptoetanol (1%), previamente aquecido a 65°C em banho-maria por 5 minutos. A mistura foi coletada com uma espátula e transferida para tubos do tipo “Falcon” (15 mL) que foram mantidos em banho-maria a 65°C por 30 minutos. A cada 5 minutos foi feita uma homogeneização por inversão.

A cada amostra, foram acrescentados 4,5 mL de clorofórmio: octanol (24: 1). Foi feita uma homogeneização por inversão suave dos tubos por 5 minutos, que foram, então, centrifugados a 1.500 g por 10 minutos. O sobrenadante (aproximadamente 4,5 mL) foi retirado com o auxílio de uma micropipeta e colocado em novos tubos (15 mL). Novamente, 4,5 mL de clorofórmio: octanol (24: 1) foram adicionados, e o material foi homogeneizado por inversão por 5 minutos. Procedeu-se à nova centrifugação (1500 g, 10 minutos).

Retirou-se a fração superior (4,5 mL de sobrenadante) que foi transferida para tubos (15 mL) nos quais foram adicionados 6 mL de isopropanol. Os tubos foram invertidos cuidadosamente até o surgimento de um “novelo” de DNA e foram colocados em refrigerador (-20°C) por 30 minutos para favorecer a precipitação. O DNA foi recuperado com um gancho de vidro e limpo em 1 mL de solução de lavagem (etanol 76%; acetato de amônia 10 mM) durante 5 minutos. O “novelo” foi transferido para um tubo (2 mL) contendo 1 mL de tampão TE por 12 h (“overnight”) à temperatura de 4°C.

O DNA dissolvido foi transferido para um tubo (2 mL) contendo 1 mL da solução fenol: clorofórmio (1: 1). As amostras foram invertidas algumas vezes e centrifugadas a 8000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para novos tubos contendo 1 mL de clorofórmio. Inverteram-se as amostras, que foram centrifugadas a 8000 g por 10 minutos. O sobrenadante (aproximadamente 800 µL) foi retirado e transferido para um de 2 mL.

As amostras foram tratadas, nesse ponto, com RNase. Um volume de 2,5 µL de RNase na concentração de 10 mg/mL foi adicionada a cada 100 µL e incubada por uma hora à temperatura ambiente.

O volume de cada amostra (800 µL) foi dividido em dois tubos (2 mL) onde foram adicionados 200 µL de acetato de amônio mais 1,4 mL de etanol absoluto. Os tubos foram invertidos algumas vezes e centrifugados (8000 g, 10 minutos). Descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 500 µL de álcool 70%. As amostras foram novamente centrifugadas (8000 g, 5 minutos). O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e os resíduos eliminados limpando-se a parte interna dos tubos. Para secagem do DNA, os tubos foram mantidos abertos por 15 a 20 minutos. O DNA foi ressuspenso em 250 µL de TE. Os tubos pertencentes a mesma amostra foram somados, totalizando um final de 500 µL de DNA em TE.

3.7.2 PCR

Cada mistura de reação (25 μ L) continha 50 ng de DNA genômico, 10 mM TRIS-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 3,0 mM de $MgCl_2$, 50 μ M de cada dNTP, 1,0 U de Taq polimerase (Invitrogen™) e 0,2 μ M de cada iniciador (item 3.6) específico para o gene *attA*. A mistura foi coberta com óleo mineral esterilizado e submetida à desnaturação (5 minutos a 95°C), seguindo-se 35 ciclos de amplificação (1 minuto a 95°C; 40 segundos a 65°C e 30 segundos a 72°C), e à extensão final (5 minutos a 72°C) em termociclador (MJ Research), gerando um fragmento de 350 pb.

Para maior segurança, as amostras submetidas ao ciclo anterior foram submetidas a nova PCR com o outro par de iniciadores. A composição da reação foi a mesma, contudo o tempo de extensão de cada ciclo passou a ser de 50 segundos, gerando um fragmento de 500 pb.

Na condução dos ciclos de amplificação de DNA via PCR tomou-se o cuidado de incluir uma reação sem DNA molde (branco) e esterilizar as micropipetas sob UV, para evitar contaminação das reações com DNA plasmidial.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v). Às amostras, foram adicionados o corante xileno ficol 0,25% e glicerol 30%. Após a eletroforese, adotou-se o procedimento usual para coloração do gel.

3.7.3 “Southern blot” e hibridização molecular

O “Southern blot” é um procedimento elegante que serve para demonstrar a integração de um transgene no genoma sob análise. Esta técnica consiste das seguintes etapas: (i) o DNA vegetal é extraído das células e hidrolisado com uma ou mais enzimas de restrição; (ii) os produtos da digestão

do DNA são separados por eletroforese em gel de agarose; (iii) o DNA, ainda no gel, é desnaturado, e transferido para uma membrana de náilon e ou nitrocelulose; (iv) o DNA é fixado à membrana por alta temperatura; (v) o DNA é hibridizado contra uma sonda de DNA que possui complementaridade com o transgene. O fragmento contendo o transgene complementar à sonda pode ser visualizado por colorimetria.

Como há sítios de *Bam*HI flanqueando o gene *attA*, o DNA genômico foi hidrolisado com esta enzima, gerando um fragmento de 1050 pb.

A reação de digestão foi realizada em tubos de 1,5 mL contendo 10 µg de DNA, tampão React III, 10 U de *Bam*HI (Invitrogen) para cada µg de DNA genômico, completando o volume de 150 µL com água mQ autoclavada. Para misturar os componentes, foi dado um pulso em centrífuga e a reação foi incubada a 37°C por 16 h em banho-maria. Foram hidrolisadas amostras de DNA de plantas transgênicas putativas e de uma planta matriz, utilizada como controle negativo. Também foi digerido o plasmídeo pCatt3300, usado como controle positivo.

Procedeu-se à precipitação do DNA por adição de 15 µL de acetato de amônia e 375 µL de etanol absoluto. Os tubos foram invertidos algumas vezes e incubados (-20°C, 24 h). As amostras foram centrifugadas (8000 g, 40 minutos) a 4°C, o sobrenadante descartado e foram adicionados 600 µL de etanol 70%. Procedeu-se nova centrifugação (8000 g, 20 minutos) a 4°C. Para a secagem do DNA, os tubos foram mantidos abertos por 1 h e o DNA ressuspendido em 50 µL de TE.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%) em TBE 0,5 X. Depois de completada a polimerização, o gel foi coberto com TBE 0,5 X contendo brometo de etídeo (10 mg/mL). Antes de carregar o gel, foram acrescentados 8 µL de sacarose 40% às amostras (50 µL). Como controle positivo, foram misturados 100 pg de pCatt3300 a 2 µL de sacarose 40% e 6 µL de água mQ. Como marcador de peso molecular, foi usado DNA do

fago λ digerido com *Hind*III. Após a corrida (1,15 V/cm, 20 h), o gel foi fotografado (GelDoc - Bio Rad).

O gel foi lavado com soluções para depuração (HCl 0,25M, 10 minutos), desnaturação (NaCl 1,5M, NaOH 0,5M, 30 minutos) e neutralização (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M, duas vezes, por 15 minutos), sob movimentação leve em um agitador horizontal.

Para a transferência do DNA para a membrana, foram utilizadas uma bandeja (24 x 30 cm) e duas placas de acrílico (Gibco™). Foram adicionados 500 mL da solução SSC 20 X (NaCl 3M, Na Citrato 0,3M) na bandeja. Foi confeccionada uma ponte de papel de filtro da mesma largura do gel posicionada sobre uma das placas de acrílico. Sobre a ponte, foi colocada uma folha de papel de cromatografia e, sobre ela, o gel com a face que contém os poços, voltada para baixo. O gel teve suas canaletas cortadas com um bisturi. Sobre o gel, foi colocada a membrana de nitrocelulose, previamente molhada em SSC 2 X, seguida de duas folhas de papel de cromatografia molhadas em SSC 2 X e 6 cm de papel toalha. Foi colocada a outra placa de acrílico e sobre esta um peso de 500 g. A transferência se deu por capilaridade em 20 h.

A membrana foi retirada do "blot" com o auxílio de pinças, colocada entre duas folhas de papel de cromatografia, embrulhada em papel alumínio e mantida em estufa a 80°C por 2 h. O gel foi corado e visualizado em um transiluminador de UV para confirmar se houve a transferência. Após esfriar por 15 minutos, a membrana foi colocada dentro de uma garrafa e umedecida com 50 ml de SSC 5X. A garrafa foi levada ao forno de hibridização onde permaneceu por 1 h a 60°C, sob agitação lenta. A solução SSC 5 X foi retirada por inversão e adicionou-se a solução de hibridização. A garrafa foi levada ao forno onde permaneceu por 2 h a 60°C (pré-hibridização).

Procedeu-se a marcação da sonda usando o Kit "Gene images random prime labelling module" (Amersham Pharmacia Biotech™). A sonda (20 ng em 25 μ L de água mili-Q) foi desnaturada por 7 minutos a 98°C e mantida em gelo. A ela foram acrescentados 9 μ L de água mQ, 10 μ L do mix de dNTP, 5 μ L de

iniciadores específicos e 1 μ L da enzima Klenow, totalizando um volume de 50 μ L. A mistura foi invertida algumas vezes, depois passou por um pulso de centrifuga e foi incubada a 37°C por 1 hora, para a construção da nova fita marcada com fluoresceína. Após este período, foi adicionado 1 μ L de EDTA 0,5 mM e a sonda foi armazenada, protegida da luz, a -20°C.

Procedeu-se nova desnaturação da sonda (50 μ L) a 98°C por 7 minutos. Retirou-se a garrafa do forno, verteu-se a solução em um tubo "Falcon" (50 mL) e foram adicionados 50 μ L de sonda na solução de hibridização, invertendo o tubo várias vezes. Retornou-se a solução de hibridização à garrafa contendo a membrana que foi colocada no forno, onde permaneceu por 16 h a 60°C. Depois procedeu-se a duas lavagens da membrana com as soluções SSC 1 X e SSC 0,5 X por 15 minutos a 60°C. A garrafa foi esfriada por 15 minutos à temperatura ambiente. Foram então adicionados 50 mL do tampão na garrafa mais o agente bloqueador (Kit de detecção "Gene images CDP – star detection module", Amersham Pharmacia BiotechTM). A garrafa permaneceu por 1 h no forno e, após esta etapa, o líquido foi vertido. Adicionaram-se 30 mL do tampão A com o anticorpo (30 mL de tampão A; 0,15 g de albumina bovina; 6 μ L de fluoresceína) e a garrafa permaneceu no forno por 2 h sob rotação leve. Em seguida, o excesso de anticorpo foi retirado por meio de três lavagens com o tampão A + Tween 20. A membrana foi retirada da garrafa e, no fluxo laminar, foi colocada sobre um papel de filtro entre duas folhas de plástico, removendo-se o tampão A com papel absorvente. A folha plástica foi retirada, e com o auxílio de uma pipeta, foi espalhado sobre a membrana 1,5 mL da solução de detecção, previamente filtrada Millipore (0,22 μ m). Foi recolocada a folha plástica e homogenizou-se a solução de detecção por toda a superfície da membrana com o auxílio de um bastão de vidro. A membrana entre as folhas plásticas foi selada com uma prensa e colocada dentro de um cassete. Na câmara escura, colocou-se a chapa fotográfica sobre a membrana e o cassete permaneceu fechado por 10 minutos. Dependendo da intensidade do sinal, uma

nova chapa foi utilizada por um período de tempo maior ou menor que 10 minutos. A chapa fotográfica foi imersa em uma solução reveladora (4 minutos), em água (1 minuto), depois em uma solução fixadora (15 minutos) e, finalmente, em água (15 minutos). Por fim, esperou-se a chapa fotográfica secar a temperatura ambiente.

3.8 Análise da expressão do transgene

3.8.1 Extração de RNA total

As plantas cuja integração do transgene foi confirmada por hibridização molecular foram analisadas quanto à expressão do mRNA do gene *attA*. Foi feita a esterilização de todo o material empregado para livrá-lo de RNases: a vidraria foi mantida em estufa a 180°C por 16 h; o material plástico foi esterilizado por submersão em uma solução de NaOH 0,5 M por 10 minutos e posterior lavagem com água autoclavada por 20 minutos a 120°C.

Um kit (TrizolR) para a extração de RNA (Invitrogen) foi utilizado. De cada planta, o tecido foliar (0,1 g) foi pulverizado em N líquido e macerado. O pó congelado foi transferido para um tubo (1,7 mL) contendo 1 mL do reagente Trizol. As amostras permaneceram por 5 minutos à temperatura ambiente. Acrescentou-se clorofórmio (0,2 mL), os tubos foram invertidos várias vezes e incubados a temperatura ambiente por 3 minutos. Após a centrifugação (12.000 g, 4°C, 15 minutos), o sobrenadante foi transferido para outro tubo no qual foi adicionado 0,5 mL de isopropanol. As amostras permaneceram à temperatura ambiente (10 minutos) e depois foram centrifugadas (12.000 g, 4°C, 10 minutos). O sobrenadante foi descartado e o "pellet" foi lavado com 1 mL de etanol 75%. O tubo foi invertido algumas vezes e depois centrifugado (7.500 g, 4°C, 5 minutos). O sobrenadante foi descartado, o "pellet" foi seco por 30 minutos e ressuspendido em 30 µL de água livre de RNases. O RNA foi

dissolvido a 55°C por 10 minutos. As amostras foram diluídas 200 vezes e quantificadas em espectrofotômetro (260 nm).

Para a análise da qualidade do RNA extraído, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo formaldeído, uma condição desnaturante. Para a preparação do gel, 1,2g de agarose foram dissolvidas a alta temperatura em tampão FA 10x (200 mM MOPS, 50 mM acetato de sódio, 10mM EDTA, pH 7,0). Após um leve resfriamento da solução, foram adicionados 1,8 mL de formaldeído 37% e 1 µL de brometo de etídio 10 mg/mL. Anteriormente à aplicação das amostras no gel, este foi equilibrado em tampão FA 1x por 30 minutos.

Para serem submetidas à eletroforese, as amostras sofreram o seguinte tratamento: 2 µL de RNA foi misturado a 10 µL de tampão de carregamento 5x (16 µL de solução de azul de bromofenol saturada, 80 µL de EDTA 500 mM, 720 µL de formaldeído 37%, 2 mL de glicerol 100%, 3,1 mL de formamida, 4 mL de tampão FA 10x, para 10 mL de solução). Esta mistura foi incubada por 5 minutos a 65°C e, em seguida, resfriada em gelo. Após este tratamento, as amostras foram aplicadas no gel e procedeu-se à eletroforese em tampão de corrida FA 1x a 7 V/cm por 1 hora. Após este período, o gel foi visualizado em luz UV e devidamente documentado.

3.8.2 RT – PCR

A técnica da RT-PCR (“Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction”) é dividida em duas etapas. Na primeira, ocorre a síntese de uma cadeia de cDNA a partir de RNA pela ação da enzima transcriptase reversa. Em seguida, procede-se à reação de PCR padrão utilizando-se iniciadores específicos para o mRNA de interesse.

Foi utilizado o kit “SuperScriptTM III Reverse Transcriptase” (Invitrogen). O protocolo, aqui modificado, iniciou-se com a adição, em um tubo livre de RNases, de 1µL de Oligo (dT), 4 µg de RNA total (2 µL) e 1 µL de dNTP mix

(10mM). Esta mistura foi então incubada a 65°C por 5 minutos. Após este período, o tubo foi colocado rapidamente no gelo e, em seguida, sofreu uma centrifugação rápida. Adicionaram-se 4 µL do tampão 5X "First strand", 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL de *RNAse out*. Esta mistura foi gentilmente misturada com uma pipeta e incubada (42°C, 2 minutos). Em seguida, adicionou-se 1 µL da enzima transcriptase reversa ("SuperscriptII™"), procedendo-se a homogeneização e incubação (42°C, 50 minutos). O tubo foi armazenado a – 20°C.

Cada mistura de reação (25 µL) de PCR continha 2,0 µL de cDNA, 10 mM TRIS-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 30 mM de MgCl₂, 4 mM de cada dNTP, 1,5 U de Taq polimerase (Invitrogen™) e 0,2 µM do par de iniciadores, específico para o gene *attA*. A mistura foi coberta com óleo mineral esterilizado e submetida à desnaturação (5 minutos, 95°C) seguida de 35 ciclos de amplificação (1 minuto a 95°C; 1 minuto a 50°C e 1 minuto a 72°C) e à extensão final (7 minutos a 72°C) em termociclador (MJ Research), que gera um fragmento de 300 pb. Utilizaram-se como controles o cDNA de maracujá não transgênico, controle negativo, e RNA extraído de maracujá transgênico, com o objetivo de detectar uma possível contaminação com DNA durante a extração de RNA.

Após a PCR, procedeu-se à eletroforese das amostras em gel 1% e a quantificação. A intensidade do campo elétrico foi de 4,0 V/cm. Cada poço continha 8 µl de azul de bromofenol contendo xileno ficol 0,25% e glicerol 30% mais 3 µl do marcador λ ou 25 µl das amostras. Os géis foram corados e visualizados, como é usual.

3.9 Aclimação e estaqueamento das plantas transgênicas putativas e matrizes FB-100

As plantas transgênicas putativas e as matrizes, mantidas *in vitro*, foram aclimatadas em telado com alta umidade. A ausência deste período de aclimação leva a planta à morte por desidratação em menos de um dia.

Retiraram-se as plantas dos frascos e suas raízes foram lavadas com água para remoção do meio de cultura. Foram cultivadas em copos plásticos descartáveis contendo o substrato Plantmax. Com o objetivo de formar uma câmara úmida, sacos plásticos perfurados, na parte inferior, foram molhados e colocados sobre os copos. As plantas e os sacos plásticos foram molhados diariamente, durante uma semana. Com as plantas já adaptadas às novas condições ambientais, retiraram-se os sacos plásticos.

Depois de 30 dias em copos, as plantas foram transferidas para sacos plásticos (1 L) contendo Plantmax e terra (1: 1). Estas foram mantidas em estufa de vidro onde foram adubadas quinzenalmente com 200 mL de uma solução (3 g/L) do adubo comercial Ouro Verde (EPPQ^R). Estas condições favorecem o desenvolvimento vegetativo do maracujazeiro, o que propicia a prática da estaquia. É importante ressaltar que a estufa possui as características recomendadas para manter organismos geneticamente modificados, conforme recomendação da Comissão Técnica de Biossegurança.

Estacas para propagação dos maracujás foram obtidas de caules maduros com pelo menos três nós. A parte superior do caule foi seccionada por tesoura de poda com 1 cm acima da última gema, e a parte inferior, em bisel. Foram mantidos 30% do limbo da folha superior da estaca.

As estacas foram acondicionadas em copos plásticos (300 mL), previamente perfurados na base para a drenagem do substrato Plantmax. As estacas foram irrigadas diariamente e mantidas em ambiente com alta umidade relativa, ou seja, maior que 65%. Com 30 dias, as estacas foram transferidas

para sacos plásticos (1 L) contendo Plantmax: terra (1: 1). Foram mantidas em estufa de vidro e adubadas quinzenalmente.

3.10 Ensaio com o herbicida glufosinato de amônio para seleção *in vivo*

3.10.1 Otimização da dose ideal de pulverização do herbicida

Para a determinação da dosagem correta para a seleção de plantas transgênicas *in vivo*, por meio da pulverização com o herbicida Finale, foram feitos dois ensaios: no primeiro, foram avaliadas dosagens de 0,0 a 2,25 L/ha; no segundo experimento, foram avaliadas dosagens de 0,0 a 1,45 L/ha. Estes experimentos tinham como objetivo determinar a dosagem ideal de pulverização visando à discriminação das plantas transgênicas de escapes, que por ventura, teriam sobrevivido à seleção *in vitro*. A escolha da amplitude de variação das diferentes dosagens foi feita baseada na recomendação comercial do fabricante para outras culturas, já que não existe este tipo de informação para o maracujazeiro.

Os ensaios foram conduzidos no Departamento de Horticultura da ESALQ/USP, onde há uma câmara de pulverização apropriada para experimentos com herbicidas (Figura 5). Esta câmara de pulverização permite manter constante a velocidade de aplicação e a pressão de pulverização da calda. Isto evita que variações devido à aplicação do herbicida possam mascarar os resultados oriundos de diferentes tratamentos.

Foi realizada a calibração da câmara de pulverização e assim determinado o volume de calda que estava sendo aplicada sob pressão de 40 libras a uma velocidade constante implementada pela câmara. Em um recipiente de área conhecida, coletou-se o volume de calda aplicada ao longo de 30 passadas com dois tipos de bico pulverizador. Este volume foi dividido pelo número de passadas e pela área do recipiente de coleta da calda. Com isso, determinou-se o volume de calda aplicado em L/ha após uma passada

com bicos de diferentes diâmetros. O bico tipo 11002 foi escolhido por apresentar um volume da calda pulverizada de 300 L/ha, que é usual nesses procedimentos.

Figura 5 - Câmara de pulverização contendo plantas de maracujá para a instalação do experimento com o herbicida Finale

Com a câmara devidamente calibrada, iniciou-se a pulverização dos tratamentos. As repetições foram dispostas na câmara, pulverizadas e retiradas a cada tratamento. Obviamente, a pulverização teve início pelas dosagens mais baixas. Após a pulverização da última dosagem, as plantas foram trazidas para o Departamento de Genética, onde permaneceram dentro da estufa própria para o cultivo de transgênicos. As avaliações visuais dos sintomas foram realizadas diariamente segundo um critério de notas (Tabela 3).

Tabela 3. Escala de avaliação visual de fitotoxicidade de herbicidas sobre plantas, proposta pelo EWRC ("European Weed Research Council")

Nota	Sintoma
1	Ausente
2	Muito leve
3	Leve
4	Moderado
5	Forte
6	Muito forte (queda de folhas)
7	Morte
8	Morte aos 10 dias
9	Morte aos 6 dias

O primeiro ensaio foi composto por dez tratamentos: 0,0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0 e 2,25 L/ha. Cada tratamento foi composto por 10 repetições (população FB-100), totalizando 100 plantas.

Um segundo ensaio visando à determinação da dosagem ótima tornou-se necessário. Foram testadas as dosagens 0,0; 0,55; 0,7; 0,85; 1,0; 1,15; 1,30 e 1,45 L/ha de fosfinotricina. Cada tratamento foi composto por 10 repetições (população FB-100), num total de 80 plantas. Procedeu-se o mesmo critério de avaliação dos sintomas provocados pelo herbicida.

3.10.2 Otimização da dose ideal de pincelamento do herbicida

Um outro procedimento empregado para o "screening" de plantas transgênicas *in vivo* foi realizado pelo pincelamento do herbicida Finale nas plantas candidatas. Esta metodologia baseia-se no mecanismo de ação do herbicida, do tipo contato, o qual é responsável por causar sintomas apenas

nos sítios de aplicação. Devido a isso, pode-se submeter uma planta transgênica putativa à ação do herbicida sem, no entanto, correr o risco de provocar danos ou matá-la.

Foram realizados dois ensaios. No primeiro, foram avaliadas soluções contendo 0,0 a 1,2% de herbicida. No segundo, a concentração das soluções variou 0,0 a 0,3%. A escolha da amplitude de variação das diferentes dosagens (tratamentos) foi feita seguindo-se recomendação dos pesquisadores Dr. Giovanni Vianna (Embrapa, Cenargen) e Dr. André Abreu (Bayer CropScience) que têm aplicado esta metodologia para a seleção de plantas de soja transgênicas.

Utilizaram-se plantas matrizes da população FB-100 para se estabelecer a curva de morte ao herbicida. Três folhas do terço médio de cada planta dos diferentes tratamentos foram marcadas com caneta de retroprojeto de maneira transversal. Em cada folha, foram traçadas duas retas paralelas com 2 cm de distância, visando delimitar a área de aplicação. O herbicida foi aplicado com cotonete para espalhar a solução pelo limbo (Figura 6). As avaliações foram realizadas diariamente pela atribuição de notas (Tabela 4).

Os dois ensaios foram realizados em estufa de vidro e cada tratamento foi composto por três plantas, cada uma com três folhas pinceladas. O primeiro ensaio foi composto por 13 tratamentos, sendo eles: 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1 e 1,2% de herbicida; no segundo ensaio, foram adotados os seguintes tratamentos: 0,0; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125; 0,15; 0,175; 0,2; 0,225; 0,25; 0,275; 0,3% de herbicida.

Tabela 4. Escala de avaliação visual de fitotoxicidade de herbicidas sobre plantas, proposta pelo EWRC (“European Weed Research Council”)

Nota		Sintoma
1		Ausente
2		Leve
3		Moderado
4		Forte
5		Necrose foliar
6		Muito forte (queda de <50% das folhas)
7		Muito forte (queda de >50% das folhas)
8		Morte

Figura 6 – Aplicação do herbicida por pincelamento das folhas

3.11 Coleta e isolamento dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* a campo

Devido à necessidade de se coletar isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, foi realizada uma viagem técnica a uma região produtora de maracujá no interior do Estado de São Paulo. Esta viagem, também tinha por objetivo permitir o conhecimento dos sistemas atuais de produção (plantio, estrutura dos pomares, tratos culturais etc) e a situação dos produtores da região (problemas fitossanitários, comercialização da produção, perspectivas).

A viagem foi organizada pelo contato com engenheiros agrônomos da CATI das diferentes cidades visitadas e se iniciou em 26 de fevereiro de 2004. Neste dia, a AFRUVEC (Associação dos Fruticultores da Região de Vera Cruz) foi visitada, além de duas propriedades. Na cidade de Garça, foram visitadas mais duas propriedades. A visita continuou na cidade de Dracena, extremo Oeste do estado de São Paulo. Em 27 de fevereiro, foi visitada a cidade de Adamantina, onde mais quatro propriedades produtoras de maracujá foram vistas.

Folhas de maracujá, apresentando sintomas típicos da bacteriose do maracujazeiro, foram coletadas nas diferentes propriedades visitadas. As folhas foram destacadas na altura do pecíolo com tesoura previamente esterilizada com álcool 70% e armazenadas em sacos plásticos individuais dentro de uma câmara fria (isopor com gelo). No total, foram coletadas 47 folhas.

As folhas com sintomas de bacteriose, tecidos necrosados circundados por áreas cloróticas, foram cortadas em três a quatro pedaços, tendo-se a preocupação de manter a área clorótica. O conjunto de cada folha foi colocado em placas de petri contendo álcool 70% durante 2 minutos para esterilizar a parte externa do limbo foliar. Os pedaços foram retirados do álcool e transferidos para outra placa contendo hipoclorito de sódio (1,0%) por 1,5

minutos. Foram então transferidos para outra placa contendo água mQ autoclavada, permanecendo por 10 segundos para retirar o excesso do hipoclorito. Aos pedaços de folha foi adicionada água mQ autoclavada e estes foram macerados com uma alça de platina. A liberação de um exsudado de coloração branca foi observada. Este exsudado foi riscado em uma placa descartável, contendo meio NA (peptona, extrato de carne e ágar), com a ajuda da alça. As placas foram incubadas a 28°C por 36 h.

Colônias típicas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* são usualmente caracterizadas por serem lisas, mucóides, brilhantes e de coloração amarela intensa. Após 24 a 48 h, as placas foram examinadas à procura de colônias de *Xanthomonas* as quais foram selecionadas e subcultivadas a 28°C. Este processo foi repetido até que placas contendo apenas colônias isoladas de *Xanthomonas* fossem obtidas.

Os isolados foram mantidos em freezer -80°C. Para isso, colônias isoladas foram retiradas com a ajuda de palitos e inoculadas em tubos contendo 3 mL de NA. Os tubos permaneceram de 24 a 36 h sob agitação (180 rpm) a 28°C. Depois de constatado o crescimento de cada isolado, o volume de 500 µL de glicerol 50% foi misturado a 500 µL da solução bacteriana em tubos (1,7mL) que foram submersos em N líquido por 10 segundos e depois transferidos para o freezer -80°C. Foram preparados cinco tubos de cada isolado.

3.12 Bioensaios

Dois bioensaios foram realizados com os isolados coletados na viagem técnica ao interior de São Paulo e outros provenientes do triângulo mineiro, cedidos pelo Dr. Mario Machaim Franco (Universidade Federal de Uberlândia). Avaliou-se a patogenicidade em três populações de maracujá: Sul Brasil, FB-100 e FB-200. O objetivo destes dois bioensaios era distinguir os dois isolados mais agressivos para posterior infecção das plantas transgênicas.

Outros dois bioensaios envolvendo as plantas transgênicas e as matrizes da população FB-100 foram conduzidos. Objetivou-se determinar e quantificar os níveis de resistência obtidos com a inserção do gene *attA* no genoma das plantas de maracujá por comparação com a respectiva planta doadora. Nestes bioensaios, foram usadas plantas “Southern blot” positivas.

3.12.1 Obtenção das mudas FB-100, FB-200 e Sul Brasil e inoculação com *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

Mudas das populações FB-100 e FB-200 foram obtidas por germinação de sementes em sacos plásticos de 1 L. O substrato foi composto de Plantmax: terra (1: 1). Com a idade de 45 dias, as mudas das duas populações foram levadas para a estufa de vidro, onde as condições ambientais (temperaturas mais altas) são favoráveis. As mudas da terceira população constituinte do bioensaio, população Sul Brasil, já encontravam-se na estufa. Estas foram obtidas por estaqueamento. Por ocasião da entrada das populações FB-100 e FB-200 na estufa, todas as plantas sofreram uma poda para padronizar o desenvolvimento da parte aérea para a inoculação bacteriana. Estas plantas foram tutoradas, conduzidas e adubadas quinzenalmente como usual.

As inoculações foram realizadas em casa de vegetação revestida com plástico para manter as condições favoráveis de umidade e temperatura ao desenvolvimento da bactéria (Figura 7). O método empregado foi o de corte com tesoura previamente imersa em suspensão bacteriana (Lopes, 2003), sendo o corte padronizado em 3 cm.

Com o auxílio de um palito, foi coletada parte de uma colônia do isolado de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. O palito foi imerso em 200 mL de NA onde as células foram mantidas a 28°C, sob agitação de 180 rpm, por 36 h (Figura 8). Um frasco contendo apenas NA foi incubado sob as mesmas condições para leitura “em branco” no espectrofotômetro. A suspensão bacteriana foi calibrada

(OD₆₀₀) na concentração de 0,3 que corresponde a aproximadamente 10⁸ unidades formadoras de colônia por mL.

Os experimentos foram realizados em blocos casualizados com três repetições. Cada parcela foi representada por uma planta no bioensaio I e duas plantas no bioensaio II, das quais foram inoculadas três folhas. Todas as folhas inoculadas foram identificadas por etiquetas colantes fixadas nos pecíolos (Figura 9). Vinte dias após a inoculação, foi feita a avaliação da área foliar lesionada. As folhas inoculadas foram coletadas e mantidas entre duas folhas de papel sulfite. Estas folhas foram escaneadas e tiveram a área foliar determinada com o auxílio do “software” QUANT (Vale, 2001). Os dados gerados foram analisados pelo “software” SAS.

Figura 7 – Estufa de inoculação mantida sob alta umidade

Figura 8 – Aspecto da cultura do isolado 89 de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* 40 h após a inoculação (à esquerda) e do controle negativo (à direita)

Figura 9 – Aspecto e identificação das folhas de maracujá inoculadas com *X. axonopodis* pv. *passiflorae*

3.12.2 Bioensaio com folhas destacadas de plantas transgênicas

Cada parcela do ensaio foi composta por uma folha da planta transgênica “Southern” positiva e uma folha da respectiva matriz, dispostas uma ao lado da outra em placas de petri (14 cm de diâmetro). No pecíolo de cada folha, foi colocado um chumaço de algodão umedecido com água esterilizada simulando a manutenção de uma câmara. O ensaio foi composto de oito tratamentos, cada um com três repetições.

A inoculação das folhas destacadas seguiu o mesmo protocolo descrito no item anterior, com exceção da concentração e composição da suspensão bacteriana. A suspensão bacteriana foi composta pela mistura dos isolados 89, 92 e AP01 e a concentração utilizada foi 0,2 (OD_{600}). Após dez dias de inoculação, as folhas foram escaneadas e tiveram a área total e foliar quantificada pelo “software” QUANT. Os dados obtidos foram analisados com a ajuda do “software” SAS.

3.12.3 Bioensaio com as plantas transgênicas e matrizes

Um terceiro bioensaio visando à quantificação dos níveis de resistência obtidos com a inserção do gene *attA* no genoma do maracujá foi realizado em estufa de inoculação do Departamento de Genética da ESALQ. Este bioensaio foi composto por 16 plantas, sendo oito “Southern” positivas e oito plantas matrizes.

Quatro folhas por planta foram inoculadas com uma suspensão bacteriana composta pelos isolados 89, 92 e AP01. A concentração desta suspensão bacteriana foi a mesma utilizada no item 3.12.1. Após 18 dias de inoculação, as folhas foram coletadas, escaneadas e tiveram a área total e foliar quantificada como descrito.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Material vegetal

Os procedimentos de desinfecção e germinação das sementes de maracujá (FB-100) foram eficientes para a obtenção de plantas axênicas. A porcentagem de germinação foi da ordem de $80 \pm 3\%$ e as contaminações do meio de cultura permaneceram inferiores a 5%. Foi obtida uma população de 150 indivíduos, a qual foi clonada mensalmente por estaquia visando obter material vegetal suficiente para otimização dos protocolos de organogênese e de seleção de transformantes na presença do herbicida. Também, outra coleção de 350 plântulas foi cultivada *in vitro* a fim de fornecer discos foliares para os ensaios de biobalística. Esta foi constantemente renovada para que os explantes utilizados possuissem um alto potencial organogênico, aumentando assim a eficiência da técnica de transformação via biobalística.

4.2 Explantes vegetais e condições de cultura

A eficiência na regeneração dos explantes interfere substancialmente na obtenção de transformantes primários. Assim, é de fundamental importância determinar a composição ideal do meio de cultura para a regeneração de brotos transgênicos. Os resultados do primeiro experimento mostraram não haver diferenças significativas entre as doses 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹ de BA ($P > 0,95$), e uma clara superioridade da posição abaxial sobre a adaxial. A partir de um

segundo experimento, no qual se variou a dosagem do fitorregulador e aumentou-se o número de repetições, determinou-se que a dosagem de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ é a que favorece as melhores respostas organogênicas da população FB-100. Esta dosagem apresentou a maior taxa de morfogênese ($76 \pm 13,4\%$) e a menor porcentagem de clorose ($10 \pm 13,4\%$) dos explantes (Figura 10).

Figura 10 - Efeito das dosagens de BA (mg.L^{-1}) sobre o desenvolvimento *in vitro* de explantes de maracujá amarelo. Ambas avaliações aos 45 dias de cultura. Barras vermelhas: desvio padrão

Na dosagem de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BA, a organogênese teve início após cinco a seis dias na borda do disco foliar, com formação de estruturas diferenciadas (protuberâncias). Aos dez dias, ocorreu a proliferação acentuada dessas estruturas e, eventualmente, observaram-se pequenos brotos originados via organogênese direta segundo critérios definidos por Fernando et al (2004). A resposta iniciou-se, principalmente, na nervura central e estendeu-se por toda a borda do disco.

Esses brotos podiam ser visualizados a partir do 25º dia de cultura e podiam ocorrer em número maior que um por disco foliar (Figura 11).

Figura 11 – Processo de organogênese direta em maracujá; (A) discos recém isolados; (B) e (C) cultura aos 30 dias; (D) detalhe da formação de broto aos 25 dias

A otimização do protocolo de regeneração de brotos a partir de discos foliares para a população FB-100 foi de fundamental importância para a execução dos demais experimentos. Sendo assim, o meio MS contendo BA ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), água de coco (5 %), solidificado com ágar, denominado MSB(A), foi aplicado nos ensaios subseqüentes de otimização da dosagem ideal de glufosinato de amônio para a seleção de brotos transgênicos e nos ensaios de biobalística.

4.3 Otimização da dosagem de fosfinotricina para a seleção *in vitro* de brotos transgênicos

4.3.1 Primeiro ensaio

No primeiro ensaio, aos sete dias de cultura, foi observada expansão foliar apenas nos tratamentos de 0,0 e 0,25 mg.L⁻¹. Nos demais tratamentos, 5,0; 7,5 e 10,0 mg.L⁻¹, foram observados pontos necróticos distribuídos aleatoriamente por todo o disco foliar. Aos 14 dias de cultura, foi observada uma grande diferença entre a dosagem zero e os demais tratamentos com relação à expansão e à coloração dos discos foliares. Já no tratamento de 2,5 mg.L⁻¹ observou-se clorose acentuada na maioria dos discos e paralisação do desenvolvimento. A despigmentação tornou-se mais intensa quanto maior a dosagem, atingindo áreas maiores, não pontos, tornando a área translúcida. A partir do tratamento 5,0 mg.L⁻¹, as bordas foliares mostraram-se necrosadas por completo, expandindo-se para a parte interior dos explantes. Na terceira avaliação, aos 21 dias, não foi observada qualquer expansão foliar além das anotadas para a dosagem zero e para o tratamento 2,5 mg.L⁻¹. O tratamento controle mostrou continuidade na expansão foliar e formação de gemas nas bordas dos discos. Com exceção do controle, nenhum disco foliar apresentou pigmentação verde, ou seja, todos os tecidos foliares morreram.

4.3.2 Segundo ensaio

Na primeira avaliação foram observadas poucas diferenças entre os tratamentos, que mostraram, sem exceções, expansão foliar. Aos 14 dias de cultura, houve efeito do herbicida em doses superiores a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, causando paralisação no desenvolvimento dos discos (Figura 12). Das dosagens que permitiram expansão foliar, o controle se destacou-se em relação a $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ e esta em relação a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. A clorose dos explantes já foi percebida a partir da dosagem de $0,75 \text{ mg.L}^{-1}$. Efeitos drásticos foram notados a partir da dosagem $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Observou-se necrose nas bordas e pontos necróticos aleatórios por todos discos foliares. Aos 21 dias de cultura, houve expansão e desenvolvimento de brotos a partir da nervura central dos discos do controle. Sintomas de clorose foram vistos a partir do tratamento $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$, porém bastante acentuados a partir da dose de $0,75 \text{ mg.L}^{-1}$. Raros foram os discos que apresentavam alguma pigmentação verde a partir da dosagem $1,25 \text{ mg.L}^{-1}$. A clorose tomou todo o limbo foliar ou se manifestou através de formações de mosaicos. Em dosagens superiores a $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$, observaram-se sintomas de encarquilhamento ou engruvinhamento dos discos. A partir desta avaliação, percebeu-se a necessidade de um terceiro ensaio que permitisse investigar a dosagem mais apropriada (entre $0,0$ e $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$) para a seleção de brotos transgênicos.

Figura 12 – Resposta de discos floiares de maracujá aos tratamentos com fosfinotricina: expansão do explante sob $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ (A) e níveis de clorose sob $0,3$ (B); $0,4$ (C); $0,5$ (D) e $0,6$ (E) mg.L^{-1}

4.3.3 Terceiro ensaio

Diferenças significativas entre os tratamentos só foram observadas a partir da segunda avaliação, aos 14 dias (Figura 13 e 14). Observou-se uma expansão uniforme até a dosagem de $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ e um padrão de coloração verde escuro. Como esperado, conforme o aumento da dose, menor a expansão e menor a intensidade da coloração verde de cada disco. A partir de $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ 70% dos discos mostraram pontos necróticos distribuídos aleatoriamente pelo limbo foliar. Na terceira avaliação, cerca de 50% dos discos do tratamento controle possuíam brotos se desenvolvendo a partir da região da nervura central. Nas dosagens de $0,1$ e $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ observou-se expansão dos discos, porém sem a presença de estruturas de regeneração. Foi notada clorose em todos os tratamentos, com exceção do controle. Na dose de $0,1$

mg.L⁻¹, cerca de 30% dos discos se mostravam com mais de 50% de suas áreas em estado clorótico. Na dosagem 0,3 mg.L⁻¹, 60% dos explantes foram considerados cloróticos (Figura 15).

Aos 28 dias de cultura, observou-se um incremento na porcentagem de explantes em estado clorótico, principalmente em dosagens superiores a 0,3 mg.L⁻¹ (Figura 14). Nos tratamentos 0,1 e 0,2 mg.L⁻¹, percebeu-se o efeito do herbicida na inibição da organogênese; nestes tratamentos, havia clorose em 50% dos discos. Já no controle, foi observado uma continuação do processo de organogênese, resultando em brotos. Nas figuras apresentadas a seguir, nota-se uma diminuição contínua do número de discos expandidos e um incremento das taxas de clorose conforme o aumento da dose do herbicida.

Figura 13 – Expansão de discos foliares de maracujá cultivados *in vitro* na presença do herbicida Finale. Dados tomados aos sete dias de cultura. As barras em vermelho indicam o desvio padrão

Figura 14 – Expansão e manifestação clorótica de discos foliares de maracujá cultivados *in vitro* na presença do herbicida Finale. Dados coletados aos 14 (acima), 21(no meio) e 28 (embaixo) dias de cultura. Barras vermelhas indicam desvio padrão

Figura 15 - Discos foliares de maracujá cultivados em MSB(A) contendo dosagens de glufosinato de amônio: 0,0 (A); 0,1 (B); 0,2 (C); 0,3 (D); 0,4 (E); 0,5 (F) mg.L⁻¹. Dados tomados aos 21 dias de cultura

Os três ensaios visando à otimização da dosagem adequada para a seleção de brotos transgênicos putativos mostraram a eficiência do herbicida glufosinato de amônio na inibição da regeneração de parte aérea já na dosagem de 0,1 mg.L⁻¹. Baixa concentração de glufosinato de amônio também foi utilizada no trabalho de Sripaoraya et al (2001), no qual foram obtidas plantas transgênicas de abacaxi (*Ananas comosus*) resistentes. Ápices foliares jovens foram selecionados em meio contendo de 0,5 a 2,0 mg.L⁻¹ desse agente seletivo.

A eficiência de seleção com glufosinato de amônio é bastante prejudicada quando explantes globosos, compostos por um grande conjunto de células, tipo embriões, calos, são utilizados. Há a necessidade de que dosagens mais agressivas sejam empregadas para a seleção deste tipo de explante, fato este provocado pelo tipo de ação do herbicida (contato). Girgi et

al (2002), utilizaram a dosagem de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ para a seleção de embriões transgênicos de milho (*Pennisetum glaucum* L.). Os embriões permaneceram por cinco meses e meio sob seleção, as plântulas foram aclimatadas e depois pulverizadas com uma solução de 200 mg.L^{-1} do herbicida. Também, plantas transgênicas resistentes foram regeneradas de embriões zigóticos de cultivares elite de trigo. O meio seletivo continha glufosinato de amônio nas doses de 2,0; 3,0 e $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (Rasco-Gauntet al., 2001). Neste trabalho, os autores, através da técnica da PCR, determinaram a eficiência de seleção de plantas transgênicas pelo herbicida. A taxa de escape foi 83,6 % sob seleção com $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$, 57,7 % com $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e de 35,3 % quando se empregou a dosagem de $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$.

Calos embriogênicos de *Leymus chinensis* foram usados para a obtenção de plantas transgênicas que foram transformadas com o gene *bar* e depois selecionadas em meio contendo 1,0 a $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de glufosinato de amônio (Shu et al., 2005). Já na dosagem de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$, uma taxa altíssima de morte foi observada. Quando utilizada a dosagem de $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ houve morte de 100 % dos calos. Estes autores passaram a utilizar a dosagem de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ nos ensaios subseqüentes e, assim, cinco plantas transgênicas, confirmadas pela técnica "Southern blot", foram obtidas.

O quadro apresentado a seguir mostra que doses mais agressivas de glufosinato de amônio têm sido utilizadas para seleção de explantes embriogênicos (Tabela 5).

Tabela 5. Sumário de trabalhos que utilizaram o herbicida glufosinato de amônio para a seleção de brotos transgênicos em diversas espécies

Dose (mg.L ⁻¹)	Explante	Espécie	Referência
3,0	Embrião	Milho	Rasco-Gaunt et al. (2003)
3,0	Embrião	Soja	Zeng et al. (2004)
4,0	Calo	Centeio	Popelka et al. (2003)
5,0	Calo	Gramma-bermuda	Goldman et al. (2004)
5,0	Embrião	Arroz	Vain et al. (2004)
8,0	Calo	Arroz	Ramesh et al. (2004)
10,0	Embrião	Milheto	Goldman et al. (2003)

Segundo a literatura é recomendável que a seleção de brotos transgênicos a partir de explantes embriogênicos seja efetuada com dosagens mais altas, otimizadas para a espécie em questão. Apesar de ser um herbicida do tipo contato, há um efeito sistêmico quando usado em dosagens mais altas. Uma outra opção seria usar herbicidas do tipo sistêmico para a seleção desse tipo de explante: Aragão et al. (2000, 2005) utilizaram a molécula herbicida imazapyr para a seleção de brotos de soja, feijão e algodão. O imazapyr é uma molécula capaz de se translocar dentro da planta e se concentrar na região meristemática apical, inibindo a divisão celular em explantes não resistentes.

Concluindo, a dosagem ideal do herbicida Finale, cujo princípio ativo é a fosfinotricina, para a seleção de brotos transgênicos a partir de discos foliares excisados da população FB -100 é 0,1 mg.L⁻¹ em meio MSB(A). Esta dosagem foi escolhida pelo fato de a mesma inibir a organogênese sem, no entanto, matar os discos foliares.

4.4 Obtenção de plantas transgênicas

A extração do plasmídeo pCatt3300 pelo Kit da Qiagen resultou na produção de cerca de 450 µg de DNA, e 1,5 µg de DNA foram utilizados para cada tiro disparado pelo acelerador de micropartículas. Foram realizados 30 ensaios, totalizando 5992 explantes bombardeados. Estes explantes foram cultivados na sala de crescimento do laboratório (Figura 16).

Figura 16 - Sala de cultura: detalhe das placas de petri contendo os explantes

O processo de obtenção de plantas transgênicas putativas de maracujá completa-se num total de 110 a 130 dias (Figura 17). Este período compreende desde a excisão dos discos foliares à obtenção da planta com boa formação de parte aérea e de raízes (Figura 18). A variação observada neste período decorre de alguns fatores, como a idade e o estado fisiológico da planta doadora do explante, do potencial organogênico do explante e do grau de ferimento causado pelo processo de biobalística.

Figura 17 - Transfecção e regeneração de plantas transgênicas putativas: obtenção dos discos foliares (A); bombardeamento (B); transferência dos explantes para meio seletivo (MSB(A)F (C); transferência dos brotos para frasco contendo MSB(A)F (D); individualização e cultivo dos brotos em MS/2 (E); obtenção de transgênicos putativos (F). Em vermelho: número de dias entre cada etapa

No processo de regeneração de brotos transgênicos putativos, são utilizados vários meios de cultura conforme mostra o quadro a seguir (Tabela 6).

Tabela 6. Meios de cultura usados nas etapas de obtenção de brotos transgênicos de maracujá

Meio	Composição	Número de dias
Indução de brotos	MS + 1,0 mg.L ⁻¹ BA	10
Seleção em placas	MS + 1,0 mg.L ⁻¹ BA + 0,1 mg.L ⁻¹ PPT	40 - 60
Seleção em frascos	MS + 1,0 mg.L ⁻¹ BA + 0,1 mg.L ⁻¹ PPT	30
Indução de raízes	MS/2	30

Figura 18 - Processo de obtenção de plantas transgênicas de maracujá: planta doadora de discos foliares (A); discos prontos para bombardeamento (B); explantes no 1º dia de cultivo em MSB(A) (C); explantes com 20 dias em MSB(A)F (D); explantes com 45 dias em meio MSB(A)F (E); brotos transgênicos putativos em MS/2 (F)

O acompanhamento, através de avaliações com 30 e 60 dias de cultura, de 1200 discos foliares em cinco ensaios distintos permitiu a coleta de informações sobre a resposta morfogênica e a incidência de clorose/necrose nos explantes (Figura 19). Observou-se que aos 30 dias, 57% dos discos apresentavam alguma resposta morfogênica. Entende-se por resposta morfogênica a presença de protuberâncias ou de gemas, parte aérea e brotos. O processo de seleção com o herbicida glufosinato de amônio reduz esta proporção em 80%. Percebe-se, claramente, o efeito do herbicida na inibição da organogênese, levando à morte dos explantes. Já a proporção dos discos cloróticos ou necróticos aos 30 dias de cultura foi de 23% e aumentou para 67%

aos 60 dias de cultura, resultando numa proporção final de 70% de morte. Nestas avaliações, os discos foliares que apresentaram mais de 50% da sua área comprometida foram considerados cloróticos ou necrosados.

O número total de brotos sobreviventes foi igual a 40, apenas 3,3% do número inicial de explantes. Os brotos que foram capazes de sobreviver 70 dias em meio seletivo tinham grande chance de serem transgênicos. Esta confirmação foi buscada através das técnicas da PCR e “Southern blot”, como será apresentado adiante.

Figura 19 - Resposta dos discos foliares em termos de regeneração e clorose/necrose aos 30 e 60 dias de cultura

Os cinco novos bombardeamentos (960 discos) permitiram o conhecimento mais detalhado sobre a geração de plantas transgênicas, no que se refere ao desenvolvimento dos brotos e a seleção pelo herbicida.

Com 10 a 15 dias de cultivo, em média, 25% dos discos foliares apresentavam-se cloróticos, com 15% dos explantes apresentando pequenos brotos. Na avaliação com 20 dias, houve um acréscimo na porcentagem de explantes cloróticos/necróticos (30%) e a manutenção da porcentagem de explantes com brotos, que se mostraram bem mais desenvolvidos. Com 25 dias, houve um forte acréscimo na porcentagem de explantes

cloróticos/necróticos (39%), indicando a ação do herbicida na seleção. Nesta avaliação, observou-se um pequeno decréscimo na porcentagem de explantes com brotos (14,2%). O acompanhamento das culturas mostrou uma evolução contínua da porcentagem de explantes cloróticos/necróticos e um decréscimo na porcentagem de explantes com brotos (Figura 20). Aos 45 dias, 75% dos discos foliares se mostravam cloróticos/necróticos e 5% deles apresentavam brotos transgênicos putativos. A partir desta avaliação, os brotos foram individualizados e transferidos para frasco contendo o meio MSB(A)F. Nos discos cultivados em meio livre de herbicida (controle) houve desenvolvimento dos brotos aos dez dias. Mesmo nos tecidos transformados, o herbicida retarda o desenvolvimento das estruturas de regeneração que ocorreu aos 15 dias.

No final deste trabalho, 100 plântulas foram regeneradas em meio seletivo (Figura 21). Destas, 80 plântulas foram aclimatadas com sucesso e mantidas em uma estufa de vidro constituindo uma população T_0 (regenerantes primários ou primeira geração de transformantes) de plantas FB-100. Estas plantas forneceram material vegetal para testes moleculares de confirmação do estado de transgenia.

Figura 20 - Evolução da clorose/necrose, expansão/protuberâncias e brotos regenerados ao longo de 45 dias de avaliação de cinco ensaios de bombardeamento de discos foliares

Figura 21 – Eficiência do agente seletivo glufosinato de amônio na seleção de brotos transgênicos de maracujá. Explantes com 45 dias em MSB(A)F

4.5 Ensaio histoquímico de GUS

O monitoramento da eficiência do processo de transformação por biobalística através da expressão do gene *uid A*, permitiu que o bombardeamento dos discos foliares fosse realizado de maneira contínua e eficaz. Os ensaios histoquímicos foram realizados a cada 500 discos bombardeados e mostraram que se prestam como ferramenta de controle do processo de geração de brotos transgênicos putativos, além de confirmarem a eficiência da biobalística, pelo menos, no que tange à expressão transiente (Figura 22).

Figura 22 - Expressão transiente do gene *uid A* em discos foliares de maracujá, 36 h após a transfecção do DNA por biobalística

4.6 Confirmação da transgenia

4.6.1 Extração de DNA

Foi extraído o DNA das 80 plantas transgênicas putativas mantidas em estufa de vidro própria para o cultivo de OGM's segundo as normas da CTNBio. A metodologia do DNAzol foi aplicada para todas as plantas regeneradas "*in vitro*", mantidas na estufa de vidro. Esta metodologia mostrou-se bastante rápida e eficaz, produzindo um DNA de alta pureza, ideal para a reação da PCR com pouca variação na quantidade final entre as diferentes amostras. No processo de quantificação foi possível constatar a eficiência do tratamento com RNase. A quantidade extraída média de DNA foi equivalente a 17 µg (250 ng/µL de TE). A outra técnica, a metodologia do CTAB, foi usada para a extração de DNA em grandes quantidades para o "Southern blot". De 50 plantas transgênicas confirmadas por PCR, apenas 50 % das plantas tiveram seu DNA extraído com qualidade e quantidades suficientes. O restante teve que ser novamente extraído. Este método possui uma resposta bastante variável com relação à quantidade final de DNA produzido, além do tempo excessivo gasto na metodologia. A quantidade extraída média entre as 45 amostras foi de 200 µg de DNA.

4.6.2 Confirmação via PCR

Dentre as 100 plantas regeneradas na presença do herbicida, 80 foram aclimatadas e submetidas à PCR e 50 mostraram-se transgênicas para ambos os pares de iniciadores (Figura 23). Este resultado fornece uma eficiência de transformação (razão entre o número de plantas transgênicas putativas e o número de explantes bombardeados) de 0,85% (50/5992). Se usarmos no denominador o número de plantas regeneradas na presença do herbicida e

aclimatadas, a eficiência de transformação foi de 62,5% (50/80). A taxa de escape ao herbicida, portanto, foi de 37,5%.

Em comparação com as plantas que têm o sistema de transformação bem estabelecido, a frequência de transformantes aqui resgatados encontra-se dentro da média. Rasco-Gaunt et al. (2001) obtiveram uma frequência média de transformação de 0,5% para seis cultivares de trigo. Em outro trabalho, com a mesma espécie, os autores obtiveram níveis de expressão mais elevados do gene seletivo e, conseqüentemente, a frequência de transformação subiu para 1,6% (Rasco-Gaunt et al., 2003). Em milho, as frequências de transformação por biobalística chegam a 45% quando a manose é usada como agente seletivo (Wright et al., 2001) e 3,2% quando o glufosinato de amônio foi utilizado (Rasco-Gaunt et al., 2003). Em milheto, as frequências foram de 0,18% (Girgi et al., 2002), 1,21 e 1,62% (Goldman et al., 2003). Trabalhando com feijão, Vianna et al. (2003) obtiveram frequências de transformação de 0,19 e 0,24%, quando bombardearam embriões com plasmídeos íntegros ou apenas com o cassete de expressão, respectivamente. Em *Leymus chinensis*, a frequência foi de 0,7% (Shu et al., 2005). É importante comentar que todos estes trabalhos referem-se ao método de transformação do tipo biobalística, porém as vias de regeneração diferem, assim como a seleção, o que pode resultar em frequências de transformação distintas.

Para incrementar a frequência de transformação aqui obtida, alguns procedimentos podem ser alterados, como, por exemplo, introduzir tratamentos osmóticos (plasmólise) durante o pré-bombardeamento. O emprego de substâncias como manitol e sorbitol aumentam a osmolaridade do meio, podendo resultar em uma maior eficiência de transformação. A presença de osmóticos faz com que as células sofram uma redução em seu turgor e, conseqüentemente, isso facilite a penetração da micropartícula evitando que as células estourem (Nandaleva et al., 1999). Este tratamento aumentou a frequência de transformação por biobalística em milho, trigo (Wright et al., 2001), mandioca (Zhang et al., 2000) e milheto (Goldman et al., 2003).

As plantas que se mostraram transgênicas pela técnica da PCR foram avaliadas por “Southern blot” e RT-PCR, visando obter evidências moleculares mais precisas da integração e expressão do transgene, respectivamente.

Figura 23 – Amplificação dos fragmentos de 500 (A) e 350 (B) pb via PCR em transgênicos putativos. “Screening” de plantas PCR positivas (A); Confirmação de um conjunto de plantas PCR positivas com outro par de *primers* (B). BR – branco; C- – DNA planta matriz; C+ – plasmídeo pCatt3300. * - marcador de peso molecular Ladder 100 pb (FermentasTM).

4.6.3 “Southern blot” e hibridização molecular

Foram submetidas ao “Southern blot” as 50 plantas PCR positivas. A eletroforese das amostras de DNA genômico revelou um rastro característico do DNA hidrolisado por completo (Figura 24) que foi, então, transferido para a membrana de nitrocelulose. Constatou-se a completa transferência através de visualização do gel sob UV (Figura 25).

Figura 24 - Digestão do DNA genômico e do plasmídeo pCatt3300 (controle positivo) por *Bam*HI

Figura 25 – Eletroforese do DNA genômico de plantas transgênicas putativas após hidrólise com *Bam* HI (esquerda); gel após a etapa de transferência do DNA para a membrana de nitrocelulose (direita)

Foi detectada pelo menos uma cópia do transgene inserida no genoma de oito plantas transformadas por biobalística. As plantas não submetidas à

transformação (matrizes) não apresentaram sinal de hibridização com a sonda correspondente do gene *att A* (Figura 26).

A maioria das plantas avaliadas não apresentou o fragmento esperado, embora fossem PCR positivas. A ausência de hibridização da sonda com o DNA das amostras pode ser explicada por: (i) ocorrência de falsos positivos derivados da técnica da PCR; (ii) não integração do transgene *att A* no genoma da planta; (iii) qualidade do DNA extraído e da digestão das amostras.

Das 50 plantas, oito (16 %) mostraram hibridização com a sonda (Tabela 7). A eficiência de transformação com inserção do transgene no genoma do maracujá foi de 0,13 % (8/5992).

A baixa eficiência da técnica de transformação por biobalística é comum também em outras espécies. Resultados semelhantes foram obtidos por Shu et al. (2005) em *Leymus chinensis*. Note a importância de se testar a integração do transgene e, também, a sua expressão, como será mostrado adiante.

Figura 26 - Hibridização molecular de DNA de plantas PCR positivas com a sonda complementar ao fragmento de 1050 pb do gene *att A*. As canaletas 2 a 9 correspondem as plantas T2, T11, T16, T18, T20, T32, T33 e T43. Na primeira canaleta foi depositado o DNA plasmidial (pCatt3300) clivado com *Bam*HI. Na décima canaleta foi depositado o DNA de uma planta matriz (controle negativo)

Tabela 7. Resumo dos ensaios de transformação genética

Ensaio	Número de explantes	Brotos Regenerados	Plantas PCR+	Plantas Southern +
1	120	0	0	0
2	160	2	4	2
3	240	4	1	0
4	240	4	3	1
5	240	5	2	0
6	240	5	2	0
7	240	3	4	1
8	120	0	0	0
9	240	4	5	0
10	240	3	0	0
11	240	4	2	0
12	240	3	3	0
13	240	4	1	1
14	240	3	3	1
15	240	3	2	0
16	240	5	1	0
17	120	0	0	0
18	120	0	0	0
19	120	3	1	0
20	192	3	2	0
21	192	4	1	1
22	192	3	1	0
23	192	5	2	0
24	192	5	4	1
25	192	4	0	0
26	192	3	2	0
27	192	6	0	0
28	192	5	0	0
29	192	3	2	0
30	192	4	2	0
Total	5992	100	50	8

4.7 Análise da expressão do transgene

4.7.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada a partir das plantas “Southern” positivas de uma planta matriz. O método utilizado foi eficiente para a extração de RNA, gerando em média 7,3 µg de RNA por µL de água (Figura 27).

Figura 27 - Gel de agarose comprovando a integridade do RNA total extraído de maracujá amarelo

4.7.2 RT-PCR

RT-PCRs foram realizadas visando à detecção do mRNA do gene *att A*, todavia, em nenhuma das reações para as oito amostras “Southern” positivas foi possível esta detecção.

As condições ideais para a detecção do mRNA da atacina A, via RT-PCR, precisam ser otimizadas. Uma outra opção interessante, e talvez mais conclusiva, é a detecção através da técnica do “Northern blot” (Alwine et al., 1977). Esta metodologia é análoga à técnica de “Southern blot” e permite a

determinação da quantidade e tamanho de RNAs específicos, presentes em preparações de RNA total.

4.8 Aclimação e estaqueamento das plantas transgênicas putativas e matrizes FB-100

Os procedimentos usados para aclimação mostraram-se eficientes na introdução das plântulas em ambiente sem controle de temperatura e fotoperíodo. A porcentagem de sobrevivência foi de $85 \pm 3\%$ (Figura 28).

A estaquia ou clonagem das plantas transgênicas e das matrizes foi fundamental para que se obtivesse um grande número de repetições de cada evento transgênico, e estes pudessem ser empregados nos bioensaios de inoculação com a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Objetivou-se a avaliação dos níveis de resistência dos transgênicos e de suas matrizes com precisão experimental.

Plantas transgênicas putativas e as plantas matrizes, ao atingirem 2 m de altura, foram estaqueadas. Cada planta produziu, em média, dez estacas. Após 30 dias, as estacas que apresentavam um bom desenvolvimento foliar e radicular foram transferidas para sacos plásticos de 1 L (Figura 29, 30). Quando as plantas atingiram 1,5 m, foram transferidas para a estufa de inoculação. Ao todo, foram obtidos 700 clones das plantas transgênicas putativas e das matrizes.

Figura 28 - Plantas transgênicas putativas aclimatadas

Figura 29 – Desenvolvimento de estacas de maracujá, 25 dias após o estaqueamento

Figura 30 - Etapas do processo de obtenção de clones de plantas de maracujá: estacas em desenvolvimento (A); mudas de maracujá em sacos para mudas (B); plantas de maracujá prontas para o bioensaio (C)

4.9 Ensaio *in vivo* com o herbicida glufosinato de amônio

Os herbicidas à base de glufosinato de amônio têm sido recomendados para várias culturas. Neste trabalho, tornou-se necessário conhecer os efeitos, as dosagens, sob diferentes métodos de aplicação, para a cultura do maracujazeiro visando à aplicação deste conhecimento para a seleção de plantas transgênicas. Os efeitos tóxicos da molécula glufosinato de amônio foram determinados e estes dados poderão ser úteis em trabalhos de fitotecnia envolvendo a variedade FB-100 de maracujá amarelo.

4.9.1 Pulverização do herbicida

4.9.1.1 Primeiro ensaio

Os primeiros sintomas da ação do herbicida (Finale^R) foram observados 24 h após a pulverização. Estes caracterizaram-se, a partir da dosagem 1,25 L/ha, por clorose e ou necrose nas folhas. A partir daí, os sintomas se intensificaram e começaram a ser notados, também, nas dosagens mais baixas. Com três dias de experimento, observou-se grande desfolha nas dosagens mais elevadas (Figura 31) que se intensificaram atingindo grande parte dos tratamentos com seis dias de pulverização.

Com 12 dias, além de sintomas de grande desfolha em 70% das plantas, observou-se a morte de ponteiros a partir da dosagem 1,5 L/ha (Figura 32). Portanto, a dosagem para a seleção *in vivo* de plantas transgênicas de maracujá deve estar entre 0,5 e 1,5 L/ha. Esta confirmação foi obtida pela análise de um segundo ensaio no qual as plantas foram submetidas a dosagens entre 0,0 a 1,45 L/ha.

Figura 31 - Efeito do herbicida Finale em folhas de maracujá, três dias pós-pulverização

Figura 32 – Efeito do herbicida Finale sob diferentes dosagens comparativamente ao controle negativo. 0,0 e 0,5 (A); 0,0 e 1,0 (B); 0,0 e 1,5 (C); 0,0 e 2,25 (D) L/ha. Avaliação com 12 dias pós-pulverização

4.9.1.2 Segundo ensaio

Os sintomas da toxidez causada pelo herbicida foram observados com três dias, sendo que as dosagens mais fortes, acima de 0,85 L/ha, caracterizaram-se por clorose e necrose das folhas.

Com nove dias, houve uma forte intensificação dos sintomas de fitotoxidez. Foram observados sintomas, leve/moderados, na dosagem de 0,55 L/ha, se caracterizando por clorose das folhas mais novas, localizadas no terço superior da planta. A dosagem de 0,7 L/ha levou à clorose e queda de $40 \pm 6\%$ das folhas. Já na dosagem de 0,85 L/ha, foi observada grande desfolha das plantas em todas as repetições. Os sintomas do herbicida também foram notados nos ponteiros. Aproximadamente, $70 \pm 4\%$ das plantas apresentavam morte dos seus ponteiros. Na dosagem de 1,0 L/ha, $90 \pm 1\%$ das plantas estavam mortas. Os sintomas se caracterizavam por queda de 100% das folhas e morte dos ponteiros em todas as repetições. Os mesmos sintomas foram observados nas dosagens mais altas.

Na avaliação após 12 dias de pulverização, pôde-se observar a morte de 100% das plantas a partir da dosagem de 0,85 L/ha. Estas plantas apresentavam queda de aproximadamente 100% das folhas, morte dos ponteiros e necrose do caule no sentido do ápice para a base. Não foi observada a morte de ponteiros na dosagem de 0,7L/ha, tampouco nas inferiores (Figura 33).

A análise dos dados obtidos detectou diferença entre os tratamentos ($P \leq 0,01$). O teste de Tukey agrupou as médias das cinco dosagens mais altas em uma categoria, e as demais médias correspondentes às outras dosagens em categorias separadas (Tabela 8). O coeficiente de variação foi de 8,38%.

Tabela 8. Resposta de plantas de maracujá à aplicação de diferentes doses de herbicida Finale e sua classificação de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,01$)

Dose (L/ha)	Média	Teste de Tukey*
1,45	7,6 ^A	A
1,3	7,4	A
1,15	7,1	A
1,0	7,1	A
0,85	7,0	A
0,7	5,2	B
0,55	4,1	C
0,0	1,0	D

* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

A morte das plantas na dosagem de 0,85 L/ha impossibilita a sua utilização e também de dosagens mais agressivas. Já a dosagem 0,7 L/ha causou fortes sintomas nas plantas, sem no entanto, matá-las. Assim, baseado nos dois ensaios realizados, recomenda-se a pulverização da dosagem de 0,7 L/ha ou 460 mg.L⁻¹ de glufosinato de amônio para a seleção de plantas transgênicas de maracujá.

A pulverização de glufosinato de amônio tem sido empregada para a seleção de plantas transgênicas de diversas espécies. Em feijão, a dosagem de 330 mg.L⁻¹ foi aplicada na forma de pulverização para o "screening" de 4537 plantas já aclimatadas, das quais 24 sobreviveram e, posteriormente, foram confirmadas como sendo transgênicas por PCR (Aragão et al., 2002). Também trabalhando com feijão, Vianna et al. (2003) pulverizaram 120 mg.L⁻¹ em plantas regeneradas e aclimatadas. Neste trabalho, 6783 plantas foram pulverizadas, 21 mostraram-se resistentes ao herbicida. Esta resistência foi confirmada pelas técnicas da PCR e "Southern blot", ou seja, o gene *bar* foi integrado ao genoma do hospedeiro.

Figura 33 - Resposta de plantas de maracujá à pulverização com o herbicida Finale. Avaliação com 12 dias. Barras vermelhas: desvio padrão

Em trabalhos com a cultura do centeio, Popelka et al. (2003) pulverizaram plântulas com o herbicida glufosinato de amônio na dosagem de 50 mg.L^{-1} . Esta etapa de seleção foi aplicada antes da aclimação das plantas. As 21 plantas sobreviventes foram aclimatadas e posteriormente foi confirmada a sua natureza transgênica via PCR e "Southern blot".

Em milho, foram utilizadas duas pulverizações com as dosagens de 100 e 200 mg.L^{-1} para a seleção de plantas resistentes ao herbicida (Girgi et al, 2002). Em outro trabalho com esta espécie, Goldman et al. (2003) pulverizaram as plantas regeneradas com uma solução aquosa do herbicida a 350 mg.L^{-1} . Em ambos os trabalhos, as plantas pulverizadas encontravam-se aclimatadas.

A pulverização do herbicida glufosinato de amônio visando à seleção de plantas transgênicas também foi aplicada em *Cynodon* e *Leymus* (Gramineae). As doses de 500 e 1400 mg.L^{-1} foram usadas respectivamente para a seleção de grama bermuda e *Leymus chinensis*, uma planta forrageira (Goldman et al., 2004; Shu et al., 2005). Nota-se que as dosagens aplicadas para a seleção de plantas resistentes são dependentes da espécie, da variedade em questão e da

idade e estado fisiológico da planta. Quando definida a dosagem ideal, este agente se presta para o “screening” das plantas transgênicas.

4.9.2 Pincelamento do herbicida

4.9.2.1 Primeiro ensaio

Os primeiros sintomas foram observados 72 h após a pincelamento. Estes se caracterizaram a partir da dosagem 0,9, por clorose da área demarcada. Conforme o incremento das dosagens, os sintomas tornavam-se mais nítidos. Com 14 dias pós-pincelamento, houve intensificação dos sintomas. Estes se caracterizaram a partir da dosagem 0,1, por clorose, inicialmente dentro da área delimitada e depois por todo o limbo foliar. Os sintomas de toxidez também foram observados em outras folhas localizadas acima das pinceladas e nos ponteiros de duas repetições. Nos ponteiros, os sintomas iniciaram-se com o bronzeamento de toda a região, evoluindo para morte do mesmo. A partir da dosagem 0,5, além da clorose das folhas, foi observado necrose e, depois, queda da folha, inclusive aquelas que não foram pinceladas.

Em alguns tratamentos, o sintoma de morte iniciou-se na região do ponteiro, evoluindo para o restante da planta. A partir da dosagem 0,2, houve morte de ponteiro de todas as plantas.

A análise dos dados acusou diferença entre os tratamentos ($P \leq 0,01$). O teste de médias indicou o agrupamento das oito dosagens mais altas em uma categoria (0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1 e 1,2) quatro dosagens intermediárias (0,4, 0,5, 0,7 e 0,9) na segunda, cinco dosagens (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5) agrupadas na terceira e apenas uma dosagem (0,0) na última categoria (Tabela 9) O coeficiente de variação do primeiro ensaio foi de 11,02%.

Tabela 9 Resposta de plantas de maracujá à aplicação de diferentes doses de herbicida Finale e sua classificação de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,01$)

Dose (%)	Média	Teste de Tukey*
0,8	7,0	A
1,0	7,0	A
1,2	6,67	A
1,1	6,67	A
0,6	6,67	A
0,9	6,22	A B
0,7	5,57	A B
0,5	5,22	A B C
0,4	4,45	B C
0,3	4,11	C
0,2	4,11	C
0,1	3,44	C
0,0	1,0	D

* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

Os sintomas de toxidez fora dos sítios de aplicação do herbicida mostraram o seu caráter sistêmico em plantas de maracujá. O modo de ação deste herbicida é do tipo contato, porém, dependendo da dosagem, assume caráter sistêmico, locomovendo-se na planta pelo xilema. Os sintomas de fitotoxidez gerados em outras folhas não pinceladas e em ponteiros demonstram a necessidade da determinação correta da dosagem de seleção de plantas transgênicas. Dosagens muito fortes podem matar até mesmo plantas que apresentem tolerância e/ou resistência ao herbicida.

4.9.2.2 Segundo ensaio

Os sintomas da toxidez causados pelo herbicida foram observados inicialmente com três dias após o pincelamento. Estes foram percebidos com maior nitidez a partir da dosagem 0,15 com clorose da área demarcada.

Na avaliação realizada com 14 dias, foi observada uma intensificação dos sintomas de fitotoxidez. Nas dosagens 0,025 e 0,05, os sintomas foram classificados entre moderados e fortes, com clorose forte na área demarcada. Já na dosagem 0,075 houve intensa necrose de todo o limbo foliar das folhas demarcadas e clorose de outras folhas da planta. Nesta dosagem foram observados sintomas de fitotoxidez em dois ponteiros. A partir das dosagens 0,1 e 0,125, além da necrose e queda de folhas, ocorreu a morte de ponteiros. Na dosagem 0,15 houve intensa queda de folhas de toda a planta e morte de todos os ponteiros (Figura 34). Nas dosagens subseqüentes, a queda de folhas foi ainda mais intensa e a morte de 100% dos ponteiros foi observada.

Os resultados encontrados confirmam que, apesar do herbicida glufosinato de amônio ser do tipo contato, o mesmo assume um caráter sistêmico em maracujá amarelo quando dosagens mais altas são empregadas (Figura 35).

Figura 34 - Resposta de plantas de maracujá ao pincelamento com o herbicida Finale

Figura 35 - Resposta de plantas de maracujá ao pincelamento com o herbicida Finale: ação sistêmica (A); morte de ponteiro (B); planta pincelada com a dosagem de 0,05% do herbicida (C)

A análise dos dados acusou diferença entre os tratamentos ($P \leq 0,01$). O teste de médias indicou o agrupamento das sete dosagens mais altas em uma categoria (0,225, 0,175, 0,275, 0,25, 0,2, 0,3 e 0,15), quatro dosagens intermediárias (0,15, 0,125, 0,1 e 0,075) na segunda, duas dosagens (0,05 e 0,025) agrupadas na terceira e apenas uma dosagem (0,0) na última categoria (Tabela 10). O coeficiente de variação deste ensaio foi de 7,19 %.

Tabela 10 Resposta de plantas de maracujá à aplicação de diferentes doses de herbicida Finale e sua classificação de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,01$)

Dose (%)	Média	Teste de Tukey*
0,225	7,0	A
0,175	7,0	A
0,275	6,78	A
0,25	6,77	A
0,2	6,77	A
0,3	6,67	A
0,15	6,22	A B
0,125	5,33	B
0,1	5,22	B
0,075	5,0	B
0,05	3,22	C
0,025	3,22	C
0,0	1,00	D

* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

A morte de todas as plantas já na dosagem de 0,1% impossibilita a utilização deste e de tratamentos mais agressivos para a seleção de plantas transgênicas. Já a dosagem 0,075% causou fortes sintomas nas plantas, inclusive fitotoxidez nos ponteiros. A dosagem 0,05% apresentou sintomas

moderados a fortes nas plantas, porém não sistêmicos. Esta dosagem pode ser utilizada para a seleção de plantas transgênicas por causar danos em plantas que não apresentam resistência ao glufosinato de amônio e, com isso, possibilitar o “screening” das plantas resistentes. Assim, baseado nos dois ensaios realizados, indica-se o pincelamento da solução na concentração de 0,05%.

O pincelamento de herbicida em plantas transgênicas putativas têm sido utilizado para o “screening” de plantas resistentes em outras espécies. Girgi et al. (2002) empregaram esta técnica para a seleção de plantas de milho resistentes ao glufosinato de amônio. Os autores pincelaram 455 plantas aclimatadas em estufa com uma solução aquosa do herbicida a 2%. Apenas duas plantas mostraram-se resistentes ao tratamento e foram confirmadas como sendo transgênicas por “Southern blot”. Rasco-Gaunt et al. (1999) selecionaram plantas de trigo com uma solução do herbicida a 0,1%. Um total de 256 plantas foi pincelado e 56 foram resistentes. Estes resultados foram confirmados pela técnica da PCR. Plantas transgênicas de milho foram selecionadas com uma solução aquosa do herbicida a 2% (Rasco-Gaunt, 2003). Oito plantas aclimatadas foram pinceladas com o herbicida e cinco se mostraram resistentes. Estes resultados foram confirmados por PCR e “Southern blot”. Já a seleção de plantas de soja transgênicas também foi realizada desta maneira. Os pesquisadores G. Vianna (Embrapa, Cenargen) e A. Abreu (Bayer CropScience) têm aplicado soluções do herbicida nas concentrações 0,3 e 0,1%, respectivamente, para seleção de plantas transgênicas putativas (comunicação pessoal).

Pelos resultados de trabalhos com diferentes espécies, percebe-se uma baixa taxa de escape quando o herbicida é aplicado via pincelamento. Entretanto, a dosagem ideal deve ser determinada com exatidão, evitando assim efeitos sistêmicos do herbicida e a possível perda de plantas sob teste.

É importante salientar que não existe referência de aplicação de herbicidas para a cultura do maracujazeiro por pulverização ou pincelamento.

4.10 Coleta e isolamento dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* a campo

Na viagem de coleta de isolados da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, foram percorridos 1000 Km e visitadas dez propriedades nas cidades de Vera Cruz, Garça, Dracena e Adamantina. Em todas as propriedades visitadas, verificou-se a ocorrência de problemas fitossanitários. A cultura do maracujazeiro, antes caracterizada por seu ciclo de três a quatro anos, hoje é uma cultura anual e itinerante. A maioria dos produtores cultiva o maracujá durante um ano e, após a primeira produção, erradicam seus pomares. Devido à falta de um controle efetivo contra doenças como a bacteriose, o vírus do endurecimento dos frutos e a fusariose, as áreas antes cultivadas com a cultura são abandonadas e outras áreas são procuradas para o plantio do maracujá. A área e a produção têm caído vertiginosamente ao longo dos últimos anos nessas regiões visitadas. Esta informação pôde ser comprovada na AFRUVEC (Associação dos Fruticultores da Região de Vera Cruz). Há dez anos atrás, a associação era composta por 250 produtores de maracujá. Hoje, restam apenas três.

Apesar do controle químico ser considerado ineficiente, são aplicadas pulverizações quinzenais com produtos à base de cobre e uma mistura de fungicidas diversos. Os custos de produção e os danos ao ambiente decorrentes deste tipo de prática agrônômica são enormes. A necessidade de variedades, populações melhoradas que apresentem tolerância ou resistência a diferentes isolados do patógeno é fundamental para a sustentabilidade da cultura do maracujazeiro. A utilização de quebra ventos e outras práticas culturais observadas em algumas propriedades, aliadas ao uso de variedades geneticamente resistentes é a maneira mais eficaz e duradoura para o controle da bacteriose. Percebe-se um grande anseio dos diversos produtores de maracujá por variedades resistentes a esta doença.

As condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da doença permitiram que diversos isolados da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* fossem coletados. Ao todo, foram selecionadas 47 folhas apresentando sintomas típicos da bacteriose. Os isolados foram classificados pelo seu local de coleta e pela agressividade nos pomares visitados. Esta divergência foi confirmada pela resposta diferenciada dos isolados quando inoculados em três populações de maracujá (Bioensaios I e II). Estes isolados somam-se a outros 20 da região do triângulo mineiro e outros sete da região de São Miguel Arcanjo (SP) e constituem a coleção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* do laboratório mantida em freezer (-80°C).

4.11 Bioensaio

4.11.1 Obtenção das mudas FB-100, FB-200 e Sul Brasil

Ao todo, 620 plantas das variedades FB-100, FB-200 e Sul Brasil compuseram as populações que serviram para a determinação dos isolados mais virulentos de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (Figura 36).

Figura 36 - Da esquerda para a direita estão dispostas as populações FB-200, FB-100 e Sul Brasil de maracujá amarelo

4.11.2 Inoculação das plantas de maracujá

No primeiro bioensaio, foram inoculados 20 isolados oriundos da região do triângulo mineiro. Os primeiros sintomas foram observados com cinco dias. Estas lesões iniciam-se na região do ferimento causado pela tesoura e caminham por todo o limbo foliar. Os sintomas evoluíram até o 14º dia, quando os isolados mais agressivos causaram lesões em quase todo o limbo. Nesta data, as folhas foram colhidas e tiveram suas áreas foliares determinadas. Os resultados demonstraram uma grande amplitude de variação entre os tratamentos (Tabela 11). Observam-se isolados que provocam resposta variando de 2,59% de área lesionada até 22,18% nas três variedades de maracujá. Foram detectadas diferenças estatísticas entre as variedades (Tabela 12; Figura 37).

Tabela 11. Porcentagem da área foliar lesionada provocada por isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* nas variedades de maracujá e sua classificação de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,01$)

Código do Isolado	Lesão (em %)	Classificação^{* *}
89	22,18	A
92	21,70	A
84	21,33	A
80	18,96	A
116	16,54	A
90	14,74	A
117	14,57	A
81	12,50	A
115	11,39	A
144	10,90	A
129	10,10	A
113	9,50	A
94	8,83	A
114	8,34	B
145	7,97	B
83	6,97	B
111	6,74	B
82	5,44	B
110	2,59	B

* Médias advindas de três repetições; * Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

Tabela 12 – Porcentagem da área foliar lesionada provocada por isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* nas variedades de maracujá e sua classificação de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,01$)

Variedade	N	Lesão (%)	Classificação* *
FB200	20	18,948	A
FB100	20	16,848	A B
Sul Brasil	20	13,014	B

* Médias advindas de três repetições; * Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

O isolado 89 foi escolhido para bioensaios subseqüentes por ter causado a maior lesão foliar (em média) com a menor variação entre as três variedades de maracujá amarelo (Figura 37).

Figura 37 - Sintomas de infecção provocados pelo isolado 89 de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* em três variedades de maracujá: FB100 (A); FB200 (B); Sul Brasil (C)

No segundo bioensaio, foram inoculados dez isolados originários da região Oeste de SP. A inoculação causou sintomas da doença nas três variedades comerciais. Os primeiros sintomas começaram a se desenvolver seis dias após a inoculação e evoluíram até o 20º dia, quando os isolados mais agressivos provocaram sintomas em todo o limbo. Nesta data, as folhas foram

colhidas e tiveram suas áreas foliares determinadas. Alguns isolados não provocaram sintomas nas plantas. Já outros, foram bastante agressivos, porém a amplitude de variação dos dados foi menor que aquela observada no primeiro bioensaio (Tabela 13, 14). Diferenças foram detectadas entre os tratamentos.

Tabela 13. Porcentagem da área foliar lesionada provocada por isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* nas variedades de maracujá e sua classificação de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,01$)

Código do Isolado	Lesão (%)	Classificação* *
AP01	17,68	A
SMA02	12,23	B
G04AF	4,9	C

* Médias advindas de três repetições; * Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

Tabela 14. Porcentagem da área foliar lesionada provocada por isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* nas variedades de maracujá e sua classificação de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,01$)

Variedade	N	Lesão (%)	Classificação* *
FB200	20	13,948	A
FB100	20	10,848	A B
Sul Brasil	20	10,014	B

* Médias advindas de três repetições; * Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

Para as três variedades, foi encontrado resultado similar ao do bioensaio anterior. A classificação das variedades com base nas porcentagens de área foliar lesionada foi equivalente. As plantas da população Sul Brasil mostraram-se mais tolerantes aos diferentes isolados e este resultado é similar ao descrito por Fogaça-Miranda (2003).

O isolado AP01 foi escolhido para bioensaios subseqüentes por ter causado a maior área lesionada com a menor variação entre as três variedades (Figura 38, 39 e 40).

Figura 38 - Sintomas de infecção provocados pelo isolado AP01 de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* em três variedades de maracujá: FB100 (A); FB200 (B); Sul Brasil (C)

Figura 39 – Aspecto das plantas que compuseram os dois bioensaios em estufa de inoculação com *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

Figura 40 - Sintomas de infecção provocados pelos isolados 89 (à esquerda) e AP01 (à direita)

4.11.3 Bioensaio com folhas destacadas de plantas transgênicas

Após quatro dias da inoculação, foram observados os primeiros sintomas da doença que se manifestaram na forma de clorose a partir do corte realizado no limbo foliar. Os sintomas evoluíram até o 10º dia, quando as folhas foram retiradas das placas e avaliadas quanto a área foliar total e a área lesionada (Figura 41).

Todas as folhas destacadas das plantas transgênicas mostraram-se mais resistentes à infecção do que as das respectivas matrizes. Todavia, a resposta das plantas transgênicas foi diferenciada (Tabela 15). Em média, as folhas destacadas das plantas transgênicas mostraram-se 2,6 vezes mais resistentes ao desenvolvimento da doença do que as das plantas matrizes. Destaque para o transformante T18, cuja área lesionada foi 6,2 vezes menor que a da planta matriz, e para os transformantes T20 e T33, que se mostraram tão suscetíveis quanto as respectivas matrizes (Figura 42).

Figura 41 - À esquerda, aspecto do bioensaio com folhas destacadas. À direita, a resposta do transformante T11 e de sua matriz à infecção por *X. axonopodis. pv. passiflorae*

Figura 42 - Resposta das folhas destacadas de plantas transgênicas e de matrizes à inoculação com *X. axonopodis. pv. passiflorae*

Tabela 15. Porcentagem da área foliar lesionada de folhas destacadas de plantas transgênicas (T) e das respectivas matrizes (M)

Transformante	Área Lesão T (%)	Área Lesão M (%)	M/T
T2	3,5865*	9,8949	2,76
T11	3,8655	9,9730	2,58
T16	9,1893	22,9780	2,50
T18	2,6940	16,6412	6,18
T20	9,3585	9,4881	1,01
T32	11,0331	25,9250	2,35
T33	6,0344	7,6289	1,26
T43	6,1981	15,8548	2,56

* Médias de três repetições

Esta metodologia, embora possua algumas limitações ou desvantagens em relação à inoculação de folhas em plantas inteiras, dá uma idéia da resposta das plantas frente à bactéria. Com dez dias de inoculação, algumas folhas apresentavam necrose de parte dos seus tecidos, o que dificulta um pouco a determinação da área lesionada. Percebeu-se, também, que os sintomas já foram notados com apenas quatro dias pós-inoculação. O fato de a folha não estar mais em contato com a planta contribui para uma maior suscetibilidade à infecção pela bactéria.

4.11.4 Bioensaio com as plantas transgênicas e matrizes

Após sete dias da inoculação com a bactéria, foram observados os primeiros sintomas da doença que se manifestaram na forma de clorose a partir do corte realizado no limbo foliar. Os sintomas evoluíram até o 18º dia, quando

as folhas foram colhidas, escaneadas e avaliadas quanto a área foliar total e a área lesionada pelo “software” QUANT(Figura 43).

Todas as plantas transgênicas mostraram-se mais resistentes à infecção do que as respectivas matrizes. Foi observada uma resposta diferenciada entre as plantas transgênicas frente à inoculação (Tabela 16). Em média, as plantas transgênicas mostraram-se 6,3 vezes mais resistentes ao desenvolvimento da doença do que as plantas matrizes. Destaque para o transformante T33 (Figura 44) e T18, cujas médias de área lesionada foram 19,2 e 15,1 vezes menores do que as respectivas plantas matrizes.

Tabela 16. Porcentagem da área foliar lesionada de plantas transgênicas(T) e respectivas matrizes (M)

Transformante	Área Lesão T (%)	Área Lesão M (%)	M/T
T2	3,6870	10,6032	2,87
T11	7,0008	22,0377	3,15
T16	8,8498	17,1443	1,94
T18	2,1748	32,8631	15,11
T20	11,1106	19,6798	1,77
T32	14,3328	25,1321	1,75
T33	1,8948	36,4430	19,23
T43	5,9729	25,9416	4,34

* Médias advindas de quatro repetições

Figura 43 - Resposta de plantas transgênicas e de matrizes à inoculação com *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

Figura 44 - Sintomas da infecção provocada por *X. axonopodis* pv. *passiflorae* em três folhas da planta T33 (A, B e C) e de sua matriz (D, E e F) após 18 dias de inoculação

A resposta diferenciada entre as plantas transgênicas frente à inoculação, pode ser atribuída a uma série de fatores: (i) variabilidade genética natural dentre indivíduos da variedade FB-100, resultando em um efeito diferenciado do transgene; (ii) sítio de inserção do transgene (Somers et al., 2004); (iii) níveis de expressão diferenciados da proteína atacina A (Fagard et al., 2000); (iv) silenciamento gênico (Fagard et al., 2000). Todavia, os resultados obtidos sugerem a ação da proteína heteróloga atacina A na redução dos sintomas da bacteriose do maracujazeiro, causada pela bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Este é o primeiro trabalho de transformação genética da cultura, no qual um gene de interesse (*att A*), visando o controle de uma doença, foi introduzido por biobalística e a sua eficiência foi comprovada.

4.12 Considerações finais

Um programa de melhoramento pode ser dividido em várias etapas: (i) pré-melhoramento, na qual genitores de interesse são selecionados nos programas já existentes ou em bancos de germoplasma e irão formar a população base; (ii) melhoramento propriamente dito, etapa na qual são empregados os diferentes métodos. Nesta etapa, ocorrem os ensaios nacionais ou locais, durante alguns anos, para avaliar a estabilidade da produção; (iii) pós-melhoramento, etapa de multiplicação da variedade ou cultivar, envolvendo a parte de “marketing” e distribuição para o produtor.

As plantas transgênicas aqui obtidas compõem a etapa de pré-melhoramento, na qual genitores com características desejáveis são produzidos ou incorporados a programas pré-existentes, objetivando a formação de populações base.

Espera-se que as plantas transgênicas de maracujá amarelo possam representar um avanço importante a favor da passicultura nacional no controle

da doença causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Todavia, a utilização do maracujazeiro transgênico, particularmente no Brasil, deve ser bem controlada por duas razões: (i) é uma planta alógama e; (ii) o Brasil é o principal centro de diversidade genética, com cerca de 150 espécies de *Passiflora* distribuídas nas regiões Central e Norte.

O escape dos transgenes via pólen é um risco nas culturas em que a taxa de fluxo gênico é alta dentro da espécie cultivada e/ou entre esta e as formas silvestres do gênero. Apesar da incompatibilidade sexual entre as espécies de maracujazeiro, há compatibilidade bastante acentuada entre as formas roxa e amarela, sendo ambas cultivadas.

Diante disto, é necessário que o fluxo de pólen em maracujazeiro seja estudado. Estudos com algodão permitiram determinar o número de linhas bordadura necessárias para a contenção do fluxo de pólen de plantas transgênicas para plantas silvestres no Brasil (Freire, 2002a). Medidas de prevenção, como a adoção de áreas de exclusão baseadas na proposta de zoneamento podem também ser efetivas no controle do fluxo (Freire, 2002b).

Uma outra opção poderia ser a utilização da machoesterilidade associada às plantas transgênicas. Esta estratégia, caso não implique em perda de produtividade, resolveria o problema de fluxo gênico e implicaria em pequenas mudanças no sistema de produção do maracujazeiro.

Apesar dos trabalhos de transformação com proteínas bactericidas não mencionarem o seu efeito na flora exofítica ou endofítica e ação tóxica sobre o homem, são também necessários estudos neste sentido.

Desta maneira, uma série de estudos são ainda necessários para a utilização das plantas de maracujá obtidas neste trabalho.

5 CONCLUSÕES

- A regeneração e seleção de brotos transgênicos da variedade FB-100 de maracujá a partir de discos foliares ocorre em meio de cultura MS contendo $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BA, 5% de água de coco e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de glufosinato de amônio;
- O herbicida glufosinato de amônio se presta para a seleção de brotos transgênicos na concentração de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$.
- A metodologia da biobalística para a transformação de plantas é eficiente para a obtenção de plantas transgênicas de maracujá amarelo. A eficiência de transformação é da ordem de 1,5%.
- A seleção de plantas transgênicas para resistência ao herbicida glufosinato de amônio pode ser realizada *in vivo* por pulverização ou pincelamento do herbicida em concentrações de 0,7 L/ha e 0,05%, respectivamente.

- A proteína heteróloga atacina A se mostra capaz de reduzir os sintomas da bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em maracujazeiros transgênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL. 2004: Anuário estatístico da agricultura brasileira. **Maracujá**. São Paulo: FNP – Consultoria e Comércio, 2004. p. 359-365.
- AGUIAR, D.R.D.; SANTOS, C.C.F. Importância econômica e mercado. In: **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. 472p.
- AKAMINE, E.K.; GIROLAMI, G. **Pollination and fruit set in the yellow passion fruit**. Havaí: University of Hawaii, 1959. 44p. (University Hawaii Technical Bulletin, 39).
- ALFANO, J.R.; COLLMER, A. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. **The Plant Cell**, v.8, p.1683-1698, 1996.
- ALMEIDA, I.M.G.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; RODRIGUES NETO, J.; BERIAM, L.O.S. Ocorrência de estirpe não pigmentada em *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, **Summa Phytopathologica**, v.20, n.1, p.47, 1994.
- ALWINE, J.C.; KEMP, D.J.; STARK, G.R.; Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to deazobenzylloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.74, p.5350-5354, 1977.
- ANDO, K.; OKADA, M.; NATORI, S. Purification of sarcotoxin II, antibacterial proteins of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. **Biochemistry**, v.26, p.226-230, 1987.

- ANDO, K.; NATORI, S. Inhibitory effect of sarcotoxin-II A, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*, on growth of *Escherichia coli*. **Journal of Biochemistry**, v.103, p.735-739, 1988.
- ARAGÃO, F.J.L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G.R.; RECH, E.L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plants at a high frequency. **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.1-6, 2000.
- ARAGÃO, F.J.L.; VIANNA, G.R.; ALBINO, M.M.C.; RECH, E.L. Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinato ammonium. **Crop Science**, v.42, p.1298-1302, 2002.
- ARAGÃO, F.J.L.; VIANNA, G.R.; CARVALHEIRA, S.B.R.C.; RECH, E.L. Germ line genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by selection of transgenic meristematic cells with herbicide molecule. **Plant Science**, 2005. <<http://www.sciencedirect.com/science>> (11 Mar, 2005).
- ASLING, B.; DUSHAY, M.S.; HULTIMARK, D. Identification of early genes in the *Drosophila* immune response by PCR-based differential display: the attacin like proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.25, p.511-518, 1995.
- BARBOSA, C. de J.; JACOMINO, A.P.; STENZEL, N.M.C. Ocorrência de fitoviroses em maracujazeiro no Norte do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.2, 1995.
- BARBOSA, L.V.; VIEIRA, M.L.C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener + *P. amethystina* Mikan. **Euphytica**, v.98, p. 121-127, 1997.
- BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v.33, p.145-172, 1995.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. História da Fitopatologia, In: KIMATI, H.; AMORIM, A.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**, 3.ed. Piracicaba: Ed. Ceres, 1997. v.2, p.2-12.

- BERIAM, L.O.S.; MALAVOLTA JR, V.A.; ROSATO, Y.B.; YANO, T. Serologia aplicada ao estudo de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, agente causal da bacteriose do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). **Arquivos Instituto Biológico**, v.65, n.2, p.25-33, 1998.
- BIASI, L.A.; FALCO, M.C.; RODRÍGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passionfruit. **Scientia Agricola**, v.57, p.661-665, 2000.
- BIRCH, P.R.J.; HYMAN, L.J.; TAYLOR, R.; OPIO, A.F.; BRAGARD, C.; TOTH, I.K. RAPD PCR-based differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.809-814, 1997.
- BIRGOUIN, H. C.; J. DOLY. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v.7, p.1513-1523, 1979.
- BOGS, J.; BRUCHMULLER, I.; ERBAR, C.; GEIDER, K. Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. **Phytopathology**, v.88, p.416-421, 1998.
- BOMAN, H. G.; HULTMARK, D. Cell-free immunity in insects. **Trends Biochemistry Science**, v.6, p.306-309, 1981.
- BOMAN, H.G.; HULTMARK, D. Cell-free immunity in insects. **Annual Review Microbiology**, v.41, p.103-126, 1987.
- BÓREM, A; DEL GIÚDICE, M. P.; SAKIYAMA, N. S.; SEDIYAMA, T.; MOREIRA, M. A; PORTUGAL, R. S. (Ed). **Biossegurança, proteção de cultivares, acesso aos recursos genéticos e propriedade intelectual na agropecuária**. Viçosa: UFV, 1998. 182p.
- BOREM, A. **Escape Gênico e Transgênicos**. Viçosa, UFV, 2001. 206 p.

- BOSCARIOL, R.L. Transformação genética da laranja doce com os genes *manA*, *atacina A* e *Xa21*. Piracicaba, 2004. 107p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- BRUCKNER, C.H.; CASALI, V.W.D.; MORAES, C.F. de; REGAZZI, A.J.; SILVA, E.A.M. Self-incompability in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Acta Horticulturae**, n.370, p.45-57, 1995.
- BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. 395p.
- BRUCKNER, C.H.; MELLETI, L.M.M.; OTONI, W.C.; ZERBINI JÚNIOR, F.M. **MARACUJAZEIRO**. In: Melhoria de Fruteiras Tropicais. Viçosa: UFV, 2002. p. 373-410.
- CAMILLO, E. Polinização do maracujazeiro. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Cultura do Maracujazeiro**. Ribeirão Preto: L. Summa, 1987. p.97-103.
- CANCINO, G.O.; DAVEY, M.R.; LOWE, K.C.; POWER, J.B. Shoot regeneration from leaf and root explants from *Passiflora molissima*. **Journal of Experimental Botany**, v.49, 1998. Suplemento.
- CARLSSON, A.; ENGSTROM, P.; PALVA, E.T.; BENNICHI, H. Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with *omp* gene transcription. **Infection and Immunity**, v.59, p.3040-3045, 1991.
- CARLSSON, NYSTROM, T.; COCK, H. de; BENNICHI, H. Attacin, an insect immune protein: binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer-membrane protein synthesis. **Microbiology**, v.144, p.2179-2188, 1998.
- CARNEIRO, M. S., CAMARGO, L. E. A., COELHO, A. S. G., VENCOSKY, R., LEITE, R. P., STENZEL, N.M., VIEIRA, M.L.C. RAPD-Based Genetic Linkage Maps of Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **Genome**, v.45, n.4, p.670-678, 2002.

- CARVALHO-OKANO, R.M.; VIEIRA, M.F. Morfologia externa e taxionomia. In: BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 33-49.
- CASTRO, A.P.; OLIVEIRA, V.; SANTINI, L.; VIEIRA, M.L.C. Resistência à bacteriose em maracujá amarelo via expressão da proteína heteróloga Atacina A. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18., Florianópolis, 2004. **Anais**. Florianópolis: Centrosul, 2004. p.24-30.
- CHAGAS, C. M. Doenças viróticas e similares do maracujazeiro no Brasil. In: RUGGIERO, C. (Coord.). **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p.175-186.
- CHEN, F. C.; KUEHNLE, A. R Obtaining transgenic *Anthurium* through *Agrobacterium*-mediated transformation of etiolated internodes. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.121, p. 47-51, 1996.
- CHRISTOU, P.; McCABE, D.E.; SWAIN, F. Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. **Plant Physiology**, v.87, p.671-674, 1988.
- COMAI, L.; STALKER, D. Mechanism of action of herbicides and their molecular manipulation. **Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology**, v.3, p.166-195, 1986.
- CHRISTOU, P. Soybean transformation by electric discharge particle acceleration. **Physiologia Plantarum**, v.79, p.163-167, 1990.
- DE BLOCK, J.; BOTTERMAN, J.; VANDERWILE, M.; DOCKX, J.; THOEN, C.; GOSSELE, V.; RAO MOVVA, N.; THOMPSON, C.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. **EMBO Journal**, v.6, p.2513-2518, 1987.

- d'EECKENBRUGGE, G.C. Exploração da diversidade genética das *Passifloras*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., Campos dos Goytacazes, 2003. **Anais**. Campos dos Goytacazes: UENF, 2003. p.32-57.
- DIAS, S. C.; TAKATSU, A. Ocorrência da bacteriose do maracujazeiro (*Passiflora* sp.) causado por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, n.2, p.140, 1987.
- DIAS, S. C.; TAKATSU, A. Variabilidade em *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.13, n.2, p.129, 1988.
- DIAS, S. C.; TAKATSU, A. Translocação de *Xanthomonas campestris* f. *passiflorae* nos tecidos da hospedeira e sua detecção na semente. **Fitopatologia Brasileira**, v.15, n.12, p.131, 1990.
- DICKINSON, L.; RUSSEL, V.; DUNN, P. E. A family of bacteria regulated, cecropin d-like peptides from *Manduca sexta*. **Journal of Biology and Chemistry**, v.263, p.19424-19429, 1988.
- DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Tissue culture studies on species of *Passiflora* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 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**, v.15, p.106-110, 1995.
- DUNWELL, J.M. Transgenic approaches to crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, v.51, p.487-496, 2000.
- DURING, K. Genetic engineering for resistance to bacteria in transgenic plants by introduction of foreign genes. **Molecular Breeding**. V.2, p.297-305, 1996.
- DYE, D.W.; BRADBURY, J.F.; GOTO, M.; HAYWARD, A.C.; LELLIOT, R.A.; SOHRO, M.N. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names of pathotype strains. **Review of Plant Pathology**, v.59, p.153-168, 1980.

- EMBRAPA - **Reunião Técnica:** Pesquisa em maracujazeiro no Brasil. Cruz das Almas (BA): CNPMF, 1998 (Documento, 77).
- ENGSTROM, A.; ENGSTROM, P.; TAO, Z.J.; CARLSSON, A. ; BENNICH, H. Insect immunity; the primary structure of the antibacterial protein attacin f and its relation to two native attacins from *Hyalophora cecropia*. **EMBO Journal**, v.3, p.2065-2070, 1984a.
- FAEMG – Federação da Agricultura e Pecuária do Estado de Minas Gerais. Agronegócio em números – Frutas. <
[http://www.faemg.org.br/agronegocios/Frutasperfil.pdf%20\(2003\)>](http://www.faemg.org.br/agronegocios/Frutasperfil.pdf%20(2003)>) (30 jan, 2004).
- FAGARD, M.; VAUCHERET, H. (Trans)gene silencing in plants: how many mechanisms?. **Annual Review in Plant Molecular Biology**, v.51, p.167-194, 2000.
- FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passion fruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, 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 Cell Developmental Botany**, v.33, p.209-212, 1997b.
- FAYE, I.; PYE, A.; RASMUSON, T.; BOMAN, H. G.; BOMAN, I. A. Insect immunity, 2 simultaneous induction of antibacterial activity and selective synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae of *Hyalophora cecropia* and *Samoa cynthia*. **Infection and Immunity**, v.12, p.1426-1438, 1975.
- FERNANDO, J.A.; MACHADO, S.R.; VIEIRA, M.L.C.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B. Ultra-estrutura da organogênese in vitro de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BOTÂNICA DE SÃO PAULO, 15., Ubatuba, 2004. **Anais**. Ubatuba: SBSP, 2004. p.45.

- FERREIRA, F.R. Germoplasma de espécies frutíferas nativas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., Porto Seguro, 2003. **Palestras**. Porto Seguro: UFBA, 2003. p.105-117.
- FERREIRA, F.R.; OLIVEIRA, J.C. Germoplasma de *Passiflora* no Brasil. In: SÃO JOSÉ, A.R. **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p. 187-200.
- FISCHER, I.H. Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da “morte prematura” do maracujazeiro, causada por *Nectria haematococa* e *Phytophthora parasitica*. Piracicaba, 2004. 54p. Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- FLYG, C.; DALHAMAR, G.; RASMUSOM, B.; BOMAN, H. G. Insect immunity: inducible antibacterial activity in *Drosophila melanogaster*. **Insect Biochem** v.17, 1986. p153-160.
- FOGAÇA-MIRANDA, J.; CAMARGO, L.E.A. Reação de genótipos de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa*) a bacteriose causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., Porto Seguro, 2003. **Anais**. Porto Seguro: UFBA, 2003. p.245.
- FOGAÇA-MIRANDA, J. Reação de variedades de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) a bacteriose causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. Piracicaba, 2004. 54p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- FREIRE, E.; BARROSO, P.A.V.; PENNA, J.C.V; BORÉM, A. Fluxo gênico: análise do caso do algodão no Brasil. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.29, p.104-113, 2002b.
- FREIRE, E. Fluxo gênico entre algodoeiros convencionais e transgênicos. **Oleaginosas e Fibrosas**, v.6, p.471-482, 2002a.

- FRUPEX – EMBRAPA. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção.** Brasília, 1996. 64p.
- FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Protoplastos de plantas: isolamento e regeneração. **Ciência e Cultura**, v. 4, p.1151-1159, 1989.
- GIRGI, M.; KENNEDY, M.M.; MORGENSTERN, A.; MAYER, G.; LORZ, H.; OLDACH, K.H. Transgenic and herbicide resistant pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) R.Br. via microprojectile bombardment of scutellar tissue. **Molecular Breeding**, v.10, p.243-252, 2002.
- GOLDMAN, J.J.; HANNA, W.W.; FLEMING, G.H.; OZIAS-AKINS, P. Fertile transgenic pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) plants recovered through microprojectile bombardment and phosphinothricin selection of apical meristem, inflorescence, and immature embryo-derived embryogenic tissues. **Plant Cell Reports**, v.21, p.999-1009, 2003.
- GOLDMAN, J.J.; HANNA, W.W.; FLEMING, G.H.; OZIAS-AKINS, P. Ploidy variation among herbicide-resistant bermudagrass plants of cv. TifEagle transformed with the *bar* gene. **Plant Cell Reports**, v.22, p.533-560, 2004.
- GONÇALVES, C.R.; ROSATO, Y.B. Genotypic characterization of xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.811- 821, 2000.
- GRISI JÚNIOR, C. Falta de polinização: a principal causa de queda excessiva de flores nos maracujazeiros (*Passiflora edulis flavicarpa*) da região de Votuporanga. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2., Viçosa, 1973. **Anais**. Viçosa: SBF, 1973. p. 427-431.
- HERRERA-ESTRELLA, L. Transgenic plants for tropical regions: some considerations about their development and their transfer to the small farmer. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.96, p.5978-5981, 1999.
- HULTMARK, D. Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. **Trends in Genetics**, v.9, p.178-183, 1993.

- HULTMARK, D.; ENGSTROM, A.; ANDERSSON, K.; STREINER, H.; BENNICH, H.; BOMAN, H.G. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. **EMBO Journal**, v.2, p.571-576, 1983.
- HULTMARK, D.; STEINER, H.; RASMUSON, T.; BOMAN, H. G. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. **European Journal of Biochemistry**, v.106, p.7-16, 1980.
- IFT. Expert report in food technology and foods: benefits and concerns associated with recombinant DNA biotechnology-derived foods. **Food Technology**, v.54, n.10, p.61-80, 2000.
- INFORME AGROPECUÁRIO. **Biotecnologia**. Belo Horizonte, v.21, 2000. 128 p.
- INGLEZ DE SOUZA, J.S.; MELLETI, L.M.M. **Maracujá: espécies variedades e cultivo**. Piracicaba: FEALQ, 1997. 235p.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal – Culturas temporárias e perenes**, v.29; <<http://www.ibge.gov.br>>. (30 jan. 2004).
- JAYNES, J.M.; XANTHOPOULOS, K.G.; DESTÉFANO – BELTRÁN, L.; DODDS, J.H. Increasing bacterial disease resistance in plants utilizing antibacterial genes from insects. **Bioassays**, v.6, p.263-270, 1987.
- JAYNES, J. M.; NAGPALA, P.; DESTEFANO-BELTRAN, L. Expression of a cecropin B lytic peptide analog in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Science**, v.89, p.43-53, 1993.
- JAMES, C. Preview: **Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2003**. ISAAA Briefs, n.30. ISAAA: Ithaca, NY.
- JAMES, C. Preview: **Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2005**. ISAAA Briefs, n.32. ISAAA: Ithaca, NY.

- JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A.; BEVAN, M.W. GUS fusion: the β -glucuronidase as sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, v.6, p.3301-3307, 1987.
- JORGENSEN, P.M.; LAWESSON, J.E.; HOLM-IELSEN, L.B. A guide to collecting passionflowers. **Annals of the Missouri Botany Garden**, St. Louis, v.71, p.1172-1174, 1984.
- JUNQUEIRA, N.T.V.; SHARMA, R.D.; RITZINGER, C.H.S.P. Manejo da bacteriose e de nematóide em maracujazeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., Campos dos Goytacazes 2003. **Anais**. Campos dos Goytacazes: UENF, 2003. p67-84.
- KANG, D.; LUNDSTROM, A.; STREINER, H. *Trichoplusia ni* attacin A, a differentially displayed insect gene coding for an antibacterial protein. **Gene**, v.174, p.245-249, 1996.
- KAWATA, K.; KURYAMA, A. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordial. **Journal of Plant Physiology**, v.147, p.281-284, 1995.
- KIKKERT, J. Biolistic® PSD-1000/HE device. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.33, p.221-226, 1993.
- KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; WU, R.; SANFORD, J.C. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, v.327, p.70-73, 1987.
- KO, K.; NORELLI, J.L.; REYNOIRD, J-P.; BORESJA-WYSOCKA, E.; BROWN, S.K.; ALDWINCKLE, H.S. Effect of untranslated leader sequence of AMV RNA 4 and signal peptide of pathogenesis-related protein 1b on *attacin* gene expression, and resistance to the fire blight in transgenic apple. **Biotechnology Letters**, v.22, p.373-381, 2000.
- KOSUGI, S.; OHASHI, Y.; NAKAJIMA, K.; ARAI, Y. An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. **Plant Science**, v.70, p.133-140, 1990.

- KURODA, N.H. Avaliação do comportamento quanto à resistência de espécies e progênies de maracujazeiro a *Xanthomonas passiflorae* Pereira. Jaboticabal, 1981. 47p. Monografia (Graduação) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.
- LAJOLO, F.M.; NUTTI, M.R. **Transgênicos**: bases científicas da sua segurança. São Paulo, SBAN, 2003. 112 p.
- LEITE, R.A.S.; BLISKA, F.M.M.; GARCIA, A.E.B. Aspectos Econômicos da produção e mercado. In: ITAL, **Maracujá**. Campinas: ITAL, 1994. p.154-176.
- LEITE JR., R.P; WENDLAND, A.; SHIMAMOTO, R.T.; STENZEL, N.M.C. Avaliação do comportamento de espécies e progênies de *Passiflora* a bacteriose causada por *Xanthomonas* sp. pv. *passiflora*. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, Londrina, 1999. **Anais**. Londrina: IAPAR, 1999. p. 56-57.
- LEITE, JR. R. P. Bacteriose do maracujazeiro e estratégias para seu controle. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, 3., Viçosa, 2002. **Anais**. Viçosa: UFV, 2002. p. 97 - 98.
- LIBERATO, J.R.; BARBOSA, L.S.; ROMEIRO, R.S.; COSTA, H. Ocorrência de crestamento bacteriano do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.311, 1993. suplemento.
- LIBERATO, J. R. Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides em maracujazeiro. In: ZAMBOLIM, L. et al. (ed.) **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. v.2, Viçosa, MG: 2002. p.699 - 827.
- LIMA, A.A.; CUNHA, M.A.P. **Maracujá**: produção e qualidade na passicultura, Cruz das Almas: EMBRAPA, 2004. 396 p.
- LOPES, R. Mapas de ligação AFLP e identificação de genes de resistência à *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em maracujá amarelo. Piracicaba, 2003. 115p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

- MALAVOLTA JÚNIOR, V.A. Bacterioses do maracujazeiro. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Maracujá do plantio à colheita**. Jaboticabal: FUNEP, 1998. p. 244-254.
- MALUF, W.R.; SILVA, J.R.; GRATTAPAGLIA, D.; TOMA-BRAGHINI, M.; CORTE, R.D.; MACHADO, M.A.; CALDAS, L.S. Genetic gains via clonal selection in passion fruit *P. edulis* Sims. **Revista Brasileira de Genética**, v.12, p. 833-841, 1989.
- MARTÍN, F.W.; NAKASONE, H.Y. The edible species of *Passiflora*. **Economic botanic**, v.333-343, p.24, 1970.
- MATTA, F.P. Mapeamento de QRL para *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). Piracicaba, 2005. 236p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- MAY, P.G.; SPEARS JÚNIOR, E.E. Andromonoecy and variation in phenotypic gender of *Passiflora incarnata* (*Passifloraceae*). **American Journal of Botany**, v.75, p.1830-1841, 1988.
- McCABE, D.E.; SWAIN, W.F.; MARTINELL, B.J.; CHRITOU, P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. **Bio/Technology**, v.6, p.923-926, 1988.
- MELLETTI, L.M.M; MAIS, L.M. **Maracujá: produção e comercialização**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1999. 62 p.
- MELLETTI, L.M.M.; BRUCKNER, C.H. Melhoramento Genético. In: BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. (Ed.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Estrelas, 2001. p182-215.
- MELLETTI, L.M.M. Comportamento de híbridos e seleções de maracujazeiro (*Passifloraceae*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., Campos dos Goytacazes, 2003. **Anais**. Campos dos Goytacazes: UENF, 2003. p.120-136.

- MELLO, S.L.M.; LOPES, C.A.; TAKATSU, A. Avaliação da virulência de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *versicatoria* no tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.1, p.39-43, 1996.
- MIKI, B.; McHUGH, S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. **Journal of Biotechnology**, v.107, p.193-232, 2004.
- MONTEIRO, M. Transformação genética de maracujá amarelo visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Piracicaba, 2002. 136p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- MURAKAMI, T.; ANZAI, H.; IMAI, S.; SATOH, H.; NAGAOKA, D.; THOMPSON, C.J. The bialophos biosynthetic genes from *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of the gene cluster. **Molecular and General Genetics**, v.205, p.42-50, 1986.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v.8, p.1134-1137, 1980.
- NAKATANI, A.K. Diversidade genética de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* e sensibilidade a produtos químicos. Piracicaba, 2001. 61p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- NANDALEVA, Y.L.; LUPI, C.G.; MEYER, C.S.; DEVI, P.S.; POTRYKUS, I.; BILANG, R. Microprojectile-mediated transient and integrative transformation of rice embryogenic suspension cells: effects of osmotic cell conditioning and the physical configuration of plasmid DNA. **Plant Cell Reports**, v.18, p.500-504, 1999.

- NORELLI, J.; ALDWINCKLE, H. Increasing the fire blight resistance of apple by transformation with genes encoding antibacterial proteins. **Acta Horticulturae**, v.338, p.385-386, 1993.
- NORELLI, J.; MILLS, J.; ALDWINCKLE, H. S. Leaf wounding increases efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. **Hortscience**, v.31, n.6, p.1026-1027, 1996.
- NYSTROM, T.; NEIDHARDT, F. C. Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v.6, p.3187-3198, 1992.
- OLIVEIRA, G.H.N.; SUDO, S.; SILVA, J.R.; KIMURA, O. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* infectando vascularmente plantas de maracujazeiro (*P. edulis* f. *flavicarpa*). **Fitopatologia Brasileira**, v.13, n.2, p.107, 1988.
- OLIVEIRA, J.C. Melhoramento genético de *Passiflora edulis* Sims *flavicarpa* Deg. visando aumento de produtividade. Jaboticabal, 1980. 167p. Tese (Livre-Docência) – Universidade do Estado de São Paulo.
- OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C.; NAKAMURA, K.; BAPTISTA, M. Comportamento de *Passiflora edulis* enxertado sobre *P. giberti* N.E. Brown. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7., Florianópolis, 1983. **Anais**. Florianópolis: SBF, 1984. v.3, p. 989-993.
- OLIVEIRA, J. C.; FERREIRA, F. R.; RUGGIERO, C.; NAKAMURA, K. Caracterização e avaliação de germoplasma de *passifloracea* quanto à morte prematura de plantas. In: CONGRESSO PAULISTA DE FRUTICULTURA, 9., Campinas, 1987. **Anais**. Campinas: SPF, 1987. p.591-596.
- OLIVEIRA, J.C. Melhoramento genético. In; RUGGIERO, C. (Ed). **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p.218-246.

- OLIVEIRA, J.C.; NAKAMURA, K.; MAURO, A.O.; CENTURION, M.A.P. Aspectos gerais do melhoramento do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R. **Maracujá, produção e mercado**. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1994. p.27-37.
- OTAHOLA, V. Regeneración de plantas de parchita (*Passiflora edulis flavicarpa*) a partir del cultivo in vitro de discos de hojas. **Bioagro**, v.12, p.71-74, 2000.
- OTONI, W.C.; BLACKHALL, N.W.; D'ÚTRA VAZ, F.B.; CASALI, V.W.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Somatic hybridization of the *Passiflora* species, *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener. and *P. incarnata* L. **Journal of Experimental Botany**, v.46, n.288, p. 777-785, 1995.
- PADUA, J.G. Análises genéticas de espécies do gênero *Passiflora* L. com base em abordagens filogenéticas, morfométricas e em marcadores microssatélites. Piracicaba, 2004. 112p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- PEREIRA, A.L.G. Uma nova doença bacteriana do maracujá (*P. edulis* Sims) causada por *Xanthomonas passiflorae* n. sp. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.36, n.4, p.163-174, 1969.
- PERUCH, L. A. M.; SCHROEDER, A. L.; BERTOLINI, E.; CALVETTE, K. Ocorrência de mancha oleosa em maracujazeiro no Estado de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p. 237, 1997.
- PIO-RIBEIRO, G.; MARIANO, R. de L. Doenças do maracujazeiro. In: KIMATI, L.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, I.E.A; REZENDE, J.A. (Ed). **Manual de Fitopatologia**, São Paulo: CERES, 1997, p. 525-537.
- PIZA Jr., C.T. A cultura do maracujá na região sudeste do Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., Jaboticabal, 1998. **Anais**. Jaboticabal: Funep, 1998. p.20-48.

- POPELKA, C.J.; XU, J.; ALTPETER, F. Generation of rye (*Secale cereale* L.) plants with low transgene copy number after biolistic gene transfer and production of instantly marker-free transgenic rye. **Transgenic Research**, v.12, p.587-596, 2003.
- POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: assessment and perspectives. **Physiologia Plantarum**, v.79, p.125-134, 1990.
- PRIOLLI, R.H.G. Avaliação morfológica de híbridos entre *Passiflora* spp e comportamento em relação ao nematóide formador de galhas *Meloidogyne incognita* Kofoid, White (1919) Chitwood (1949) raça 1. Jaboticabal, 1991. 88p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo.
- QUECINI, V.M.; VIEIRA, M.L.C. Plantas Transgênicas. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. de. (Coord.). **Biotecnologia na agricultura e agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. cap. 8, p.279-331.
- RAMESH, S.; NAGADHARA, D.; REDDY, V.D.; RAO, K.V. Production of transgenic indica rice resistant to yellow stem borer and sap-sucking insects, using super-binary vectors of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science**, v.166, p.1077-1085, 2004.
- RASCO-GAUNT, S.; RILEY, A.; LAZZERI, P.; BARCELO, P. A facile method for screening for phosphinothricin (PPT)-resistant transgenic wheat. **Molecular Breeding**, v.5, p.255-262, 1999.
- RASCO-GAUNT, S.; RILEY, A.; CANNELL, M.; BARCELO, P.; LAZZERI, A. Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.865-874, 2001.
- RASCO-GAUNT, S.; LIU, D.; LI, C.P.; DOHERTY, A.; HAGEMANN, K.; RILEY, A.; THOMPSON, T.; BRUNKAN, C.; MITCHELL, M.; LOWE, K.; KREBBERS, E.; LAZZERI, P.; JAYNE, S.; RICE, D. Characterization of the expression of a novel constitutive maize promoter in transgenic wheat and maize. **Plant Cell Reports**, v.21, p.569-576, 2003.

- RÊGO, M.M. do; RÊGO, E.R.; BRUCKNER, C.H.; SILVA, E.A.M.; FINGER, F.L.; PEREIRA, K.J.C. Pollen tube behavior in yellow passion fruit following compatible and incompatible crosses. **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, n.5/6, p.685-689, 2000.
- RODRIGUES NETO, J.; SUGIMORI, M.H.; MALAVOLTA Jr., V.A. Infecção natural em *P. alata* por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. **Summa Phytopathologica**, v.10, n.1/2, p.50, 1984.
- RUGGIERO, C.; SÃO JOSE, A. R.; VOLPE, P. A.; OLIVEIRA, J. C.; DURIGAN, J. F.; BAUMGATNER, J. C.; SILVA, J. R.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, M. E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V. de P. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1996. 64p.
- RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J.C. Enxertia do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, 5., Jaboticabal, 1998. **Anais**. Jaboticabal: UNESP, 1998. p.70-92.
- SAVITCI, L.A.; GASPARINO-FILHO, J.; MORETTI, V.A. Identificação do potencial da fruta brasileira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 32., Brasília, 1994. **Anais**. Brasília: Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, 1994, v.2, p.969-979.
- SCHUSTER, M.G. & COYNE, D.P. Survival of plant parasitic bacteria of plants grown in tropics with emphasis on beans (*Phaseolus vulgaris*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.12, n.2, p.117-130, 1977.
- SILVA, M.B. Transformação genética de maracujá amarelo (*passiflora edulis f. flavicarpa* Degener) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Viçosa, 1998. 45p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.
- SILVA-FILHO, M.C.; FALCO, M.C. Plantas transgênicas no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S. de.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos Genéticos e Melhoramento**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.1011-1056.

- SHU, Q.Y.; LIU, G.S.; XU, S.X.; LI, X.F.; LI, H.J. Genetic transformation of *Leymus chinensis* with the *pat* gene through microprojectile bombardment to improve resistance to the herbicide Basta. **Plant Cell Reports**, 2005. <<http://www.springerlink.com/media/6A86VNYRGG2JD7NWDRWQ>> (11 Mar, 2005).
- SMITH, F.D.; JOFRE-GARFIAS, A.; SANFORD, J.C. Transformation of bean apical dome cells by microparticle bombardment. **Phytopathology**, v.82, p.1167-1168, 1992.
- SOMERS, D.A.; MAKAREVITCH, I. Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes?. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p.126-131, 2004.
- SOUZA, J. S. I.; MELLETI, L. M. M. **Maracujá. Espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ, 1997. 179p.
- SRIPAORAYA, S.; MARCHANT, R.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Herbicide-tolerant transgenic pineapple (*Ananas comosus*) produced by microprojectile bombardment. **Annals of Botany**, v.88, p.597-603, 2001.
- SUASSUNA, T.M.F.; BRUCKNER, C.H.; CARVALHO, C.; BORÉM, A. Self-incompatibility in passionfruit: evidence of gametophytic-sporophytic control. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.298-302, 2003.
- SUGIYAMA, M. Genetic analysis of plant morphogenesis *in vitro*. **International Review of Cytology**, v.196, p.67-84, 2000.
- SUN, S.C.; LINDSTROM, I.; LEE, J.Y.; FAYE, Y. Structure and expression of the attacin genes in *Hyalophora cecropia*. **European Journal of Biochemistry**, v.196, p.247-254, 1991.
- TACHIBANA, K.; WATANABE, T.; SEKIZAWA, Y.; TAKEMATSU, T. Accumulation of ammonia in plants treated with bialophos. **Journal of Pesticide Science**, v.11, p.33-37, 1986.

- TACHIBANA, K.; WATANABE, T.; SEKIZAWA, Y.; TAKEMATSU, T. Inhibition of glutamine synthase and quantitative changes of free amino acids in shoots of bialophos- treated Japanese barnyard millet. **Journal of Pesticide Science**, v.11, p.27-31, 1986.
- TAKAHASHI, E.K. Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*) por biobalística. Piracicaba, 2002. 137p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- TASSA, S.O.M.; DUARTE, V. Ocorrência de mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em maracujá (*Passiflora* spp.) no Estado do Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.271, 2001. suplemento.
- THOMPSON, C.J.; RAO MOVVA, N.; TIZARD, R.; CRAMERI, R.; DAVIES J.E.; LAUWEREYS, M.; BOTTERMAN, J. Characterization of the herbicide-resistant bar gene from *Streptomyces hygroscopicus*. **EMBO Journal**, v.6, p.2519-2523, 1987.
- TRINDADE, C.C.; TRINDADE, D.R.; POLTRONIERI, L.S.; ALBUQUERQUE, F.C.; LUCAS, B.L.L. Doenças do maracujazeiro no Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.346-347, 2000. Suplemento.
- VAIN, P.; HARVEY, A.; WORLAND, B.; ROSS, S.; SNAPE, J.W.; LONSDALE, D. The effect of additional virulence genes on transformation efficiency, transgene integration and expression in rice plants using the pGreen/pSoup dual binary vector system. **Transgenic Research**, v.13, p.593-603, 2004.
- VALE, F.X.R., FERNANDES FILHO, E.I., LIBERATO, J.R. Quant – a software to quantify plant disease severity. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT DISEASE EPIDEMIOLOGY, 8., Ouro Preto, 2001. **Anais**. Ouro Preto: International society of plant pathology, 2001, p.160.

- VALOIS, A.C.C.; INGLIS, M.C.V.; CARNEIRO, V.T.C.; SUJII, E.R.; BUSTAMANTE, P.G.; AVIDOS, M.F.D. **Organismos transgênicos: visão estratégica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 1999. 21 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 39).
- VALOIS, A.C.C. **Possibilidades de uso de genótipos modificados e seus benefícios**, Brasília: Embrapa, Informação Tecnológica, 2003. 65 p.
- VASIL, I.K. The science and politics of plant biotechnology – a personal perspective. **Nature Biotechnology**, v.21, p.849-851, 2003.
- VIANNA, G.R.; ALBINO, M.M.C.; DIAS, B.B.A.; SILVA, L.M.; RECH, E.L.; ARAGÃO, F.J.L. Fragment DNA as vector for genetic transformation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Scientia Horticulturae**, v.99, p.371-378, 2003.
- VIEIRA, M.L.C. Hibridação somática em plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.3, p.36-40, 1997.
- VIEIRA, M.L.C. Conservação de germoplasma in vitro. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.14, p.18-20, 2000.
- VIEIRA, M.L.C.; CARNEIRO, M.S. *Passiflora* spp. Passionfruit. In: LITZ, R.E. **Biotechnology of fruit and nut crops**. Trowbridge: Cromwell Press, p.435-453, 2004.
- WENDLAND, A.; UENO, B.; LEITE JÚNIOR, R.P. Avaliação da variabilidade de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* através de características fenotípicas e do perfil de proteínas totais por eletroforeses. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14., Curitiba, 1996. **Resumos**. Curitiba: SBF, 1996, p. 324.
- WILMINK, A.; DONS, J.J.M. Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. **Plant Molecular Biology Reports**, v.11, p.165-185, 1993.
- WOHLLEBEN, W.; ARNOLD, W.; BROER, I.; HILLEMANN, D.; STRAUCH, E.; PUHLER, A. Nucleotide sequence of the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. **Gene**, v.70, p.25-37, 1988.

- WRIGHT, M.; DAWSON, J.; DUNDER, E.; SUTTIE, J.; REED, J.; KRAMER, C.; CHANG, Y.; NOVITZKY, R.; WANG, H.; ARTIM-MOORE, L. Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker. **Plant Cell Reports**, v.20, p.429-436, 2001.
- YANISCH-PEARSON, C.; VIEIRA, J.; MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC 19 vectors. **Gene**, v.33, p.103-119, 1985.
- ZENG, P.; VADNAIS, D.A.; ZHANG, Z.; POLACCO, J.C. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Plant Cell Reports**, v.22, p.478-482, 2004.
- ZHANG, P.; LEGRIS, G.; COULIN, P.; PUONTI-KAERLAS, J. Production of stably transformed cassava plants via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v.19, p.939-945, 2000.