UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ALESSANDRA CRISTINA BOFFINO DE ALMEIDA MONTEIRO-HARA

Transformação genética de maracujazeiro azedo para resistência ao vírus do endurecimento dos frutos (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV)

Piracicaba
2010

ALESSANDRA CRISTINA BOFFINO DE ALMEIDA MONTEIRO-HARA

Transformação genética de maracujazeiro azedo para resistência ao vírus do endurecimento dos frutos (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV)

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Prof. Dra. Beatriz Madalena Januzzi Mendes

Piracicaba
2010

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

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

Monteiro-Hara, Alessandra Cristina Boffino de Almeida
Transformação genética de maracujazeiro azedo para resistência ao vírus do endurecimento dos frutos (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV) / Alessandra Cristina Boffino de Almeida Monteiro-Hara; orientadora Beatriz Madalena Januzzi Mendes. - - Piracicaba, 2010.
76 p.: fig.

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

1. Agrobacterium 2. Genes virais 3. Maracujá 4. Plantas transgênicas 5. Potyvirus 6. Resistência genética vegetal I. Título

CDU 634.776.3:578.864

Ao meu querido marido Eduardo Hara,
pelo incentivo, amor e companheirismo.

Aos meus pais, Manoel Antonio e Maria Cristina,
pelo carinho e apoio.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Beatriz Madalena Januzzi Mendes (CENA/USP) pela oportunidade, confiança e por seus ensinamentos. Sobretudo por sua dedicação, amizade e respeito.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela oportunidade de cursar doutorado em Biologia na Agricultura e Ambiente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao prof. Dr. Jorge A. Marques Rezende (ESALQ/USP) pelo constante apoio e colaboração, bem como pelo seu interesse e disponibilidade durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Ricardo Harakava do Instituto Biológico de São Paulo por toda a atenção, auxílio e grande colaboração durante a elaboração de parte deste trabalho.

Ao prof. Dr. Francisco de Assis A. Mourão Filho (ESALQ/USP) pelo auxílio durante o desenvolvimento das plantas em estufa aclimatizada.

À profa. Dr. Adriana Pinheiro Martinelli (CENA/USP) pela atenção e amizade. Pela valiosa colaboração na fase final deste trabalho.

Aos Viveiros Flora Brasil Ltda. (Araguari, MG) pela concessão de sementes de maracujazeiro da variedade FB-100 e à Dra. Laura M. M. Meletti do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) pela concessão de sementes das variedades IAC-275 e IAC-277.

Ao técnico José Edivaldo Buriolla, do Laboratório de Virologia, do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (ESALQ/USP) pela ajuda durante os trabalhos de inoculação das plantas.

À Dra. Adriana S. Jadão, pelo grande auxílio durante as análises de RT-PCR.

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

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

À equipe da Pós-Graduação, especialmente à Neuda F. de Oliveira, pelo auxílio e atenção.

À secretária Suzineide Maniesco pela ajuda e disponibilidade.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal (ESALQ/USP), Sr. José e Davi, por cuidarem das plantas de maracujazeiro em casa de vegetação.

À bióloga e técnica do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP), Renata B. Cruz, por toda ajuda, disponibilidade e amizade.

À minha grande amiga Liliane C. L. Stipp (Lili), por sua amizade, conselhos e companheirismo. Pela colaboração durante todo o desenvolvimento do meu trabalho, principalmente durante a fase de clonagem da construção *hairpin*.

À amiga Danielle C. Scotton pela grande ajuda e disponibilidade. Pela amizade e divertidas conversas.

Aos amigos e companheiros de trabalho, Ana Paula C. Pinto, Andréa D. Koehler, Eduardo de A. Bressan, Eveline C. da R. Tavano, Fabiana R. Muniz e Leonardo Soriano, pelo auxílio e amizade.

Aos amigos e colegas Alice A. Perez, Amancio J. Souza, Flavio Trevisan, Janaynna Barbosa-Mendes, Luciana Castelotti, Maria Graziela Krug, Vânia Nakano e Waner F. Júnior.

Ao estagiário Tarcísio S. Vasconcellos, pelo auxílio na fase final deste trabalho.

Ao meu querido marido Eduardo Hara, por me incentivar a realizar o curso de doutorado. Por seu constante apoio e valiosa compreensão. Pelo amor, amizade e respeito.

À minha família, principalmente meus pais, Manoel e Maria Cristina, pelo amor, dedicação e apoio constantes.

Aos meus sogros, Nobuo e Helena, pelas palavras de incentivo e apoio, bem como pela amizade e respeito.

À Deus, por tudo!

RESUMO

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

A cultura do maracujazeiro é afetada pela virose causada pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), provocando a redução da qualidade e produtividade dos frutos e, em alguns casos, pode inviabilizar o cultivo comercial desta espécie. Uma alternativa para o controle de doenças viróticas é o desenvolvimento de plantas resistentes pela transformação genética. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de plantas transgênicas de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), utilizando 2 construções gênicas contendo a região codificadora do gene da proteína capsidial do CABMV. A construção pCABMV-asCP, que contém um fragmento na orientação antisenso e a construção pCABMV-dsCP, que contém fragmentos senso e antisenso do gene da proteína capsidial, separados por um íntron, uma construção *hairpin*. Para os experimentos de transformação genética, via *Agrobacterium tumefaciens*, foram utilizados os explantes de segmentos de hipocótilo e discos de folhas jovens das variedades FB-100, IAC-275 e IAC-277. Após 2 - 3 dias de co-cultivo em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo acetosseringona (100 mM), os explantes foram transferidos para meio de cultura de seleção e regeneração constituído de sais minerais e vitaminas de MS, suplementado com canamicina (100 mg/L) + cefotaxima (500 mg/L) + nitrato de prata (4,0 mg/L), pH 5,8 e os reguladores BAP, TDZ e combinação de BAP e TDZ. Após 4 - 6 semanas, as gemas adventícias desenvolvidas foram transferidas para meio de cultura de alongamento MSM + GA_3 (1,0 mg/L) + cefotaxima (500 mg/L) + nitrato de prata (4,0 mg/L). As plantas desenvolvidas foram aclimatizadas e analisadas por PCR, utilizando-se *primers* específicos para a detecção dos transgenes. Foram identificadas 30 plantas transgênicas PCR positivas para do gene *npt*II, sendo 11 positivas para o fragmento antisenso da proteína capsidial do CABMV e 2 positivas para o fragmento da construção gênica *hairpin*. Até o momento, a integração dos transgenes foi confirmada por *Southern blot* em 4 plantas. Paralelo aos experimentos de transformação genética, foram avaliadas plantas de maracujazeiro das variedades IAC-275 e IAC-277, obtidas em experimentos anteriores, com a construção gênica pCABMV-CP, que contém o gene da proteína capsidial do CABMV. A análise de *Southern blot* de 14 plantas destes experimentos, confirmou a integração do transgene em 13 plantas, as quais foram propagadas e inoculadas mecanicamente com 3 isolados do CABMV (SP, RJ, CE). A linhagem T16 foi resistente as 3 inoculações, com os 3 isolados testados. Clones desta linhagem foram analisados por RT-PCR, comprovando a transcrição do transgene.

Palavras-chave: Transgenia. *Agrobacterium. Passiflora edulis* f. *flavicarpa. Potyvirus. Hairpin*

.

ABSTRACT

MONTEIRO-HARA, A. C. B. de A. **Genetic transformation of yellow passionfruit for resistance to woodiness virus (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* – CABMV)**. 2010. 76 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

The yellow passionfruit is affected by *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), which causes a decrease in fruit quality and productivity and in some cases making it unpractical for commercial cultivation of this species. Ann alternative for the control of virus diseases is the development of resistant plants through genetic transformation techniques. The objective of this work was to obtain passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) transgenic plants with two different gene constructs derived from the CABMV coat protein coding region. pCABMV-asCP contains the gene fragment in an antisense direction and pCABMV-dsCP contains a sense and antisense coat protein gene fragments, separated by intron, a hairpin construct. The genetic transformation experiments with *Agrobacterium tumefaciens*, were done in hypocotyl segments and young leaf disks explants from varieties FB-100, IAC-275 and IAC-277. After two to three days in co-culture in MS culture medium (MURASHIGE; SKOOG, 1962) supplemented with acetoseringone (100 mM) the explants were subcultured to medium for selection and regeneration, composed of MS minerals and vitamins, supplemented with kanamycin (100 mg/L), cefotaxime (500 mg/L) and silver nitrate (4.0 mg/L), at pH 5.8, and the growth regulators BAP, TDZ and combination of BAP and TDZ. After four to six weeks, the adventitious buds developed were transferred to an elongating medium composed of MSM salts supplemented with GA_3 (1.0 mg/L), cefotaxime (500 mg/L) and silver nitrate (4.0 mg/L). Plants were acclimatized and analyzed by PCR, with specific primers for the transgenes detection. Thirty transgenic plants were identified as PCR positive for the *npt*II gene, with 11 being positive for the antisense fragment of the CABMV coat protein gene and two positive for the hairpin gene construct fragment. Currently, the transgene integration was confirmed by Southern blot analysis in four plants. Simultaneously to the genetic transformation experiments, passionfruit plants, varieties IAC-275 e IAC-277, obtained from previous experiments with pCABMV-CP, which contains CABMV coat protein gene, were analized. The Southern blot analysis of 14 plants from these experiments confirmed the transgene integration in 13 plants, which were propagated and mecanically inoculated with three CABMV isolates (SP, RJ, CE). Line T16 was resistant to three inoculations with all three isolates tested. Clones from this line were analyzed by RT-PCR which confirmed the transgene transcription.

Keywords: Transgenic. *Agrobacterium. Passiflora edulis* f. *flavicarpa. Potyvirus. Hairpin*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13
2.1 Importância da cultura do maracujazeiro 13
2.2 Transformação genética de plantas para resistência a doenças causadas por vírus 17
2.3 Cultura de tecidos e transformação genética em *Passiflora* 21
3 MATERIAL E MÉTODOS 26
3.1 Material vegetal 26
3.2 Obtenção dos explantes 26
3.2.1 Segmento de hipocótilo 26
3.2.2 Disco de folha..... 26
3.3 Construções gênicas 27
3.3.1 Elaboração da construção gênica pCABMV-dsCP 27
3.3.1.1 Construção do cassete de expressão *hairpin* 27
3.3.1.2 Construção do vetor de expressão *hairpin* 30
3.3.2 Construção gênica antisenso pCABMV-asCP 31
3.3.3 Construção gênica senso pCABMV-CP 32
3.4 Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* com as construções gênicas pCABMV-asCP e pCABMV-dsCP 33
3.4.1 Sensibilidade dos segmentos de hipocótilo ao antibiótico canamicina .. 33
3.4.2 Manutenção e cultivo da *A. tumefaciens* 33
3.4.3 Inoculação e co-cultivo dos explantes com *Agrobacterium* 34
3.4.4 Seleção, regeneração e alongamento das gemas adventícias 34
3.4.5 Aclimatização das plantas 35
3.4.6 Identificação das plantas transgênicas por PCR 35
3.4.7 Análise de *Southern blot* 36
3.5 Análise de plantas obtidas em experimentos anteriores de transformação genética com a construção gênica pCABMV-CP 37
3.5.1 Análise de *Southern blot* 37
3.5.2 Propagação das plantas e avaliação da resistência ao CABMV 38
3.5.3 Extração de RNA e análise da transcrição do transgene por RT-PCR .. 39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 40
4.1 Construção gênica *hairpin* pCABMV-dsCP 40
4.2 Avaliação da sensibilidade dos segmentos de hipocótilo ao antibiótico canamicina 43
4.3 Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* com as construções gênicas pCABMV-asCP e pCABMV-dsCP 45

4.3.1 Experimentos com a construção gênica antisenso pCABMV-asCP 46
4.3.2 Experimentos com a construção gênica *hairpin* pCABMV-dsCP 49
4.3.3 Identificação das plantas transgênicas por PCR 54
4.3.4 Análise de *Southern blot* 56
4.4 Análise de plantas obtidas em experimentos anteriores de transformação genética com a construção gênica pCABMV-CP 58
4.4.1 Análise de *Southern blot* 59
4.4.2 Propagação das plantas e avaliação da resistência ao CABMV 59
4.4.3 Análise da transcrição do transgene por RT-PCR 63
5 CONCLUSÕES 64
REFERÊNCIAS 65

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* apresenta um grande número de espécies economicamente importantes, sendo cultivadas para diferentes fins. Dentro deste gênero, a espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* é a mais cultivada nos pomares comerciais do país, apresentando importância econômica, devido à comercialização dos frutos *in natura* e do suco concentrado. O suco concentrado se destaca no mercado voltado para exportação, principalmente para Holanda, Alemanha e Estados Unidos.

A cultura do maracujazeiro é afetada por diversas doenças causadas por bactérias, fungos e vírus, que podem limitar o cultivo em determinadas regiões produtoras. O endurecimento dos frutos, uma das doenças mais importantes da cultura, é causado pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), o qual é transmitido por afídeos. Esta virose foi facilmente disseminada pelo país provocando perdas significativas na produtividade e qualidade dos frutos (GIORIA et al., 2000). As plantas infectadas apresentam sintomas de mosaico, deformações nas folhas e nos frutos e desenvolvimento reduzido, tornando-se pouco produtivas.

Os métodos de controle são praticamente inexistentes e pouco eficazes pois a transmissão desta virose é do tipo não-persistente, o que torna o controle químico do vetor pouco eficiente. Além disso, nenhuma variedade resistente ao vírus foi identificada no germoplasma do maracujá azedo cultivado. Diante disso, uma alternativa para controle desta virose causada pelo CABMV é a obtenção de plantas resistentes por transformação genética.

A resistência a viroses por transformação genética pode ser obtida utilizando-se o próprio genoma viral, pela introdução e integração de genes ou fragmento de genes do patógeno no hospedeiro. Este princípio é conhecido como resistência derivada do patógeno (PDR - pathogen derived resistance), proposto por Sanford e Johnston (1985). Diversos trabalhos já foram relatados utilizando genes virais para obtenção de plantas resistentes (PROVVIDENTI; TRICOLI, 2002; BUKOVINSZKI et al., 2007). A resistência derivada do patógeno pode ser mediada pela expressão da proteína do transgene ou somente pelo RNA do transgene (TEPFER, 2002).

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

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi a obtenção de plantas transgênicas de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) utilizando 2 construções gênicas, a pCABMV-asCP, contendo um fragmento do gene da proteína capsidial do CABMV na orientação antisenso do CABMV e, a pCABMV-dsCP, contendo fragmentos do gene da proteína capsidial na orientação senso e antisenso, separados por um íntron, uma construção do tipo *hairpin*. Paralelamente aos experimentos de transformação genética, plantas de maracujazeiro das variedades IAC-275 e IAC-277, obtidas em experimentos anteriores de transformação genética, com a construção pCABMV-CP, que contém o gene da proteína capsidial do CABMV (TREVISAN, 2005). As plantas foram avaliadas para a confirmação da integração do transgene e identificação de clones resistentes ao CABMV.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância da cultura do maracujazeiro

O maracujazeiro pertence à família *Passifloraceae* a qual posssui mais de 580 espécies, sendo a maioria destas originárias da América tropical (SOUSA; MELETTI, 1997). Dentre as espécies comestíveis do gênero *Passiflora*, cultivadas comercialmente no Brasil, podemos citar *Passiflora edulis* (maracujá roxo), *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá amarelo ou azedo) e *Passiflora alata* (maracujá doce). Devido a grande diversidade genética, além da importância agrícola para a produção de frutos, o gênero *Passiflora* também tem suas aplicações na indústria farmacêutica e cosmética. Além disso, algumas espécies de *Passiflora* também apresentam potencial ornamental, como *Passiflora caerulea* e *P. incarnata* (PEIXOTO, 2005).

Atualmente, o Brasil é o principal produtor mundial de maracujá, com aproximadamente 44.363 ha de área colhida e produção de 615.196 toneladas, possibilitando a geração de mais de 200 mil empregos diretos e indiretos (RUGGIERO, 2000; MANICA; OLIVEIRA JÚNIOR, 2004; FNP, 2009). As regiões Nordeste e Sudeste são as maiores produtoras, com 377.136 e 152.204 t, respectivamente, destacando os estados da Bahia (207.962 t), Ceará (101.035 t), Espírito Santo (72.079 t), Minas Gerais (42.767 t) e Sergipe (41.919 t) (FNP, 2009). Aproximadamente 60 a 70% da produção comercializada é destinada ao mercado da fruta fresca (RUGGIERO, 2000).

Além da comercialização do fruto *in natura*, o maracujá é comercializado na forma de produto industrializado, como suco concentrado, que possui grande aceitação no mercado internacional. Juntamente com o Brasil, países como Equador, Colômbia e Peru, são grandes produtores e exportadores de suco de maracujá (CANÇADO JÚNIOR; ESTANISLAU; PAIVA, 2000; MANICA; OLIVEIRA JÚNIOR, 2004). Atualmente, as exportações de maracujá podem ocorrer sob a forma de fruta fresca, fruta conservada (congelada) e suco concentrado, destinados principalmente para países europeus e, mais recentemente, para a Argentina e Uruguai, no caso de frutas *in natura*. O mercado voltado para a exportação de suco concentrado apresenta os maiores ganhos em divisas, sendo intensamente comercializado para Holanda,

Alemanha, Estados Unidos, Porto Rico e Japão, os quais importam 76% da produção mundial (LIMA et al., 2006).

O suco é rico em vitaminas A e C e minerais, como cálcio e fósforo. As cascas e as sementes, subprodutos da industrialização do suco, são ricas em aminoácidos, proteínas e carboidratos, e têm sido utilizadas na produção de ração animal. Além disso, pesquisas recentes relatam o uso da casca, em forma de pó ou farinha, para o consumo humano como auxiliar no controle dos níveis de colesterol e açúcar no sangue, por ser um produto rico em pectina (RAMOS et al., 2007; JANEBRO et al, 2008). Compostos químicos fitoterápicos como flavonóides e alcalóides, presentes em espécies de *Passiflora*, principalmente em *P. edulis, P. alata e P. incarnata*, são explorados pela indústria farmacêutica (VASCONCELLOS; SILVA; REIS, 2005).

O maracujazeiro pode ser propagado por sementes ou vegetativamente, por enxertia ou estaquia (GRATTAPAGLIA et al., 1991; SÃO JOSÉ et al., 1994). Na propagação por sementes, devido a polinização cruzada, temos o desenvolvimento de indivíduos diferentes, com consequente formação de lavouras heterogêneas, acarretando diferenças de Brix e coloração do suco, prejudicando o aproveitamento industrial do produto. A propagação vegetativa realizada em programas de pesquisa e melhoramento genético permite a obtenção de plantios mais uniformes e a multiplicação de plantas selecionadas com alta produtividade e rendimento de suco (GRATTAPAGLIA et al., 1991; SOUSA; MELETTI, 1997).

Apesar da importância da cultura para o país, o cultivo comercial do maracujazeiro apresenta problemas fitossanitários que resultam em baixa produtividade. A produtividade média é de 22 - 28 t/ha (FNP, 2007), mas poderia atingir 50 t/ha, com a utilização de sementes melhoradas e tecnologia de produção adequada (MELETTI; MAIA, 1999).

A expansão da área cultivada nos últimos anos e a ausência de tratos culturais adequados resultou no aumento dos problemas fitossanitários, provocando a redução da área de cultivo ou até inviabilizando a produção em determinadas regiões. A cultura é afetada por uma série de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, que podem ser limitantes à produção, exigindo medidas imediatas para reduzir perdas e evitar sua

disseminação (SOUSA; MELETTI, 1997; GOES, 1998; KITAJIMA, 1998; MALAVOLTA JÚNIOR, 1998; SANTOS FILHO; LARANJEIRA, 2004).

As principais doenças causadas por vírus que infectam a cultura do maracujazeiro são: o endurecimento dos frutos (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV), o mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus* – CMV), a pinta verde (Rhabdovirus), o clareamento das nervuras (Rhabdovirus), o mosaico amarelo (*Passionfruit yellow mosaic virus* – PFYMV) e o mosaico do maracujá roxo (*Purple granadilla mosaic virus* – PGMV). Dentre estes, destaca-se o CABMV, uma espécie do gênero *Potyvirus*, da família *Potyviridae*, com partículas do tipo flexuosas (690 - 760 nm de comprimento, 11 - 16 nm de diâmetro), apresentando RNA de fita simples e senso positiva, de aproximadamente 10.000 nucleotídeos. No citoplasma das células infectadas, podem ocorrer inclusões lamelares, típicas dos *Potyvirus* (NOVAES; REZENDE; KITAJIMA, 2000; NASCIMENTO et al., 2006). Até recentemente, acreditava-se que esta virose era causada pelo *Passion fruit woodiness virus* (PWV) porém, atualmente, sabe-se que o agente causal é uma estirpe do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (NASCIMENTO et al., 2006).

A transmissão natural do CABMV ocorre por meio de afídeos, principalmente pelas espécies *Mysus persicae* Sulz. e *Aphis gossypii* Glover, sendo a relação vírus-vetor do tipo não persistente e não circulativa. Entretanto, Piero et al. (2006) observaram formas ápteras e ninfas de *Aphis gossypii* em plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, 100 dias após a inoculação, sugerindo que o afídeo pode colonizar a planta e contribuir para a disseminação do vírus na cultura.

O CABMV não é transmitido por sementes, porém a transmissão mecânica pode ser relativamente fácil (NOVAES; REZENDE; KITAJIMA, 2000; BARBOSA; SANTOS FILHO; LARANJEIRA, 2004). As plantas infectadas apresentam sintomas generalizados de mosaico foliar, podendo aparecer manchas anelares, bolhas, rugosidade e deformações no limbo foliar. Pode ocorrer a redução do tamanho do entrenó, afetando o crescimento da planta. Nos frutos podem ocorrer deformações, com redução do seu tamanho e da polpa, além de apresentarem consistência endurecida (NOVAES; REZENDE; KITAJIMA, 2000). Em plantas infectadas com PWV, Gioria et al. (2000) verificaram danos evidentes relacionados com a redução da área foliar e consequente

redução na produção dos frutos, em quantidade e qualidade, ou seja, ocorreram perdas em número, peso e valor dos frutos produzidos.

O vírus afeta um grande número de espécies do gênero *Passiflora*. Recentemente, Maciel et al. (2009) avaliaram a resistência de dezesseis espécies de *Passiflora* com quatro isolados do CABMV (PA, SP, RJ e CE). Apenas uma espécie selvagem, *P. suberosa*, foi identificada por como sendo resistente ou imune aos quatro isolados do vírus, mesmo quando enxertada em porta-enxerto de *P. edulis* f. *flavicarpa* infectado pelo vírus.

O controle desta virose em maracujazeiro tem sido muito difícil. O plantio de novos pomares próximos a pomares abandonados ou antigos, que podem servir como fonte de inóculo, e a dificuldade de controle dos vetores, podem ser considerados os fatores principais para a disseminação da doença. Além disso, nenhuma fonte de resistência ou tolerância à infecção pelo vírus tem sido encontrada no germoplasma de maracujá azedo cultivado e a pré-imunização, com isolados do PWV, não proporcionou proteção contra estirpes mais virulentas (NOVAES; REZENDE, 2003). Uma alternativa para a eliminação do CABMV em maracujazeiro é a utilização da microenxertia a partir ápices caulinares de plantas infectadas, enxertados em epicótilo e hipocótilo de plantas sadias. Ribeiro et al. (2008) observaram que 180 dias após a realização da microenxertia, 93% das mudas encontravam-se livres de vírus detectável pelo teste ELISA (‘Enzyme Linked Imunosorbent Assay’).

Atualmente, no Brasil, a única maneira de controlar a doença é através de práticas culturais, como o uso de mudas sadias para transplante, eliminação de pomares antigos infectados antes da instalação dos novos, evitar o cultivo intercalado com espécies leguminosas as quais podem ser hospedeiras do vírus e efetuar a retirada de plantas doentes até 5 ou 6 meses após o plantio.

A escassez de variedades de maracujá azedo que associem características desejáveis como alta produtividade, qualidade e homogeneidade dos frutos, além de tolerância ou resistência genética às principais doenças que afetam a cultura, tem sido limitante para melhorar a qualidade e produtividade dos pomares brasileiros (MELETTI; SANTOS; MINAMI, 2000). Diante deste cenário, as técnicas de biologia molecular e

transformação genética apresentam grande importância para a obtenção de plantas resistentes ou tolerantes às doenças, com características agronômicas desejáveis.

2.2 Transformação genética de plantas para resistência a doenças causadas por vírus

A transformação genética de plantas visando resistência a vírus está associada ao conceito da resistência derivada do patógeno (PDR - pathogen derived resistance), proposto por Sanford e Johnston (1985). Os autores propuseram que a resistência do hospedeiro pode ser obtida pela introdução de gene (s) do próprio patógeno no genoma hospedeiro. O desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos e engenharia genética permitiram a identificação, clonagem e introdução de genes do patógeno na planta hospedeira.

A hipótese da PDR tem sido utilizada principalmente para a obtenção de plantas resistentes a vírus, com a produção de plantas transgênicas contendo genes ou fragmentos do genoma viral. A estratégia mais empregada nos trabalhos para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a viroses é baseada no uso do gene da proteína capsidial de vírus (ARAGÃO; FARIA, 2007).

A primeira demonstração do uso da PDR foi feita por Powell-Abel et al. (1986) que obtiveram plantas transgênicas de fumo expressando a proteína capsidial do *Tobacco mosaic virus* (TMV). Neste caso, foi observado que o nível de resistência foi proporcional a quantidade de proteína transgênica acumulada e plantas que apresentaram apenas o acúmulo de mRNA do transgene foram suscetíveis ao TMV.

Plantas transformadas com o gene da proteína capsidial apresentando resistência a vírus já foram descritas para várias espécies, como ameixeira (*Prumus domestica*) para o *Plum pox virus* (PPV) (RAVELONANDRO et al., 2000), abóbora (*Cucurbita pepo*) para o *Squash mosaic virus* (SqMV) (PROVVIDENTI; TRICOLI, 2002) e batata (*Solanum tuberosum*) com o gene da proteína capsidial do *Lettuce mosaic virus* (LMV) obtendo resistência contra o *Potato virus Y* (PVY) (HASSAIRI et al., 1998; BUKOVINSZKI et al., 2007). Abóboras resistentes ao WMV, ZYMV e CMV e a batata

resistente ao PVY já foram licenciadas para a comercialização nos Estados Unidos (ARAGÃO; FARIA, 2007).

Além do gene da proteína capsidial, genes como da replicase (*NIb*), associada a replicação do vírus, e genes expressando proteínas de movimento, também tem sido utilizados nas pesquisas (ARAGÃO et al., 2001; ZHANDONG; SHUANGYI; QIWEI, 2007).

Bag, Singh e Jain (2007) obtiveram plantas transformadas de *Arachis hypogaea* utilizando as construções senso e antisenso do gene da proteína capsidial do *Tobacco streak virus* (TSV). Os autores observaram níveis insignificantes da proteína nas plantas transformadas com a construção antisenso, em contraste com altos níveis da proteína nas plantas transgênicas contendo a construção senso.

A evolução dos trabalhos nesta linha de pesquisa demonstra que nem sempre existe uma correlação entre o nível de expressão da proteína transgênica e o nível de resistência ao patógeno (SANJAYA et al., 2005). Em alguns casos, a resistência é observada mesmo quando a proteína não é detectada, sugerindo que a expressão da mesma não seja essencial para a resistência ao patógeno (NEVES-BORGES et al., 2001). Sabe-se hoje, que as estratégias da PDR estão divididas nas que requerem a expressão da proteína do transgene (protein-mediated resistance) e nas que requerem apenas a transcrição do transgene (RNA-mediated resistance) (SPIELMANN et al., 2000; RITZENTHALER, 2005).

A resistência mediada pela proteína depende da síntese da proteína codificada pelo transgene e normalmente é efetiva para um grande número de estirpes do vírus, mas pode não conferir altos níveis de resistência, estando muitas vezes, associada ao atraso no aparecimento dos sintomas. A resistência mediada pelo RNA é conferida pela degradação de seqüências específicas do mRNA do transgene e do RNA viral, sendo específica para o vírus homólogo ao transgene e conferindo altos níveis de resistência ou imunidade (BEACHY, 1997; TEPFER, 2002).

O uso da resistência mediada pelo RNA para obtenção de plantas resistentes a vírus foi primeiramente descrita por Lindbo et al. (1993), demonstrando ser este um processo relacionado ao silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) com a

degradação do RNA do transgene e do RNA viral no citoplasma (HIGGINS et al., 2004; RITZENTHALER, 2005).

O processo de PTGS é iniciado pela presença de RNA de fita dupla (dsRNA) e desencadeia uma série de eventos moleculares. A dsRNA é reconhecida e clivada por uma enzima específica, Dicer, da família das RNAseIII, e são gerados pequenos fragmentos de 21 - 26 nucleotídeos, os siRNAs (small interfering RNA). Os siRNAs produzidos são incorporados a um sistema complexo de defesa (RISC – RNA-induced silencing complexes), o qual direciona a clivagem do RNA alvo, transformando o RNA em fita simples e degradando o mRNA homólogo (LEE; ROTH, 2003; YU; KUMAR, 2003; LIN et al., 2007).

O PTGS é considerado um componente do sistema de defesa das plantas contra vírus (CHELLAPAN et al., 2004) que pode ser acionado em plantas transgênicas, com construções senso ou antisenso do transgene (CUOZZO, et al., 1988; FANG; GRUMET, 1993; JORGENSEN; ALBRECHTSEN, 2007).

A estratégia utilizando seqüências antisenso da proteína capsidial tem sido empregada para diferentes grupos de vírus. O mecanismo de ação do RNA antisenso pode ocorrer em nível traducional, sendo que a presença de uma seqüência do vírus integrado ao genoma da planta pode silenciar sua própria expressão (ARAGÃO et al., 2001). De forma semelhante, com a utilização de construções antisenso, Praveen, Mishra e Dasgupta (2005) observaram que a obtenção da resistência ocorre pela hibridização complementar do RNA transgene com o RNA viral, formando um híbrido e bloqueando a tradução. Zhandong, Shuangyi e Qiwei (2007) obtiveram sucesso na utilização da construção antisenso para obtenção de plantas resistentes de *Brassica campestris* ssp. *pekinensis*, utilizando o gene antisenso da replicase do TuMV (*Turnip mosaic virus*). Neste caso, as plantas apresentaram alto nível de resistência após a inoculação, pois, o gene antisenso da replicase afeta diretamente a replicação viral, bloqueando a tradução ou degradando o mRNA pelo RNAi. Nesse sentido, resultados positivos também foram obtidos por Mubin et al. (2007) utilizando a orientação antisenso do gene AV2 do ToLCNDV (*Tomato leaf curl New Delhi virus*) para obtenção de resistência em plantas de tabaco, evitando a replicação ou o movimento viral.

De acordo com Chen et al. (2004) a produção de plantas transgênicas com construções gênicas tradicionais senso ou antisenso normalmente resulta na obtenção de um pequeno número de indivíduos expressando o fenômeno de silenciamento gênico.

Uma estratégia para aumentar a eficiência do PTGS e a obtenção de um maior número de plantas transgênicas resistentes é o uso de construções gênicas que possuem cópias do transgene na orientação senso e antisenso, separadas por uma sequência íntron, chamada de construção *hairpin* (SMITH et al., 2000; CHEN et al., 2004; SUSI et al., 2004). Este tipo de construção gênica facilita a produção de RNA de fita dupla (dsRNA) ou RNA *hairpin* (hpRNA), em etapas intermediárias do processo de replicação do vírus, acionando PTGS (WESLEY et al., 2001; WATERHOUSE; HELLIWELL, 2003).

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

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

Dessa forma, a utilização de técnicas para a indução de silenciamento gênico pós-transcricional, visando a obtenção de plantas transgênicas capazes de suprimir a expressão de genes endógenos e ácidos nucléicos ‘exógenos’, constitui uma importante ferramenta biotecnológica para programas de melhoramento de plantas (SOUZA; MENDES; MOURÃO FILHO, 2007).

2.3 Cultura de tecidos e transformação genética em *Passiflora*

O desenvolvimento da cultura de tecidos *in vitro* para *Passiflora* spp permite associar as técnicas de micropropagação, hibridação somática e transformação genética aos programas de melhoramento genético possibilitando a obtenção de plantas com características agronômicas superiores.

O primeiro relato do cultivo *in vitro* em *Passiflora* foi feito por Moran Robles (1978; 1979), cultivando gemas axilares e entrenós de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. mollissima*. Foi observado o desenvolvimento de calos e a multiplicação das plantas foi feita em meio de cultura contendo 2,0 mg/L de cinetina.

A grande maioria dos trabalhos de cultivo *in vitro* e micropropagação foram realizados com *P. edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa* estando relacionados à indução e multiplicação de gemas (BACCARIN, 1988; KANTHARAJAH; DODD, 1990; DREW, 1991; KAWATA et al., 1995; FARIA; SEGURA, 1997a; BIASI et al., 2000; MONTEIRO et al., 2000a; ISUTSA, 2004).

A micropropagação de *P. edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa* foi obtida por Isutsa (2004), utilizando BAP, na concentração de 5 mg/L. O autor relata a importância da adição de ácido giberélico (GA_3) no meio de cultura, favorecendo o alongamento das gemas obtidas. O GA_3, também foi adicionado ao meio de cultura por Monteiro et al. (2000a) visando alongamento das plântulas. Os autores compararam os meios de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e MSM durante a micropropagação de *P. edulis* f. *flavicarpa*, acrescidos de 3,0 mg/L de BAP. As plântulas multiplicadas em meio MSM apresentaram maior crescimento devido a melhores condições nutricionais.

Trabalhos de organogênese em espécies de *Passiflora* a partir de explantes foliares, segmentos internodais e hipocotiledonares foram estudados por diversos autores, onde foi testada a adição de diferentes citocininas no meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), principalmente BAP (6-benzilaminopurina), cinetina e TDZ (thidiazuron) (AMUGUNE; GOPALAN; BYTEBIER, 1993; MONTEIRO; RODRIGUEZ; MENDES, 1996; FARIA; SEGURA, 1997b; PASSOS, 1999; BIASI et al.,

2000; MONTEIRO et al., 2000b; BECERRA; FORERO; GÓNGORA, 2004; TREVISAN; MENDES, 2005; PINTO et al., 2009).

Visando a indução de gemas adventícias a partir de explantes foliares de espécies de *Passiflora* utilizando diferentes reguladores, Monteiro-Hara (2000) obteve a regeneração de plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. suberosa*, quando cultivados em meio contendo BAP. Em *P. alata* pode-se observar apenas a formação de gemas adventícias, que não se desenvolveram em plantas. Este fato também foi observado por Pinto et al. (2009) em discos foliares de *P. alata*, onde as gemas adventícias não se desenvolveram em meio de alongamento. Entretanto, os autores obtiveram sucesso na regeneração de plantas a partir de segmentos de hipocótilo desta espécie. O meio de cultura suplementado com BAP + TDZ foi eficiente para indução das gemas adventícias e desenvolvimento em plantas.

Existem evidências que o acúmulo de etileno nos frascos de cultura *in vitro*, interfere no desenvolvimento de gemas adventícias e plântulas. A adição de inibidores de etileno no meio de cultura favorecendo a regeneração *in vitro* em *P. edulis* f. *flavicarpa* foi estudada por diversos autores (FARIA; SEGURA, 1997b; BARBOSA, 1999). De acordo com Pinto et al. (2009) a adição de nitrato de prata ($AgNO_3$), um inibidor da síntese de etileno, no meio de cultura foi um fator decisivo para promover a organogênese *in vitro* de *P. alata*. Resultados semelhantes foram obtidos por Trevisan e Mendes (2005), onde a indução de gemas adventícias em *P. edulis* f. *flavicarpa* foi superior nos tratamentos contendo TDZ e $AgNO_3$, promovendo maior número de explantes responsivos e maior número de gemas desenvolvidas por explante.

O acréscimo de um precursor de etileno, o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) e de inibidores de etileno, o ácido aminoetoxivinilglicina (AVG) e tiossulfato de prata (STS) no meio de cultura foi avaliado durante desenvolvimento de gemas axilares de *P. edulis* f. *flavicarpa*. O ACC teve efeito marcante sobre as gemas, inibindo o comprimento e expansão foliar, enquanto que AVG e STS estimularam o desenvolvimento e o aumento do número de gemas por explante (REIS et al., 2003).

O efeito da adição de água de coco nos meios de cultura durante as fases de indução e alongamento de gemas adventícias foram relatados por diversos autores (DORNELAS; VIEIRA, 1994; HALL et al.; 2000; TREVISAN; MENDES, 2005; PINTO et

al., 2009). A adição de 10% de água de coco durante a fase de indução promoveu um rápido desenvolvimento de gemas e aumento da porcentagem de explantes responsivos (DORNELAS; VIEIRA, 1994; HALL et al.; 2000), e aumentou consideravelmente o número de gemas alongadas de *P. edulis* f. *flavicarpa* (TREVISAN; MENDES, 2005).

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

Trabalhos de isolamento e cultivo de protoplastos foram relatados para algumas espécies de *Passiflora* por Dornelas e Vieira (1993), d'Utra Vaz et al. (1993), Otoni (1995), Otoni et al. (1995a, b; 1996), Barbosa (1998) e Monteiro (2005). Hibridação somática a partir de eletrofusão de protoplastos isolados de mesófilo de *P. incarnata* + *P. edulis* f. *flavicarpa* foi obtida por Otoni (1995) e entre *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. alata*, *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. amethystina*, *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. cincinnata*, *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. giberti*, e *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. coccinea*, por fusão química por Dornelas et al. (1995).

Além da espécie, tipo de explantes e reguladores testados, a eficiência da regeneração *in vitro* também pode ser influenciada pela idade das plantas doadoras de explantes. A organogênese foi observada com maior intensidade em explantes foliares de plantas com até 2 meses, confirmando maior capacidade morfogenética de tecidos jovens (BECERRA, FORERO; GÓNGORA, 2004).

Estudos histológicos da morfogênese podem ser realizados para caracterizar a via de regeneração, verificar os tipos celulares envolvidos e regiões do explante potencialmente morfogênicas, podendo-se determinar melhores condições de cultivo e estabelecer protocolos eficientes para indução e obtenção de plantas *in vitro* (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; VIEIRA; DORNELAS, 1999; BIASI et al., 2000; LOMBARDI, 2003). A análise histológica de discos de folhas de *P. edulis* f. *flavicarpa* permitiu verificar a formação de áreas meristemáticas na superfície adaxial da nervura central,

promovendo a formação de brotos (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; VIEIRA; DORNELAS, 1999).

A determinação da região ou células responsáveis pela morfogênese torna-se importante em trabalhos relacionados à transformação genética, pois esta é dependente de um protocolo eficiente de regeneração de plantas e da área morfogênica dos explantes. De acordo com Alves (1999) esta área deve ser coincidente com aquela atingida pela transformação genética, independente do método utilizado, seja pela *Agrobacterium* ou por bombardeamento. Explantes hipocotiledonares de *P. edulis* f. *flavicarpa* foram analisados anatomicamente por Fernando et al. (2007). Os autores observaram a regeneração direta e indireta de gemas a partir de meristemóides e protuberâncias formadas nas camadas superficiais do explante e recomendam a utilização do explante de hipocótilo para transformação genética via *Agrobacterium*.

Assim, a disponibilidade de técnicas de cultivo *in vitro* com a regeneração de plantas, permite a associação a programas de melhoramento genético, como trabalhos voltados para a transformação genética.

Diversos trabalhos envolvendo técnicas de transformação genética em *Passiflora* vêm sendo relatados, os quais avaliaram o efeito de antibióticos na regeneração dos explantes, a expressão de genes marcadores e a expressão de genes para resistência a antibióticos (MANDERS et al., 1994; OTONI, 1995b; SILVA, 1998; BRAZ, 1999). Plantas transformadas com a construção antisenso do gene *CMe-Aco1*, inibidor da síntese de etileno, foram obtidas por Quoirin, Winkler e Ayub (2004).

Reis et al. (2007) utilizaram explantes radiculares provenientes de hipocótilo para a obtenção de plantas transformadas de *P. cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa*. Os explantes de hipocótilo foram cultivados com *A. rhizogenes* contendo o gene quimérico *nos-npt*II-*nos*. A regeneração das plantas ocorreu via embriogênese somática a partir das raízes formadas.

Mais recentemente, foram obtidas plantas transgênicas contendo genes de resistência a doenças. Plantas transformadas de *P. edulis* f. *flavicarpa* foram obtidas contendo o gene exógeno *atacina A* (*att*A), por biobalística (TAKAHASHI, 2002) e via *Agrobacterium* (MONTEIRO, 2005), promovendo a resistência à bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Neste trabalho, foram identificadas plantas

PCR positivas para o gene *att*A provenientes de explantes hipocotiledonares, apresentando 11% de eficiência de transformação. Após a inoculação com o patógeno, 32% das plantas não apresentaram sintomas da doença.

Alfenas et al. (2005) obtiveram plantas transgênicas de maracujazeiro expressando um mRNA correspondente a parte dos genes *NIb* (replicase) e *CP* (proteína capsidial) de um isolado do vírus do endurecimento dos frutos de maracujazeiro (CABMV). Dentre as plantas obtidas, apenas uma linhagem apresentou certo grau de resistência ao CABMV, específico para o isolado utilizado (CABMV-MG1). Trevisan et al. (2006) trabalhando com as variedades IAC-275 e IAC-277 confirmaram a integração do gene da proteína capsidial do CABMV, por *Southern blot*, em 7 linhagens regeneradas de experimentos de transformação genética via *Agrobacterium*. As plantas obtidas foram inoculadas com 3 isolados do CABMV e foi possível verificar uma linhagem imune aos 3 isolados testados. Pelas análisse de *Northern blot* e *Western blot* desta linhagem não foi possível detectar a presença do mRNA e da proteína, indicando a ocorrência de silenciamento gênico.

O sucesso destes primeiros trabalhos estimula a avaliação do uso de novas construções gênicas que tem se mostrado eficientes para a obtenção de plantas resistentes a vírus em outros sistemas patógeno-hospedeiro (SMITH et al., 2000; CHEN et al., 2004). Além disso, devido aos problemas de incompatibilidade inerentes da cultura, há necessidade da obtenção de um grande número de plantas transgênicas de maracujazeiro a fim de garantir a polinização, sem comprometer a qualidade dos frutos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, do CENA/USP, no Laboratório de Virologia, do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, da ESALQ/USP, e no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, do Instituto Biológico de São Paulo.

3.1 Material vegetal: foram utilizadas as variedades de maracujá azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), FB 100 (Viveiros Flora Brasil Ldta. – Araguari/MG, fruto para indústria), IAC-275 (Instituto Agronômico de Campinas/SP, fruto para indústria) e IAC-277 (Instituto Agronômico de Campinas/SP, fruto para consumo *in natura*).

3.2 Obtenção dos explantes

3.2.1 Segmento de hipocótilo: os segmentos de hipocótilo (10 mm) foram coletados de plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro*. A assepsia das sementes foi feita em solução de hipoclorito de sódio (cloro ativo 2,5%) em água destilada (1:2), por 20 min. Em seguida, as sementes foram lavadas (4 vezes) com água destilada estéril, em condições assépticas e transferidas para tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). O material foi incubado em ausência de luz, a 27 ± 1 °C, durante 3 - 4 semanas para a germinação das sementes e estiolamento das plantas. Após este período o material foi transferido para condições de fotoperíodo de 16 h e temperatura de 27 ± 1 °C, por 4 - 5 semanas.

3.2.2 Disco de folha: os discos de folhas (6 mm) foram coletados de plantas jovens, obtidas de sementes germinadas em substrato (Plantmax), incubadas sob condições controladas de fotoperíodo e temperatura (16 h de luz / 27 ± 1 °C). A assepsia das folhas foi feita em solução de hipoclorito de sódio (cloro ativo 2,5%), em água destilada, na proporção de 1:3, durante 20 minutos, seguida de 4 lavagens com água destilada estéril, em condições assépticas. Os discos de folhas foram obtidos com auxílio de um vazador de rolha e incubados com a face adaxial em contato com o meio de cultura.

3.3 Construções gênicas

3.3.1 Elaboração da construção gênica pCABMV-dsCP

3.3.1.1 Construção do cassete de expressão *hairpin*

A construção gênica do tipo *hairpin*, foi elaborada utilizando-se um fragmento de 208 pb, contendo a região conservada WCIEN, do gene da proteína capsidial do CABMV - isolado SP (Acesso AY433950). Este fragmento foi amplificado a partir do vetor pCambia 2300-PWV, utilizado por Trevisan (2005), sendo inicialmente clonado no vetor pGEM®-T (Easy Vector Sytems - Promega, Madison, USA). Para a amplificação deste fragmento, foram utilizados *primers* contendo os sítios de restrição para as enzimas *Bst*EII, *Nco*I, *Kpn*I e *Sac*I, visando facilitar a clonagem dos fragmentos no cassete de expressão:

Primer foward: 5' - CCC GGTGACC CCATGG AGACACAGCTCAGCAAATGG - 3'
*Bst*EII *Nco*I

Primer reverse: 5' - CCC GAGCTC GGTACC AGTGTGGGTTTTGCGTTTTC - 3'
*Sac*I *Kpn*I

A reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi realizada com o programa de 2 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C, 30 s a 72 °C, mais 1 ciclo de 7 min a 72 °C. Após a amplificação, o fragmento (Figura 1a) foi purificado do gel de agarose com auxílio do kit 'QIAEX® II Gel Extraction' (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), seguindo-se as orientações do fabricante. Em seguida, o fragmento de 239 pb, correspondente ao gene da proteína capsidial do CABMV (CP) e os sítios de restrição para as enzimas, foi clonado no pGEM®-T (Figura 1b), seguindo as instruções do fabricante. A confirmação da clonagem do fragmento no vetor pGEM®-T foi feita por sequenciamento, onde a reação foi submetida em sequenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems).

Para obtenção do cassete de expressão *hairpin*, utilizou-se o plasmídeo pGEM modificado (pGEM/35S-íntron-NOST) (Figura 1c), contendo o promotor 35S do CaMV (*Cauliflower mosaic virus*), um íntron, o terminador NOST e sítios de restrição para as enzimas.

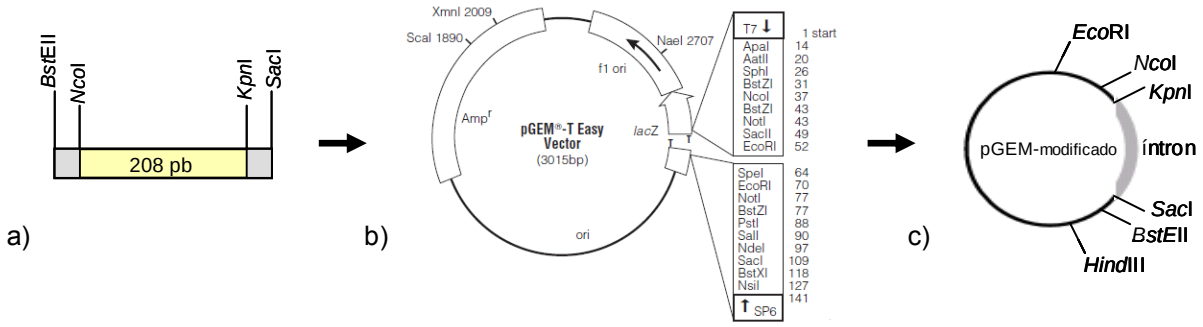

Figura 1 - Etapa inicial da clonagem do cassete de expressão *hairpin*. a) fragmento amplificado do gene da proteína capsidial do CABMV (208 pb), onde foram adicionados os sítios de restrição para as enzimas *Bst*EII, *Nco*I, *Kpn*I e *Sac*I; b) vetor pGEM®-T, onde o fragmento do gene foi inicialmente clonado; c) pGEM modificado (pGEM/35S-íntron-NOST), utilizado para a construção *hairpin*, pCABMV-dsCP. O promotor 35S-P se encontra entre os sítios de restrição das enzimas *Eco*RI e *Nco*I e o terminador NOS-T entre os sítios de restrição das enzimas *Bst*EII e *Hind*III

Para a inserção dos fragmentos de aproximadamente 208 pb no pGEM modificado, foram feitas digestões com as enzimas de restrição *Nco*I e *Kpn*I para a inserção do fragmento na orientação senso e com as enzimas *Sac*I e *Bst*EII, para a inserção do fragmento na orientação antisenso (Figura 2).

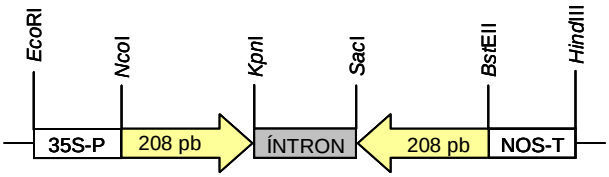

Figura 2 - Esquema do cassete de expressão *hairpin*, contendo o promotor (35S), o íntron, o terminador (NOST) e os sítios de restrição para as enzimas, onde foram clonados os fragmentos do gene da proteína capsidial do CABMV (208 pb)

Para a clonagem do fragmento senso, os vetores pGEM®-T, contendo o fragmento de aproximadamente 208 pb, e pGEM modificado (pGEM/35S-íntron-NOST) foram digeridos com as enzimas *Nco*I e *Kpn*I (2 h, 37 °C). O vetor pGEM modificado foi purificado diretamente pelo kit 'PureLink™ PCR Purification' (Invitrogen - Carlsbad, USA) e o fragmento de interesse (inserto) foi purificado do gel de agarose pelo kit 'QIAEX® II Gel Extraction' (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). A reação de ligação entre o vetor e o inserto foi realizada na proporção de 3:1 (inserto:vetor), utilizando 6 μL de inserto, 2 μL do vetor, 1 μL do tampão (10X) e 1 μL da enzima T4 DNA Ligase (Promega - Madison, USA), durante 16 h, a 16 °C. A reação de ligação foi precipitada em 1 μL de acetato de sódio (3M, pH 5,2) e 11 μL etanol absoluto (13 min, -80 °C), e posteriormente centrifugada (14000 rpm, 20 min, 4 °C). Em seguida, o precipitado foi lavado com etanol 70% (50 μL) e novamente centrifugado (14000 rpm, 5 min, 4 °C). Após a secagem do pellet, adicionou-se 2 μL de água MilliQ estéril. O produto da ligação foi introduzido por eletroporação em 40 μL de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* (DH10B), preparadas segundo Sambrook e Russell (2001).

Após a eletroporação, as células foram colocadas em 1 mL de meio de cultura SOC (S.O.C. medium - Invitrogen), incubando-se por 1 h (160 rpm, 37 °C). A suspensão (200 μL) foi plaqueada em meio de cultura LB (Luria-Bertani - triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 10 g/L, ágar 15 g/L), suplementado com 100 mg/L de ampicilina, sendo incubada por 16 h, a 37 °C. Para a confirmação da inserção do fragmento senso da construção *hairpin*, colônias isoladas de *E. coli* foram analisadas por PCR e pela digestão do plasmídeo purificado com as enzimas *Nco*I e *Kpn*I. A purificação do plasmídeo foi realizada com auxílio do kit 'Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System' (Promega - Madison, USA).

Para a clonagem do fragmento antisenso da construção *hairpin*, os vetores (pGEM-T e pGEM-modificado) foram digeridos com as enzimas *Sac*I (1 h, 37 °C), seguida da digestão com a enzima *Bst*EII (1 h, 60 °C). Após as reações de digestão, foi feita a reação de ligação, na proporção de 3:1 (inserto:vetor), utilizando-se os mesmos procedimentos descritos para a clonagem do fragmento senso. Para a confirmação da inserção do fragmento antisenso, colônias isoladas de *E. coli* foram analisadas pela digestão do plasmídeo purificado (kit 'Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System' - Promega) com as enzimas *Sac*I e *Bst*EII.

Para a confirmação da clonagem do cassete de expressão *hairpin*, construção pCABMV-dsCP, foi feita a digestão do plasmídeo (pGEM-modificado) com a enzima *Eco*RI (1 h, 37 °C) seguida da digestão com a enzima *BstE*II (1 h, 60 °C).

3.3.1.2 Construção do vetor de expressão *hairpin*

O cassete de expressão *hairpin* foi clonado no vetor binário pCambia 2201 (Cambia GPO Box 3200, Camberra ACT 2601, Austrália) (Figura 3). O plasmídeo pCambia 2201 contém bordas esquerda e direita de região de transferência do plasmídeo de *Agrobacterium tumefaciens*, e o gene de seleção *npt*II (neomicina fosfotransferase II), que confere resistência em plantas, ao antibiótico canamicina.

O vetor pGEM modificado, contendo o cassete de expressão *hairpin*, e o vetor binário, foram digeridos com a enzima de restrição *Eco*RI (1 h, 37 °C), seguida da digestão com a enzima *BstE*II (1 h, 60 °C). Os procedimentos seguintes de purificação, ligação e transformação são os mesmos descritos no item 3.3.1.1. Após a eletroporação e crescimento em meio de cultura SOC, a suspensão bacteriana foi plaqueada em meio de cultura LB, acrescido de cloranfenicol (25 mg/L). As colônias isoladas foram selecionadas e analisadas por PCR, utilizando *primers* específicos para a detecção do fragmento do gene da proteína capsidial do CABMV. Para a confirmação da inserção do cassete de expressão *hairpin*, foi feita a extração do plasmídeo com auxílio do kit 'Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System' (Promega), seguida da digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI e *BstE*II.

O plasmídeo pCambia 2201 contendo a construção *hairpin* (pCABMV-dsCP) foi inserido em *A. tumefaciens*, linhagem EHA 105, pelo método do choque térmico (LACORTE; ROMANO, 1998). Após a transformação, as colônias de *A. tumefaciens* foram selecionadas em meio de cultura YEP (peptona 10 g/L, extrato de levedura 10 g/L, cloreto de sódio 5 g/L, ágar 10 g/L), contendo os antibióticos canamicina (100 mg/L) e rifampicina (50 mg/L).

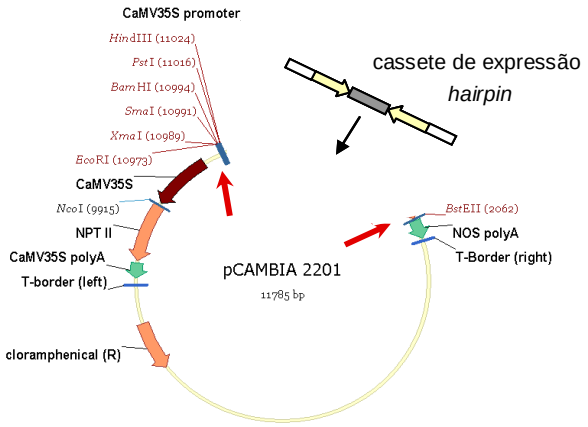

Figura 3 - Clonagem do cassete de expressão *hairpin* no vetor pCambia 2201. O esquema mostra a ligação do cassete de expressão no vetor após a digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Bst*EII

As colônias transformadas foram analisadas por PCR e pela digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Bst*EII para a confirmação da inserção do cassete de expressão *hairpin*. O fragmento de aproximadamente 208 pb, amplificado pela reação de PCR (item 3.3.1.1), foi purificado do gel de agarose ('QIAEX® II Gel Extration Kit' - QIAGEN Gmbh, Hilden, Germany) e quantificado por fluorometria ('Qubit™ Fluorometer' e 'Quant iT™ DNA Assay Kit' - Invitrogen, Carlsbad, USA). Para confirmar a inserção do transgene, correspondente ao fragmento da CP do CABMV (208 pb), no pCambia 2201, o produto de PCR purificado (200 ng) foi submetido ao sequenciamento de nucleotídeos (Macrogen Inc., Seoul, Korea).

3.3.2 Construção gênica antisenso pCABMV-asCP

O cassete de expressão antisenso contém um fragmento de 610 pb do gene CP do CABMV (Figura 4), clonado no plasmídeo pCambia 2201 (Cambia GPO Box 3200, Camberra ACT 2601, Austrália) e inserido em *A. tumefaciens*, estirpes EHA 105 e LBA 4404, pelo método do choque térmico (LACORTE; ROMANO, 1998). A construção pCABMV-asCP foi elaborada no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, do Instituto Biológico de São Paulo, sob a supervisão do Dr. Ricardo Harakava.

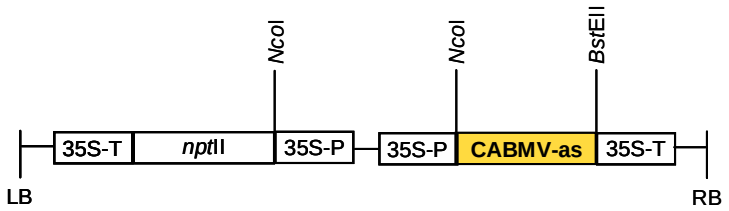

Figura 4 - Esquema da região de transferência (T-DNA) do vetor pCambia 2201*; nptII*: região codificadora do gene de seleção *nptII* (neomicina fosfotransferase II); CABMV-as: fragmento antisenso do gene CP do CABMV (610 pb); 35S-P: promotor constitutivo CaMV-35S; 35S-T: terminador; LB: borda esquerda; RB: borda direita

3.3.3 Construção gênica senso pCABMV-CP

As variedades IAC-275 e IAC-277, obtidas de experimentos de transformação genética contendo a construção gênica pCABMV-CP (TREVISAN, 2005) foram cultivadas e propagadas em casa de vegetação. As plantas foram analisadas por *Southern blot*, por RT-PCR e avaliadas em relação à resistência ao CABMV.

O cassete de expressão da construção pCABMV-CP é constituído pelo gene que codifica a proteína capsidial do CABMV (850 pb), o promotor CaMV35S duplicado e pelo terminador NOST (Figura 5).

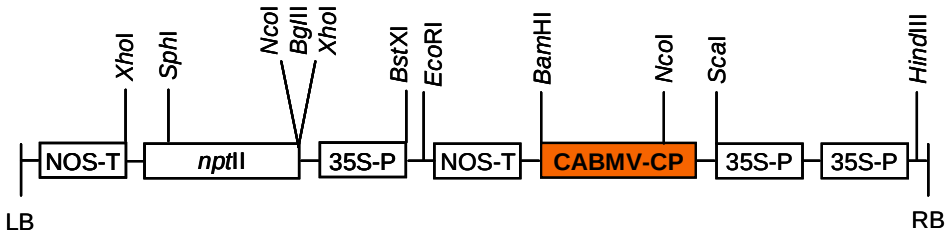

Figura 5 - Esquema da região de transferência (T-DNA) do pCambia 2300-CABMV; *nptII*: região codificadora do gene neomicina fosfotransferase II, CABMV-CP: região codificadora do gene da proteína capsidial do CABMV; 35S: promotor constitutivo CaMV-35S; terminador NOS-T; LB: borda esquerda; RB: borda direita

3.4 Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* com as construções gênicas pCABMV-asCP e pCABMV-dsCP

3.4.1 Sensibilidade dos segmentos de hipocótilo ao antibiótico canamicina

Para iniciar os experimentos de transformação genética com segmentos de hipocótilo, foi feita a avaliação da sensibilidade destes explantes ao antibiótico canamicina. Os explantes foram cultivados em meio de cultura MS, suplementado com benzilaminopurina (BAP - 1 mg/L) e o agente seletivo canamicina em diferentes concentrações (0; 50; 75; 100 ou 150 mg/L). Foram realizadas 5 repetições para cada concentração do antibiótico, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri, contendo 10 explantes. A avaliação foi realizada após 4 semanas de incubação (27 ± 1 °C, em ausência de luz), determinando-se o número de explantes com desenvolvimento de gemas adventícias.

Para os discos foliares, utilizou-se a dose de 100 mg/L de canamicina, conforme relatado por Trevisan (2005).

3.4.2 Manutenção e cultivo da *Agrobacterium tumefaciens*

As linhagens de *A. tumefaciens*, EHA 105 e LBA 4404 contendo o vetor de expressão foram mantidas à temperatura -80 °C, em solução estoque de glicerol (50%). Para a construção pCABMV-asCP foram utilizadas as 2 linhagens e, para a construção pCABMV-dsCP, a linhagem EHA-105. Para uso nos experimentos de transformação genética, as bactérias foram plaqueadas em meio de cultura YEP sólido (peptona 10 g/L, extrato de levedura 10 g/L, cloreto de sódio 5 g/L, ágar 10 g/L), suplementado com canamicina (50 mg/L) e rifampicina (50 mg/L), sendo incubadas a 27 ± 1 °C, por um período de 2 - 3 dias. Após o crescimento das colônias, uma colônia isolada foi transferida para meio de cultura YEP líquido, contendo canamicina (50 mg/L) e rifampicina (50 mg/L), cultivada por 16 h, em agitador orbital (180 rpm, 28 °C). A leitura da absorbância (OD 600 nm) foi feita em espectrofotômetro (BIO-RAD - SmartSpec™ 3000). Em seguida, a suspensão bacteriana apresentando densidade óptica entre 0,5 -

1,0 nm foi centrifugada (4800 rpm, 15 min, 15 °C). O precipitado obtido foi ressuspendido em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), em um volume adequado para obter a concentração de bactérias de 5 x 10^8 CFU/mL.

3.4.3 Inoculação e co-cultivo dos explantes com *Agrobacterium*

Segmentos de hipocótilo (10 mm) e discos foliares (6 mm) foram inoculados com suspensão bacteriana durante 20 min. Em seguida, os explantes foram secos em papel de filtro estéril, incubados em placa de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura MS, suplementado com acetosseringona (100 mM), pH 5,5, cultivados em ausência de luz, à temperatura de 24 °C, por um período de 2 - 3 dias. Os segmentos de hipocótilo foram cultivados em meio de cultura MS contendo benzilaminopurina (BAP - 1 mg/L) e os discos foliares em meio MS acrescido de TDZ (0,25 mg/L).

3.4.4 Seleção, regeneração e alongamento das gemas adventícias

Após o co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio de cultura de seleção, constituído do meio MS suplementado com canamicina (100 mg/L) + cefotaxima (500 mg/L) + nitrato de prata (4,0 mg/L), pH 5,8. Para o cultivo dos discos de folhas, o meio de cultura de seleção foi suplementado com TDZ (0,25 mg/L) ou a combinação de BAP + TDZ (0,8 mg/L + 0,25 mg/L) e os segmentos de hipocótilo foram cultivados em meio de cultura contendo BAP (1 mg/L) ou BAP + TDZ (0,8 mg/L + 0,25 mg/L).

As culturas foram incubadas no escuro, sob temperatura de 27 ± 1 °C, sendo transferidas a cada 2 semanas para meio de cultura fresco. Após 4 - 6 semanas de cultivo, as gemas adventícias desenvolvidas foram identificadas, individualizadas e transferidas para meio de cultura de alongamento MSM (MONTEIRO et al., 2000b), suplementado com ácido giberélico (GA_3 - 1,0 mg/L) e antibiótico (cefotaxima - 500 mg/L). As culturas foram mantidas em sala de luz, sob fotoperíodo de 16 h e temperatura de 27 ± 1 °C, sendo subcultivadas a cada 2 semanas. As plantas

alongadas foram cultivadas em meio de cultura contendo ácido indolbutírico (IBA - 1,0 mg/L) para enraizamento.

Os experimentos de transformação genética foram avaliados após 4 - 6 semanas de cultivo, determinando-se o número de explantes responsivos aos tratamentos. Após este período, as gemas adventícias desenvolvidas foram transferidas para meio de cultura MSM + GA_3 (1,0 mg/L).

3.4.5 Aclimatização das plantas

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

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

As plantas desenvolvidas foram analisadas por PCR para a identificação inicial das plantas transgênicas. As plantas identificadas como PCR positivas para a presença do fragmento do gene da proteína capsidial do CABMV para as construções pCABMV-asCP e pCABMV-dsCP ou positivas para o gene de seleção *npt*II, foram aclimatizadas em casa de vegetação. A extração de DNA foi realizada a partir de tecido foliar jovem, pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990).

Para a amplificação do fragmento de aproximadamente 208 pb da construção pCABMV-dsCP, foram utilizados os *primers* 5' - CCCGGTGACCCCATGGAGACACAGCTCAGCAAATGG - 3' e 5' - CCCGAGCTCGGTACCAGTGTGGGTTTTGCGTTTTC - 3', utilizando o programa de 2 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C, 30 s a 72 °C, mais 1 ciclo de 7 min a 72 °C.

Para a amplificação do fragmento de 610 pb da construção pCABMV-asCP, foram utilizados os *primers* 5' - GGTGACCGCTGGTAGAGTACTTCT - 3' e 5' - CCATGGTGCATATTCTGATTAAC - 3'. A reação de PCR seguiu o programa de 1 ciclo de 2 min a 94 °C e seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C, 40 s a 72 °C e 1 ciclo de 5 min a 72 °C.

A amplificação do fragmento do gene de seleção *npt*II (655 pb), foi realizada com os *primers* 5' - ATTCGCCGCCAAGCTCTT - 3' e 5' - GAGGCTATTCGGCTATGACTGG - 3', seguindo o programa de 1 ciclo de 2 min a 94 °C, seguido de 39 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 62 °C, 40 s a 72 °C e 1 ciclo de 4 min a 72 °C.

Para o controle positivo das reações foram utilizados plasmídeos purificados contendo as construções pCABMV-asCP ou pCABMV-dsCP, ou DNA de planta transformada contendo a construção pCABMV-CP. Como controle negativo, foi utilizado o DNA de plantas não transformadas e água (branco).

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

3.4.7 Análise de *Southern blot*

O DNA total foi extraído pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), a partir de folhas jovens (1,4 g) de plantas aclimatizadas, identificadas como transgênicas por PCR e de plantas não transgênicas, para controle negativo (testemunha). Após a extração, a qualidade do DNA foi avaliada em gel de agarose 0,8%, e a quantificação foi realizada por fluorometria ('Qubit™ Fluorometer' e 'Quant iT™ DNA Assay Kit' - Invitrogen, Carlsbad, USA).

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

Os fragmentos gerados na digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%), transferidos para membrana de nylon 'Amersham Hybond™ - N^+' (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) e fixados a 80 °C, por 2 h. A sonda

utilizada para a detecção do fragmento antisenso gene da proteína capsidial do CABMV ou do gene de seleção *npt*II foram preparadas por PCR, conforme descrito no item 3.4.6. Os fragmentos foram purificados com o auxilio do kit 'QIAEX® II Gel Extration' (QIAGEN Gmbh, Hilden, Germany) e quantificados por fluorometria.

As sondas foram marcadas com a enzima fosfatase alcalina, com auxílio do Kit 'AlkPhos Direct Labelling Reagents' (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). A hibridização foi realizada a 60 °C, durante 16 h. A reação de detecção foi realizada com auxílio do kit 'CDP - Star™ Detection Reagent' (GE Healthcare, UK), seguindo-se as orientações do fabricante. Após a secagem, a membrana foi transferida para filme plástico e colocada em contato com chapa fotográfica (Hyperfilm™ MP - GE Healthcare, UK) durante 1 - 3 h, dentro do cassete fotográfico (Hypercassette™ - Amersham Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Após o período de exposição, a chapa foi tratada com Revelador e Reforçador Kodak GBX (Carestream Health, Inc. Rochester, New York), por 4 min, lavada em água (1 min), em seguida transferida para Fixador e Reforçador Kodak GBX (Carestream Health, Inc. Rochester, New York), durante 14 min e novamente lavada em água (1 min).

3.5 Análise de plantas obtidas em experimentos anteriores de transformação genética com a construção gênica pCABMV-CP

Plantas de maracujazeiro azedo, das variedades IAC-275 e IAC-277, transformadas com a construção gênica pCABMV-CP por Trevisan (2005), foram cultivadas e multiplicadas em casa de vegetação, as quais foram analisadas por *Southern blot* e por RT-PCR e avaliadas em relação a resistência ao CABMV.

3.5.1 Análise de *Southern blot*

O DNA das 14 plantas PCR positivas para o gene da proteína capsidial do CABMV foi extraído pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). Após a avaliação da qualidade do DNA em gel de agarose, foi feita a quantificação por fluorometria ('Qubit™ Fluorometer' e 'Quant iT™ DNA Assay Kit' - Invitrogen, Carlsbad, USA).

Um total de 60 µg de DNA foi digerido com a enzima *Hind*III (16 h, a 37 °C), que corta o T-DNA fora da região do transgene. A sonda utilizada para a detecção do gene da proteína capsidial do CABMV, foi preparada por PCR, utilizando os *primers* 5' - GAAGCTTATGTCTGATGGAAAG - 3' e 5' - GGGATCCTCAGACGCATGGGCA - 3', resultando na amplificação de um fragmento de 850 pb. A reação foi realizada com o programa de 2 min a 94 °C, 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 1 min a 52 °C, 1 min a 72 °C , mais um ciclo de 1 min a 72 °C. Os demais procedimentos da análise foram feitos conforme descrito no item 3.4.7.

3.5.2 Propagação das plantas e avaliação da resistência ao CABMV

As plantas transgênicas contendo a construção pCABMV-CP, variedades IAC-275 e IAC-277, foram cultivadas em casa de vegetação e propagadas por estaquia, para a realização dos testes de avaliação da resistência ao CABMV. Os ramos foram cortados em segmentos, contendo 1 ou 2 gemas axilares e meia folha na extremidade. As estacas, com cerca de 30 - 40 cm, foram cultivadas em vasos, contendo a mistura de substrato (Rendmax - Eucatex) e fertilizante, onde foram mantidas em casa de vegetação.

Para avaliação da resistência das plantas, foram feitas inoculações mecânicas com diferentes isolados do CABMV (SP, RJ e CE). As plantas foram submetidas a 3 inoculações sucessivas, com diferentes diluições, 1:200, 1:100 e 1:50, para verificar a resistência em diferentes pressões de inóculo. Os inóculos foram obtidos pela maceração de folhas infectadas com os respectivos isolados do vírus, em almofariz, na presença de tampão fosfato de potássio (0,02 M, pH 7,0). As inoculações foram feitas em 2 folhas das plantas, previamente polvilhadas com carbureto de silício, totalizando o volume de 200 µL por planta. O inóculo foi aplicado sobre as folhas com auxílio de micropipeta e feita a fricção o com o dedo indicador. Como controles, foram inoculadas plantas não transgênicas, no início e no final da inoculação de todas as plantas.

A avaliação foi realizada após 30 dias da inoculação, com base na observação dos sintomas nas folhas das plantas infectadas.

3.5.3 Extração de RNA e análise da transcrição do transgene por RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*)

O RNA total foi extraído a partir de tecido foliar jovem (60 mg), com o produto comercial TRizol® Reagent (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade do RNA foi avaliada em gel de agarose (1%), e a quantificação foi realizada por fluorometria ('Qubit™ Fluorometer' e 'Quant iT™ RNA Assay kit' - Invitrogen). Após a quantificação, um total de 4 µg de RNA foram tratados com com a enzima DNase, com auxílio do kit RQ1 RNAse-Free DNase (Promega - Madison, USA), de acordo com as orientações do fabricante.

A síntese do cDNA foi realizada com a enzima 'M-MLV Reverse transcriptase' (Invitrogen), seguindo a recomendação do fabricante, utilizando *primers* oligo(dT) (Invitrogen). Aproximadamente 1 µg de RNA tratado foi submetido à reação de transcrição reversa. Para a reação da PCR foram utilizados 2 µL do cDNA sintetizado e *primers* específicos para a detecção do gene da proteína capsidial do CABMV (5' - GAAGCTTATGTCTGATGGAAAG - 3' e 5' - GGGATCCTCAGACGCATGGGCA - 3'). O ciclo da reação de PCR foi descrita no item 3.5.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção gênica *hairpin* pCABMV-dsCP

A elaboração da construção pCABMV-dsCP foi iniciada pela inserção dos fragmentos senso e antisenso do gene da proteína capsidial do CABMV no plasmídeo pGEM modificado (pGEM/35S-íntron-NOST). A inserção do fragmento de 208 pb do gene da CP do CABMV, na orientação senso e antisenso, pode ser verificada pela digestão do vetor com as enzimas *Nco*I e *Kpn*I (Figura 6a) e *Sac*I e *Bst*EII (Figura 6b), respectivamente.

A confirmação da construção do *hairpin* foi observada após a digestão do pGEM modificado (pGEM/35S-íntron-NOST) com a enzima *Nco*I (Figura 6c) liberando um fragmento de aproximadamente 900 pb, correspondente ao conjunto da sequência do íntron e dos fragmentos senso e antisenso da CP do CABMV. Da mesma forma, a digestão do pGEM modificado com as enzimas *Kpn*I e *Bst*EII (Figura 6d), possibilitou a visualização dos fragmentos de 500 pb e de 208 pb, correspondentes ao íntron e ao fragmento do gene de interesse, respectivamente. A Figura 6e mostra a reação de digestão do vetor pCambia 2201 e do pGEM modificado, contendo o cassete de expressão *hairpin*, com as enzimas *Eco*RI e *Bst*EII, para realização da reação de ligação do cassete de expressão *hairpin* no pCambia 2201.

A clonagem do plasmídeo pCambia 2201 contendo a construção pCABMV-dsCP em *Escherichia coli* e *Agrobacterium tumefaciens* pode ser confirmada pelas análises de PCR e pela digestão com as enzimas *Eco*RI e *Bst*EII, como pode ser observado na Figura 7.

Além das confirmações por digestão e por PCR, a presença do fragmento do gene da CP do CABMV na construção gênica pCABMVds-CP também foi confirmada pelo sequenciamento de nucleotídeos.

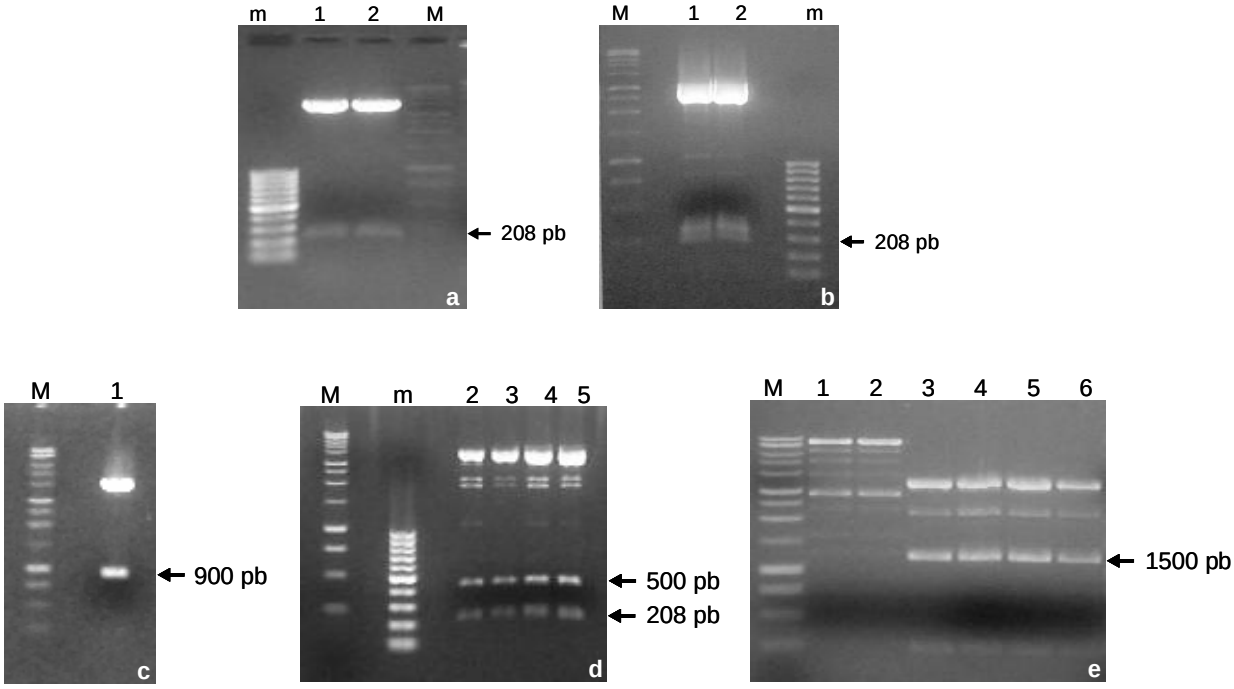

Figura 6 - Construção do cassete de expressão *hairpin* contendo o fragmento de 208 pb do gene da proteína capsidial (CP) do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). a-b) clonagem do fragmento no pGEM®-T Easy Vector Sytems (Promega), digerido com as enzimas *Nco*I e *Kpn*I (a) e *Sac*I e *Bst*EII (b); c-d) digestão do cassete de expressão *hairpin* no pGEM (pGEM/35S-íntron-NOST) com a enzima *Nco*I (c), liberando um fragmento de 900 pb e, digestão com as enzimas *Kpn*I e *Bst*EII (d) para confirmação da inserção dos fragmentos do gene da CP do CABMV (208 pb) senso antisenso, além do íntron (500 pb); e) digestão do vetor binário pCambia 2201 (1-2) e do vetor pGEM modificado contendo o cassete de expressão *hairpin* (3-6) com as enzimas *Eco*RI e *Bst*EII para a reação de ligação. M: marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega); m: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas)

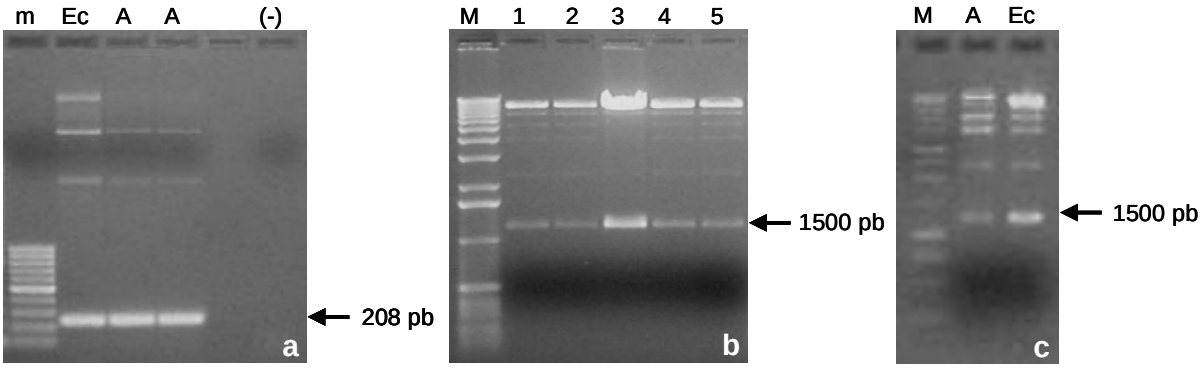

Figura 7 - Plasmídeo pCambia 2201 contendo a construção gênica pCABMV-dsCP em *Escherichia coli* (Ec) e *A. tumefaciens* (A). a) reação de PCR de plasmídeo purificado das colônias transformadas, utilizando *primers* específicos para amplificação do fragmento do gene da CP do CABMV (208 pb); (-) controle negativo: água. b-c) reação de digestão dos plasmídeos em *E. coli* (1-5) e em *A. tumefaciens* (A) com as enzimas *Eco*RI e *Bst*EII, liberando um fragmento de aproximadamente 1500 pb. m: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas). M: marcador de peso molecular de 1 Kb, Invitrogen (b) e Promega (c)

A sequência de nucleotídeos de 208 pb (Figura 8a) clonada na construção pCABMV-dsCP, foi analisada pelo programa BLAST apresentou 92 - 96% de identidade com a sequência correspondente ao fragmento da CP de diferentes isolados brasileiros do CABMV (Figura 8b).

a)

5' - AGACGACGGCTCGAGCGAAATGGTTTGAAGCCGATTAAAGGAGAGTACGAGCT
GGACGAAGACGAAGATGGGTGTTATCATGAATGGGTTCATGGTTTGGTGCATTG
AAAATGGAACTTCGCCTGATGTGAATGGAGTGTGGACAATGATGGATGGGGACG
AGCAAGTGGAATTTCCGCTCAAGCCCATCGTGGAAAACGCAAAACCCACACT - 3'

b)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AY433950.1	Cowpea aphid-borne mosaic virus strain CABMV-SP coat protein mI	344	344	86%	1e-91	96%
AY253911.1	Cowpea aphid-borne mosaic virus isolate SE1 polyprotein mRNA, pa	344	344	86%	1e-91	96%
AY434454.1	Cowpea aphid-borne mosaic virus strain CABMV-M3 coat protein ge	316	316	86%	3e-83	93%
AY505342.1	Cowpea aphid-borne mosaic virus strain F-144 polyprotein mRNA, p	305	305	86%	6e-80	92%
AY433951.1	Cowpea aphid-borne mosaic virus strain F-101 coat protein mRNA,	305	305	86%	6e-80	92%
AY433952.1	Cowpea aphid-borne mosaic virus strain CABMV-M2 coat protein mI	300	300	86%	3e-78	92%

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

Figura 8 - Análise de sequenciamento. a) sequência de nucleotídeos de 208 pb do transgene; b) valores de identidade da sequência de nucleotídeos do transgene com diferentes isolados do CABMV

4.2 Avaliação da sensibilidade dos segmentos de hipocótilo ao antibiótico canamicina

A análise dos dados apresentados na Tabela 1 permite verificar que os segmentos de hipocótilo de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) se mostraram sensíveis à presença do antibiótico (Figura 9), após 4 semanas de cultivo em meio de cultura MS + BAP (1,0 mg/L), suplementado com diferentes concentrações de canamicina.

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

Canamicina (mg/L)	Nº de explantes com gemas / Nº total de explantes
0	8/10
50	1,8/10
75	0,6/10
100	0,4/10
150	0/10

O desenvolvimento de gemas adventícias foi inibido na menor dose testada (50 mg/L), reduzindo gradativamente até a dose de 150 mg/L, sendo que na concentração de 100 mg/L, apenas 0,4% dos explantes apresentaram regeneração de gemas. Verificou-se que a dose de 150 mg/L não promoveu a formação de gemas adventícias nos explantes, porém, foi observada necrose acentuada dos explantes neste tratamento. Dessa forma, para os experimentos de transformação genética, o meio de cultura de seleção e regeneração foi suplementado com canamicina, na concentração de 100 mg/L. Esta dose de antibiótico também foi relatada por Trevisan (2005), para discos foliares e por Reis et al. (2007) para explantes de hipocótilo de maracujazeiro.

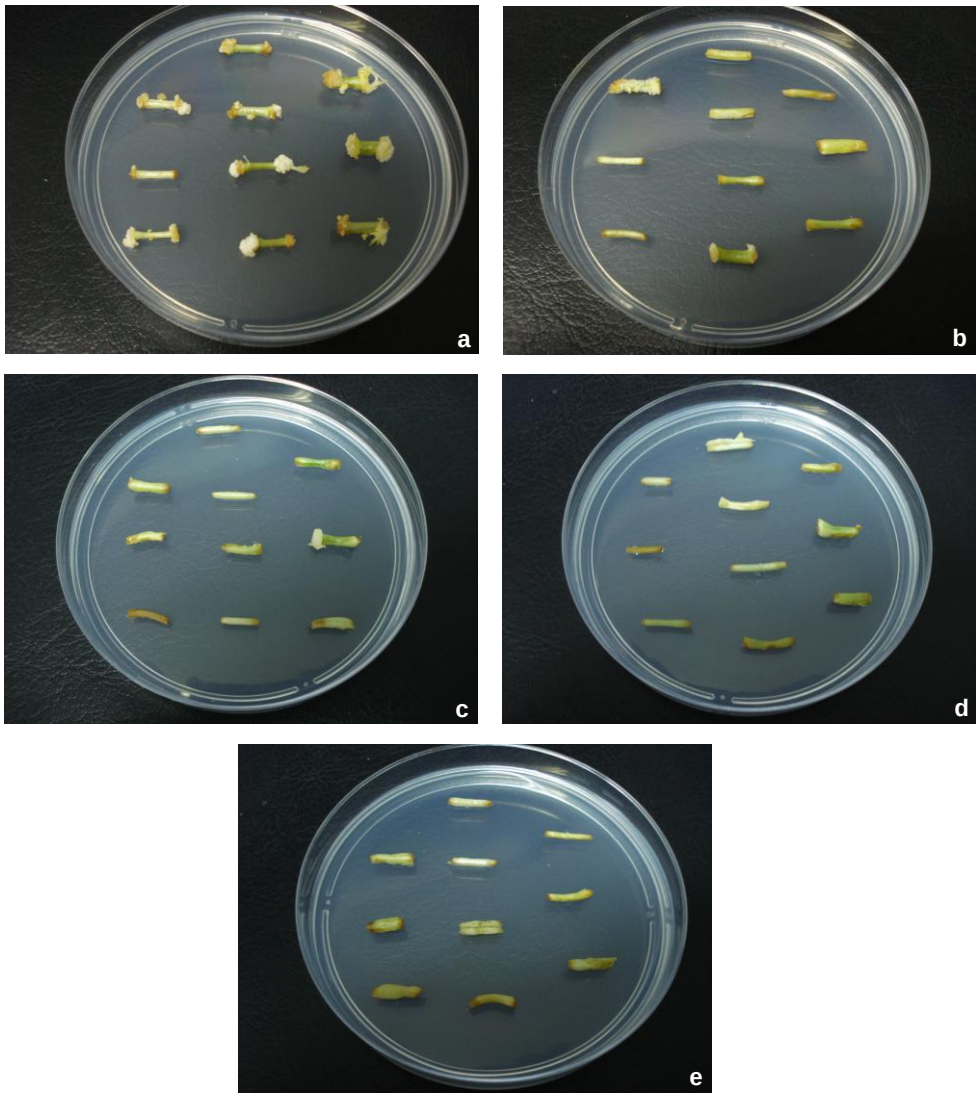

Figura 9 - Avaliação da sensibilidade dos segmentos de hipocótilo ao antibiótico canamicina, após 4 semanas de cultivo em meio de cultura MS acrescido de BAP (1,0 mg/L). a) regeneração de gemas adventícias na ausência de antibiótico; b-e) redução ou ausência de indução de gemas adventícias, nos tratamentos com adição de 50 (b), 75 (c), 100 (d) e 150 (e) mg/L de canamicina

4.3 Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* com as construções gênicas pCABMV-asCP e pCABMV-dsCP

Inicialmente, foram feitos testes preliminares para a indução de organogênese a partir de segmentos de hipocótilo e de discos foliares, da variedade FB-100, em meio de cultura MS contendo BAP (1,0 mg/L). Pela avaliação dos experimentos, verificou-se um maior número de explantes responsivos quando se utilizou dos segmentos de hipocótilo. Estes resultados foram confirmados por aqueles obtidos por Monteiro (2005) para a regeneração de plantas transgênicas de maracujazeiro, utilizando meio de cultura suplementado com BAP (1,0 mg/L), e explantes de hipocótilos.

Estudos anatômicos realizados por Fernando et al. (2007) reforçam a superioridade deste explante para a formação de gemas adventícias e desenvolvimento de plantas, em relação ao disco foliar. Nos segmentos de hipocótilo foi observada a ocorrência de protuberâncias individualizadas, originando maior número de gemas formadas. Portanto, por esses estudos, os experimentos de transformação genética deste trabalho foram inicialmente conduzidos a partir de segmentos de hipocótilo.

Os experimentos de transformação genética utilizando os explantes de hipocótilo apresentaram de forma geral, formação de gemas adventícias após 3 - 4 semanas de incubação, em ausência de luz, em meio de cultura para seleção e regeneração, MS + BAP (1,0 mg/L) + canamicina (100 mg/L) + cefotaxima (500 mg/L) + nitrato de prata (4,0 mg/L), pH 5,8.

Entretanto, com a evolução dos experimentos de transformação genética com a variedade FB-100, verificou-se um número reduzido de explantes responsivos e, consequentemente, número reduzido de plantas PCR positivas, em relação ao número de explantes introduzidos. Diante desta dificuldade, visando otimizar o processo de transformação genética, foram feitas alterações no meio de cultura de seleção e regeneração, no tipo de explante e nas variedades utilizadas.

Para a variedade FB-100, além dos explantes de hipocótilo, foram também testados discos foliares. Os dois tipos de explantes, segmentos de hipocótilo e discos de folhas, foram testados para as variedades IAC-275 e IAC-277, incubados sob combinações dos reguladores BAP e TDZ, ou somente TDZ.

Para a indução da organogênese nos experimentos de transformação genética, foram feitas modificações nas combinações e concentrações dos reguladores vegetais utilizados no meio de cultura. Os segmentos de hipocótilo das 3 variedades foram cultivados com BAP + TDZ (0,8 mg/L + 0,25 mg/L) e os discos foliares cultivados em meio de cultura contendo TDZ (0,25 mg/L) ou com a combinação BAP + TDZ (0,8 mg/L + 0,25 mg/L). A realização dos experimentos de transformação genética utilizando discos de folhas cultivados em meio de cultura suplementado com TDZ (0,25 mg/L) foi baseada no sucesso do trabalho realizado por Trevisan (2005).

Os experimentos de transformação genética de 1 - 9 (Tabela 2), com a construção pCABMV-asCP e os experimentos de 1 - 15 (Tabela 3), com a construção pCABMV-dsCP, foram realizados utilizando-se meio de cultura de seleção e regeneração suplementado de BAP (1,0 mg/L). O meio de cultura contendo BAP + TDZ (0,8 mg/L + 0,25 mg/L) foi utilizado nos experimentos de 10 a 17 (Tabela 2) e nos experimentos 16 a 21 e 27, 28, 31 e 33 (Tabela 3). Os tratamentos contendo apenas TDZ (0,25 mg/L) foram utilizados para o cultivo de discos foliares nos experimentos 18 a 25 (Tabela 2) e nos experimentos 22 a 26, 29, 30, 32, 34 a 36 (Tabela 3).

4.3.1 Experimentos com a construção gênica antisenso pCABMV-asCP

Como pode ser observado na Tabela 2, foram realizados 25 experimentos de transformação genética com a construção pCABMV-asCP. Foram introduzidos um total de 4355 explantes, sendo 3475 segmentos de hipocótilo e 880 discos foliares. Foram obtidos 582 explantes responsivos, os quais resultaram em 40 plantas, sendo 37 analisadas por PCR. Até o momento, pelas análises de PCR, foram obtidas 11 plantas PCR positivas para o fragmento antisenso do gene da proteína capsidial do CABMV (610 pb).

Apesar das modificações realizadas nos experimentos de transformação genética, a alteração do tipo de explante utilizado, não apresentou os resultados esperados. Os experimentos contendo discos foliares cultivados em meio de cultura, suplementado com BAP + TDZ (0,8 mg/L + 0,25 mg/L), ou TDZ (0,25 mg/L), não foram responsivos para as das 3 variedades testadas. Embora tenham sido obtidos 17 explantes responsivos, de um total de 880 discos, não foi observado o desenvolvimento

de plantas. No caso da variedade FB-100, os resultados preliminares já haviam demonstrado a baixa porcentagem dos discos foliares responsivos. Os dados obtidos neste trabalho (Tabela 2), diferem dos resultados descritos por Trevisan (2005), nos experimentos de transformação genética para as variedades IAC-275 e IAC-277. O autor constatou o desenvolvimento de gemas adventícias a partir de discos foliares, cultivados em meio de cultura suplementado com TDZ (0,25 mg/L). Esta diferença pode estar relacionada às condições fisiológicas das plantas utilizadas para a coleta dos explantes e ao número de experimentos realizados.

Tabela 2 - Experimentos de transformação genética de *P. edulis* f. *flavicarpa*, utilizando os explantes de segmentos de hipocótilo e discos foliares das variedades FB-100, IAC-275 e IAC-277, com a construção pCABMV-asCP

Explante	Variedade	Experimentos	N° explantes responsivos/ N° total de explantes	N° plantas obtidas/ N° plantas analisadas	N° plantas PCR +		Eficiência de transformação (%)
					K+	As+	
Segmento de hipocótilo	FB-100	1■	65/360	3/3		1	0,27
		2■	47/360	1/1		1	0,27
		3■	49/440	3/3			-
		4■	15/164	2/2		2	1,21
		5■	36/219	5/5	1	1	0,91
		6■	31/241	5/5		2	0,83
		7■	25/210	2/2 +		1	0,47
		8■	26/406	3/3	1	1	0,50
		9■	32/225	3/3		1	0,44
		10◇	36/182	7/5* +	1	1	1,09
		14◇	108/234	2/2 +			
		15◇	31/144	2/1 +			
		16◇	20/105	0			-
		17◇	44/185	2/2 +			
		Subtotal	565/3475	40/37	3	11	0,66
Disco de folha	FB-100	11◇	4/133	0			-
		12◇	0/165	0			-
		13◇	0/132	0			-
		18•	0/60	0			-
		19•	4/61	0			-
		20•	1/54	0			-
	IAC 275	21•	0/53	0			-
		23•	1/49	0			-
		25•	3/50	0			-
	IAC 277	22•	2/78	0			-
		24•	2/45	0			-
		Subtotal	17/880				
Total			582/4355	40/37	3	11	0,66

■ meio de cultura de seleção suplementado com BAP (1,0 mg/L).

◇ meio de cultura de seleção suplementado com BAP + TDZ (0,8 mg/L + 0,25 mg/L).

• meio de cultura de seleção suplementado com TDZ (0,25mg/L).

* perda da planta em fase de aclimatização, antes da análise.

+ plantas em fase de alongamento, não analisadas.

K+: plantas PCR positivas para o gene *npt*II.

As+: plantas PCR positivas para fragmento antisenso do gene da CP do CABMV.

Nos experimentos de 1 - 9, realizados com o meio de cultura MS + BAP (1,0 mg/L), foram introduzidos 2625 segmentos de hipocótilo, apresentando 326 explantes responsivos que resultaram no desenvolvimento de 27 plantas, até o momento. Os experimentos 10, 14 - 17, realizados com meio de cultura contendo BAP + TDZ (0,8 mg/L + 0,25 mg/L), do total de 850 explantes introduzidos, 239 foram responsivos, sendo obtidas, até o momento, 13 plantas . Para os explantes de segmentos de hipocótilo, a alteração do meio de cultura de seleção e regeneração contendo BAP (1,0 mg/L) para o meio de cultura suplementado com BAP + TDZ (0,8 mg/L + 0,25 mg/L) foi positiva. Neste meio de cultura, os explantes mostraram-se mais responsivos, com porcentagem de formação de gemas de 28,1%, experimentos 10, 14 - 17 (Tabela 2), enquanto os explantes cultivados em meio de cultura acrescido de BAP (1,0 mg/L) apresentaram 12,4% de explantes responsivos. Em *Passiflora alata*, a combinação dos reguladores BAP e TDZ foi eficiente para o desenvolvimento de gemas adventícias utilizando segmentos de hipocótilo, apresentando 26,6 - 37,2% de explantes responsivos, após 4 semanas de cultivo (PINTO et al., 2009).

Os experimentos realizados com os segmentos de hipocótilo cultivados em meio de cultura contendo BAP + TDZ (1,0 mg/L + 0,25 mg/L) mostraram, até o momento, maior porcentagem de plantas obtidas em relação ao número de explantes responsivos. Dessa forma, pode-se afirmar que, pelos resultados obtidos, os tratamentos contendo a combinação de BAP + TDZ promoveram um maior número de plantas que se desenvolveram em meio de alongamento (1,5%) em relação àqueles contendo BAP (1,0%).

Ainda estão em fase de alongamento, 31 plantas obtidas dos experimentos de transformação genética (7, 10, 14, 15 e 17) contendo a construção pCABMV-asCP, que posteriormente serão analisadas por PCR. Em casa de vegetação estão sendo cultivadas 12 plantas, das quais 7 foram analisadas por *Southern blot*.

4.3.2 Experimentos com a construção gênica *hairpin* pCABMV-dsCP

A Tabela 3 mostra os experimentos de transformação genética realizados com a construção gênica *hairpin*, pCABMV-dsCP. Foram realizados 36 experimentos, totalizando 5904 explantes introduzidos, sendo 4458 segmentos de hipocótilo e 1446 discos foliares. Foram observados 548 explantes responsivos, dos quais foram obtidas 42 plantas, sendo 29 analisadas por PCR para a identificação do transgene. Pelas análises de PCR, 14 plantas apresentaram amplificação do gene *npt*II e 2 plantas amplificaram o fragmento do gene da CP do CABMV (208 pb).

Assim como os experimentos realizados com a construção pCABMV-asCP (Tabela 2), os experimentos realizados com a construção pCABMV-dsCP, utilizando-se discos foliares, foram pouco responsivos (Tabela 3). De um total de 1446 explantes introduzidos, foram observados 53 explantes responsivos, que originaram 6 plantas das variedades FB-100 e IAC-277, provenientes dos tratamentos contendo meio de cultura com BAP + TDZ (0,8 mg/L + 0,25 mg/L) e TDZ (0,25 mg/L), correspondentes aos experimentos 32, 34 e 36. Estas plantas estão em fase de alogamento e não foram analisadas.

Pela análise dos dados da Tabela 3, o cultivo dos explantes de segmentos de hipocótilo, da variedade FB-100, em meio de seleção e regeneração, suplementado com BAP + TDZ (0,8 mg/L + 0,25 mg/L), permitiu a obtenção dos melhores resultados para a indução de gemas adventícias. Para estes experimentos, foram introduzidos 760 explantes, sendo 115 responsivos (15%) e 11 plantas foram obtidas (1,4%). Para os experimentos contendo o meio de cultura acrescido de BAP (1,0 mg/L) da variedade FB-100, foram introduzidos 3350 segmentos de hipocótilo, 238 foram responsivos (7,1%), sendo obtidas 31 plantas até o momento (0,9%). O cultivo dos segmentos de hipocótilo em meio de cultura contendo BAP (1,0 mg/L) apresentou menor porcentagem de explantes responsivos e de plantas desenvolvidas, semelhante aos resultados obtidos na Tabela 2, utilizando a construção gênica pCABMV-asCP.

Tabela 3 - Experimentos de transformação genética de *P. edulis* f. *flavicarpa*, utilizando os explantes de segmentos de hipocótilo e discos foliares das variedades FB-100, IAC-275 e IAC-277, com a construção pCABMV-dsCP

Explante	Variedade	Experimentos	N° explantes responsivos/ N° total de explantes	N° plantas obtidas/ N° plantas analisadas	N° plantas PCR +		Eficiência de transformação (%)
					K+	Hp+	
Segmento de hipocótilo	FB-100	1■	4/273	0			
		2■	2/184	2/2		1	0,54
		3■	2/320#	1/0*			-
		4■	36/362	1/1	1		0,27
		5■	23/237	0			-
		6■	14/248	0			-
		7■	8/243	0			-
		8■	11/234	2/2	2		0,85
		9■	50/238	14/9* +	6		2,52
		10■	16/233	4/3*	2		0,85
		11■	1/210#	-			-
		12■	8/197	1/1	1		0,50
		13■	7/150	3/3 +	0		-
		14■	33/118	0			-
		15■	23/103	3/3	0		-
		16◇	34/232	10/5 +	2	1	1,30
		20◇	19/145	1/0* +			-
		21◇	28/141	+			-
		33◇	34/242	+			-
	IAC 275	28◇	45/137	+			-
		31◇	54/109	+			-
	IAC 277	27◇	43/102	+			-
		Subtotal	495/4458	42/29	14	2	0,97
Disco de folha	FB-100	17◇	6/163	0			
		18◇	0/180	0			
		19◇	0/190	0			
		22•	0/73	0			
		23•	8/90	0			
		24•	0/73	0			
		25•	0/65	0			
		26•	1/82	0			
		36•	1/60	+			-
	IAC 275	30•	8/80	0			
		35•	2/80	0			
	IAC 277	29•	8/74	0			
		32•	2/87	+			-
		34•	17/149	+			-
		Subtotal	53/1446				
Total			548/5904	42/29	14	2	0,97

■ meio de cultura de seleção suplementado com BAP (1,0 mg/L).

◇ meio de cultura de seleção suplementado com BAP + TDZ (0,8 mg/L + 0,25 mg/L).

• meio de cultura de seleção suplementado com TDZ (0,25mg/L).

contaminação do experimento.

* perda da planta em fase de aclimatização, antes da análise.

+ plantas em fase de alongamento, não analisadas.

K+: plantas PCR positivas para o gene *npt*II.

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

Estão em fase de alongamento, 36 plantas provenientes dos experimentos de transformação genética (9, 13, 16, 20, 21, 27, 28, 31, 32, 33, 34 e 36), realizados com a construção gênica pCABMV-dsCP, sendo que destas, 6 plantas foram obtidas a partir de discos foliares. Em casa de vegetação, estão sendo cultivadas 14 plantas PCR positivas para o gene da canamicina, das quais 5 foram avaliadas por *Southern blot*.

Foram introduzidos um total de 10.259 explantes nos experimentos de transformação genética, utilizando as construções pCABMV-asCP e pCABMV-dsCP (Tabelas 2 e 3), sendo obtidas 64 plantas, destas, 56 foram aclimatizadas e, 67 plantas encontram-se em fase de alongamento em meio MSM + GA_3 (1,0 mg/L) + cefotaxima (500 mg/L), que serão analisadas posteriormente.

Pela avaliação das Tabelas 2 e 3, pode-se observar que as alterações realizadas no meio de cultura de seleção e regeneração, tipo de explante e variedades utilizadas, não foram eficientes para um aumento significativo no número de plantas desenvolvidas.

Diferenças na resposta morfogênica dos explantes de hipocótilo e de discos foliares foram observadas. A formação das gemas adventícias nos explantes de hipocótilo ocorreu após 3 - 4 semanas de cultivo, acompanhada da proliferação de calo (Figura 10a-b), apresentando desenvolvimento satisfatório em meio de alongamento (MSM + GA_3 + cefotaxima). Nos discos foliares, a formação das gemas adventícias foi observada após 4 - 6 semanas, ocorrendo nas bordas dos explantes (Figura 10c-d) e geralmente, com menor proliferação de calo. De acordo com Trevisan e Mendes (2005) os melhores resultados para indução de organogênese a partir de discos de folhas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, da variedade FB-100, foram obtidos com TDZ (0,25 mg/L), apresentando alta porcentagem de regeneração e elevado número de gemas por explante. Este meio de cultura foi eficiente para obtenção de plantas transformadas utilizando discos foliares (TREVISAN, 2005).

Pelo resultado dos experimentos de transformação genética, foi observado um número reduzido de explantes foliares responsivos, como também, um pequeno número gemas que se desenvolveram no meio de alongamento. Este fato pode ser explicado pelas análises histológicas realizadas por Fernando et al. (2007), durante a

organogênese de explantes foliares e hipocotiledonares de *P. edulis* f. *flavicarpa*, da variedade FB-100. Os autores descrevem a ocorrência da formação de protuberâncias, as quais são responsáveis por originar gemas e primórdios foliares. No caso dos discos foliares, essas protuberâncias perdem a adesão com o tecido, provocando a redução na formação das gemas.

As gemas obtidas, provenientes dos discos foliares e dos segmentos de hipocótilo, foram transferidas para meio de cultura de alongamento (MSM + GA_3 + cefotaxima), sendo subcultivadas para meio fresco a cada 15 dias (Figura 10e). Durante esta fase, um grande número de gemas transferidas para o alongamento não se desenvolveram, reduzindo o número de plantas obtidas. A baixa eficiência no alongamento das gemas adventícias provenientes dos experimentos de transformação genética utilizando discos de folhas, também foi observada por Trevisan (2005).

A média da eficiência de transformação genética, foi de 0,66%, com a utilização da construção gênica pCABMV-asCP (Tabela 2) e 0,97% com a construção pCABMV-dsCP (Tabela 3), embora alguns experimentos tenham apresentado valores de 0,27% e 2,52%, como pode ser observado nos experimentos 4 e 9, da Tabela 3. A eficiência de transformação genética dos experimentos realizados foi obtida calculando-se o número de plantas PCR positivas pelo número total de explantes introduzidos em cada experimento. Valores da eficiência de transformação genética encontrados na literatura são muito variáveis, dependendo de vários fatores, entre eles, da espécie ou variedade e tipo de explante utilizados. Para *P. edulis* f. *flavicarpa*, variedade FB-100, foram encontrados valores de 6 e 11% para discos de folhas e segmentos de hipocótilo, respectivamente (MONTEIRO, 2005) e para discos foliares, das variedades IAC-275 e IAC-277, de 1,8 e 0,3%, respectivamente (TREVISAN, 2005). A variação da eficiência de transformação genética também pode ser observada em outras espécies frutíferas como melancia (*Cucurbita lanatus* cv. 'Crimson Sweet'), de 1,1 a 10,16% (STIPP, 2009) e variedades de laranja doce, como as laranjas 'Hamlin', 'Valência', 'Natal' e 'Pêra' que apresentam eficiência de transformação de 6,2, 5,6, 4,0 e 2,7%, respectivamente (BARBOSA-MENDES, 2007).

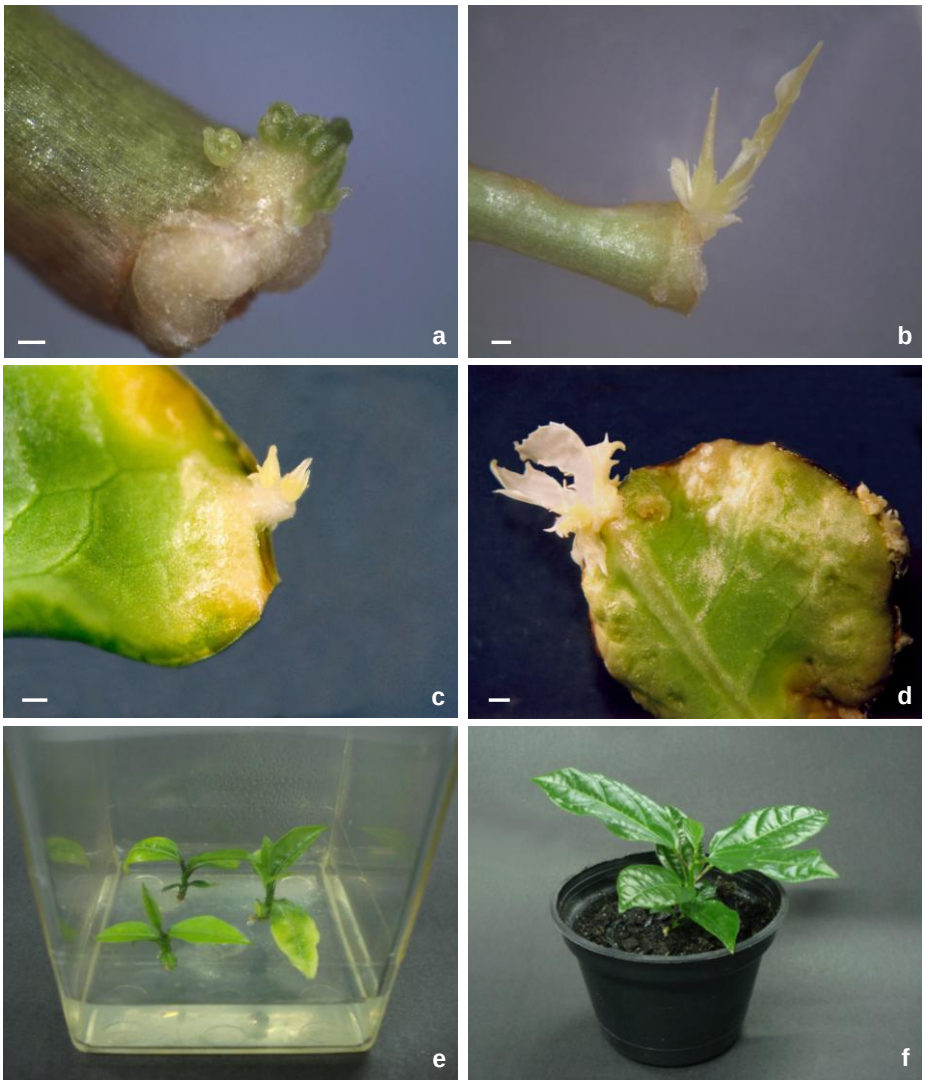

Figura 10 - Organogênese *in vitro* e transformação genética de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* a partir de segmentos de hipocótilo (a-b) e discos foliares (c-d) cultivados em meio de cultura de regeneração e seleção. a) início do desenvolvimento de gemas adventícias na extremidade do explante, após 4 semanas de indução; b) gema desenvolvida; c-d) desenvolvimento de gemas adventícias a partir de discos de folhas após 6 semanas de cultivo; e) alongamento das plantas em meio de cultura MSM + GA_3 + cefotaxima; f) planta aclimatizada. Barras: 500 µm

Após a fase de alongamento, as plantas apresentando 3 - 5 cm foram aclimatizadas, inicialmente em sala climatizada (16 h, 27 ± 1 °C) e, em seguida transferidas para casa de vegetação (Figura 10f). Durante a fase de aclimatização, apenas 8 plantas não sobreviveram ao processo, representando uma perda de 12,5% do número total de plantas obtidas.

4.3.3 Identificação das plantas transgênicas por PCR

Até o momento, 66 plantas provenientes dos experimentos de transformação genética contendo as construções pCABMV-asCP e pCABMV-dsCP foram analisadas por PCR.

Durante o desenvolvimento do trabalho, ocorreram dificuldades para a detecção dos genes de interesse e, como alternativa, foram também utilizados os *primers* específicos para a amplificação do gene de seleção *npt*II. A detecção do gene *npt*II também foi realizada por Quoirin, Winkler e Ayub (2004) para a confirmação da transformação genética em plantas de maracujazeiro contendo a construção antisenso do gene *CMe-Aco1*, inibidor da síntese do etileno.

Dessa forma, a identificação das plantas transformadas foi realizada utilizando-se os *primers* específicos para a detecção do gene *npt*II (Figura 11a-b) e os *primers* específicos para a detecção dos fragmentos do gene de interesse das construções pCABMV-asCP (Figura 11c) e pCABMV-dsCP (Figura 11d).

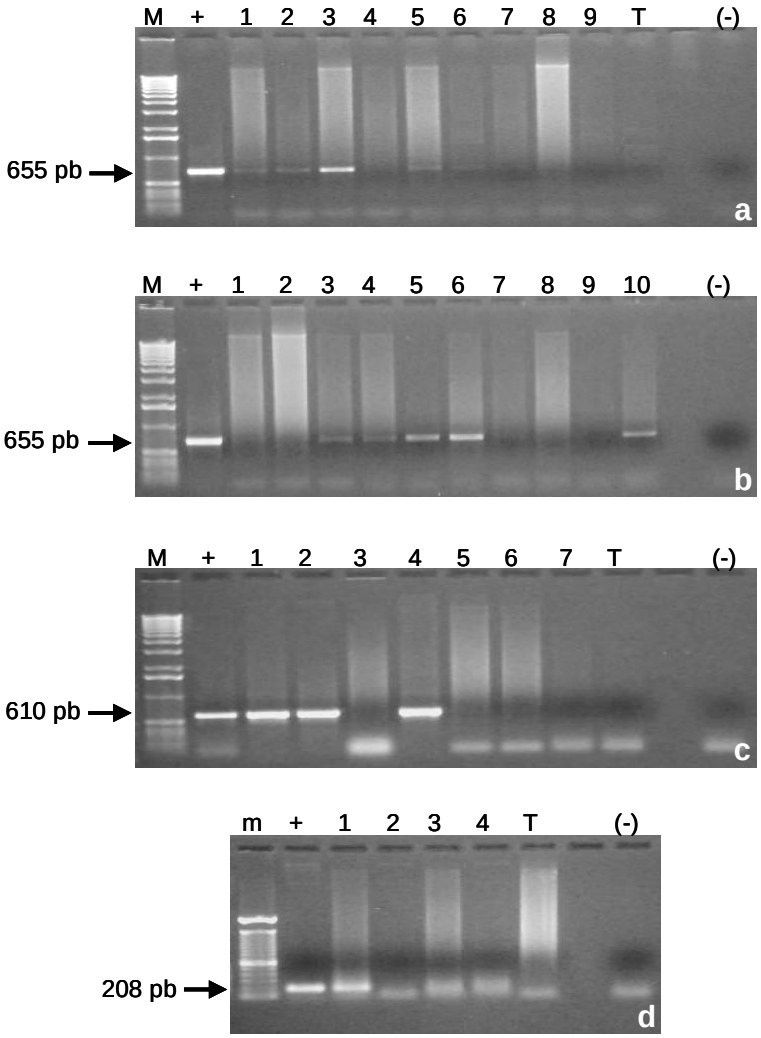

Figura 11 - Análise de PCR das plantas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* obtidas dos experimentos de transformação genética. a-b) PCR de plantas provenientes dos experimentos com as construções pCABMV-asCP ou pCABMV-dsCP, utilizando *primers* para amplificação do gene de seleção *npt*II (655 pb), 1-3: plantas obtidas com a construção pCABMV-asCP, 4-10: plantas obtidas com a construção pCABMV-dsCP; c) PCR de plantas provenientes dos experimentos contendo a construção pCABMV-asCP utilizando *primers* específicos para amplificação do fragmento antisenso (610 pb) do gene da CP do CABMV; d) PCR de plantas contendo a construção pCABMV-dsCP, utilizando *primers* para amplificação do fragmento de 208 pb do gene da CP do CABMV. +: controle positivo (planta transgênica ou plasmídeo purificado); (-): controle negativo (água). T: testemunha (planta não transgênica). M: marcador de 1 Kb (Invitrogen); m: marcador de 100 pb (Promega)

4.3.4 Análise de *Southern blot*

A análise de *Southern blot* foi realizada para as plantas da variedade FB-100, resultantes dos experimentos de transformação genética. Foram avaliadas no total, 12 plantas, sendo 7 plantas obtidas dos experimentos de transformação genética com a construção gênica pCABMV-asCP e 5 plantas obtidas de experimentos de transformação genética com a construção gênica pCABMV-dsCP. O DNA foi digerido com a enzima de restrição *Eco*RI, cortando o T-DNA uma vez, fora da região do gene de interesse.

Devido a dificuldade de detecção do transgene da construção pCABMV-dsCP, optou-se pela realização da análise de *Southern blot* utilizando-se a sonda para detecção do gene de seleção *npt*II, permitindo também, a avaliação de plantas contendo a construção pCABMV-asCP. A detecção do gene de interesse da construção pCABMV-asCP foi obtida após o aumento da quantidade de DNA digerido, para 70 µg.

Pela observação das Figuras 12a e 12b, pode-se verificar a integração do gene de seleção *npt*II, que confere resistência ao antibiótico canamicina em 5 plantas, apresentando de 1 a 5 eventos de inserção. As plantas 1, 2 e 3, foram obtidas de experimentos de transformação genética contendo a construção gênica pCABMV-asCP e, as plantas 4 e 5, obtidas dos experimentos de transformação genética com a construção gênica *hairpin*, pCABMV-dsCP.

A Figura 12c mostra a hibridização com a sonda do fragmento antisenso do gene do CABMV, em 4 das 5 plantas analisadas, apresentando de 1 a 2 eventos de inserção. Vale ressaltar, que a planta 4, obtida dos experimentos de transformação genética com a construção gênica pCABMV-dsCP, apresentou hibridização do fragmento de 208 pb (*hairpin*) com a sonda da construção antisenso (610 pb). Não foi observada a hibridização das amostras de DNA das plantas não transgênicas (controle negativo) com as sondas utilizadas para detecção dos genes *npt*II (655 pb) e do fragmento antisenso do gene da CP (610 pb).

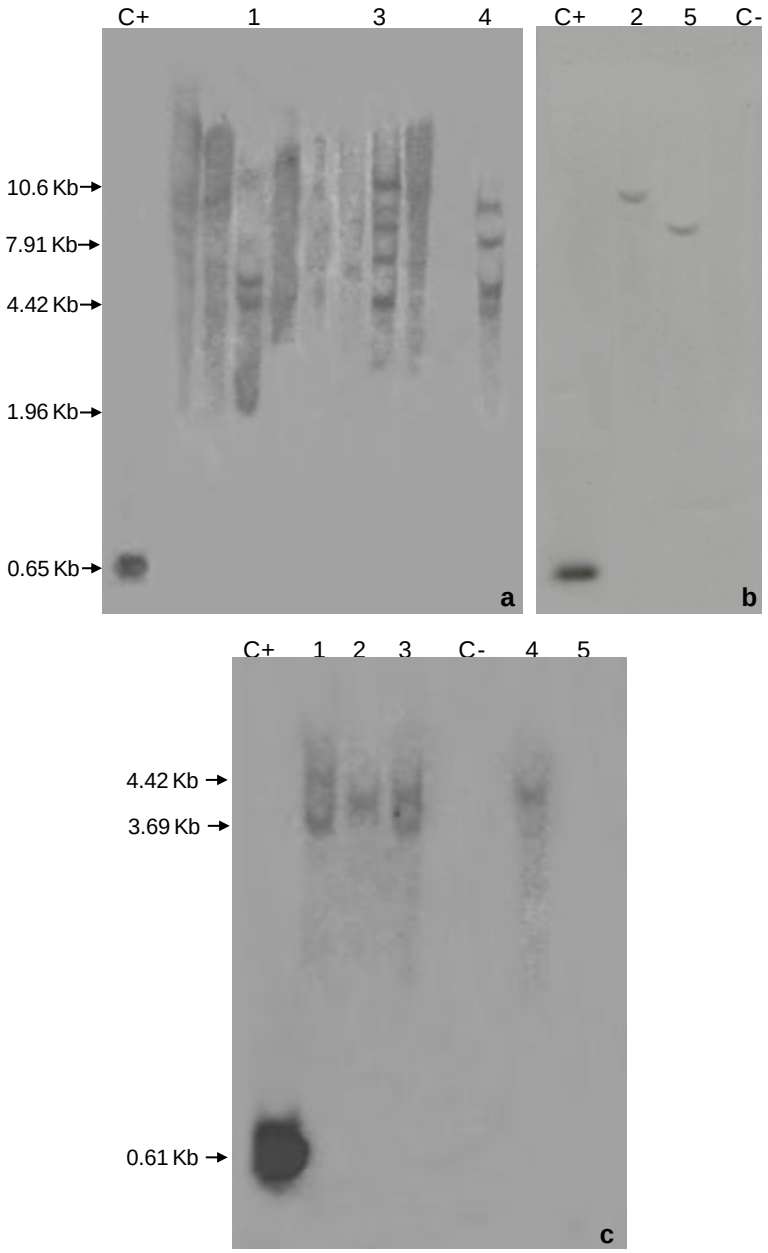

Figura 12 - Análise de *Southern blot* das plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, variedade FB-100, desenvolvidas nos experimentos de transformação genética com as construções pCABMV-asCP e pCABMV-dsCP. a-b) C+: controle positivo do gene *npt*II (produto de PCR purificado - 650 pb); c) C+: controle positivo do fragmento antisenso do gene do CABMV (produto de PCR purificado - 610 pb); C-: controle negativo (planta não transgênica). Plantas analisadas: 1, 2 e 3 plantas transformadas com a construção gênica pCABMV-asCP e, 4 e 5 plantas transformadas com a construção gênica pCABMV-dsCP

Em maracujazeiro, a análise *Southern blot* de plantas transformadas com o gene da proteína capsidial do CABMV (TREVISAN et al., 2006) mostrou a integração do transgene em 7 das 8 plantas avaliadas. Destas, 3 linhagens transgênicas apresentaram elevado número de eventos de inserção e, 2 plantas com apenas 1 evento de inserção.

As análises de *Southern blot* encontrados na literatura, geralmente relatam a ocorrência de diferentes eventos de inserção no genoma das plantas transformadas, de 1 a 3 cópias (ZANDONG et al., 2007; BAG; SINGH; JAIN, 2007) e 1 a múltiplas cópias (NEVES-BORGES et al., 2001;) apresentando diferentes pesos moleculares, indicando que bandas hibridizadas resultam de eventos de transformação independentes. Clarke et al. (2008) observaram que as plantas analisadas apresentaram a integração do transgene com tamanho maior que do T-DNA (inserção completa do T-DNA), como também de fragmentos menores, com inserção parcial do T-DNA, podendo ser causada pela integração truncada do mesmo (ZHU et al., 2006).

Zanek et al. (2008) verificaram a integridade do transgene e o número de cópias inseridas no genoma de variedades de laranja doce, onde a maioria das linhagens apresentou uma cópia do transgene, enquanto 2 linhagens mostraram a inserção de 2 a 3 cópias. Resultados semelhantes foram obtidos por Muniz (2008) para plantas de laranja 'Valência' contendo o gene da proteína capsidial e da região conservada do CTV (*Citrus tristeza virus*), que apresentaram de 1 a 3 eventos de inserção.

4.4 Análise das plantas obtidas em experimentos anteriores de transformação genética com a construção gênica pCABMV-CP

Plantas de maracujazeiro, das variedades IAC-275 e IAC-277, obtidas em experimentos de transformação genética realizados com a construção gênica pCABMV-CP, contendo o gene da proteína capsidial do CABMV (850 pb) (TREVISAN, 2005), foram analisadas neste trabalho para a confirmação da inserção e expressão do transgene e, avaliadas em relação a resistência ao CABMV.

4.4.1 Análise de *Southern blot*

A análise de *Southern blot* foi realizada com as 14 plantas PCR positivas para o gene da proteína capsidial do CABMV. Um total de 60 µg de DNA foi digerido com a enzima de restrição *Hind*III, cortando o T-DNA fora da região do gene de interesse.

Pela observação da Figura 12, pode-se verificar a confirmação da integração do gene da proteína capsidial do CABMV, em 13 das 14 plantas analisadas, sendo 11 da variedade IAC-275 (T8; T9; T11; T12; T13; T14; T15; T17; T19; T20 e T21) e 3 plantas da variedade IAC-277 (T10; T16; T18). Apenas a planta T21 não apresentou a integração do transgene no genoma. Não houve hibridização do DNA das amostras usadas como controle negativo (plantas não transgênicas).

O resultado da análise de *Southern blot* permite confirmar que as plantas são transgênicas, provenientes de diferentes eventos de transformação genética, possuindo de 1 a 4 eventos de inserção do transgene, provavelmente com mais de uma cópia do gene em cada um. As plantas T14, T15 e T20 apresentaram somente 1 evento de inserção, enquanto 6 plantas, T10, T11, T12, T13, T17 e T18, apresentaram 2 eventos de inserção, e as plantas T8, T9, T16 e T19 apresentaram 3 ou mais eventos (Figura 12).

As análises de *Southern blot* realizadas por Trevisan et al. (2006) mostraram a integração do transgene em 7 das 8 plantas analisadas e, em 3 delas foi observado elevado número de eventos de inserção.

4.4.2 Propagação e avaliação da resistência ao CABMV

As plantas matrizes de maracujazeiro, das variedades IAC-275 e IAC-277 foram propagadas por estaquia e cultivadas em casa de vegetação. A inoculação com o CABMV foi realizada após as estacas apresentarem, 3 ou 4 folhas desenvolvidas.

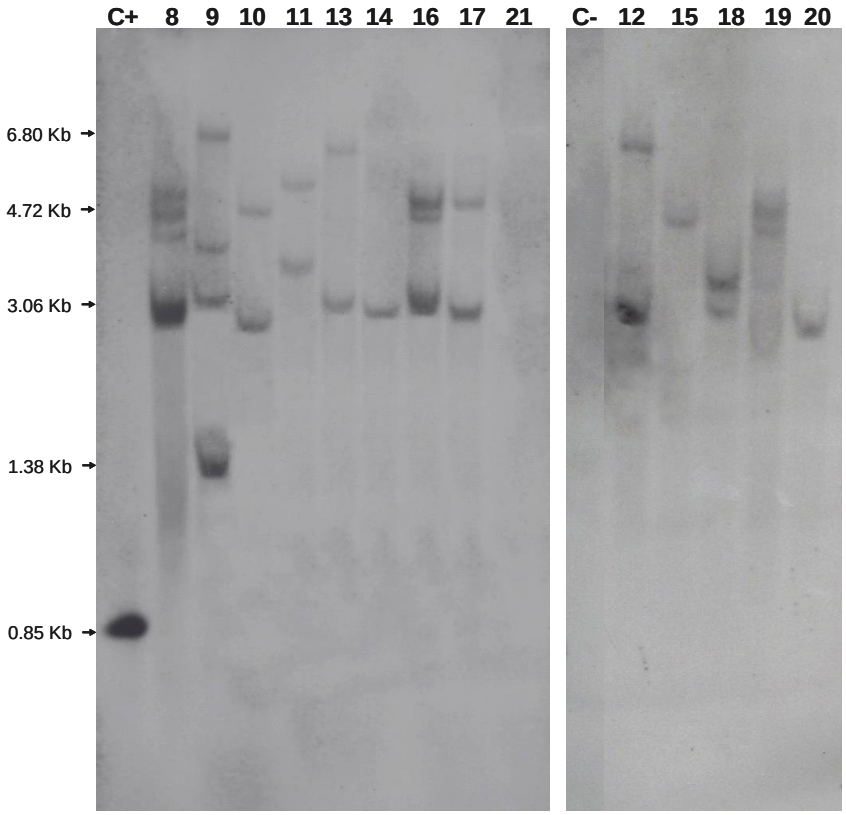

Figura 13 - Análise de *Southern blot* de plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, variedades IAC-275 e IAC-277, provenientes de experimentos de transformação genética com a construção gênica pCABMV-CP. C+: controle positivo (produto de PCR purificado - 850 pb); C-: controle negativo (planta não transgênica). Plantas analisadas: a) T8; T9; T10; T11; T13; T14; T16; T17; T21 e b) T12; T15; T18; T19 e T20

A Tabela 4 mostra o resultado dos experimentos de avaliação da resistência das plantas transgênicas contendo a construção pCABMV-CP das variedades IAC-275 (T9; T11; T12; T13; T14; T15; T17; T19; T20 e T21) e IAC-277 (T10; T16; T18) a diferentes isolados do CABMV (SP, RJ e CE).

Tabela 4 - Resultados da avaliação da inoculação das plantas de maracujazeiro com diferentes concentrações de inóculo dos isolados CABMV-SP, CABMV-RJ e CABMV-CE. Número de plantas infectadas / número de plantas inoculadas. C: plantas controle (não transgênicas)

Linhagem	**T9**	**T10**	**T11**	**T12**	**T13**	**T14**	**T15**	**T16**	**T17**	**T18**	**T19**	**T20**	**T21**	**Ci**	**Cf**
Dosagem															
CABMV-SP															
1ª Inoc. (1:200)	0/7	2/8	0/2	2/5	1/2	2/6	2/3	0/9	2/6	3/9	4/5	1/2	1/8	2/2	1/2
2ª Inoc. (1:100)	5/7	4/8	2/2	2/5	2/2	5/6	2/3	0/9	4/6	6/9	5/5	2/2	2/8	2/2	2/2
3ª Inoc. (1:50)	5/7	5/8	0/2	5/5	-	-	2/3	0/9	5/6	9/9	-	-	7/8	4/4	1/4
CABMV-RJ															
1ª Inoc. (1:200)	5/6	0/6	1/1	2/8	3/5	2/4		0/3	2/3	5/7	2/9	5/6	3/4	2/3	2/3
2ª Inoc. (1:100)	6/6	2/6	1/1	8/8	5/5	4/4		0/3	2/3	7/7	5/9	5/6	4/4	2/2	3/3
3ª Inoc. (1:50)	-	3/6	-	-	-	-		0/3	3/3	-	9/9	5/6	-	3/3	3/3
CABMV-CE															
1ª Inoc. (1:200)		0/4	2/3	2/2	2/5	1/1	2/2	0/2	3/3	1/4		0/3	5/6	3/3	2/2
2ª Inoc. (1:100)		4/4	2/3	2/2	5/5	1/1	2/2	0/2	3/3	4/4		3/3	6/6	1/1	1/2
3ª Inoc. (1:50)			2/3	-	-	-	-	0/2	-	-		-	-	1/2	2/3

* Plantas infectadas / plantas inoculadas.

** Ci: controle de inóculo inicial; Cf: controle de inóculo final.

As plantas não transgênicas desenvolveram sintomas evidentes de mosaico e deformação foliar, em aproximadamente 25 dias após a inoculação com os 3 isolados do vírus. A linhagem T16 apresentou resistência total aos 3 isolados (Figura 13), e algumas plantas da linhagem T10 apresentaram certa resistência aos isolados SP e RJ. Pelas avaliações realizadas, pode-se verificar que, de modo geral, as linhagens transgênicas apresentaram sintomas menos severos ou mais tardios quando comparadas com as plantas controle.

Figura 14 - Análise das plantas transgênicas de maracujazeiro 30 dias após a inoculação com o isolado CABMV-SP. a) planta com sintomas de mosaico foliar; b) planta T16 resistente ao vírus, com ausência de sintomas após inoculação com 3 concentrações crescentes de inóculo

Diferenças nos sintomas das plantas transgênicas inoculadas com 3 isolados do CABMV foram observadas por Trevisan et al. (2006). Após a segunda inoculação, com inóculo mais concentrado (1:100) do isolado SP, os clones de 4 linhagens (T1, T2, T7 e T8) não apresentaram sintomas de mosaico nas folhas, sendo a planta T2, identificada como resistente aos 3 isolados testados.

Dando continuidade aos trabalhos de avaliação da resistência das linhagens transgênicas de maracujazeiro obtidas por Trevisan (2005), Jadão et al. (2008) analisaram clones das plantas R_0 e R_1 de T2 e T16, com 4 inoculações sucessivas com o isolado CABMV-SP por meio de inoculações mecânicas e de afídeos *Myzus nicotianae*. Os resultados mostraram que, das 295 plantas R_1 da planta T16, 14 apresentaram resistência à infecção ao CABMV.

4.4.3 Análise da transcrição do transgene por RT-PCR

A análise por RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) foi realizada em 12 clones da planta T16, que apresentou resistência às inoculações mecânicas (item 4.4.2) com os diferentes isolados do CABMV.

A transcrição do transgene foi confirmada pela análise por RT-PCR. Pelos resultados obtidos pode-se verificar a amplificação do transgene, correspondente ao gene da proteína capsidial do CABMV (Figura 14) em todos os clones da planta T16, comprovando sua expressão. Neste caso, pela confirmação da expressão do transgene, a resistência da linhagem T16, pode estar sendo mediada pela proteína expressa pelo transgene.

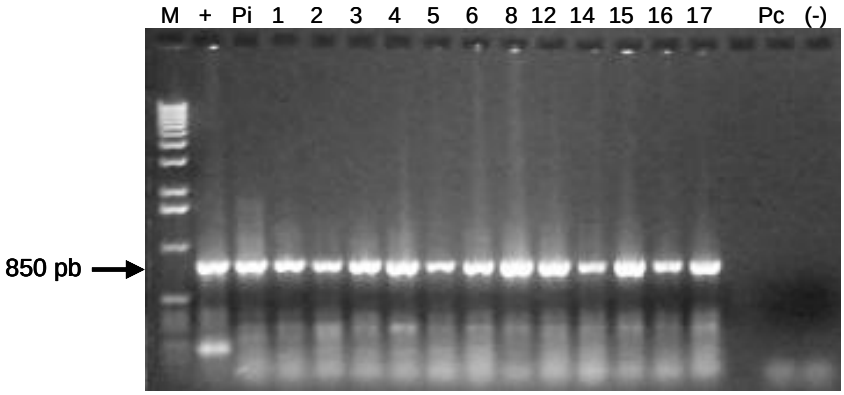

Figura 15 - Análise de RT-PCR dos clones da planta T16 para detecção do mRNA do transgene, confirmando a amplificação do gene da proteína capsidial do CABMV (850 pb); +: planta matriz T16; Pi: planta inoculada com o CABMV-SP; 1-17 clones; Pc: planta controle (não transgênica); (-): controle negativo (água). M: marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen)

A análise por RT-PCR foi realizada por Zandong et al. (2007) para verificar a expressão do gene *NIb*, do TuMV (*Turnip mosaic virus*), na orientação antisenso, em plantas de *Brassica campestris*. Neste trabalho, a análise das plantas não transgênicas inoculadas com o vírus, apresentou alta quantidade de produto amplificado. A baixa quantidade do produto de RT-PCR nas plantas transgênicas inoculadas ou não com o TuMV, indicou que a expressão do gene antisenso-*NIb* reduziu muito a replicação do vírus.

5 CONCLUSÕES

✓ É possível obter plantas de maracujazeiro azedo resistentes ao CABMV por transformação genética.

✓ O processo de transformação genética de maracujazeiro é influenciado pela variedade e tipo de explante.

✓ Foram obtidas plantas transgênicas de maracujazeiro, da variedade FB-100, com as construções gênicas pCABMV-asCP e p CABMV-dsCP.

✓ Foi identificada uma linhagem transgênica da variedade IAC-277, contendo a construção pCABMV-CP, resistente aos 3 isolados do CABMV.

REFERÊNCIAS

ABHARY, M.K.; ANFOKA, G.H.; NAKHLA, M.K.; MAXWELL, D.P. Post-transcriptional gene silencing in controlling viruses of the *Tomato yellow leaf curl virus complex*. **Archives of Virology**, New York, v. 151, p. 2349-2363, 2006.

ALFENAS, P.F.; BRAZ, A.S.K.; TORRES, L.B.; SANTANA, E.N.; NASCIMENTO, A.V.S. do; CARVALHO, M.G. de; OTONI, W.C.; ZERBINI, F.M. Transgenic passionfruit expressing RNA derived from *Cowpea aphid-borne mosaic virus* is resistant to passionfruit woodiness disease. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 33-38, 2005.

ALVES, A.C. **Estudos anatômicos da organogênese *in vitro* de soja e otimização do processo de transformação via *Agrobacterium tumefasciens*.** 1999. 107 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade São Paulo, Piracicaba, 1999.

AMUGUNE, N.O.; GOPALAN, H.N.B.; BYTEBIER, B. Leaf disc regeneration of passion fruit. **African Crop Science Journal**, Kampala, v. 1, p. 99-104, 1993. Disponível em: http://www.bioline.org.br/request?cs93015.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passion fruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 2007-2013, 1999.

ARAGÃO, F.J.L.; VIANNA, G.R.; ALBINO, M.M.C.; DIAS, B.B.A.; FARIA, F.C. Transgênico resistente a geminivirus. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, p. 22-26, 2001.

ARAGÃO, F.J.L.; FARIA, J.C. de. Avanços no desenvolvimento de plantas transgênicas com resistência a doenças no Brasil. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 15, p. 45-68, 2007.

BACCARIN, M.N.R.A. **Cultura de tecidos e enxertia em *Passiflora* spp**. 1988. 101 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade São Paulo, Piracicaba, 1988.

BAG, S.; SINGH, R.S.; JAIN, R.K. *Agrobacterium* – mediated transformation of groundnut with coat protein gene of *Tobacco streak virus*. **Indian Journal of Virology**, New Delhi, v. 18, p. 65-69, 2007.

BARBOSA, C.J.; SANTOS FILHO, H.P.; LARANJEIRA, F.F. Doenças do maracujazeiro – doenças causadas por vírus. In: LIMA, A. DE A.; CUNHA, M.A.P. DA. (Ed.). **Maracujá**: produção e qualidade na passicultura. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 267-280.

BARBOSA, L.V. **Citologia de híbridos somáticos de *Passiflora* spp obtidos por fusão de protoplastos**. 1998. 127 f. Tese (Doutorado em Genética) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade São Paulo, Piracicaba, 1998.

BARBOSA, W.M. **Morfogênese *in vitro* de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) associada a antibióticos e ao etileno.** 1999. 70 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

BARBOSA-MENDES, J.M. **Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *hrpN* (harpina) e avaliação da resistência ao cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.).** 2007. 78 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade São Paulo, Piracicaba, 2007.

BEACHY, R.N. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 8, p. 215-221, 1997.

BECERRA, D.C.; FORERO, A.P.; GÓNGORA, G.A. Age and physiological condition of donor plantas affect in vitro morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 79, p. 87-90, 2004.

BIASI, L.A.; FALCO, M.C.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, p. 661-665, 2000.

BRAZ, A.S.K. **Clonagem e sequenciamento dos genes da proteína capsidial e da replicase de um *Potyvirus* causador do endurecimento dos frutos do maracujazeiro, e transformação de maracujá-amarelo com construção derivada desses genes**. 1999. 106 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

BUKOVINSZKI, A.; DIVÉKI, Z.; CSÁNYI, M.; PALKOVICS, L.; BALÁZS, E. Engineering resistance to PVY in different potato cultivars in a marker-free transformation system using a 'shooter mutant' *A. tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 26, p. 459-465, 2007.

CANÇADO JÚNIOR, F.L.; ESTANISLAU, M.M.L.; PAIVA, B.M. de. Aspectos econômicos da cultura do maracujá. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, p. 10-17, 2000.

CHELLAPPAN, P.; MASONA, M.V.; VANITHARANI, R.; TAYLOR, N.J.; FAUQUET, C.M. Broad spectrum resistance to ssDNA viruses associated with transgene-induced gene silencing in *Cassava*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 56, p. 601-611, 2004.

CHEN,Y.; LOHUIS, D.; GOLDBACH, R.; PRINS, M. High frequency induction of RNA-mediated resistance against *Cucumber mosaic virus* using inverted repeat constructs. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 14, p. 215-226, 2004.

CLARKE, J.L.; SPETZ,C.; HAUGSLIEN, S.; XING,S.; DEES, M.W.; MOE, R.; BLYSTAD, D.R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of poinsettia, *Euphorbia pulcherrima*, with virus-derived hairpin RNA constructs confers resistance to *Poinsettia mosaic virus*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, p. 1027-1038, 2008.

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

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg*., P. amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, New York, v. 13, p. 103-106, 1993.

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 36, p. 211-217, 1994.

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

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13-15, 1990.

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

D'UTRA VAZ, F.B.; SANTOS, A.V.P. dos; MANDERS, G.; COCKING, E.C.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv *flavicarpa* Degener.): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, New York, v. 12, p. 220-225, 1993.

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

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

FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. *In vitro* control of adventious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*.

In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, Gaithersburg, v. 33, p. 209-212, 1997b.

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

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

FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS. **Agrianual 2007**: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2007. p. 387-394.

GIORIA, R.; BOSQUÊ, G.G.; REZENDE, J.A.M.; AMORIN, L.; KITAJIMA, E.W. Incidência de viroses de maracujazeiro na Alta Paulista-SP e danos causados pelo *Passion fruit woodiness virus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 182-189, 2000.

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

GRATTAPAGLIA, D.; CALDAS, L.S.; SILVA, J.R. da.; MACHADO, M.A. Cultura de tecidos de maracujá. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. **A cultura do maracujá no Brasil.** Jaboticabal:Funep, 1991. p. 61-77.

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

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

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

HIGGINS, C.M.; HALL, R.M.; MITTER, N.; CRUICKSHANK, A.; DIETZGEN, R.G. Peanut stripe potyvirus resistance in peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants carrying viral coat protein gene sequences. **Transgenic Research**, London, v. 13, p. 59-67, 2004.

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

JADÃO, A. S.; MONTEIRO, A.C.B.; MENDES, B.M.J.; VIEIRA, M.L.C.; REZENDE, J.A.M. Avaliação de plantas transgênicas de maracujazeiro ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) através da inoculação mecânica e por afídeos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.33, S298, vir-054, 2008. Resumos 41° Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2008, apresentado em Belo Horizonte.

JANEBRO, D.I.; QUEIROZ, M. do S.R. de; RAMOS, A.T.; SABAA-SRUR, A.U.O.; CUNHA, M.A.L. da; DINIZ, M. de F.F.M. Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, p. 724-732, 2008.

JORGENSEN, B.; ALBRECHTSEN, M. Stability of RNA silencing-based traits in potato after virus infection. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 19, p. 371-376, 2007.

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

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

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

LACORTE C.; ROMANO E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. cap. 6, p. 103-104.

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

LIMA, A. de A.; CARDOSO, C.E.L.; SOUZA, J. da S.; PIRES, M. de M. **Comercialização do maracujazeiro**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. (Maracujá em Foco, 29). Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/produto_em_focomaracuja_29.pdf. Acesso em: 21 jan. 2010.

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

LINDBO, J.A.; SILVA-ROSALES, L.; PROEBSTING, W.M.; DOUGHERTY, W.G. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for

regulation of gene expression and virus resistance. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 1749-1759, 1993.

LOMBARDI, S.P. **Estudos anatômicos e fisiológicos da organogênese *in vitro* em *Passiflora cincinnata* MAST**. 2003. 60 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

LUDLOW, E.J.; MOURADOV, A.; SPANGENBERG, G.C. Post-transcriptional gene silencing as an efficient tool for engineering resistant to white clover mosaic virus in white clover (*Trifolium repens*). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 166, p. 1557-1567, 2009.

MACIEL, S. da C.; NAKANO, D.H.; REZENDE, J.A.M.; VIEIRA, M.L.C. Screening of *Passiflora* species for reaction to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* reveals an immune wild species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, p. 414-418, 2009.

MALAVOLTA JÚNIOR, V.A. Bacterioses do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5, 1998, Jaboticabal. **Maracujá**: do plantio à colheita. Jaboticabal: Funep, 1998. p. 217-229.

MANDERS, G.; OTONI, W.C.; D'UTRA VAZ, F.B.; BLACKHALL, N.W.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener.) using *Agrobacterium tumefasciens*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 13, p. 697-702, 1994.

MANICA, I.; OLIVEIRA JÚNIOR, M.E de. **Produção e exportação brasileira e mundial de maracujá**. Jaboticabal: Toda Fruta, 2004. Disponível em: http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=6680. Acesso em: 06 dez. 2004.

MELETTI, L.M.M.; MAIA, M.L. **Maracujá**: produção e comercialização. Campinas: Instituto Agronômico, 1999. 62 p. (Boletim Técnico, 181).

MELETTI, L.M.M.; SANTOS, R.R.; MINAMI, K. Melhoramento do maracujazeiro-amarelo: obtenção do cultivar composto IAC-27. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, p. 491-498, 2000.

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

MONTEIRO, A.C.B. de A.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Organogênese *in vitro* de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) a partir de discos de folha. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 4, 1996, Piracicaba. **Resumos...** São Paulo: USP, 1996. v. 1, p. 417.

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

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

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

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

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

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

MUBIN, M.; MANSOOR, S.; HUSSAIN, M.; ZAFAR, Y. Silencing of the AV2 gene by antisense RNA protects transgenic plants against a bipartite begomovirus. **Virology Journal**, Bethesda, v. 4, n. 10, 2007. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1796863/pdf/1743-422X-4-10.pdf.

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

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

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

NEVES-BORGES, A.C.; COLLARES, W.M.; PONTES, J.A.; BREYNE, P.; FARINELLI, L.; OLIVEIRA, D.E. Coat protein RNAs-mediated protection against *Andean potato mottle virus* in transgenic tobacco. **Plant Science**, Limerick, v. 160, p. 699-712, 2001.

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

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

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

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

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

OTONI, W.C.; CASALI, V.W.D.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Isolamento de protoplastos de mesófilo de *P. suberosa* L.: influência da idade das plantas matrizes. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 43, p. 157-164, 1996.

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

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

PIERO, R.M. Di; REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; PASCHOLATI, S.F.; DELFINO, M.A. Transmissão do *passion fruit woodiness virus* por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e colonização de maracujazeiro pelo vetor. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, p. 139-140, 2006.

PINTO, A.P.C.; MONTEIRO-HARA, A.C.B. de A.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J.*In vitro* organogenesis of *Passiflora alata*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Gaithersburg, 2009. DOI: 10.1007/s11627-009-9251-5. Disponível em: http://www.springerlink.com/content/947467n8452q43l4/fulltext.pdf.

POWELL-ABEL, P.P.; NELSON, R.S.; de B.; HOFFMAN, N.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T.; BEACHY, R.N. Delay of disease development in transgenic plants that express the *tobacco mosaic virus* coat protein gene. **Science**, Washington, v. 232, p. 738-743, 1986.

PRAVEEN, S.; MISHRA, A.K.; DASGUPTA, A. Antisense suppression of replicase gene expression recovers tomato plants from *leaf curl virus* infection. **Plant Science**, Limerick, v. 168, p. 1011-1014, 2005.

PROVVIDENTI, R.; TRICOLI, D.M. Inheritance of resistance to *Squash mosaic virus* in a squash transformed with the coat protein gene of pathotype 1. **HortScience**, Alexandria, v. 37, p. 575-577, 2002.

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

RAMOS, A.T.; CUNHA, M.A.L. da; SABAA-SRUR, A.U.O.; PIERS, V.C.F.; CARDOSO, M.A.A.; DINIZ, M. de F.M.; MEDEIROS, C.C.M. Uso de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* na redução do colesterol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, p. 592-597, 2007.

RAVELONANDRO, M.; SCORZA, R.; CALLAHAN, A.; LEVY, L.; JACQUET, C.; MONSION, M.; DAMSTEEGT, V. The use of transgenic fruit trees as a resistance strategy for virus epidemics: plum pox (sharka) model. **Virus Research**, Amsterdam, v. 71, p. 63-69, 2000.

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

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

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

RIBEIRO, L.M.; PEIXOTO, J.R.; ANDRADE, S.R.M. de.; FONSECA, R.S.; VIEIRA, L.M.; PEREIRA, W.V.S. Microenxertia ex vitro para eliminação do vírus CABMV em maracujá-azedo, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 589-594, 2008.

RITZENTHALER, C. Resistance to plant viruses: old issue, news answers? **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 16, p. 118-122, 2005.

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

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 1, p. 1.119-1.122.

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

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

SANTOS FILHO, H.P.; LARANJEIRA, F.F. Doenças do maracujazeiro – doenças causadas por fungos. In: LIMA, A. de A.; CUNHA, M.A.P. da. (Ed.). **Maracujá**: produção e qualidade na passicultura. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 241-267.

SÃO JOSÉ, A.R.; SOUZA, I.V.B.; DUARTE FILHO, J.; LEITE, M.J.N. Formação de mudas de maracujazeiros. In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.). **Maracujá**: produção e mercado. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1994. p. 41-48.

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

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

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

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

SOUZA JÚNIOR, M.T.; GONSALVES, D. Sequence similarity between the viral *cp* gene and the transgene in transgenic papayas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 479-486, 2005.

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

SPIELMANN, A.; KRASTANOVA, S.; DOUET-ORHANT, V.; GUGERLI, P. Analysis of transgenic gravepine (*Vitis rupestri*) and *Nicotiana benthamiana* plants expressing an *Arabis mosaic virus* coat protein gene. **Plant Science**, Limerick, v. 156, p. 235-244, 2000.

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

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

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

TEPFER, M. Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 467-491, 2002.

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

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

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

VASCONCELLOS, M.A. da S.; SILVA, A.C.; SILVA, A.C.; REIS, F. de O. Ecofisiologia do maracujazeiro e implicações na exploração diversificada. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). **Maracujá**: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. cap. 12, p. 295-313.

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

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

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

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

ZANEK, M.C.; REYES, C.A.; CERVERA, M.; PEÑA, E.J.; VELÁZQUEZ, K.; COSTA, N.; PLATA, M.I.; GRAU, O.; PEÑA, L.; GARCIA, M.L. Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene of *Citrus psorosis virus* and evaluation of resistance against the virus. **Plant Cell Reports**, New York, v.27, p.57-66, 2008.

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

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