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

LILIANE CRISTINA LIBORIO STIPP

**Transformação genética de abobrinha-de-moita e melancia para
resistência ao *Papaya ringspot virus* - type Watermelon e ao *Zucchini
yellow mosaic virus***

**Piracicaba
2009**

LILIANE CRISTINA LIBORIO STIPP

**Transformação genética de abobrinha-de-moita e melancia para
resistência ao *Papaya ringspot virus* - type Watermelon e ao *Zucchini
yellow mosaic virus***

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

Área de concentração: Biologia na Agricultura e
Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz M. Januzzi Mendes

**Piracicaba
2009**

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

Stipp, Liliane Cristina Liborio

Transformação genética de abobrinha-de-moita e melancia para resistência ao *Papaya ringspot virus* – type Watermelon e ao *Zucchini yellow mosaic virus* / Liliane Cristina Liborio Stipp; orientador Beatriz Madalena Januzzi Mendes. - - Piracicaba, 2009.

97 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. Genética molecular vegetal 3. Plantas transgênicas
4. Potyvirus I. Título

CDU 635.62:578.864

DEDICO

Aos meus pais Lauro e Rosaly pelo amor, compreensão e infinita paciência,

aos meus irmãos Lauro Jr e Valeria pelo carinho e amizade

*e ao meu querido sobrinho Gabriel (Bibico) pelo amor incondicional, pelos momentos
inesquecíveis e pelas alegrias que sempre me traz.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra Beatriz Madalena Januzzi Mendes (CENA/USP) pela confiança, pela constante orientação, por minha formação científica e por me ensinar a ver a pesquisa com os olhos da razão e do coração. Serei eternamente grata pelos seus ensinamentos.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela oportunidade de cursar doutorado em Biologia na Agricultura e Ambiente, especialmente ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal, onde a maioria dos experimentos foi realizada.

Ao Prof. Dr. Jorge A. Marques Rezende (ESALQ/USP) pela importante colaboração durante a execução deste trabalho, pela dedicação e atenção.

Ao Dr. Ricardo Harakava do Instituto Biológico de São Paulo pela imensa ajuda e pela paciência em resolver nossos constantes problemas e dúvidas!

À prof. Dra. Adriana P. Martinelli (CENA/USP) pela amizade e pela ajuda nesta etapa final do trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação do CENA e sua equipe, em especial à Neuda F. de Oliveira, pela paciência e constante auxílio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária - NAP/MEPA (ESALQ/USP) pela utilização dos equipamentos e microscópio eletrônico de varredura.

Ao João Geraldo Brancalion e à Silvana Pousa Maziero do Laboratório de Instrumentação e Informática (CENA/USP) pela eficiência e pelo auxílio nos serviços de computação gráfica.

Ao Dr. Reinaldo Barata pelo auxílio durante o início da construção do vetor de expressão.

Ao funcionário Sr. José do Departamento de Produção Vegetal, por ter cuidado das plantas na casa-de-vegetação, com tanta dedicação.

Ao engenheiro agrônomo José Edivaldo Buriolla do Laboratório de Virologia Vegetal (ESALQ/USP) pela ajuda nas análises de ELISA.

À bibliotecária chefe Marília Henyei (CENA/USP) pela revisão das referências bibliográficas.

Aos estagiários do Laboratório de Biotecnologia Vegetal: Carolina Monte Bello, Renan Packer e Sylvia Rodrigues Silveira pelo convívio e constante auxílio.

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

À minha grande amiga Alessandra C. B. de A. Monteiro Hara (Tty) pelo incentivo, pelo companheirismo e por sua amizade desde a época da graduação. Pelo auxílio constante, principalmente nos registros fotográficos.

À amiga Danielle Camargo Scotton pelo auxílio sempre que necessário, pela grande ajuda e dicas durante a clonagem e especialmente pela amizade.

Às minhas amigas Daniella Macedo (Arara) e Maria Graziela Z. Krug (Zizi) pelo companheirismo, apoio e longas conversas.

À amiga Luciana Castelotti pela ajuda, especialmente pela boa vontade e competência na condução dos experimentos de transformação.

Às amigas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP) Alice N. Aranda Perez, Ana Paula Chiaverini Pinto, Andréa D. Koehler, Eveline C. R. Tavano, Fabiana M. Rezende, Janaynna M. Barbosa-Mendes e Renata B. Cruz pelo convívio, pelo auxílio e pelos bons momentos compartilhados.

Aos colegas e amigos que passaram pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal: Amâncio Souza, Gustavo Paoli, Evandro Schinor, Fernanda Mendes-da-Glória, Fernando Azevedo, Flávio Trevisan, Taciana Uehara, Joanne Moraes, Raquel Boscariol, Rosely Pereira, Suane Cardoso, Vânia Nakano e Waner Freitas Júnior pelo companheirismo e convívio agradável.

SUMÁRIO

RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	09
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Importância e principais doenças das cucurbitáceas.....	15
2.2 Cultura de tecidos em abobrinha-de-moita (<i>Cucurbita pepo</i>) e melancia (<i>Citrullus lanatus</i>).....	20
2.3 Transformação genética em cucurbitáceas.....	24
2.4 Resistência derivada do patógeno associada à transformação genética.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Material Vegetal.....	33
3.2 Organogênese <i>in vitro</i> de abobrinha-de-moita.....	34
3.2.1 Condições de cultivo.....	34
3.2.2 Alongamento e enraizamento das gemas obtidas.....	35
3.2.3 Aclimatização das plantas.....	35
3.2.4 Análise histológica.....	36
3.2.5 Análise morfológica.....	36
3.3 Obtenção da construção gênica para transformação genética.....	37
3.3.1 Isolamento dos fragmentos dos genes da proteína capsidial do ZYMV e do PRSV-W.....	37
3.3.1.1 Inoculação mecânica dos vírus.....	37
3.3.1.2 Isolamento do RNA total a partir de plantas infectadas.....	38
3.3.1.3 Síntese e amplificação do DNA complementar por RT-PCR.....	38
3.3.2 Pré-clonagem dos fragmentos isolados em vetor pGEM®-T.....	40
3.3.3 Construção do cassete de expressão.....	40
3.3.4 Construção do vetor de expressão.....	44
3.4 Transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	45

3.4.1 Manutenção e cultivo das linhagens de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	45
3.4.2 Inoculação e co-cultivo dos explantes com <i>A. tumefaciens</i>	47
3.4.3 Seleção e regeneração de plantas.....	47
3.4.4 Identificação de plantas transgênicas por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	48
3.5 Aclimatização e polinização das plantas para obtenção de R ₁	48
3.6 Caracterização molecular das plantas obtidas por <i>Southern blot</i>	49
3.7 Avaliação da resistência ao ZYMV e ao PRSV-W.....	50
3.7.1 Inoculação das plantas transgênicas com os patógenos.....	50
3.7.2 Teste sorológico PTA-ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay - Plate Trapped Antigen</i>).....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1 Organogênese <i>in vitro</i> de abobrinha-de-moita.....	52
4.2 Obtenção da construção gênica para transformação genética.....	60
4.3 Obtenção de plantas transgênicas de abobrinha-de-moita.....	65
4.4 Obtenção de plantas transgênicas de melancia.....	68
4.5 Aclimatização e polinização das plantas de abobrinha-de-moita e melancia.....	71
4.6 Análise das plantas aclimatizadas por <i>Southern blot</i>	72
4.7 Avaliação da resistência ao ZYMV e ao PRSV-W.....	77
5 CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS.....	83

RESUMO

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) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

No Brasil, doenças causadas pelo *Papaya ringspot virus* - type Watermelon (PRSV-W) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) reduzem a produção e a qualidade dos frutos de abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo*) e melancia (*Citrullus lanatus*), assim como em outras cucurbitáceas. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de plantas transgênicas de abobrinha-de-moita e melancia resistentes ao PRSV-W e ao ZYMV. Um sistema eficiente de regeneração *in vitro* é necessário para a obtenção de plantas transgênicas. O sistema de organogênese *in vitro* de abobrinha-de-moita foi desenvolvido utilizando como explantes a região basal do cotilédono e um segmento do hipocótilo obtidos a partir de sementes germinadas *in vitro*. Os explantes foram cultivados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com diferentes concentrações de BAP (benzilaminopurina). A indução de gemas adventícias foi mais eficiente nas concentrações de 1,0 e 1,25 mg/L de BAP. Este protocolo foi usado para regenerar plantas em experimentos de transformação genética de abobrinha-de-moita cv. 'Caserta' e melancia cv. 'Crimson Sweet', via *Agrobacterium tumefaciens*. O vetor binário pCAMBIA2201, contendo fragmentos dos genes da proteína capsial do ZYMV e do PRSV-W, numa construção gênica do tipo *hairpin* e o gene de seleção *nptII*, sob controle do promotor 35S, foi usado nos experimentos de transformação genética. Após 2 dias de co-cultivo, em meio de cultura MS, suplementado com BAP (1 mg/L), os explantes foram transferidos para meio de cultura de seleção, suplementado com BAP (1 mg/L), timentin (400 mg/L) e canamicina (100 mg/L) e cultivados por 3 a 4 semanas, sob fotoperíodo de 16 horas de luz. Plantas regeneradas foram analisadas por PCR, usando *primers* específicos para detecção dos fragmentos dos genes da proteína capsial do PRSV-W e ZYMV. Foram utilizados 1050 explantes de abobrinha-de-moita e de 973 explantes de melancia, resultando em 36 e 59 plantas PCR positivas, respectivamente. A eficiência de transformação foi de 3,4% para abobrinha-de-moita e 6,1% para melancia. Plantas PCR positivas foram aclimatizadas, gradualmente, em sala de luz e transferidas para casa-de-vegetação. Pela análise de *Southern blot* foi confirmada a integração dos fragmentos dos genes da proteína capsial do ZYMV e PRSV-W em 3 plantas de abobrinha-de-moita. Depois de desenvolvidas, flores femininas foram polinizadas manualmente e sementes foram coletadas de frutos maduros. Plantas R₁ de abobrinha-de-moita e melancia foram inoculadas com o PRSV-W e o ZYMV por meio de *Myzus nicotianae* virulíferos. Não foram identificadas, até o momento, plantas resistentes aos patógenos em estudo.

Palavras-chave: plantas transgênicas, *C. lanatus*, *C. pepo*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Potyvirus*.

ABSTRACT

STIPP, L. C. L. **Genetic transformation of zucchini squash and watermelon for resistance to *Papaya ringspot virus* - type W and *Zucchini yellow mosaic virus*.** 2009. 97 f. Thesis (Doctoral) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

Diseases caused by the potyviruses *Papaya ringspot virus* - type Watermelon (PRSV-W) and *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) significantly reduce the yield and fruit quality of zucchini squash (*Cucurbita pepo*), watermelon (*Citrullus lanatus*), as well as other cucurbit crops in Brazil. The purpose of this work was to obtain zucchini squash and watermelon transgenic plants resistant to PRSV-W and ZYMV. An efficient *in vitro* regeneration system which can be associated with the protocol is necessary to obtain transgenic plants. *In vitro* organogenesis system was successfully developed using comprised of distal region of hypocotyl and the base of cotyledon of a germinated seed. The explants were cultured in MS medium (MURASHIGE; SKOOG, 1962), supplemented with different concentration of BAP (benzylaminopurine). The induction of adventitious buds was more efficient at concentrations of 1.0 and 1.25 mg.L⁻¹ BAP. This protocol was used to regenerate plants from genetic transformation experiments with zucchini squash cv. 'Caserta' and watermelon cv. 'Crimson Sweet' via *Agrobacterium tumefaciens*. For transformation, the binary vector pCAMBIA 2201, containing sequences of the coat protein coding regions of ZYMV and PRSV-W in a hairpin construct and the *nptII* gene, driven by 35S promoter was used. After 2 days of co-culture in MS medium supplemented with BAP (1.0 mg.L⁻¹), explants were transferred to the MS selection culture medium, supplemented with BAP (1.0 mg.L⁻¹), timentin (400 mg.L⁻¹) and kanamycin (100 mg.L⁻¹), and incubated for 3 to 4 weeks at 27 °C, under 16 h photoperiod. Regenerated plants were analyzed by PCR, using specific pairs of primers for the detection of the coat protein gene segments of PRSV-W and ZYMV. A total of 1,050 zucchini squash and 973 watermelon explants were used in the transformation experiments, resulting in 36 and 59 PCR positive plants, respectively. The genetic transformation efficiency was 3.4% for zucchini squash and 6.1% for watermelon. The PCR positive plants were slowly acclimatized in the culture room and transferred to the greenhouse for further growth. Southern blot analysis confirmed the genome integration of the the ZYMV and PRSV-W coat protein gene fragments in three zucchini squash plants which survived the acclimatization step. Later in development, female flowers were manually pollinated and seeds were collected from mature fruits. R₁ transgenic zucchini squash and watermelon plants were inoculated with PRSV-W and ZYMV by means of viruliferous *Myzus nicotianae*. Resistant plants were not yet observed among the R₁ plants available.

Key words: transgenic plants, *C. lanatus*, *C. pepo*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Potyvirus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Explantes utilizados em experimentos de transformação genética de melancia e abobrinha-de-moita.....	34
Figura 2 - Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para amplificar o fragmento do gene da proteína capsidial do ZYMV (<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>).....	39
Figura 3 - Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para amplificar o fragmento do gene da proteína capsidial do PRSV-W (<i>Papaya ringspot mosaic virus</i>).....	39
Figura 4 - Obtenção do cassete de expressão no vetor pGEM/35S-íntron-NOST- <i>hairpin</i> ZYMV+PRSV-W, contendo fragmentos dos genes da proteína capsidial do ZYMV e do PRSV-W, numa construção do tipo <i>hairpin</i> , sob controle do promotor constitutivo 35S.....	43
Figura 5 - Obtenção do vetor de expressão pCambia 2201, contendo fragmentos dos genes da proteína capsidial do ZYMV e do PRSV-W, numa construção do tipo <i>hairpin</i> e o gene de seleção <i>npII</i> , sob controle do promotor constitutivo 35S.....	46
Figura 6 - Organogênese <i>in vitro</i> de abobrinha-de-moita (<i>Cucurbita pepo</i> cv. Caserta).....	53
Figura 7 - Análise morfo-anatômica do processo organogênico em abobrinha-de-moita (<i>Cucurbita pepo</i> cv. Caserta).....	59
Figura 8 - Isolamento dos fragmentos dos genes da proteína capsidial do <i>Papaya ringspot virus</i> - type W e do <i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	61

- Figura 9 - Confirmação da pré-clonagem dos fragmentos dos genes da proteína capsidial do *Papaya ringspot virus* - type W (PRSV-W) e do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) no vetor pGEM®-T (Easy Vector Systems - Promega) pela digestão dos plasmídeos extraídos de colônias PCR⁺.. 62
- Figura 10 - Confirmação da clonagem do cassete e vetor de expressão de uma construção gênica do tipo *hairpin* contendo os fragmentos dos genes da proteína capsidial (CP) do *Papaya ringspot virus* - type W (PRSV-W) e do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)..... 64
- Figura 11 - Confirmação da transformação genética de *Agrobacterium tumefaciens* com o plasmídeo pCambia2201/*hairpin*ZYMV + PRSV-W..... 65
- Figura 12 - Transformação genética de abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* cv. Caserta) para resistência ao ZYMV e PRSV-W..... 67
- Figura 13 - Transformação genética de melancia (*Citrullus lanatus* cv. 'Crimson Sweet') para resistência ao ZYMV e PRSV-W..... 70
- Figura 14 - Crescimento e desenvolvimento de plantas PCR⁺ de abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* cv. Caserta) em casa-de-vegetação..... 73
- Figura 15 - Crescimento e desenvolvimento de plantas de melancia PCR⁺ (*Citrullus lanatus* cv. 'Crimson Sweet') em casa-de-vegetação..... 74
- Figura 16 - Análises de *Southern blot* em plantas de abobrinha-de-moita transformadas com fragmentos dos genes da proteína capsidial do ZYMV e PRSV-W..... 76
- Figura 17 - Avaliação da resistência ao ZYMV e ao PRSV-W pela inoculação por meio de afídeos virulíferos (*Myzus nicotianae*) em plantas R₁ de abobrinha-de-moita e melancia..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito do número de dias de germinação <i>in vitro</i> das sementes de abobrinha-de-moita (<i>Cucurbita pepo</i> cv. 'Caserta'), utilizadas para a coleta dos explantes, na indução da organogênese <i>in vitro</i> em meio de cultura MS, suplementado com BAP (1,0 mg/L).....	54
Tabela 2 - Organogênese <i>in vitro</i> a partir da região basal do cotilédone e um segmento do hipocótilo de abobrinha-de-moita (<i>Cucurbita pepo</i> cv. 'Caserta') cultivados em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de BAP (mg/L). (Média de 2 experimentos independentes).....	56
Tabela 3 - Organogênese <i>in vitro</i> a partir da região basal do cotilédone e um segmento do hipocótilo de abobrinha-de-moita (<i>Cucurbita pepo</i> cv. 'Caserta'), cultivados em meio de cultura suplementado com BAP (1,0 mg/L).....	57
Tabela 4 - Transformação genética de abobrinha-de-moita (<i>Cucurbita pepo</i> cv. 'Caserta') para resistência ao ZYMV e PRSV-W a partir da região basal do cotilédone e um segmento do hipocótilo com <i>A. tumefaciens</i> , estirpes LBA 4404 ou EHA 105.....	68
Tabela 5 - Transformação genética de melancia (<i>Citrullus lanatus</i> cv. 'Crimson Sweet') para resistência ao ZYMV e PRSV-W a partir da região basal do cotilédone e um segmento do hipocótilo com <i>A. tumefaciens</i> , estirpes LBA 4404 ou EHA 105.....	69
Tabela 6 - Obtenção da progênie (R ₁) de plantas transgênicas de abobrinha-moita (<i>Cucurbita pepo</i> cv. 'Caserta') e melancia (<i>Citrullus lanatus</i> cv. 'Crimson Sweet') e avaliação da resistência ao ZYMV e ao PRSV-W com a primeira inoculação por meio de afídeos virulíferos.....	79

1 INTRODUÇÃO

A abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo*) e a melancia (*Citrullus lanatus*) são hortaliças da família *Cucurbitaceae*, que possuem grande importância econômica no mercado brasileiro, sendo parte considerável do volume comercializado de hortaliças. Contudo, problemas fitossanitários, principalmente causados por doenças viróticas, reduzem a produtividade além de afetar a qualidade dos frutos, tornando-se fatores limitantes ao cultivo dessas cucurbitáceas nas principais regiões produtoras do Brasil.

Dentre as doenças viróticas, as duas principais que infectam a abobrinha-de-moita e a melancia são o mosaico do mamoeiro e o mosaico da abobrinha, causados pelo *Papaya ringspot virus* (PRSV-W) e pelo *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), respectivamente. Considerando o prejuízo que essas duas viroses causam aos produtores e a dificuldade de controle, a busca por cultivares resistentes ou tolerantes se torna imprescindível. Assim, a transformação genética se apresenta como uma alternativa para obtenção de variedades resistentes a essas viroses.

A resistência a doenças causadas por vírus pode ser obtida a partir de genes do próprio genoma viral, que são introduzidos e integrados no genoma da planta, via transformação genética (SANFORD; JOHNSON, 1985). A literatura apresenta trabalhos de transformação genética de abobrinha-de-moita e melancia para obtenção de plantas resistentes a vírus, utilizando genes que codificam a proteína capsidial de diferentes vírus, com desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a um ou múltiplos vírus (FUCHS; GONSALVES et al., 1995; PANG et al., 2000; PROVVIDENTI; TRICOLI, 2002; PARK et al., 2005; KLAS et al., 2006). Não há relatos de plantas transgênicas de abobrinha-de-moita resistentes ao PRSV-W, assim como plantas transgênicas apresentando dupla resistência, ao PRSV-W e ao ZYMV. Em melancia, há um relato de plantas transgênicas, com o PRSV-W (KRUG, 2005), não havendo relatos de plantas transgênicas com genes da proteína capsidial do PRSV-W e ZYMV.

Apresentamos a hipótese de que a introdução de fragmentos de 200 pb dos genes da proteína capsidial desses vírus no genoma da planta possa ser eficiente para a obtenção de plantas resistentes às doenças causadas pelo PRSV-W e pelo ZYMV. Com a utilização desta estratégia, a resistência será obtida pela sequência de RNA, com o silenciamento gênico.

Assim, o objetivo deste trabalho foi a obtenção de plantas transgênicas de abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* cv. 'Caserta') e de melancia (*Citrullus lanatus* cv. 'Crimson Sweet'), via *Agrobacterium tumefaciens*, resistentes aos vírus do mosaico do mamoeiro, estirpe da melancia, e do mosaico da abobrinha, pela introdução e integração de fragmentos dos genes da proteína capsidial desses dois vírus, numa construção gênica do tipo *hairpin*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância e principais doenças das cucurbitáceas

A família *Cucurbitaceae* é constituída de cerca de 118 gêneros e mais de 800 espécies, sendo que várias espécies possuem grande valor econômico na horticultura mundial, representando uma parte significativa do volume comercializado de hortaliças. A produção mundial das principais cucurbitáceas, no ano de 2007, foi acima de 187 milhões de toneladas (FAO, 2008). Os gêneros de maior importância econômica são: *Cucumis* (melão e pepino), *Citrullus* (melancia), *Sechium* (chuchu) e *Cucurbita* (abóbora, abobrinha-de-moita e moranga). As cucurbitáceas também têm grande importância social devido à alta demanda de mão-de-obra, desde seu cultivo até a comercialização de seus frutos (LOPES, 1991).

A melancia (*C. lanatus*), espécie de maior destaque no gênero *Citrullus*, é originária da África. A produção mundial de melancia, em 2007, foi de cerca de 92 milhões de toneladas, mais de 60% da produção mundial de cucurbitáceas. Os principais países produtores são China, Turquia e Irã (FAO, 2008). No Brasil, a melancia é considerada a quarta olerícola em volume produzido e é superada apenas pelo tomate, pela batata e pela cebola. A produção está distribuída por todos estados brasileiros, destacando-se Rio Grande do Sul, São Paulo, Goiás e Bahia (FNP Consultoria & Comércio, 2008).

As variedades de melancia diferem entre si quanto à forma do fruto, coloração externa e da polpa. Na escolha da variedade deve-se considerar o tipo de fruto preferido pelo mercado e sua resistência ao transporte, a adaptação da cultivar à região e a tolerância a doenças e aos distúrbios fisiológicos. Quanto ao formato do fruto, a melancia apresenta variedades alongadas, como a 'Charleston Gray' e 'Starbrite' e variedades redondas, como a 'Crimson Sweet', considerada a mais importante do mercado nacional (FILGUEIRA, 2000). Atualmente, variedades sem sementes

(triplóides) são freqüentemente encontradas no mercado e têm uma grande aceitação do consumidor.

O gênero *Cucurbita* possui diversas espécies que se destacam economicamente, entre elas: a abóbora e a abobrinha verde (*C. moschata*), a abobrinha-de-moita (*C. pepo*) e a moranga (*C. maxima*). A produção mundial do gênero *Cucurbita*, em 2007, foi de aproximadamente 20 milhões de toneladas. A China se destaca como o maior produtor mundial, com de cerca de 30% da produção total, seguida por Índia, Estados Unidos e Egito (FAO, 2008). No Brasil, a produção de abobrinha está concentrada na região Sudeste, sendo os estados de São Paulo e Minas Gerais, os principais produtores (CAMARGO FILHO; MAZZEI; ALVES, 2003). O volume comercializado pelo CEAGESP em 2007, foi de cerca de 15 mil toneladas (CEAGESP, 2008).

No Brasil, a designação abobrinha é a dada às espécies *Cucurbita pepo* ou *Cucurbita moschata* quando os frutos são consumidos no estágio imaturo. Botanicamente, a principal diferença entre as duas espécies é a presença de espículos coriáceos, nos pedúnculos e pecíolos, das plantas de *C. pepo* (FILGUEIRA, 2000). *C. pepo*, conhecida como abobrinha-de-moita, tem a preferência dos consumidores da região sudeste em relação à *C. moschata*, e dos produtores, pelo seu hábito de crescimento determinado, que facilita a colheita e a circulação na área cultivada. A abobrinha-de-moita possui ainda, crescimento rápido e os frutos podem ser colhidos em 40 a 60 dias, enquanto que em *C. moschata*, a colheita só se inicia aos 75 dias (YUKI, 1990). Além disso, as plantas de abobrinha-de-moita são mais produtivas e seus frutos alcançam melhores preços no mercado, que as de *C. moschata* (CEAGESP, 2008).

Muitas pragas e doenças afetam as cucurbitáceas. As pragas mais importantes são brocas (*Diaphania nitidalis* e *D. hyalinata*), moscas das frutas (*Anastrepha grandis*), pulgões (*Aphis gossypii* e *Myzus persicae*), vaquinhas (*Diabrotica speciosa* e *D. bivitula*) e moscas brancas (*Bemisia tabaci* e *B. argentifolli*), que além de danos, podem transmitir viroses (PUIATII; SILVA, 2005a; PUIATII; SILVA, 2005b). As doenças que

atingem as cucurbitáceas podem ser causadas por fungos, bactérias e vírus. As mais problemáticas são oídio (*Erysiphe cichoracearum*), crestamento gomoso do caule ou cancro das hastes (*Didymella bryoniae*), podridão dos frutos (*Erwinia caratovora*, *Pythium* spp, *Phytophthora* spp. e *Sclerotium* spp.), antracnose (*Colletotrichum orbiculare*), fusariose (*Fusarium oxysporum*) e as doenças viróticas (PUIATII; SILVA, 2005a; PUIATII; SILVA, 2005b).

As doenças causadas por vírus têm se mostrado um problema de grande relevância para a produção da maioria das cucurbitáceas, uma vez que podem reduzir significativamente a produtividade, além de afetar a qualidade de frutos (YUKI et al., 2000). A incidência e a severidade das viroses dependem da espécie de vírus e suas estirpes, da espécie vegetal e cultivar, além da população de vetores e proximidades da fonte de inóculo (LIMA; VIEIRA, 1992).

No Brasil, são descritos 9 vírus infectando cucurbitáceas: *Papaya ringspot virus* - type W (PRSV-W), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Squash mosaic virus* (SqMV), *Zucchini letal chlorosis virus* (ZLCV), necrose da abóbora (provável *Necrovirus*), *Watermelon mosaic virus* - 2 (WMV-2), *Rhabdovirus* e *Flexivirus* (YUKI; COSTA; NAGAI, 1991; YUKI et al., 2000; NAGATA et al., 2005). Dentre esses vírus, o PRSV-W e o ZYMV são considerados os mais importantes para a abobrinha-de-moita e a melancia, pela alta incidência nas principais regiões produtoras (YUKI et al., 2000).

Em abobrinha-de-moita, analisando-se a incidência de viroses no Estado de São de Paulo, verificou-se principalmente, o PRSV-W em 48,3% das amostras, seguido do ZYMV, em 24,5% das amostras (YUKI et al., 2000). Em outros estados, foi constatado que o PRSV-W, o ZYMV e o ZLCV foram os vírus de maior incidência (STANGARLIN; DIAS; REZENDE, 2000; STANGARLIN et al., 2001).

Em melancia, as viroses ocasionadas pelo PRSV-W, ZYMV e WMV são consideradas fatores limitantes ao cultivo (OLIVEIRA; QUEIRÓZ; LIMA, 2002). No

estado de São Paulo, verificou-se a incidência do PRSV-W em 68,7% das amostras de melancia, seguido do ZYMV, em 18,7% das amostras de melancia (YUKI et al., 2000).

O *Papaya ringspot virus* - type W (PRSV-W) e o *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) que são espécies do gênero *Potyvirus*, da família *Potyviridae*, possuem partículas alongadas e flexuosas, e são constituídos por uma única molécula de RNA de fita simples senso positivo, envolvida por um capsídeo (MURPHY et al., 1995). Inicialmente, estes vírus expressam uma única poliproteína que é processada por autoproteólise, dando origem às proteínas virais (PURCIFULL et al., 1984). Essas proteínas incluem proteínas de movimento de célula a célula e a longa distância, proteínas responsáveis pela transmissão por afídeos, a replicase viral e a proteína capsidial (VERCHOT; KOONIN; CARRINGTON, 1991). Algumas proteínas virais podem agregar-se dentro de diferentes compartimentos celulares, formando inclusões citoplasmáticas, características da família *Potyviridae* (EDWARDSON; CHRISTIE, 1978). As inclusões citoplasmáticas, denominadas cata-ventos, podem ser formadas pelo acúmulo de algumas proteínas produzidas em excesso ou serem um resquício da atividade de determinada proteína ou ainda serem necessárias para que a proteína execute determinada função (ZERBINI; MACIEL-ZAMBOLIM, 1999).

A capa protéica ou proteína capsidial (CP) é o produto gênico mais estudado dos potyvirus. A CP é responsável pelo encapsulamento do RNA e participa também no processo de transmissão do vírus por afídeos (ATREYA; RACCAH; PIRONE, 1990), do movimento célula a célula (DOLJA et al., 1995; ROJAS et al., 1997) e a longa distância (DOLJA et al., 1995) e da indução de sintomas (NADERI; BERGER, 1997). Nos potyvirus, a proteína capsidial apresenta uma extremidade amínica muito variável, uma região central altamente conservada e uma extremidade carboxílica (SHUKLA; FRENKEL; WARD, 1991).

Tanto o PRSV-W como o ZYMV são transmitidos por diversas espécies de afídeos de maneira não persistente, ou seja, os vetores tornam-se virulíferos imediatamente após sua alimentação em plantas portadoras do vírus, não havendo

período de latência (BARNETT, 1991; BEDENDO, 1995). Experimentalmente, na transmissão desses 2 vírus, destacam-se as espécies *Aphis gossypii* e *Myzus persicae*, (CASTLE et al., 1992; GIAMPAN; REZENDE; 2001). No verão, época na qual reprodução dos vetores é acelerada, a incidência de viroses pode limitar o cultivo de cucurbitáceas, podendo chegar a inviabilizar seu cultivo em determinadas áreas (FILGUEIRA, 1981). Devido a sua rápida disseminação, podem ocorrer perdas consideráveis na produção, podendo chegar a 100% (GREBER, 1978).

Os sintomas causados pelo *Papaya ringspot virus* - type W e o *Zucchini yellow mosaic virus* são muito semelhantes, uma vez que ambos apresentam sintomas característicos de mosaico foliar, não podendo ser diferenciados visualmente. O sintoma inicial é o amarelecimento internerval nas folhas. Posteriormente, além do mosaico foliar, apresentam redução e deformação do limbo foliar. As plantas infectadas apresentam também uma redução severa no desenvolvimento. As plantas não produzem frutos após duas semanas de infecção ou produzem frutos deformados e com alteração de cor, como escurecimento, impróprios para comercialização (PROVVIDENTI, 1996). Além disso, em plantas de cucurbitáceas, a infecção conjunta do PRSV-W e ZYMV é comumente verificada. Assim, a diferenciação exata destes vírus pode ser feita apenas por hospedeiros diferenciadores, sorologia (ELISA) (KUROZAWA; PAVAN, 1997) e análises moleculares (RT-PCR).

O controle do PRSV-W e ZYMV é dificultado pela baixa eficiência do controle químico dos vetores e pela dificuldade de utilização de práticas culturais que minimizem a disseminação do vírus (YUKI, 1990; PROVVIDENTI, 1996). As principais recomendações para diminuição da incidência dessas duas viroses incluem: eliminação de possíveis hospedeiras próximas da área de plantio; controle dos afídeos com inseticidas ou óleos minerais; utilização de cobertura do solo com materiais repelentes, como casca de arroz, plásticos coloridos e materiais refletos (LOVISOLO, 1980; YUKI, 1990; KUROZAWA; PAVAN, 1997). Em melancia, o controle desses 2 vírus é ainda dificultado pela ausência de variedades resistentes ou tolerantes. Recentemente,

foi colocada no mercado nacional uma variedade de abobrinha-de-moita resistente ao PRSV-W, ZYMV, WMV e oídio, desenvolvida pela empresa Sakata Seed Sudamerica LTDA.

Em plantas de abobrinha-de-moita, a premunização é uma alternativa no controle do PRSV-W e do ZYMV. Esta técnica baseia-se na inoculação dos vírus com estirpes fracas, não afetando o desenvolvimento e a produção da abobrinha-de-moita, protegendo-a da infecção com estirpes severas (REZENDE; PACHECO, 1998). A preminização induz apenas sintomas fracos de mosaico nas folhas, contudo nenhum sintoma é observado nos frutos (LECOQ; LEMAIRE; WIPF-SCHEIBEL, 1991). A dupla premunização com as estirpes fracas PRSV-W-1 e ZYMV-M possibilitou a proteção de plantas de abobrinha-de-moita, contra estirpes severas desses vírus em casa-de-vegetação e em campo (RABELO, 2002; RABELO; REZENDE, 2004). A sua aplicação prática, todavia, não tem atingido escala comercial.

Em melancia, ao contrário dos resultados satisfatórios obtidos com a premunização de plantas de abobrinha-moita, as plantas premunizadas apresentaram redução do peso dos frutos (DIAS; REZENDE, 2001).

2.2 Cultura de tecidos em abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo*) e melancia (*Citrullus lanatus*)

Para o sucesso da transformação genética é essencial o desenvolvimento de um protocolo eficiente de regeneração *in vitro* de plantas, que pode ocorrer diretamente no tecido do explante ou indiretamente, com uma fase de calo antes da formação de gemas adventícias ou embriões somáticos (NIEDZ et al., 1989). A literatura apresenta protocolos eficientes de regeneração de plantas *in vitro*, para diversas cucurbitáceas, como abobrinha-de-moita (CHEE, 1992; ANANTHAKRISHNAN et al., 2003), abóbora (RAHMAN et al, 1993), melancia (COMPTON; GRAY, 1993; DABAUZA et al., 1997; KRUG et al., 2005), melão (GABA et al., 1999; STIPP et al., 2001), moranga (LEE;

CHUNG; EZURA, 2002; LEE; CHUNG; EZURA, 2003) e pepino (LOU; KAKO, 1994; KIM et al., 2000).

Nos gêneros *Cucurbita* e *Citrullus*, a morfogênese *in vitro* pode ser obtida tanto por organogênese *in vitro*, isto é, pelo desenvolvimento de gemas adventícias (KRUG et al., 2005; ANANTHAKRISHNAN et al., 2003) como por embriogênese somática, ou seja, pela indução e desenvolvimento de embriões a partir de tecido somático (CHEE, 1992; LEE; CHUNG; EZURA, 2003). As gemas adventícias são estruturas monopolares que se desenvolvem com conexão vascular com tecido de origem, enquanto que embriões somáticos são estruturas bipolares não conectadas ao tecido de origem, com sistema vascular independente (HACCIUS, 1978).

Em *Citrullus lanatus*, a embriogênese somática pode ser obtida utilizando-se como explantes embriões zigóticos imaturos cultivados em meio de cultura, suplementado com 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) (DONG; JIA, 1991; COMPTON; GRAY, 1993). A combinação de auxina com citocinina também favoreceu o processo embriogênico, sendo os melhores resultados obtidos pelo uso de meio de cultura, suplementado com 2,4-D e TDZ (thidiazuron) (DONG; JIA, 1991). No entanto, o processo de embriogênese somática não é recomendado para propagação *in vitro* de melancia devido à baixa regeneração quando comparada à organogênese *in vitro*, além da dificuldade de obtenção de explantes para indução do processo embriogênico (COMPTON; GRAY; GABA, 2004).

Em *Cucurbita pepo*, os explantes mais utilizados na embriogênese somática são segmentos de cotilédone obtidos a partir de sementes maduras (CHEE, 1991; CHEE, 1992; GONSALVES; XUE; GONSALVES, 1995) ou de plântulas germinadas *in vitro*, com 3 a 7 dias de idade (GONSALVES; XUE; GONSALVES, 1995; KINTZOS et al., 1998), segmentos de hipocótilo (JELASKA, 1974; JELASKA et al., 1985) e segmentos de folhas jovens (GONSALVES; XUE; GONSALVES, 1995; KINTZOS et al., 2002). Os explantes que apresentam melhores resultados na formação e

desenvolvimento de embriões somáticos são segmentos de cotilédone obtidos a partir de sementes germinadas *in vitro* (GONSALVES; XUE; GONSALVES, 1995).

Apesar de menos utilizados no processo embriogênico de abobrinha-de-moita, embriões somáticos também podem ser obtidos a partir da cultura de óvulos (METWALLY et al., 1998a; SHALABY, 2007) e da cultura de anteras (METWALLY et al., 1998b). Os ovários são coletados um dia antes da antese e pré-tratados sob refrigeração (4 °C) por 0, 2 e 4 dias. Após o pré-tratamento, os óvulos são removidos dos ovários (METWALLY et al., 1998a). As anteras são coletadas a partir de flores masculinas com 9 - 10 mm e pré-tratadas sob refrigeração (4 °C) durante 4 dias (METWALLY et al., 1998b). Os calos obtidos tanto a partir da cultura de anteras, como de óvulos, são transferidos para meio de indução, para obtenção de embriões somáticos (METWALLY et al., 1998a; METWALLY 1998b).

Auxinas, como o 2,4-D, são muito empregadas na indução da embriogênese somática de abobrinha-de-moita (CHEE, 1992; GONSALVES; XUE; GONSALVES, 1995; METWALLY et al., 1998a; METWALLY et al., 1998b). No processo embriogênico, as combinações de auxinas com citocininas também são importantes (CHEE, 1991; CHEE, 1992). Neste caso, a concentração de auxinas é elevada, enquanto que a concentração de citocininas é bem menor (CHEE, 1992; KINTZOS et al., 2002). As combinações de 2,4-D e cinetina ou 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxi acético), BAP (benzilaminopurina) e cinetina possibilitam a obtenção de embriões somáticos a partir de calos obtidos de folhas novas em abobrinha-de-moita (KINTZOS et al., 1998; KINTZOS et al., 2002).

Em melancia, os explantes utilizados na indução da organogênese *in vitro* são segmentos de cotilédone obtidos de plântulas germinadas *in vitro*, com 2 a 5 dias de idade, podendo ser tanto da parte distal como da proximal dos cotilédones (COMPTON; GRAY, 1993; CHOI et al., 1994; COMPTON, 2000; KRUG et al., 2005). Entretanto, a melhor eficiência de regeneração depende do genótipo utilizado, uma vez que para algumas variedades os melhores resultados foram obtidos com segmentos de

cotilédone da parte proximal, enquanto que em outras com a parte distal (COMPTON, 2000). Em melancia, o processo organogênico também é influenciado pela ploidia, sendo que variedades diplóides apresentaram uma melhor eficiência de regeneração do que variedades triplóides (COMPTON; GRAY, 1994).

Na organogênese *in vitro* de melancia, o regulador vegetal mais empregado é a benzilaminopurina (BAP), sendo que as concentrações utilizadas são bastante variadas (DONG; JIA, 1991; DABAUZA et al., 1997; KRUG et al., 2005). A combinação BAP (1,0 mg/L) e IAA (ácido indolacético - 0,1 mg/L) também é relatada com sucesso em organogênese de melancia (PARK et al., 2005). Para o alongamento das gemas adventícias de melancia, os explantes responsivos são transferidos para meio de cultura MS, suplementado com cinetina (DONG; JIA, 1991; KRUG et al., 2005) ou em ausência de reguladores vegetais (COMPTON; GRAY, 1993).

O processo de organogênese *in vitro* de *Cucurbita pepo*, é obtido com o uso de explantes compostos pela região basal do cotilédone e por um segmento do hipocótilo, coletada de plântulas germinadas *in vitro*, com 5 a 9 dias de idade, sendo que a idade em que os explantes foram utilizados dependeu da variedade estudada. A regeneração das gemas adventícias ocorreu na região em que o ápice vegetativo foi retirado (ANANTHAKRISHNAN et al., 2003; KATHIRAVAN et al., 2006; ANANTHAKRISHNAN et al., 2007). Esses autores relataram ainda que a região basal do cotilédone com mais de 2 mm, a região basal sem o hipocótilo e apenas o segmento do hipocótilo são ineficientes para obtenção de gemas adventícias em *C. pepo*. Resultados contrários foram apresentados por Pal et al. (2007) na obtenção de gemas adventícias a partir de segmentos de cotilédone ou segmentos de hipocótilo obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro*, com 8 a 9 dias de idade.

A citocinina BAP é o regulador vegetal mais utilizado para indução da organogênese *in vitro* em abobrinha-de-moita. A concentração de BAP utilizada é de 1,0 mg/L (ANANTHAKRISHNAN et al. 2003; KATHIRAVAN et al., 2006; ANANTHAKRISHNAN et al., 2007). O regulador vegetal TDZ (0,5 mg/L) e as

combinações BAP (1,0 mg/L) + GA₃ (ácido giberélico - 0,1 mg/L) e BAP (1,0 mg/L) + NAA (ácido naftalenoacético - 0,1 mg/L) também são eficientes no processo organogênico de abobrinha-de-moita (PAL et al., 2007). Para o alongamento das gemas adventícias obtidas, os explantes responsivos de abobrinha-de-moita são transferidos para meio de cultura MS, suplementado com uma dose reduzida de BAP (0,1 mg/L), com uma combinação de BAP (0,1 mg/L) e GA₃ (1,0 mg/L) ou em ausência do regulador vegetal. A combinação com BAP + GA₃ propiciou uma melhor resposta no alongamento dessas (ANANTHAKRISHNAN et al., 2003; KATHIRAVAN et al., 2006; ANANTHAKRISHNAN et al., 2007).

A obtenção de gemas adventícias em abobrinha-de-moita também é influenciada pelo genótipo utilizado. Diferenças significativas foram observadas em diversas variedades, sendo que em duas espécies recalcitrantes, a regeneração *in vitro* somente foi possível, quando os explantes receberam tratamento de sonicação (KATHIRAVAN et al., 2006; ANANTHAKRISHNAN et al., 2007).

2.3 Transformação genética em cucurbitáceas

A transformação genética de plantas visa a introdução, a integração e a expressão de genes exógenos. Os trabalhos de transformação genética em cucurbitáceas iniciaram-se em 1990 (FANG; GRUMET, 1990) com o desenvolvimento de um sistema eficiente de produção de plantas transgênicas de *Cucumis melo* via *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando segmentos de cotilédone obtidos a partir de sementes germinadas *in vitro*, com 4 - 5 dias de idade, para introdução do gene *npII*, para resistência ao antibiótico canamicina. Contudo, a primeira cucurbitácea transgênica, expressando um gene de interesse agrônomo, foi obtida por Gonsalves et al. (1992), que desenvolveram plantas de *Cucumis sativus* resistentes ao *Cucumber mosaic virus* (CMV), pela expressão do gene da proteína capsidial desse vírus.

A partir disso, plantas transgênicas em cucurbitáceas com diversos genes com características de interesse agrônomo têm sido obtidas, como: aumento da vida pós-colheita, com a expressão do gene antisense da enzima ACC oxidase, relacionado à biossíntese do etileno (AYUB et al., 1996; BOUQUIN et al., 1997); resistência a fungos, como *Botrytis cinerea*, com a expressão do gene *RCC2* da quitinase do arroz (TABEL et al., 1998); aumento da tolerância à salinidade, com a expressão do gene *HAL1* (ELLUL et al., 2003) e resistência a vírus, com utilização do gene da proteína capsidial do CMV (GONSALVES et al., 1994), do ZYMV (FANG; GRUMET, 1993), do WMV-2 (FUCHS et al., 1997) e do SqMV (PROVVIDENTI; TRICOLI, 2002), conferindo resistência a esses vírus.

Em abobrinha-de-moita e melancia, a maioria dos trabalhos de transformação genética existentes concentra-se na obtenção de plantas transgênicas resistentes a vírus (ARCE-OCHOA; DAINELLO; PIK, 1995; CLOUGH; HAMM, 1995; FUCHS; GONSALVES, 1995; TRICOLI et al., 1995; FUCHS et al., 1998; PANG et al., 2000; PROVVIDENTI; TRICOLI, 2002; PARK et al., 2005). A utilização do gene da proteína capsidial de diferentes vírus, possibilita a obtenção de plantas transgênicas de resistência múltipla, permitindo que diversos pesquisadores desenvolvessem plantas transgênicas de abobrinha-de-moita e melancia, com resistência a dois ou três vírus (FUCHS; GONSALVES, 1995; TRICOLI et al., 1995; FUCHS et al., 1998).

Tricoli et al. (1995) desenvolveram, via *Agrobacterium tumefaciens*, linhagens de plantas transgênicas de abobrinha-de-moita, para resistência ao CMV, ZYMV e WMV-2. No entanto, em condições de campo, apenas a linhagem ZW-20H, expressando a proteína capsidial do ZYMV e do WMV-2, apresentou ausência de sintomas ou pequenos pontos cloróticos quando inoculadas com esses dois vírus (FUCHS; GONSALVES, 1995; TRICOLI et al., 1995). Em 1995, esse híbrido resistente ao ZYMV e ao WMV (ZW-20H) foi aprovado para a comercialização nos Estados Unidos e denominado comercialmente 'Freedom II'. A variedade 'Freedom II' foi a primeira planta transgênica resistente a vírus liberada comercialmente (TEPFER, 2002).

Posteriormente, as plantas transgênicas ZW-20H ('Freedom II') e ZW-20B, ambas expressando a proteína capsial do ZYMV e do WMV-2, foram testadas em campo, em dois anos consecutivos de plantio para verificar o comportamento e o nível de resistência aos dois vírus estudados. As plantas inoculadas foram analisadas pelo teste sorológico ELISA, demonstrando que a maioria das plantas não apresentaram o ZYMV e o WMV-2, sendo que somente 4% das plantas de ZW-20H e 9% das plantas de ZW-20B desenvolveram sintomas pontuais (KLAS; FUCHS; GONSALVES, 2006). Esses resultados confirmaram os resultados obtidos anteriormente para resistência de plantas transgênicas de abobrinha-de-moita ao ZYMV e WMV-2. Contudo, essas plantas não permaneceram no mercado norte-americano, pois não obtiveram o sucesso esperado pelos produtores, uma vez que são suscetíveis a outros vírus, como o PRSV-W.

Recentemente, dois relatos com transformação genética em melancia (CHO et al., 2008) e em abobrinha-de-moita (SHAH et al., 2008) foram apresentados na literatura. Plantas de abobrinha-de-moita foram transformadas para tolerância a baixas temperaturas, com gene *cbf1* sob o controle do promotor induzível *rd29A* (SHAH et al., 2008). Em melancia foram obtidas com sucesso plantas transgênicas com um outro gene de seleção, o gene *bar*, que confere resistência ao herbicida glifosato (CHO et al., 2008).

2.4 Resistência derivada do patógeno associada à transformação genética

Com o desenvolvimento de sistemas de transformação genética de plantas e o surgimento do conceito da resistência derivada do patógeno (*Pathogen-derived resistance* - PDR) (SANFORD; JOHNSON, 1985), novas perspectivas surgiram para o controle das doenças causadas por vírus. O princípio da resistência derivada do patógeno propõe que a resistência a determinado vírus pode ser obtida a partir de genes do seu próprio genoma. Esses genes são identificados e clonados a partir do vírus e, posteriormente, introduzidos e expressos no genoma da planta, via

transformação genética, podendo conferir resistência ao patógeno (SANFORD; JOHNSON, 1985). Além disso, a obtenção de plantas transgênicas resistentes a vírus utilizando esse princípio é muito interessante, pois genes de vírus são mais fáceis de serem identificados e isolados que os genes de plantas (BUCK, 1991).

Em 1986, utilizando esta estratégia, foram desenvolvidas as primeiras plantas transgênicas com resistência derivada do patógeno: plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) expressando o gene da proteína capsial do *Tobacco mosaic virus* – TMV (POWELL-ABEL et al., 1986). Atualmente, existem plantas transgênicas com resistência específica a vírus em diversas espécies vegetais de grande importância econômica, como abobrinha (TRICOLI et al., 1995; JAN et al., 2000), batata (MISSIOU et al., 2004), mamoeiro (TENNANT et al., 2001), pepino (GONSALVES et al., 1992), soja (WANG et al., 2001), tomateiro (KANIEWSKI et al., 1999) e trigo (SIVAMANI et al., 2002).

Para obtenção de plantas transgênicas empregando o princípio da resistência derivada do próprio genoma viral utilizam-se duas principais estratégias: uma estratégia baseada na expressão da proteína do transgene (*protein-mediated resistance*) e outra baseada na sequência de RNA do transgene (*RNA-mediated resistance*) (SPIELMANN et al., 2000; GOLDBACH; BUCKER; PRINS, 2003). A resistência baseada na sequência de RNA poder ser transcricional, onde não ocorre a transcrição devido à metilação de uma região promotora, ou pós-transcricional, onde ocorre a degradação do RNA após sua transcrição (YU; KUMAR, 2003).

A resistência mediada pela expressão da proteína do transgene consiste na introdução deste gene, clonado do vírus que se pretende inibir, na planta hospedeira. Na planta, a expressão dessa proteína interfere no ciclo replicativo do vírus homólogo, impedindo sua replicação (BAULCOMBE, 1996; GOLDBACH; BUCKER; PRINS, 2003). A resistência obtida em plantas transgênicas expressando o gene da proteína capsial se mostrou dependente do nível de homologia entre o transgene e o gene da proteína

capsidial do isolado que infecta a planta, sendo que quanto maior o nível de homologia mais efetiva é a resistência (LINDBO et al. 1993; TENNANT et al., 1997).

Contudo, a resistência de plantas transgênicas mediada pela introdução de genes do próprio genoma viral não é necessariamente desencadeada pela sua expressão (BAULCOMBE, 1996). A resistência a vírus em plantas transgênicas pode também ser obtida pelo silenciamento gênico por homologia do RNA, mecanismo que ocorre naturalmente em plantas e outros organismos, impedindo a invasão de genomas 'estrangeiros'. O silenciamento gênico pode ocorrer quando o gene endógeno homólogo está associado a uma sequência específica de RNA a ser degradada (LINDBO; DOUGHERTY, 2005).

Em algumas plantas, o silenciamento gênico é transcricional (*Transcriptional Gene Silencing* - TGS), inibindo a transcrição por metilação do DNA nuclear de um gene específico. Posteriormente, a cromatina reestabelece o nível do DNA (YU; KUMAR, 2003; LINDBO; DOUGHERTY, 2005; AMBION, 2006). O silenciamento gênico transcricional associado à metilação do promotor alvo pode ser desencadeado por construções do tipo *hairpin* RNA ou pela recombinação de sequências do transgene e do vírus (METTE et al., 2000). Para a resistência a vírus, a metilação de promotores pode causar o silenciamento do gene alvo e conseqüentemente, conferir resistência da planta transgênica ao vírus em questão (JONES; RATCLIFF; BAULCOMBE, 2001). Esse fenômeno foi relatado e confirmado em plantas de pomelo, transformadas com gene que codifica a proteína p23 do *Citrus tristeza virus* (CTV). Nesse trabalho, a resistência ao CTV foi verificada em apenas uma planta transgênica, sendo que nesta planta não foi possível detectar os siRNAs, assim como o RNA do próprio CTV (FEBRES; MOORE; LEE, 2008).

Entretanto, a maioria das plantas transgênicas resistentes a vírus apresenta silenciamento gênico pós-transcricional (*Post-Transcriptional Gene Silencing* - PTGS). Neste caso, a transcrição do gene local não é afetada, ocorrendo somente a

degradação de uma sequência específica do RNA mensageiro (mRNA) (YU; KUMAR, 2003; LINDBO; DOUGHERTY, 2005; AMBION, 2006).

O silenciamento gênico pós-transcricional foi observado primeiramente em *Petunia hybrida* e denominado co-supressão. As plantas de petúnia foram transformadas para superexpressar o gene *chalcona sintase* (*chs*), com o objetivo de intensificar a cor púrpura das flores. No entanto, muitas das flores desenvolvidas eram completamente brancas. Estudos revelaram que plantas transformadas com gene *chs* apresentavam esse gene silenciado ou 'desligado' em diferentes níveis, ou seja, o fenômeno consistia no silenciamento de um gene causado pela presença de um gene homólogo (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990). Mais tarde, plantas de tabaco transformadas com fragmentos do gene da proteína capsidial do *Tobacco etch virus* (TEV) apresentavam resistência a esse vírus. Contudo, verificou-se que o TEV podia iniciar a replicação nas plantas transformadas, produzindo sintomas típicos da infecção, mas estas plantas eram capazes de se recuperar da infecção, aproximadamente 3 a 5 semanas após a inoculação com o TEV, retornando ao estado sadio de planta não infectada (LINDBO et al., 1993). O entendimento desse fenômeno somente ocorreu anos depois, com resultados dos experimentos com *Caenorhabditis elegans*, surgindo o termo interferência por RNA (*RNA interference* – RNAi) (FIRE et al., 1998). No entanto, essa conexão biológica, não foi estabelecida imediatamente, pois o mecanismo em *C. elegans* envolvia a supressão da tradução, enquanto que em plantas, o processo foi tratado apenas como uma diminuição da estabilidade do RNA alvo (BAULCOMBE, 2008).

O PTGS é observado em plantas (WATERHOUSE; GRAHAM; WANG, 1998), nematóides (FIRE et al., 1998), protozoários (NGO et al., 1998), insetos (KENNERDELL; CARTHEW, 1998) e animais (WIANY; ZERNICKA-GOETZ, 2000), e é considerado responsável pelo mecanismo de resistência a vírus, além de participar na regulação da expressão gênica de vários processos de desenvolvimento, (YU; KUMAR, 2003; BARTEL, 2004; BAULCOMBE, 2004). O PTGS ou simplesmente silenciamento

por RNA (*RNA silencing*), termo mais aceito atualmente (BAULCOMBE, 2008), tornou-se o maior foco de pesquisas da biologia molecular e pesquisas biomédicas. Este fato pode ser verificado com uma simples pesquisa, em qualquer base de dados da área, com as palavras *RNA silencing*, cuja resposta mostra um número expressivo de artigos científicos.

Os significativos avanços na elucidação dos mecanismos relacionados ao silenciamento por RNA têm gerado uma riqueza de informações não somente sobre os mecanismos em si, mas também sobre a complexidade de padrões biológicos, bem como revelado suas interações, tornando-se uma importante ferramenta para estudo da função gênica e melhorias na produção de espécies vegetais de interesse econômico. Recentes descobertas com relação às respostas a estresses bióticos e abióticos, em plantas, mostram que o silenciamento por RNA poderá ajudar o ser humano a enfrentar os problemas na produtividade agrícola devido às condições ambientais cada vez mais desfavoráveis causadas pelas mudanças climáticas (EAMENS et al., 2008).

No silenciamento por RNA, RNAs em sequências invertidas são gerados e assumem a estrutura de grampo (*hairpin*), com a formação de uma dupla fita RNA retorcida (*double strand RNA* - dsRNA), caracterizando assim o início do processo e possibilitando a posterior degradação de uma sequência específica de nucleotídeos do mRNA, para a expressão de genes específicos (LEE; ROTH, 2003; YU; KUMAR, 2003). A dsRNA então é reconhecida pela enzima *dicer*, uma ribonuclease RNase III que processa e cliva dsRNA em pequenos RNAs inteferentes (*small RNAs* – siRNAs) de 21-25 nucleotídeos de tamanho, dependendo da espécie. A clivagem do dsRNA mediada pela *dicer* requer ATP. A *dicer* é altamente conservada e composta por 2 domínios modulares de RNase III, um domínio de helicase, um domínio PAZ e um domínio DUF283 e um motivo de ligação a RNA de dupla fita (HANNON, 2002; BUSHMAN, 2003).

Os siRNAs sintetizados se associam a uma proteína R2D2, determinando qual das duas fitas será incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-*

induced silencing complex - RISC). No citosol, os siRNAs juntamente com proteínas, membros da família Argonauta formam o RISC, responsável pela clivagem e posterior degradação do RNA alvo. As proteínas da família Argonauta, com domínios PAZ e PIWI parecem determinar a especificidade do RISC a um determinado siRNA. No complexo RISC, o RNA alvo é clivado em uma única vez e posteriormente liberado e sintetizado, não se acumulando, pois é degradado rapidamente, no citoplasma pelo 'ataque' de endonucleases (LEE; ROTH, 2003, BAULCOMBE, 2004 AMBION, 2006). Sabe-se que a sinalização do silenciamento é sistêmica, podendo ser com movimento célula a célula, via plasmodesmos e a longas distâncias, via floema (HANNON, 2002).

Apesar de existirem inúmeros relatos do sucesso do silenciamento por RNA para resistência a vírus, a resistência nem sempre é totalmente efetiva, pois algumas proteínas virais são capazes de suprimir esse silenciamento, promovendo o aparecimento dos sintomas nas plantas (KUBOTA et al., 2003; MITTER; SULISTYOWATI; DIETZGEN, 2003).

Construções gênicas possuindo um íntron, entre a fita senso e a antisenso do gene, favorece a formação da dsRNA, aumentando as chances de ocorrer o silenciamento (YU; KUMAR, 2003). O uso de uma construção gênica do tipo *hairpin*, (*hpRNA*) constituída pela seqüência senso e antisenso do gene de interesse, espaçados por um íntron, apresenta uma eficiência de silenciamento gênico de 90 a 100% (SMITH et al., 2000; WESLEY et al., 2001; WATERHOUSE; HELLIWELL, 2003). Diversos estudos indicam que esse tipo de construção gênica como indutor da resistência mediada por RNA, pode ser muito mais eficiente que o uso de construções gênicas com fita simples senso ou antisenso (SMITH et al., 2000).

Além disso, pesquisas mostram que seqüências de 110 - 150 pb do gene são suficientes para induzir o silenciamento (JAN et al. 2000; BUCHER et al., 2006). Com a utilização de uma única construção gênica quimérica do tipo *hairpin* foi possível obter uma alta freqüência de resistência a múltiplos vírus (*Tomato spotted wilt virus* - TSWV, *Tomato chlorotic spot virus* - TCCV, *Groundnut ringspot virus* - GRSV e *Watermelon*

silver mottle virus - WSMoV) em *Nicotiana benthamiana*, utilizando-se fragmentos fusionados de 150 pb do gene *N* desses 4 vírus (BUCHER et al., 2006).

Outras estratégias podem ser empregadas na obtenção de plantas transgênicas para resistência a vírus, com o uso do gene da replicase viral ou de genes de proteínas relacionadas ao movimento viral. As proteínas codificadas por esses genes entram em competição com a proteína funcional produzida pelo vírus, diminuindo o movimento célula a célula, resultando em resistência, impedindo que o vírus se estabeleça, ou atrasando o aparecimento dos sintomas causados pela virose nas plantas infectadas (LOMONOSSOF, 1995; BAULCOMBE, 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

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

3.1 Material Vegetal

Sementes de abobrinha-de-moita cv. 'Caserta' foram imersas em água por 30 minutos, para facilitar a retirada da casca. As sementes sem casca foram colocadas em álcool etílico 70% por 1 minuto e lavadas com água destilada (4x). A assepsia das sementes foi feita em solução de hipoclorito de sódio (cloro ativo 2,5%) em água, na proporção de 1:2, por 20 minutos, seguida de lavagens com água destilada estéril (4x), em condições assépticas e mantidas em água estéril por 2 a 3 horas, conforme procedimentos descritos por Ananthakrishnan et al. (2003). As sementes foram germinadas *in vitro* isoladamente, para diminuir a contaminação por bactérias, em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30 g/L) e ágar (8 g/L). O material foi incubado sob fotoperíodo de 16 horas de luz, a 27 °C.

A assepsia de sementes de melancia cv. 'Crimson Sweet' foi realizada em duas etapas conforme descrito por Compton & Gray (1993). Inicialmente, a assepsia foi realizada em hipoclorito de sódio (cloro ativo 2,5%), por 30 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas com água destilada estéril (4x), em condições assépticas, e mantidas por 16 horas em água destilada estéril, no escuro. Após esta etapa, retirou-se a casca das sementes e foi realizado um segundo tratamento de assepsia em solução comercial de hipoclorito de sódio (cloro ativo 2,5%) em água, na proporção de 1:2, por 20 minutos, seguida de lavagens com água destilada estéril (4x), em capela de fluxo

laminar. As sementes foram germinadas *in vitro* em recipientes do tipo Magenta (Sigma), contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30 g/L) e ágar (8 g/L). O material foi incubado no escuro, a 27 °C.

Durante o período em que as sementes foram colocadas para germinar, observou-se a abertura dos cotilédones e o alongamento do eixo hipocótilo/radícula. Após 3 e 4 dias, as sementes foram retiradas em condições assépticas, sendo excisados a radícula, o ápice vegetativo e a metade apical dos cotilédones. O explante propriamente dito foi composto pela região basal do cotilédone (3 a 6 mm) e um segmento do hipocótilo (1 a 2 mm) (Figura 1). A orientação do explante para incubação foi com a superfície abaxial em contato com meio de cultura.

Figura 1 - Explantes utilizados em experimentos de transformação genética de melancia e abobrinha-de-moita. a) região basal do cotilédone (c) e um segmento do hipocótilo (h) obtidos a partir de sementes germinadas *in vitro* de melancia, com 3 dias de idade. b) região basal do cotilédone (c) e um segmento do hipocótilo (h) obtidos a partir de sementes germinadas *in vitro* de abobrinha-de-moita, com 4 dias de idade. Barras: 500 μ m (a); 1 mm (b).

3.2 Organogênese *in vitro* de abobrinha-de-moita

3.2.1 Condições de cultivo

Para otimização da indução e do desenvolvimento de gemas adventícias foram testadas diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP - 0,0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0;

1,25 mg/L). Utilizou-se o meio de cultura MS, suplementado com sacarose (30 g/L) e solidificado com ágar (8 g/L). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8. O material foi cultivado a 27 °C, sob fotoperíodo de 16 horas de luz. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com 7 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri com 6 explantes. Diferentes idades das plântulas germinadas *in vitro* (4, 5 e 6 dias) para a coleta dos explantes também foram testadas na obtenção de gemas adventícias, em meio de cultura MS, suplementado com BAP (1,0 mg/L). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com 6 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri com 6 explantes.

3.2.2 Alongamento e enraizamento das gemas obtidas

As gemas adventícias obtidas em meio de cultura MS, suplementado com BAP foram transferidas para meio de cultura MS, suplementado com ácido giberélico (GA₃ - 1,0 mg/L) e BAP (0,1 mg/L), para o alongamento e desenvolvimento de plantas. O subcultivo foi realizado em intervalo de 15 dias. Para enraizamento, as gemas alongadas foram transferidas para MS básico, suplementado com ácido indolbutírico (IBA - 1,0 mg/L).

3.2.3 Aclimatização das plantas

Após o enraizamento, as plantas de abobrinha-de-moita foram transferidas para aclimatização em sala de luz. As plantas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente e transferidas para vasos (0,5 L), contendo substrato (Plantmax - hortaliças) autoclavado e metade da concentração de sais minerais (½ MS). Nesta etapa da aclimatização as plantas foram cobertas com saco plástico e mantidas sob fotoperíodo de 16 horas, a 27 °C. A retirada do saco plástico foi gradual por um período

de 15 dias. Após o período de aclimatização, as plantas foram transferidas para vasos de 5 L, mantidas em uma mistura de terra, areia e esterco e cultivadas em casa-de-vegetação. As plantas foram adubadas com osmocote, na proporção 22:4:8 (N:P:K), a cada 10 dias aproximadamente.

3.2.4 Análise histológica

Amostras de explantes de abobrinha-de-moita cultivados em meio de cultura MS, suplementado com BAP (1,0 mg/L), foram coletadas e preparadas para análise histológica. As amostras coletadas foram mantidas em solução fixadora (paraformaldeído - 4%), sob refrigeração (4 °C). Os tecidos fixados foram desidratados à temperatura ambiente em uma série alcóolica de 100% metilcelosolve, etanol, propanol, e butanol, seguido de imersão em butanol:meio de infiltração (1:1) e, posteriormente, imersão em meio de infiltração (100%). As amostras em meio de infiltração foram mantidas a 4 °C, por 7 dias. A emblocagem foi realizada em Historesina (Leica, Heidelberg). Após a polimerização da resina, foram realizados cortes seriados (5 µm), com auxílio de micrótomo (Leica RM2155), os quais foram corados com azul de toluidina (0,05%), por cerca de 2 minutos, para as observações gerais.

3.2.5 Análise morfológica

Amostras de explantes de abobrinha-de-moita cultivados em meio de cultura MS, suplementado com BAP (1,0 mg/L) foram coletados e preparados para microscopia eletrônica de varredura. Foi utilizada solução fixadora (paraformaldeído - 4%), sob refrigeração (4 °C). A desidratação foi realizada em uma série etílica (35, 50, 60, 70, 80, 90, 95 e 100%). O material desidratado foi colocado em recipientes próprios para secagem de amostras ao ponto crítico. Após a secagem, o material foi montado em suportes específicos para microscópio eletrônico de varredura, com auxílio de

microscópio estereoscópico. Os suportes contendo as amostras foram cobertos com ouro (45 a 60 nm de ouro) em metalizador (RODRIGUEZ; WETZSTEIN, 1998). O material foi observado em microscópio de varredura, do Núcleo de Apoio à Pesquisa / Microscopia Aplicada a Agricultura - NAP/MEPA, ESALQ/USP.

3.3 Obtenção da construção gênica para transformação genética

3.3.1 Isolamento dos fragmentos dos genes da proteína capsidial do ZYMV e do PRSV-W

3.3.1.1 Inoculação mecânica dos vírus

Folhas de diferentes plantas de abobrinha-de-moita foram inoculadas individualmente, com isolado do ZYMV, proveniente de Rinópolis (ZYMV-RI) e com isolado do PRSV-W, proveniente de Campinas (PRSV-W-C). Os inóculos do ZYMV-RI e PRSV-W-C foram obtidos, separadamente, pela maceração de folhas de abobrinha-de-moita infectadas, em tampão de fosfato de potássio (0,02 M - pH 7,0), contendo sulfito de sódio (0,02 M). A diluição do inóculo utilizada foi 1:10 (peso:volume).

Os inóculos foram aplicados em folhas expandidas do ponteiro de plantas de abobrinha-de-moita. A inoculação foi feita friccionando-se o dedo indicador, umedecido no inóculo, nas folhas previamente polvilhadas com o abrasivo carbureto de silício (Carborundum). Posteriormente, as folhas foram lavadas com água para retirada do excesso de inóculo e abrasivo. Cada vírus foi inoculado, separadamente, em diferentes plantas.

3.3.1.2 Isolamento do RNA total a partir de plantas infectadas

O RNA total foi isolado a partir de folhas jovens de plantas infectadas pelos vírus, apresentando sintomas de mosaico. A extração do RNA total foi realizada com o produto comercial Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguindo as orientações do fabricante. Foram utilizados 3 discos de folha (diâmetro 0,5 cm). Alíquotas do RNA extraído foram desnaturadas por 10 minutos, a 65 °C e em seguida, mantidas em gelo, por 5 minutos. Posteriormente, foram aplicadas em gel desnaturante, para verificar a qualidade do RNA extraído.

3.3.1.3 Síntese e amplificação do DNA complementar por RT-PCR

A transcrição reversa e amplificação dos fragmentos foram realizadas em uma etapa, com o kit SuperScript™ One-Step RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) com *Taq Platinum* (Invitrogen), adicionando os *primers* (oligonucleotídeos) específicos para os genes da proteína capsidial do ZYMV (Figura 2) e do PRSV-W (Figura 3). Os *primers* foram definidos pelo programa Primer 3, disponível no endereço <http://frodo.wi.mit.edu/>. Esses *primers* contêm sítios de restrição específicos para posterior clonagem, tanto da parte senso quanto da parte antisenso do vetor *hairpin*. O programa utilizado para transcrição reversa e síntese da primeira fita de cDNA para cada gene, consistiu em 1 ciclo de 30 minutos a 50 °C, seguido de 2 minutos a 94 °C, quando iniciou-se amplificação dos fragmentos. Para o gene da proteína capsidial do ZYMV, utilizou-se o programa de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C e 30 segundos 72 °C, e 1 ciclo de 5 minutos, para extensão final.

a) *Primer ZYMV-BstEII/NcoI*

BstEII   NcoI

5' CCC GGTGACC CCATGG GATTTGAATGAGCAACAGATGG 3'

b) *Primer ZYMV-BamHI*

BamHI

5' CCC GGATCC CTCCGCTGCATCTGAGAAGT 3'

Figura 2 - Seqüência dos *primers* utilizados para amplificar o fragmento do gene da proteína capsidial do ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*). a) *primer forward* ZYMV, contendo os sítios de restrição das enzimas *BstEII* e *NcoI*. b) *primer reverse* ZYMV, contendo os sítios de restrição da enzima *BamHI*.

Para o gene da proteína capsidial do PRSV-W, utilizou-se o programa de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 50 °C e 30 segundos 72 °C, com uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. As reações foram aplicadas em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo. Após a eletroforese, os fragmentos de aproximadamente 200 pb foram cortados do gel e purificados com o kit 'QIAEX II Gel Extraction' (QIAGEN GmbH, Alemanha), seguindo-se as instruções do fabricante.

a) *Primer PRSV-W-BamHI*

BamHI

5' CCC GGATCC TCGTGCCACTCAATCACAAT 3'

b) *Primer PRSV-W-SacI/KpnI*

SacI   KpnI

5' CCC GAGCTC GGTACC GACGGAGTAGCGTGCTCAAT 3'

Figura 3 - Seqüência dos *primers* utilizados para amplificar o fragmento do gene da proteína capsidial do PRSV-W (*Papaya ringspot mosaic virus* – type Watermelon). a) *primer forward* PRSV-W, contendo os sítios de restrição da enzima *BamHI*. b) *primer reverse* PRSV-W, contendo os sítios de restrição das enzimas *SacI* e *KpnI*.

3.3.2 Pré-clonagem dos fragmentos isolados em vetor pGEM®-T

Inicialmente, foram realizadas pré-clonagens dos fragmentos do gene da proteína capsidial do ZYMV e do PRSV-W, para facilitar a posterior clonagem no cassete de expressão. Os fragmentos do ZYMV e do PRSV-W, amplificados por RT-PCR e purificados do gel de agarose, foram clonados, separadamente no vetor pGEM®-T (Easy Vector Systems - Promega, Madison, USA). Após a clonagem dos dois fragmentos na parte senso do cassete de expressão, esses foram amplificados juntos por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), com a utilização dos *primers* ZYMV-*BstEII/NcoI* e PRSV-W-*SacI/KpnI*, obtendo-se um fragmento de 400 pb, que foi purificado do gel de agarose com o kit 'QIAEX II Gel Extraction' e posteriormente clonado no pGEM®-T, para que então seja clonado na parte antisenso do cassete de expressão (Figura 4). As clonagens no pGEM®-T foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.3 Construção do cassete de expressão

A estratégia para construção gênica do cassete do tipo *hairpin* foi a utilização de fragmentos, de aproximadamente 200 pb, fusionados, de regiões mais conservadas, dos genes da proteína capsidial do ZYMV e do PRSV-W. Para obtenção do cassete de expressão utilizou-se um plasmídeo pGEM modificado, onde foram inseridos o promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), um íntron, o terminador NOS (nopalina sintase) e vários sítios de restrição – pGEM/35S-íntron-NOST (Figura 4).

O primeiro fragmento clonado foi o ZYMV, com cerca de 200 pb, nos sítios de restrição *NcoI* e *BamHI* (Figura 4). O pGEM®-T contendo o fragmento do gene da proteína capsidial do ZYMV e o plasmídeo pGEM/35S-íntron-NOST foram digeridos com as enzimas de restrição *NcoI* e *BamHI*, por 2 horas, a 37 °C. Após este período, o fragmento do ZYMV, liberado do pGEM®-T pela digestão com *NcoI* e *BamHI*, foi purificado do gel de agarose com o kit 'QIAEX II Gel Extraction' (QIAGEN) e o vetor

pGEM/35S-ínton-NOST foi purificado com o kit 'PureLink™ PCR Purification' (Invitrogen). A ligação do inserto e vetor digeridos e purificados foi realizada na proporção de 3:1 (inserto:vetor). A reação de ligação consistiu em 6 µL do inserto, 2 µL do vetor, 1 µL do tampão 10X e 1 µL da T4 DNA ligase (3 unidades/µL - Promega), por 16 horas, a 16 °C. Em seguida, a reação de ligação foi precipitada, adicionando-se 10% do volume da reação de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 (1 µL) e 2,5 vezes o volume da reação mais o volume do acetato de sódio (11 µL) de etanol absoluto (27,5 µL), colocando-se por 20 minutos a -80 °C, para facilitar a precipitação. Após este período, a reação foi centrifugada por 20 minutos (14000 rpm, 4 °C). Após a centrifugação, adicionou-se 50 µL de etanol 70%, centrifugando-se novamente, por 5 minutos (14000 rpm, 4 °C). O precipitado foi ressuspendido em 2 µL de água Milli-Q estéril. Em condições assépticas, foram adicionados, a esse volume, 20 - 40 µL de células eletrocompetentes, preparadas segundo Sambrook & Russell (2001). A transformação foi realizada por eletroporação. Após a eletroporação, as células foram colocadas em 1 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB - triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 10 g/L, ágar 15 g/L), incubando-se por 1 hora (180 rpm, 37 °C). A suspensão (200 µL) foi plaqueada em meio de cultura LB, suplementado com 100 mg/L de ampicilina. As placas de Petri foram incubadas por 16 horas, a 37 °C. As colônias isoladas de *Escherichia coli* foram analisadas por PCR, com *primers* específicos para o fragmento do ZYMV. Para a confirmação da inserção do inserto, realizou-se a extração do plasmídeo pelo kit 'Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System' (Promega) a partir de colônias de *E. coli* PCR positivas, seguida da digestão com as enzimas *NcoI* e *BamHI*.

O fragmento PRSV-W foi clonado em seguida, nos sítios *BamHI* e *KpnI* (Figura 4). O pGEM®-T contendo fragmento do gene da proteína capsidial do PRSV-W e o vetor pGEM/35S-ínton-NOST, contendo o fragmento do gene da proteína capsidial do ZYMV (pGEM/35S-ínton-NOST+ZYMV) foram digeridos com as enzimas de restrição

*Bam*HI e *Kpn*l, por 2 horas, a 37 °C. Após a digestão, o fragmento do PRSV-W, liberado do pGem®-T pela digestão com *Bam*HI e *Kpn*l, foi purificado do gel de agarose com o kit 'QIAEX II Gel Extraction' (QIAGEN) e o vetor pGEM/35S-ítron-NOST+ZYMV foi purificado com o kit 'PureLink™ PCR Purification' (Invitrogen). A ligação do inserto e vetor foi realizada na proporção de 7:1 (inserto:vetor). A reação de ligação consistiu em 7 µL do inserto, 1 µL do vetor, 1 µL do tampão 10X e 1 µl da T4 DNA Ligase (3 unidades/µL - Promega), por 16 horas, a 16 °C. Em seguida, a reação de ligação foi precipitada e ressuspensa, seguindo os mesmos procedimentos da clonagem do fragmento do ZYMV. Em condições assépticas, foram adicionados à reação de ligação precipitada e ressuspensa em água Milli-Q (2 µL), 20-40 µL de células eletrocompetentes, preparadas segundo Sambrook & Russell (2001). A transformação também foi realizada por eletroporação. As células eletroporadas foram colocadas em 1 mL de meio de cultura LB, incubando-se por 1 hora (180 rpm, 37 °C). A suspensão (200 µL) foi plaqueada em meio de cultura LB, suplementado com 100 mg/L de ampicilina. As colônias isoladas foram analisadas por PCR, com *primers* específicos para detecção do fragmento do PRSV-W e com os *primers* ZYMV-*Bst*EII/*Nco*I e PRSV-W-*Sac*I/*Kpn*l, para detecção dos dois fragmentos fusionados. Para a confirmação da inserção do inserto, realizou-se a extração do plasmídeo e sua posterior digestão com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*l a partir de colônias PCR positivas. A digestão com as enzimas de restrição *Nco*I e *Kpn*l também foi realizada, para confirmar se os dois fragmentos estavam clonados, com a obtenção de um fragmento de aproximadamente 400 pb.

A sequência antisenso foi clonada a partir da sequência senso e inserida entre os sítios de restrição das enzimas *Sac*I e *Bst*EII (Figura 4). O pGEM®-T contendo os fragmentos fusionados do gene da proteína capsial do ZYMV e do PRSV-W e o vetor pGEM/35S-ítron-NOST, contendo senso os dois fragmentos no sentido senso (pGEM/35S-ítron-NOST+ZYMV+PRSV-W) foram digeridos com a enzima de restrição *Sac*I, por 1 hora, a 37 °C. Após este período, a enzima de restrição *Bst*EII foi

Figura 4 - Obtenção do cassete de expressão no vetor pGEM/35S-ínteron-NOST-*hairpin*ZYMV+PRSV-W, contendo fragmentos dos genes da proteína capsial do ZYMV e do PRSV-W, numa construção do tipo *hairpin*, sob controle do promotor constitutivo 35S.

adicionada à reação de digestão e as amostras continuaram sendo digeridas por 1 hora, a 60 °C. Os fragmentos fusionados ZYMV + PRSV-W, liberados do pGem®-T pela digestão com *SacI* e *BstEII*, foram purificados do gel de agarose com o kit 'QIAEX II Gel Extraction' (QIAGEN) e o pGEM/35S-ínton-NOST+ZYMV+PRSV-W foi purificado com o kit 'PureLink™ PCR Purification' (Invitrogen). A ligação do inserto e vetor foi realizada na proporção de 3:1 (inserto:vetor). A reação de ligação consistiu em 6 µL do inserto, 2 µL do vetor, 1 µL do tampão 10X e 1 µL da T4 DNA Ligase (3 unidades/µL - Promega), por 16 horas, a 16 °C. Em seguida, a reação de ligação foi precipitada e ressuspensa, como descrito acima. Esta reação foi transformada por eletroporação, seguindo as mesmas etapas da clonagem da sequência senso do cassete de expressão. Para a confirmação da inserção do inserto, realizou-se a extração do plasmídeo e sua posterior digestão com as enzimas *SacI* e *BstEII* a partir de colônias PCR positivas. A digestão com as enzimas de restrição *NcoI* e *BstEII* também foi realizada, para confirmar se as sequências senso e antisenso, contendo os dois fragmentos estavam clonadas, com a obtenção de um fragmento de aproximadamente 1400 pb.

3.3.4 Construção do vetor de expressão

O cassete de expressão contendo os fragmentos do gene da proteína capsial do ZYMV e do PRSV-W, no sentido senso e antisenso, foi inserido no vetor binário, pCambia 2201 (Cambia GPO Box 3200, Camberra ACT 2601, Austrália) (Figura 5). O plasmídeo pCambia 2201 contém bordas esquerda e direita de região de transferência do plasmídeo de *Agrobacterium tumefaciens*, e o gene de seleção *npII* (*neomycin phosphotransferase II*), que confere resistência ao antibiótico canamicina, em plantas. O vetor pGEM/35S-ínton-NOST, contendo o cassete de expressão (pGEM/35S-ínton-NOST-*hairpin*ZYMV+PRSV-W) e o vetor binário (pCambia 2201) foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI*, por 1 hora, a 37 °C, seguida da digestão com a enzima de restrição *BstEII*, por 1 hora, a 60 °C. As etapas posteriores de purificação, ligação e

transformação foram realizadas conforme descrito no item 3.3.3. A suspensão bacteriana foi plaqueada em meio de cultura LB, suplementado com cloranfenicol (25 mg/L). As colônias isoladas foram analisadas por PCR, com os *primers* ZYMV-*BstEII/NcoI* e PRSV-W-*SacI/KpnI*, para detecção dos dois fragmentos fusionados. Para a confirmação da inserção do inserto, realizou-se a extração do plasmídeo com o kit 'Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System' (Promega) e posteriormente, a digestão com as enzimas *EcoRI* e *BstEII* a partir de colônias PCR positivas, para obtenção de um fragmento de aproximadamente 1900 pb. A confirmação das clonagens dos fragmentos dos genes da proteína capsidial do ZYMV e do PRSV-W também foi realizada por sequenciamento. A miniprep das construções foi submetida à reação de seqüenciamento em sequenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems).

Após a confirmação da obtenção do vetor de expressão, o plasmídeo pCambia 2201, contendo fragmentos dos genes da capa protéica do ZYMV e do PRSV-W, numa construção do tipo *hairpin* (pCambia2201/*hairpin*ZYMV+PRSV-W) foi introduzido em *Agrobacterium*, estirpes EHA 105 e LBA 4404, pelo método do choque térmico (LACORTE; ROMANO, 1998). Após a transformação, as colônias de *A. tumefaciens* foram selecionadas em meio de cultura, contendo os antibióticos específicos para seleção da estirpe. A confirmação das colônias transformadas foi realizada por PCR e digestão com *EcoRI* e *BstEII*.

3.4 Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

3.4.1 Manutenção e cultivo das linhagens de *Agrobacterium tumefaciens*

As linhagens da bactéria foram mantidas à temperatura -80 °C, em solução estoque de glicerol (25%). Para utilização nos experimentos de transformação genética, as linhagens EHA105 e LBA4404 de *A. tumefaciens* foram plaqueadas em meio de

Figura 5 - Obtenção do vetor de expressão pCambia 2201, contendo fragmentos dos genes da proteína capsial do ZYMV e do PRSV-W, numa construção do tipo *hairpin* e o gene de seleção *npII*, sob controle do promotor constitutivo 35S.

cultura YEP sólido (peptona 10 g/L, extrato de levedura 10 g/L, cloreto de sódio 10 g/L, ágar 15 g/L), suplementado com canamicina (100 mg/L) e rifampicina (50 mg/L), e incubadas a 28 °C, por 3 dias. Após o crescimento, uma colônia isolada dessa cultura foi transferida e cultivada em YEP líquido, na mesma temperatura, em agitador orbital (180-200 rpm), por 12 - 16 horas. Quando a suspensão bacteriana alcançou a densidade óptica entre 0,5 - 1,0, em espectrofotômetro (600 nm), esta foi centrifugada (4800 rpm, 15 °C), por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em meio de cultura MS, em um volume adequado para obter a concentração de bactérias de 5×10^8 CFU/mL.

3.4.2 Inoculação e co-cultivo dos explantes com *A. tumefaciens*

Explantes de abobrinha e melancia foram incubados na suspensão bacteriana (5×10^8 CFU/mL) por 15 a 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram secos em papel filtro estéril, para retirar o excesso de bactéria, e incubados em meio de cultura MS, suplementado com BAP (1,0 mg/L). O material foi mantido a 24 °C, no escuro, por 2 dias, para o co-cultivo.

3.4.3 Seleção e regeneração de plantas

Após o co-cultivo, os explantes foram transferidos e cultivados em meio de seleção e regeneração, suplementado com o agente seletivo (canamicina - 100 mg/L) e com o antibiótico Timentin™ (400 mg/L), para controle da *Agrobacterium*. O material foi incubado a 27 °C, sob fotoperíodo de 16 horas de luz. A avaliação foi realizada após 4 semanas de incubação, determinando-se o número de explantes com gemas adventícias. As gemas obtidas foram alongadas em meio de cultura MS, suplementado com GA₃ (1,0 mg/L), BAP (0,1 mg/L) e enraizadas em meio de cultura, suplementado com IBA (1,0 mg/L). Os meios de cultura de alongamento e enraizamento também

foram suplementados com Timentin™. Em todas as etapas, o subcultivo foi realizado em intervalo de 15 dias. As plântulas enraizadas foram aclimatizadas, seguindo os procedimentos descritos no item 3.2.3.

3.4.4 Identificação de plantas transgênicas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A identificação de plantas transgênicas foi realizada, primeiramente, por PCR a partir do DNA extraído de plântulas individualizadas e alongadas, com cerca de 7 a 10 cm de altura. A extração do DNA foi feita pelo método descrito por Doyle & Doyle (1990). As reações de PCR foram conduzidas em termociclador PTC-100 (MJ Research), utilizando-se os *primers* ZYMV-BstEII/NcoI e PRSV-W-SacI/KpnI, para a amplificação dos fragmentos fusionados do gene da proteína capsidial do ZYMV e do PRSV-W, com tamanho de 400 pb. A reação de PCR seguiu o programa de 1 ciclo de 2 minutos a 94 °C e seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 s a 55°C, 30 segundos a 72°C e 1 ciclo de 5 minutos a 72°C. As plântulas identificadas como PCR positivas foram aclimatizadas em sala de luz e, posteriormente, transferidas para casa-de-vegetação.

3.5 Aclimatização e polinização das plantas para obtenção de R₁

Plantas de abobrinha-de-moita e melancia PCR⁺ para fragmentos dos genes da proteína capsidial do ZYMV e do PRSV-W foram aclimatizadas e transferidas para casa-de-vegetação. Essas plantas mantidas em casa-de-vegetação se desenvolveram e foram polinizadas manualmente, transferindo-se grãos de pólen da flor masculina à flor feminina várias vezes sucessivas. A polinização foi realizada no período da manhã, logo após a abertura da flor feminina.

3.6 Caracterização molecular das plantas obtidas por *Southern blot*

A extração do DNA total foi realizada pelo método de CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990) utilizando-se folhas novas de plantas PCR positivas, aclimatizadas e mantidas em casa-de-vegetação. Após a extração, o DNA total foi quantificado por fluorometria com o aparelho 'Qubit™ Fluorometer (Invitrogen)', utilizando o kit específico para este aparelho 'Quant – iTMM DNA Assay', do mesmo fabricante. Após a quantificação, um total de 60 µg de DNA foi submetido à reação de digestão com a enzima de restrição *EcoRI*, por 16 horas, a 37 °C. A enzima de restrição *EcoRI* corta o T-DNA fora da região dos fragmentos do gene da proteína capsidial do ZYMV e PRSV-W apenas uma vez. O DNA digerido foi precipitado em acetato de amônia e etanol absoluto, por 40 minutos, a -80 °C. Após a precipitação, todo o DNA digerido foi ressuspendido em água Milli-Q, acrescentado de sacarose (40%) e foi separado por eletroforese em gel de agarose (1%), por 16 horas. Em seguida, o DNA separado foi transferido para membrana de nylon Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences Little Chalfont, UK), por 16 horas e posteriormente, fixado por 2 horas, a 80 °C. A membrana foi pré-hibridizada por 30 minutos (60 °C), para evitar ligações inespecíficas da sonda.

A sonda para os fragmentos fusionados dos genes da proteína capsidial do ZYMV e do PRSV-W foi preparada por PCR e purificada com o kit "QIAEX II Gel Extration" (QIAGEN). A sonda foi marcada com fosfatase alcalina, com o kit 'AlkPhos Direct Labelling Reagents' (Amersham Biosciences, UK). A hibridização foi realizada por 16 horas, a 60 °C. Após a hibridização, a membrana foi lavada em soluções recomendadas pelo kit de marcação.

A reação de detecção foi realizada com o kit 'CDP Star™ Detection Reagent' (Amersham Biosciences, UK). A reação de detecção foi realizada conforme as orientações do fabricante. O excesso do agente de detecção foi retirado e a membrana foi colocada no cassete (Amersham Life Science, USA) com uma chapa fotográfica por

1 hora. A revelação do filme foi realizada em solução reveladora (KODAK) por 5 minutos. Após lavagem em água, o filme foi mantido por 15 minutos em solução fixadora.

3.7 Avaliação da resistência ao ZYMV e ao PRSV-W

A avaliação da resistência ao ZYMV e ao PRSV-W foi realizada em R₁ de plantas transgênicas de abobrinha-de-moita e melancia. A avaliação foi baseada na observação do aparecimento de sintomas nas folhas das plantas inoculadas e posteriormente, na realização do teste sorológico PTA-ELISA.

3.7.1 Inoculação das plantas transgênicas com os patógenos

Plantas transgênicas R₁ de abobrinha-de-moita e melancia foram inoculadas com a estirpe severa do ZYMV, isolada em Rinópolis (ZYMV-RI) e a estirpe PRSV-W, isolada em Campinas (PRSV-W-C). A transmissão foi realizada por afídeos da espécie *Myzus nicotianae*. As colônias de afídeos foram mantidas em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Os afídeos foram removidos das folhas de tabaco com auxílio de um pincel e colocados em um recipiente fechado, permanecendo por 30 minutos em jejum. Após este período, os afídeos foram transferidos para folhas de plantas de abobrinha-de-moita infectadas com ZYMV-RI e PRSV-W-C, separadamente para aquisição dos vírus por um período de 10 minutos. Em seguida, os afídeos virulíferos foram transferidos para plantas transgênicas R₁ de abobrinha-de-moita e melancia. Foram utilizados 10 afídeos por planta, sendo que 5 afídeos virulíferos para ZYMV e 5 afídeos virulíferos com PRSV-W. As plantas inoculadas foram avaliadas pela presença dos sintomas ou alterações dos sintomas iniciais fracos e pelo teste sorológico PTA-ELISA. Para controle do inóculo e comparação dos sintomas, plantas não transformadas e sadias também foram inoculadas.

3.7.2 Teste sorológico PTA-ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay - Plate Trapped Antigen*)

Para realização do teste PTA-ELISA, foram utilizados antissoros específicos contra ZYMV e contra PRSV-W. Amostras de tecido vegetal de plantas transgênicas inoculadas com o ZYMV e o PRSV-W foram maceradas em presença de tampão carbonato (15 mM Na₂CO₃; 35 mM NaHCO₃ e 3 mM NaN₃), pH 9,6, para uma diluição de 1:20 (peso:volume). Após a maceração, foram colocados 100 µl de cada amostra por pocinho na placa de ELISA, utilizando-se 2 pocinhos por amostra. A placa ELISA foi incubada por 15 minutos, a 37 °C. Então, a placa foi lavada (3x), com PBS-T (*Phosphate buffered saline* – 0,0015 M KH₂PO₄; 0,004 M NaHPO₄; 0,14 NaCl; 0,003 M KCl; pH 7,4 + *Tween 20* - 0,05%). Foram colocados, por pocinho, 100 µL de antissoro policlonal contra o PRSV-W ou contra o ZYMV, diluído 1:1000 em PBS-TPB (PBS-T + *Polyvinylpyrrolidone* – 2% + albumina bovina – 0,02%), incubando-se por 2 horas, a 37 °C. A placa foi lavada em PBS-T (3x), e adicionando-se um antissoro secundário (imunoglobulina G) conjugado a fosfatase alcalina (Sigma) diluído 1:34000 em tampão Tris-HCl. A placa foi incubada por 2 horas, a 37 °C. Para a reação enzimática ocorrer, adicionou-se p-fosfato de nitrofenil diluído em dietanolamina, mantendo-se a placa de ELISA no escuro durante 30 - 60 minutos. A reação enzimática foi avaliada pela absorbância (405 nm) no leitor ELISA (Metertech 960). Extratos de plantas sadias não transformadas foram utilizados como controle negativo. Extratos de plantas infectadas com o ZYMV e PRSV-W, separadamente e em conjunto, foram utilizados como controle positivo. Quando o valor médio da absorbância foi superior 3 vezes a média das amostras sadias, a infecção foi considerada positiva.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Organogênese *in vitro* de abobrinha-de-moita

Um protocolo eficiente de cultivo *in vitro* é essencial para o estabelecimento de um programa de transformação genética de sucesso. A eficácia de um protocolo depende não somente da composição do meio de cultura, mas também do tipo e idade do explante e das condições de incubação. Em cucurbitáceas, a organogênese *in vitro* tem sido obtida a partir de segmentos de cotilédone, contudo a regeneração *in vitro* de plantas ocorre com baixa eficiência, pois as estruturas desenvolvidas dificilmente se alongam, por serem na verdade apenas primórdios foliares, sem a presença de meristema caulinar (STIPP et al., 2001; YALCIN-MENDI et al., 2003; KRUG et al., 2005). Ananthakrishnan et al. (2003) relataram o sucesso da utilização de um novo tipo de explante, constituído pela região basal do cotilédone e um segmento do hipocótilo, para organogênese *in vitro* de *Cucurbita pepo*.

Dados obtidos, neste trabalho, confirmam a eficácia deste novo tipo de explante na organogênese *in vitro* de *C. pepo* cv. 'Caserta', a cultivar mais importante de abobrinha no Brasil. As Figuras 6a-b mostram segmento da região basal do cotilédone e um segmento do hipocótilo obtidos a partir de sementes germinadas *in vitro* e utilizados como explantes. Após 3 - 4 dias de cultivo, em meio de cultura, suplementado com citocinina BAP, os explantes cultivados apresentaram tamanho consideravelmente maior em relação aos explantes originais. Após 7 - 10 dias, na região em que foi retirado o ápice vegetativo, observou-se o início de formação das gemas adventícias (Figura 6c). O desenvolvimento de gemas adventícias pode ser observado após 4 semanas de cultivo na região em que o ápice vegetativo foi retirado (Figura 6d). A eficácia deste novo tipo de explante de cucurbitáceas pode estar relacionada à presença da parte proximal do cotilédone, que é uma região altamente

Figura 6 - Organogênese *in vitro* de abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* cv. Caserta). a-b) explante inicial: região basal do cotilédone e um segmento do hipocótilo. c) aspecto geral do explante, após 10 dias de cultivo *in vitro*; d) gemas adventícias desenvolvidas após 4 semanas de cultivo do explante em meio de cultura MS, suplementado com 1,0 mg/L de BAP; e) plântulas alongadas em meio de cultura para enraizamento (IBA – 1,0 mg/L); f) planta aclimatizada. Barras: 1 mm (b; c; d).

meristemática. Esta região tem mostrado uma alta competência para desenvolvimento de gemas adventícias em *Citrullus lanatus* (COMPTON; GRAY, 1993) e *Cucurbita maxima* (LEE; CHUNG; EZURA, 2003). Em *Cucurbita pepo*, não foi possível verificar a regeneração *in vitro* a partir da região basal do cotilédone ou do hipocótilo, entretanto a presença de parte da região proximal do cotilédone aumentou consideravelmente a porcentagem de regeneração quando comparado com a porcentagem obtida com a utilização de explantes constituídos de apenas da região em que o ápice vegetativo foi retirado (ANANTHAKRISHNAN et al., 2003).

A idade das plântulas germinadas *in vitro* tem sido relatada como um importante fator que afeta a regeneração *in vitro* em cucurbitáceas. A análise do efeito dos dias de germinação *in vitro* das sementes, para a coleta dos explantes, possibilitou a escolha de um explante mais adequado, que resultasse em um número maior de explantes responsivos, sendo que o melhor resultado obtido no presente trabalho, com a variedade 'Caserta', foi o uso de explantes com 4 dias de germinação *in vitro* (Tabela 1). Contudo, Ananthakrishnan et al. (2003) relataram que a germinação *in vitro* das sementes de *Cucurbita pepo* por 5 a 9 dias, possibilitou a obtenção da melhor resposta morfogênica, dependendo da variedade utilizada. Esses resultados sugerem que o número de dias para que a plântula apresente as condições adequadas para resposta organogênica *in vitro* varia conforme o genótipo, afetando significativamente a regeneração *in vitro* em cucurbitáceas (COMPTON, 2000; KATHIRAVAN et al., 2006).

Tabela 1 - Efeito do número de dias de germinação *in vitro* de sementes de abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* cv. Caserta), utilizadas para a coleta dos explantes, na indução da organogênese *in vitro*, em meio de cultura MS, suplementado com BAP (1,0 mg/L).

dias de germinação	nº explantes responsivos / nº explantes introduzidos (%)
4	18/36 (50,00) a
5	10/36 (27,78) b
6	4/36 (11,11) b

* letras iguais não diferem estatisticamente (Duncan, $p = 0,05$ e $CV = 51,69\%$). CV = coeficiente de variação.

A suplementação do meio de cultura com a citocinina BAP foi essencial à organogênese *in vitro*, uma vez que na sua ausência não houve o desenvolvimento de gemas adventícias. Com relação à concentração, os tratamentos 1,00 e 1,25 mg/L de BAP apresentaram melhores respostas organogênicas, não havendo diferença significativa entre eles, o que sugere o uso de 1,0 mg/L de BAP (Tabela 2). A maioria dos protocolos de organogênese *in vitro* em *Cucurbita pepo* utilizam meios de cultura suplementados com BAP para obtenção de gemas adventícias (ANANTHAKRISHNAN et al. 2003; KATHIRAVAN et al., 2006; ANANTHAKRISHNAN et al. 2007). PAL et al. (2007) desenvolveram um protocolo eficiente de regeneração de plantas *in vitro* de *Cucurbita pepo* utilizando meios de cultura suplementado com outros reguladores vegetais como TDZ (0,5 mg/L) ou com as combinações BAP (1,0 mg/L) + GA₃ (0,1 mg/L) e com a combinação BAP (1,0 mg/L) + NAA (0,1 mg/L).

Nos experimentos realizados, neste trabalho, pôde-se verificar que a taxa de regeneração, ou seja, explantes que desenvolveram gemas adventícias, na presença de BAP, foi de no máximo de 57% (Tabela 2). Esta porcentagem de explantes responsivos está dentro dos valores descritos para outras variedades de *Cucurbita pepo*. Estudos da organogênese *in vitro*, na presença de BAP, com 15 variedades de *C. pepo*, demonstraram uma taxa de regeneração variando de 56 a 94% para todas variedades estudadas, com exceção de uma variedade, em que a taxa de regeneração foi de 22% (KATHIRAVAN et al., 2006).

A maioria das gemas adventícias após serem individualizadas e transferidas para meio de cultura MS, suplementado com 1,0 mg/L de GA₃ e 0,1 mg/L de BAP, desenvolveram-se em plântulas (Figura 6e) e foram transferidas para meio de cultura de enraizamento (IBA - 1,0 mg/L), onde formaram raízes após 15 dias, aproximadamente. No experimento para determinar a eficiência do alongamento, verificou-se uma média de 3,62 plântulas formadas por explante responsivo (Tabela 3). Este resultado pode ser considerado satisfatório, pois KATHIRAVAN et al. (2006) obtiveram 1,2 a 3,9 plantas por explante responsivo, dependendo da variedade utilizada.

Tabela 2 - Organogênese *in vitro* a partir da região basal do cotilédone e um segmento do hipocótilo de abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* cv. 'Caserta') cultivados em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de BAP (mg/L). (Média de 2 experimentos independentes)

BAP (mg/L)	nº explantes responsivos / nº explantes introduzidos (%)
0,00	0/0 (0,00) a
0,25	6/84 (7,14) a
0,50	24/84 (28,57) b
0,75	27/84 (32,14) b
1,00	48/84 (57,14) c
1,25	39/84 (46,43) c

* letras iguais não diferem estatisticamente (Duncan, $p = 0,05$ e $CV = 49,85\%$). CV = coeficiente de variação.

A alta eficiência no alongamento de gemas adventícias deve estar relacionada ao tipo de explante que favoreceu o desenvolvimento de estruturas com a presença do meristema caulinar, posteriormente comprovada pela análise histológica. A alta eficiência no alongamento é diferente da relatada em outras cucurbitáceas, como melão e melancia, que utilizaram segmentos de cotilédone como explantes, obtendo-se estruturas que não se desenvolviam em plantas e que morriam amareladas (GABA et al., 1999, STIPP et al., 2001; KRUG et al., 2005).

A aclimatização das plantas obtidas se revelou bastante delicada, devendo ser conduzida com muito cuidado. A transferência das plantas para casa-de-vegetação deve ser lenta e gradual, para que a aclimatização seja obtida com sucesso (Figura 6f). As plantas não devem ser mantidas muito úmidas, pois o excesso de água pode provocar seu apodrecimento na região do colo.

Tabela 3 - Organogênese *in vitro* a partir da região basal do cotilédone e um segmento do hipocótilo de abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* cv. 'Caserta'), cultivados em meio de cultura suplementado com BAP (1,0 mg/L).

repetições	nº explantes responsivos / nº explantes introduzidos	nº plântulas obtidas	nº plântulas obtidas / explantes responsivos
1	5/6	21	4,2
2	4/6	7	1,75
3	3/6	9	3,0
4	3/6	14	4,67
5	4/6	17	4,25
6	3/6	15	5,0
7	2/6	5	2,5
Média	3,43/6	12,57	3,62

Análises ao microscópio eletrônico de varredura mostraram que as gemas adventícias se desenvolvem na região em que o ápice meristemático foi retirado. Observou-se também a presença de inúmeros tricomas nestas gemas adventícias (Figura 7a-b). A presença de tricomas é comumente encontrada em gemas e folhas de cucurbitáceas, e conseqüentemente em gemas adventícias, fato este que prejudica uma melhor observação dessas estruturas formadas, ao microscópio eletrônico de varredura. Análises histológicas mostraram estruturas monopolares, com conexão vascular ao tecido original, característico do processo organogênico. A regeneração de plantas *in vitro* via organogênese direta foi confirmada com a formação e organização de regiões meristemáticas (Figura 7c) e com a posterior formação de gemas adventícias, com meristema caulinar e primórdios foliares e uma epiderme bem definida, após 20 dias de indução (Figura 7d-f). A presença de gemas bem desenvolvidas certamente favoreceu a alta eficiência na fase de alongamento das gemas obtidas. Em diversas cucurbitáceas, essa eficiência não foi verificada, pois pela análise histológica verificou-se a presença de muitas protuberâncias, com células não

meristemáticas e pequenos primórdios foliares, sem presença de um meristema caulinar, fenômeno este que elucida porque grande parte das estruturas formadas não se desenvolvem em plantas (KIM et al., 2000; STIPP et al., 2001; YALCIN-MENDI et al., 2003).

Desta forma, o desenvolvimento de um protocolo que permita a obtenção de gemas bem desenvolvidas é de extrema importância, iniciando-se pela definição de um explante que apresente esta competência dadas as condições de cultivo utilizadas. Em outras culturas como o maracujazeiro, a busca por um explante mais adequado para organogênese *in vitro* também foi relatada devido à baixa frequência de alongamento das estruturas desenvolvidas, observando-se através da análise histológica estas se tratavam de estruturas foliares sem a presença de meristema caulinar e erroneamente interpretadas como gemas adventícias (FERNANDO et al., 2007).

O estabelecimento de um protocolo eficiente de regeneração *in vitro* de plantas de abobrinha-de-moita foi muito importante para a continuidade deste trabalho, através de experimentos de transformação genética via *Agrobacterium*, pois para o sucesso na obtenção de plantas transgênicas é essencial que as células transformadas pelo contato com a *Agrobacterium*, se diferenciem e se desenvolvam em plantas.

Figura 7 - Análise morfo-anatômica do processo organogênico em abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* cv. Caserta. a-b) análise em microscópio eletrônico de varredura, mostrando o desenvolvimento inicial de gemas adventícias (a) e um detalhe dos primórdios foliares (pf), apresentando grande quantidade de tricomas (tr) (b); c) corte histológico mostrando a formação de áreas meristemáticas e no explante após 10 dias de cultivo *in vitro*. d-f) cortes histológicos mostrando o desenvolvimento de gemas adventícias no tecido materno, apresentando meristema caulinar (mc), primórdios foliares (pf), tricomas (tr) e epiderme bem definida (seta). Barras: 30 μm (b); 50 μm (c-f); 100 μm (a).

4.2 Obtenção da construção gênica para transformação genética

A análise do RNA extraído de plantas de abobrinha-de-moita infectadas, separadamente, com o PRSV-W e o ZYMV possibilitou verificar que o RNA apresentava boa qualidade para sintetizar o cDNA dos fragmentos dos genes (Figura 8a). A partir das amostras de RNA, pôde-se sintetizar e amplificar os fragmentos dos genes da proteína capsidial dos 2 vírus, em uma reação de RT-PCR, isolando assim cada um dos fragmentos. Para a elaboração da construção gênica do tipo *hairpin*, optou-se por utilizar fragmentos com 200 pb do gene da proteína capsidial de cada um dos vírus estudados (Figura 8b-c). Jan et al. (2000), trabalhando no sistema *hairpin*, relataram que fragmentos de 110 – 150 pb do gene do vírus estudado foram suficientes para desencadear o silenciamento gênico. A avaliação de alíquotas dos fragmentos purificados foi realizada em um novo gel de agarose e possibilitou verificar que a concentração de cada fragmento era suficiente para iniciar a clonagem no vetor pGem® T (Easy Vector Systems - Promega) (Figura 8d-e).

Os fragmentos isolados de 200 pb dos genes da proteína capsidial do PRSV-W e ZYMV, foram clonados no vetor pGem® T. A digestão com as enzimas *NcoI* e *BamHI* de plasmídeos extraídos a partir das colônias brancas de *E. coli* PCR positivas, confirmou a clonagem do ZYMV (Figura 9a). A digestão com *BamHI* e *KpnI* de plasmídeo extraído a partir de colônias brancas de *E. coli* PCR positivas confirmou a clonagem do PRSV-W (Figura 9b). Os fragmentos do ZYMV e do PRSV-W fusionados (400 pb) também foram clonados no vetor pGem® T para serem clonados no sentido antisenso do *hairpin*, em uma única etapa. A digestão com *NcoI* e *KpnI* confirmou a clonagem dos 2 fragmentos em plasmídeos extraídos a partir de colônias brancas de *E. coli* PCR positivas para o ZYMV + PRSV-W, obtendo-se um fragmento de 400 pb (Figura 9c).

Figura 8 - Isolamento dos fragmentos dos genes da proteína capsial do *Papaya ringspot virus* - type W e do *Zucchini yellow mosaic virus*. a) amostras de RNA total extraído a partir de plantas de abobrinha-de-moita infectadas com PRSV-W (1P, 2P e 3P) e ZYMV (1Z, 2Z e 3Z) submetidas a eletroforese, em gel desnaturante. b) RT-PCR com *primers* específicos para síntese e amplificação do fragmento do gene da proteína capsial do ZYMV. c) RT-PCR com *primers* específicos para síntese e amplificação do fragmento do gene da proteína capsial do PRSV-W. Fragmentos dos genes da proteína capsial do ZYMV (d) e PRSV-W (e) purificados pelo kit QIAEX II (Qiagen). Mr: 0,24-095 kb RNA Ladder (Invitrogen). M₁₀₀: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas). Os produtos amplificados de 200 pb correspondem aos fragmentos dos genes da proteína capsial do PRSV-W e ZYMV.

Figura 9 - Confirmação da pré-clonagem dos fragmentos dos genes proteína capsial do *Papaya ringspot virus* - type W (PRSV-W) e do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) no vetor pGEM®-T (Easy Vector Sytems - Promega) pela digestão dos plasmídeos extraídos de colônias PCR⁺. a) digestão com *NcoI* e *BamHI*, obtendo-se um fragmento de 200 pb que corresponde ao ZYMV. b) digestão com *BamHI* e *KpnI*, obtendo-se um fragmento de 200 pb que corresponde ao PRSV-W. c) digestão com *NcoI* e *KpnI*, obtendo-se um fragmento de 400 pb que corresponde ZYMV + PRSV-W. M₁₀₀: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas). M_{1i}: marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen). M_{1p}: marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega).

Após a transformação com o fragmento do gene da proteína capsial do ZYMV no vetor pGEM modificado (pGEM/35S-íntron-NOST), colônias de *E. coli* foram analisadas por PCR, identificando-se colônias PCR positivas para o fragmento do gene da proteína capsial do ZYMV (Figura 10a). A digestão do plasmídeo extraído de uma colônia PCR positiva para o ZYMV foi realizada com as enzimas *NcoI* e *BamHI*, sendo verificada uma banda de 200 pb, correspondente ao fragmento do gene da proteína capsial do ZYMV (Figura 10b). Após a transformação com fragmento do gene da proteína capsial do PRSV-W no vetor contendo o ZYMV (pGEM/35S-íntron-NOST+ZYMV), colônias de *E. coli* foram analisadas por PCR, sendo identificadas colônias PCR positivas para fragmento da proteína capsial do PRSV-W (Figura 10c). Os plasmídeos de colônias PCR positivas para o PRSV-W foram extraídos de *E. coli* e digeridos com as enzimas *BamHI* e *KpnI*, obtendo-se um fragmento de 200 pb (PRSV-W) e com as enzimas *NcoI* e *KpnI*, obtendo-se um fragmento de 400 pb,

correspondente aos fragmentos dos genes da proteína capsidial do ZYMV + PRSV-W (Figura 10d). Assim como a parte senso, a clonagem do antisenso foi realizada, sendo que nesta etapa não se pode fazer PCR para verificar a inserção dos fragmentos, pois a presença da parte senso já tornaria a PCR positiva. Após a transformação no vetor contendo a parte senso do ZYMV e PRSV-W (pGEM/35S-íntron-NOST+ZYMV+PRSV-W), os plasmídeos de colônias de *E. coli* foram extraídos (pGEM/35S-íntron-NOST-*hairpin*ZYMV+PRSV-W) e analisados por digestão com enzima *Nco*I e *Bst*EII, sendo que obteve-se um fragmento de aproximadamente 1400 pb, correspondente à parte senso dos fragmentos do ZYMV e do PRSV-W, ao íntron e à parte antisenso dos fragmentos do ZYMV e do PRSV-W (Figura 10e).

Após a clonagem do cassete de expressão, este foi digerido com as enzimas *Eco*RI e *Bst*EII, para liberação do promotor 35S + *hairpin* do ZYMV+PRSV-W. Esse fragmento, com aproximadamente 1900 pb, foi clonado no vetor binário pCambia 2201, nos sítios de inserção destas 2 enzimas, sendo que o gene repórter *uidA* (GUS) foi retirado do vetor. A confirmação da clonagem foi realizada pela digestão com *Eco*RI e *Bst*EII, obtendo-se um fragmento de aproximadamente 1900 pb (Figura 10f).

As clonagens dos fragmentos dos genes da proteína capsidial do ZYMV e do PRSV-W também foram confirmadas por seqüenciamento, sendo que cerca de 600 bases foram seqüenciadas a partir das extremidades 5' e 3' das construções.

O plasmídeo pCambia2201/*hairpin*ZYMV+PRSV-W foi extraído de *E. coli* e utilizado na transformação de *Agrobacterium tumefaciens*, estirpes LBA-4404 e EHA-105, pelo método do choque térmico. A confirmação da transformação foi realizada por PCR, com as colônias obtidas após 3 dias da transformação. Diversas colônias analisadas foram positivas, amplificando um produto de 400 pb, correspondente aos fragmentos dos genes da proteína capsidial do ZYMV e PRSV-W (Figura 11a-b). Estas colônias foram estocadas em glicerol, a -80 °C. Após esta etapa, pôde-se iniciar os experimentos de transformação genética de abobrinha-de-moita e melancia.

Figura 10 - Confirmação da clonagem do cassete e do vetor de expressão da construção gênica do tipo *hairpin* contendo os fragmentos dos genes da proteína capsidial (CP) do *Papaya ringspot virus* - type W (PRSV-W) e do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). a) PCR de colônias de *E. coli*, para verificar a presença do fragmento do gene da CP do ZYMV (200 pb). b) confirmação da clonagem do ZYMV nos plasmídeos extraídos de colônias PCR⁺, pela digestão com *Nco*I e *Bam*HI (200 pb). c) PCR de colônias de *E. coli*, para verificar a presença do ZYMV e do PRSV-W (400 pb). d) confirmação da clonagem do PRSV-W nos plasmídeos extraídos de colônias PCR⁺, pela digestão com *Bam*HI e *Kpn*I (200 pb - PRSV-W) e pela digestão com *Nco*I e *Kpn*I (400 pb - ZYMV + PRSV-W). e) confirmação da clonagem da parte senso + antisenso pela digestão com *Nco*I e *Bst*EII, obtendo-se um fragmento de 1400 pb. f) confirmação da clonagem do cassete de expressão (35S + *hairpin*) no vetor pCAMBIA 2201 pela digestão dos plasmídeos com *Eco*RI e *Bst*EII, obtendo-se um fragmento de 1900 pb. M₁₀₀: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas). M_{1i}: marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen). M_{1p}: marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega).

Figura 11 - Confirmação da transformação genética de *Agrobacterium tumefaciens* com o plasmídeo pCambia2201/*hairpin*ZYMV+PRSV-W por choque térmico. Análise de colônias de *A. tumefaciens*, estirpes LBA-4404 (a) e EHA-105 (b) por PCR com *primers* específicos para os fragmentos dos genes da proteína capsial do ZYMV e PRSV-W.

4.3 Obtenção de plantas transgênicas de abobrinha-de-moita

Foram realizados 8 experimentos de transformação genética de abobrinha-de-moita, via *A. tumefaciens* contendo o plasmídeo pCAMBIA 2201, com fragmentos dos genes da proteína capsial do PRSV-W e ZYMV, numa construção gênica tipo *hairpin*. Após 2 dias de co-cultivo em meio de cultura, suplementado com BAP (1,0 mg/L), na ausência de luz, a 24 °C, os explantes de abobrinha-de-moita foram transferidos para meio de cultura de seleção e regeneração e incubados sob fotoperíodo de 16 horas de luz, a 27 °C, como foi estabelecido pelo protocolo de regeneração *in vitro* (Figura 12a). O meio de cultura de seleção foi suplementado com BAP (1,0 mg/L), canamicina (100 mg/L) e Timentin™ (400 mg/L). Após 4 semanas de incubação foi possível avaliar o número de explantes responsivos (Figura 12b). Nesses experimentos, verificou-se 73 explantes responsivos, ou seja, com o desenvolvimento de gemas adventícias, de um total de 1050 explantes inoculados com *A. tumefaciens* (Tabela 4).

As gemas desenvolvidas foram separadas do explante inicial e transferidas para meio de cultura de alongamento suplementado com GA₃ (1,0 mg/L), BAP (0,1 mg/L) e Timentin™ (400 mg/L). A partir desta etapa, o antibiótico canamicina não foi mais adicionado ao meio de cultura a fim de facilitar o desenvolvimento das gemas adventícias. A extração de DNA foi realizada a partir de folhas coletadas de gemas

alongadas (Figura 12c), pois antes disso não seria possível identificar qual gema teria sido realmente analisada, uma vez que as gemas se desenvolvem em 'tufos'. Foram avaliadas por PCR um total de 43 plantas alongadas, sendo que 36 plantas foram PCR positivas, isto é, continham o fragmento de 400 pb, correspondente ao transgene (Figura 12e).

A porcentagem de escapes, ou seja, plantas não transformadas que passaram pelo processo de transformação genética e que sobreviveram na presença do antibiótico de seleção, foi muito baixa (16,3%), mostrando que o sistema de transformação genética e seleção utilizado foi eficiente para abobrinha-de-moita. Esses resultados são satisfatórios, pois a alta frequência de escapes é comumente relatada em sistemas de transformação genética de diversas espécies, uma vez que células não transformadas podem ser protegidas da ação do agente de seleção pelas células transformadas que estão ao seu redor (DOMÍNGUEZ et al., 2004). Esses autores relatam uma taxa de escapes inferior a 25%. No entanto, em *Cucumis melo*, Castelblanque et al. (2008) apresentaram uma taxa de 100% de escapes, utilizando-se o gene *nptII* como agente seletivo e uma taxa de 17 a 23% de escapes, utilizando-se o gene *pmi* (*phosphomannose isomerase*), que permite o desenvolvimento em meio de cultura, suplementado com o açúcar manose.

A eficiência de transformação genética foi determinada pela razão entre o número de plantas PCR⁺ e o total de explantes inoculados com a *Agrobacterium*. A eficiência de transformação obtida em abobrinha-moita variou bastante, com uma média de 3,43%, considerando-se todos os experimentos realizados (Tabela 4). A eficiência de transformação de 3,43% foi bem superior à alcançada por Shah et al. (2008), que obteve apenas 0,7%, contudo esse baixo valor é explicado pela utilização de 2 vetores de expressão, um vetor contendo o gene de *cbf1*, para tolerância a baixas temperaturas, e outro vetor contendo o gene de seleção *nptII*, sistema denominado co-transformação. Este sistema apresenta uma baixa eficiência de transformação devido ao fato de que é necessária a integração dos 2 genes em estudo em uma mesma planta transgênica.

Figura 12 - Transformação genética de abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* cv. 'Caserta') para resistência ao ZYMV e ao PRSV-W. a) explante inicial: região basal do cotilédone e um segmento do hipocótilo. b) desenvolvimento de gemas adventícias. c) plântulas alongadas. d) plantas aclimatizadas PCR⁺. e) Análise das plantas alongadas por PCR, obtendo-se um fragmento de 400 pb correspondente ao produto amplificado dos fragmentos dos genes da proteína capsidial (CP) do PRSV-W e ZYMV. M marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega). C⁺: controle positivo (bactéria contendo fragmentos do gene da CP do PRSV-W e ZYMV); 1 e 7: plantas negativas de abobrinha-de-moita. 2 a 6 e 8 a 25: plantas transformadas de abobrinha-de-moita contendo fragmentos do gene da CP do PRSV-W e ZYMV. 26: controle negativo (planta não transformada). C⁻: controle negativo (água). Barras: 1 mm (a; b).

Tabela 4 - Transformação genética de abobrinha-de-moita (*C. pepo* cv. 'Caserta') para resistência ao ZYMV e PRSV-W a partir da região basal do cotilédone e um segmento do hipocótilo com *A. tumefaciens*, estirpes LBA 4404 ou EHA 105.

	nº explantes responsivos / nº explantes introduzidos	plantas PCR ⁺ / plantas alongadas	eficiência de transformação* (%)
Experimento 1	0/158	0/0	0,00
Experimento 2	8/152	6/8	3,94
Experimento 3	5/112	3/4	2,68
Experimento 4	14/126	1/2	0,79
Experimento 5	8/128	7/8	5,47
Experimento 6	12/152	10/10	6,58
Experimento 7	6/102	1/1	0,98
Experimento 8	10/120	8/10	6,67
TOTAL	73/1050	36/43	m = 3,43

*plantas PCR⁺/número de explantes introduzidos.

m = média da eficiência de transformação de todos os experimentos de transformação genética.

4.4 Obtenção de plantas transgênicas de melancia

Foram realizados 7 experimentos de transformação genética de melancia. Os explantes, após 2 dias no escuro, a 24 °C (co-cultivo), foram transferidos e cultivados em meio de cultura de seleção e regeneração e incubados sob fotoperíodo de 16 horas de luz, a 27 °C (Figura 13a). O número de explantes responsivos foi avaliado após 4 semanas de cultivo *in vitro* (Figura 13b). Nesses experimentos de transformação genética, um total de 973 explantes foram inoculados com a suspensão bacteriana, sendo que 195 apresentaram a formação de gemas adventícias (explantes responsivos) (Tabela 5). Os experimentos de melancia foram comprometidos por contaminação bacteriana, na etapa de alongamento das gemas adventícias, o que acarretou na perda de grande quantidade de material.

Assim como nos experimentos de abobrinha-de-moita, amostras de DNA foram obtidas a partir de folhas novas das gemas alongadas de melancia (Figura 13c). Em

seguida, foi realizada a reação de PCR com *primers* específicos para detecção dos fragmentos dos genes da proteína capsidial do ZYMV e do PRSV-W, identificando-se 59 plantas PCR positivas de melancia (Figura 13e).

Tabela 5 - Transformação genética de melancia (*C. lanatus* cv. 'Crimson Sweet') para resistência ao ZYMV e PRSV-W a partir da região basal do cotilédone e um segmento do hipocótilo com *A. tumefaciens*, estirpes LBA 4404 ou EHA 105.

	nº explantes responsivos / nº explantes introduzidos	plantas PCR ⁺ / plantas alongadas	eficiência de transformação* (%)
Experimento 1	20/96	6/8	6,25
Experimento 2	30/162	9/9	5,55
Experimento 3	49/128	13/17	10,16
Experimento 4	17/90	1/5	1,11
Experimento 5	2/183	15/23	8,20
Experimento 6	45/169	8/9	4,73
Experimento 7	32/145	7/12	4,83
TOTAL	195/973	59/83	m = 6,06

*plantas PCR⁺/número de explantes introduzidos.

m = média da eficiência de transformação de todos os experimentos de transformação genética.

Trabalhos de transformação genética de melancia descrevem a obtenção de plantas transgênicas via *A. tumefaciens* através do cultivo de segmentos cotilédone, utilizando o gene de seleção *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina (CHOI et al., 1994; ELLUL et al., 2003). Plantas transgênicas também foram obtidas com sucesso com o gene de seleção *bar* que confere resistência ao herbicida glifosato (CHO et al., 2008). A utilização do gene *bar* em substituição do gene *nptII*, é uma alternativa extremamente interessante, devido às questões ligadas à biossegurança e à aceitação pública dos transgênicos, pois o gene *nptII* gera inúmeras críticas pelo suposto risco de sua transferência para as bactérias do trato digestivo humano ou animal ou para as células do organismo, acarretando, conseqüentemente, a resistência a estes antibióticos (MIKI; MCHUGH, 2004).

Figura 13 - Transformação genética de melancia (*Citrullus lanatus* 'Crimson Sweet') para resistência ao ZYMV e ao PRSV-W. a) explante inicial: região basal do cotilédone e um segmento do hipocótilo. b) desenvolvimento de gemas adventícias; c) plântulas alongadas. d) plantas aclimatizadas PCR+. e) análise das plantas alongadas por PCR, obtendo-se um fragmento de 400 pb corresponde ao produto amplificado dos fragmentos dos genes da proteína capsidial (CP) do PRSV-W e do ZYMV. M: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas); C+: controle positivo (bactéria contendo fragmentos dos genes da CP do PRSV-W e do ZYMV); 1 a :12 plantas transformadas de melancia contendo fragmentos dos genes da CP do PRSV-W e ZYMV. 13: controle negativo (planta não transformada). C⁻: controle negativo (água). Barras: 500 μ m (a; b).

A eficiência de transformação genética em melancia (6,06%) obtida neste trabalho foi superior à eficiência de transformação de melancia cv. 'Crimson Sweet' e 'Dulce Maravilha' relatada por Ellul et al. (2003), cujos valores foram de 2,8% e 5,3%, respectivamente. Essa eficiência foi também superior quando comparada à obtida em abobrinha-de-moita (3,43%) no presente trabalho.

4.5 Aclimatização e polinização das plantas de abobrinha-de-moita e melancia

A aclimatização em sala de luz e a transferência para condições de casa-de-vegetação das plantas de abobrinha-de-moita e melancia obtidas no processo de transformação genética foram limitantes para o melhor desenvolvimento do presente trabalho. A maioria das plantas PCR⁺ para os genes da proteína capsidial do ZYMV e do PRSV-W de abobrinha-de-moita e melancia morreram durante essas etapas.

Na tentativa de minimizar as perdas das plantas transgênicas, a aclimatização foi alterada. As plantas de abobrinha-de-moita e melancia confirmadas como PCR⁺ para o ZYMV e o PRSV-W foram transferidas para recipiente tipo Magenta, contendo substrato Plantmax – hortaliças autoclavado e meio de cultura ½ MS líquido. Após 15 dias, as plantas foram transferidas para vasos (0,5 L) contendo substrato (Plantmax - hortaliças) autoclavado (Figuras 12d, 13d). Nesta etapa da aclimatização as plantas foram cobertas com saco plástico e cultivadas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, a 27 °C. A retirada do saco plástico foi gradativa por um período de 15 dias. Terminado o período de aclimatização, as plantas foram transferidas para vasos de 5 L, mantidas em uma mistura de terra, areia e esterco e incubadas em casa-de-vegetação. Mesmo com os cuidados adicionais na aclimatização muitas plantas ainda foram perdidas após a transferência para casa-de-vegetação.

Das 36 plantas de abobrinha-de-moita identificadas como PCR⁺ para os genes da proteína do ZYMV e do PRSV-W, apenas 6 plantas sobreviveram à aclimatização, enquanto das 59 plantas de melancia identificadas como PCR⁺ para os genes da proteína do ZYMV e do PRSV-W, apenas 2 plantas de melancia sobreviveram. Tanto as

plantas de abobrinha-de-moita como as plantas de melancia cresceram e se desenvolveram bem, em casa-de-vegetação (Figura 14a; Figura 15a), permitindo que as plantas fossem conduzidas para polinização manual e desenvolvimento de frutos.

A aclimatização foi relatada por Krug (2005) como uma etapa crítica na obtenção de plantas de melancia transformadas com gene da proteína capsidial do PRSV-W. Dificuldades na transferência de plântulas *in vitro* para o campo também foram observadas na cultura do melão (TABELI; KANNO; NISHIO, 1991).

Após aproximadamente 30 dias da transferência das plantas para casa-de-vegetação, observou-se o início do desenvolvimento de flores masculinas, em seguida as flores femininas tanto para as plantas de abobrinha-moita como para as plantas de melancia (Figura 14b-c; Figura 15b-c). Todas as plantas foram polinizadas manualmente, transferindo o pólen da flor masculina para a flor feminina. A formação do fruto pode ser verificada após 3 - 5 dias da polinização (Figura 14d; Figura 15d). Foram obtidos 4 frutos de abobrinha-de-moita, após 120 dias da polinização (Figura 14e). Esses frutos apresentaram tamanho semelhante, no entanto a quantidade de sementes por fruto foi bem variada: 3, 12, 22 e 96 sementes por fruto (Figura 14e). Em melancia, foram obtidos 2 frutos de tamanho semelhante da mesma planta, após 35 - 40 dias da polinização, com 34 e 73 sementes por fruto (Figura 15e). As sementes foram armazenadas a 4 °C, para posteriores experimentos para avaliação da resistência ao ZYMV e ao PRSV-W. Os demais frutos obtidos de abobrinha e melancia apodreceram, pela presença de uma doença bacteriana.

4.6 Análise das plantas aclimatizadas por *Southern blot*

Para confirmação da integração do transgene foram realizadas análises de *Southern blot*. Para as análises foram extraídas amostras de DNA genômico de 6 plantas de abobrinha-de-moita e 2 plantas de melancia PCR⁺ para os fragmentos dos

Figura 14 - Crescimento e desenvolvimento de plantas PCR⁺ de abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* cv. 'Caserta') em casa-de-vegetação. a) plantas desenvolvidas em vasos de 5 L. b) flor masculina. c) flor feminina polinizada. d) fruto imaturo, após 15 dias da polinização. e) fruto maduro, após 120 dias da polinização. Barra = 5 cm.

Figura 15 - Crescimento e desenvolvimento de plantas PCR⁺ de melancia (*Citrullus lanatus* cv. 'Crimson Sweet') em casa-de-vegetação. a) plantas desenvolvidas em vasos de 5 L. b) flor masculina. c) flor feminina. d) fruto imaturo, após 15 dias da polinização. e) fruto maduro, após 35 dias da polinização. Barra = 2,5 cm.

genes da proteína capsidial (CP) do ZYMV e do PRSV-W, aclimatizadas e mantidas em casa-de-vegetação. As amostras de DNA foram digeridas com a enzima de restrição (*EcoRI*) e hibridizadas com a sonda dos fragmentos dos genes da CP do ZYMV e PRSV-W. A integração do transgene foi verificada em 3 plantas de abobrinha-de-moita (Figura 16a-b). Pelos resultados obtidos, pôde-se verificar que as plantas transgênicas apresentam 1 a 2 eventos de inserção do transgene, tendo diferentes locais de integração do transgene no genoma da planta, demonstrando que são provenientes de diferentes eventos de transformação (Figura 16a-b). Amostras de DNA de plantas não transformadas, utilizadas como controle negativo, não hibridizaram com a sonda utilizada nas análises realizadas. Nas amostras de DNA de plantas de melancia avaliadas não foi verificada a hibridização, não havendo, portanto, a confirmação da transformação genética.

Apesar da análise de *Southern blot* ter sido repetida algumas vezes, não pode ser continuada, pois as plantas têm ciclo de vida curto. No entanto, apesar das plantas de melancia R₀ não terem sido confirmadas pela análise de *Southern blot*, pretende-se realizar essa análise em algumas plantas R₁ que não tenham sido inoculadas com os patógenos em estudo. A ocorrência de plantas negativas pode ser atribuída à dificuldade da otimização da técnica, uma vez que repetidas análises de DNA por PCR das plantas mantidas em casa-de-vegetação continuaram apresentando resultados positivos.

O número de eventos de transformação do transgene obtido foi semelhante aos encontrados na literatura em plantas transgênicas para resistência a vírus obtidas a partir de uma construção gênica do tipo *hairpin*. Fuentes et al. (2006) analisaram por *Southern blot* plantas transgênicas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), contendo o gene *C1* do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), numa construção do tipo *hairpin*. Foi possível verificar de um a múltiplos eventos de transformação. Contudo, os autores verificaram apenas uma linhagem resistente à infecção, sendo que essa linhagem apresentava um evento de transformação.

Na transformação genética de cevada (*Hordeum vulgare*) para resistência ao *Barley yellow dwarf virus* (BYDV), 38 plantas transgênicas foram confirmadas por *Southern blot*, apresentando 19 plantas com apenas um evento de transformação do transgene, 12 plantas com 2 eventos de transformação e 7 plantas com 3 ou mais eventos de transformação (ABBOTT; WANG; WATERHOUSE, 2001). No entanto, esses autores selecionaram apenas 2 linhagens de plantas transgênicas, que apresentavam 2 eventos de inserção, para avaliação da herança do transgene na progênie e da resistência ao BYDV, podendo-se observar que 3/4 da progênie dessas plantas, apresentaram o transgene e foram resistentes à infecção com BYDV.

Figura 16 - Análises de *Southern blot* em plantas de abobrinha-de-moita transformadas com fragmentos dos genes da proteína capsidial do ZYMV e PRSV-W. C⁺: controle positivo (produto de PCR que corresponde aos fragmentos fusionados do ZYMV e PRSV-W). C⁻: controle negativo (DNA de planta não transformada digerido com *EcoRI*). Colunas 1 a 3: correspondem ao DNA de plantas PCR+ digerido com *EcoRI*, apresentando 1 evento de inserção (a - coluna 1) e 2 eventos de inserção do transgene (b - colunas 2 e 3).

4.7 Avaliação da resistência ao ZYMV e ao PRSV-W

Foram inoculadas com o ZYMV e o PRSV-W, por meio de afídeos virulíferos, 38 plantas R₁ de abobrinha-moita, sendo 18 obtidas de uma planta transgênica com um evento de transformação do transgene e 20 obtidas de uma planta transgênica com 2 eventos de transformação. Foram inoculadas também 19 plantas R₁ de melancia. Como controles foram inoculadas plantas sadias de abobrinha-de-moita e melancia (Figura 17a-d), com os vírus separadamente e em conjunto.

Após 5 - 7 dias, 36 plantas transgênicas de abobrinha-de-moita desenvolveram sintomas evidentes de mosaico, assim como o controle para o ZYMV (Figura 17b). Uma planta de abobrinha-de-moita (3B) não desenvolveu sintomas neste período, porém após 15 dias pequenos sintomas pontuais começaram a aparecer e evoluíram, e acabaram assemelhando-se aos sintomas observados nas demais plantas infectadas (Figura 17c). Uma planta de abobrinha-de-moita não apresentou sintomas de mosaico. Neste período, o controle para o PRSV-W não apresentou sintomas característicos, que começaram a aparecer após 15 - 20 dias da inoculação. Sintomas de mosaico apareceram após 7 - 10 dias da inoculação em 18 plantas de melancia, sendo que uma planta não apresentou sintomas característicos do ZYMV e PRSV-W. As duas plantas que não apresentaram sintomas, tanto de abobrinha-de-moita como de melancia, foram inoculadas novamente por meio de afídeos virulíferos. Após esta segunda inoculação, a planta de melancia apresentou sintomas de mosaico, enquanto que a planta de abobrinha-de-moita não apresentou sintomas até o momento.

Amostras das plantas inoculadas de abobrinha-de-moita e melancia foram analisadas pelo teste sorológico PTA-ELISA. Os resultados obtidos pelo ELISA baseados na leitura de absorbância (450 nm) das amostras confirmaram os resultados para o ZYMV, sendo que todas as amostras estavam infectadas, com exceção da planta 3B. Pelo teste ELISA, pôde-se verificar que o controle e as plantas R₁ também estavam infectadas pelo PRSV-W, mesmo não apresentando ainda os sintomas visuais, inclusive na amostra 3B (Tabela 6). Os sintomas evoluíram em todas as

plantas, sendo estas descartadas, posteriormente. Nas amostras de melancia analisadas por ELISA, pôde-se verificar que todas estavam infectadas tanto para ZYMV como para o PRSV-W. No entanto, algumas amostras foram positivas apenas para ZYMV, enquanto que outras foram apenas para o PRSV-W (Tabela 6). Estas plantas também foram descartadas.

Figura 17 - Avaliação da resistência ao ZYMV e ao PRSV-W pela inoculação por meio de afídeos virulíferos (*Myzus nicotianae*) em plantas R₁ de abobrinha-de-moita e melancia. a) plantas saudáveis de abobrinha-de-moita, antes da inoculação. b) plantas R₁, após 7 dias da inoculação, apresentando sintomas de mosaico (seta). c) plantas R₁, após 7 dias da inoculação, apresentando sintomas pontuais de mosaico. d) plantas saudáveis de melancia. e) plantas R₁, após 15 dias da inoculação, apresentando sintomas de mosaico.

Tabela 6 - Obtenção da progênie (R_1) de plantas transgênicas de abobrinha-moita (*Cucurbita pepo* cv. 'Caserta') e melancia (*Citrullus lanatus* cv. 'Crimson Sweet') e avaliação da resistência ao ZYMV e ao PRSV-W com a primeira inoculação por meio de afídeos virulíferos.

Plantas aclimatizadas	Frutos maduros / nº de sementes	Plantas R ₁ inoculadas	Plantas sem sintomas	ELISA	
				ZYMV ^c	PRSV-W ^d
Abobrinha					
1	1/3 ^a	0	-	-	-
	1/12	-	-	-	-
2	0/0	-	-	-	-
3	1/22	20	1 ^b	7/7	7/7
4	0/0	-	-	-	-
5	1/96	18	0	17/18	18/18
6	0/0	-	-	-	-
Melancia					
1	1/34	19	1 ^b	9/10	6/10
	1/73	-	-	-	-
2	0/0	-	-	-	-

^a essas sementes não germinaram.

^b plantas de abobrinha-de-moita e melancia sem sintomas em que foi feita a 2ª inoculação por meio de afídeos virulíferos.

^c número de plantas positivas para o ZYMV em relação ao número de plantas analisadas por ELISA.

^d número de plantas positivas para o PRSV-W em relação ao número de plantas analisadas por ELISA.

Krug (2005) identificou duas plantas transgênicas de melancia (R_0), contendo o gene da proteína capsidial do PRSV-W, resistentes à infecção, após a inoculação mecânica com a estirpe severa PRSV-W-C. Esse resultado foi confirmado pelo teste sorológico ELISA, que foi negativo, ou seja, sem a presença do PRSV-W e pelo teste recuperação, através da inoculação de extratos das plantas transgênicas resistentes em plantas sadias de abobrinha-de-moita, que permaneceram sem sintomas. Posteriormente, parte da progênie (R_1) destas plantas foram avaliadas para resistência ao PRSV-W, sendo que as plantas analisadas foram infectadas por este vírus.

Na cultura do maracujá, clones de plantas transgênicas contendo o gene da proteína capsidial do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV (*Passion fruit woodiness virus*) foram inoculados mecanicamente com três isolados do CABMV (SP,

RJ e CE), sendo que duas plantas matrizes (T2 e T16 - IAC-277) foram identificadas como resistentes (TREVISAN et al., 2006, MONTEIRO-HARA et al., 2007). Estudos recentes dessas plantas transgênicas de maracujazeiro realizados por Jadão et al. (2008), para avaliação da resistência de R₁ de T2 e T16, pela inoculação do isolado CABMV-SP com *Myzus nicotianae* virulíferos, mostraram que todas plantas R₁ de T2 foram suscetíveis à infecção e que das 275 plantas R₁ de T16 inoculadas, apenas 14 plantas permaneceram resistentes à infecção, após 4 inoculações sucessivas. Foi relatado também que a inoculação mecânica pode ser ineficiente na identificação da resistência de plantas transgênicas, pois clones R₀ de T2 foram resistentes à infecção quando inoculados mecanicamente, enquanto que 98,2% dos clones R₀ de T2 apresentaram sintomas quando inoculados com afídeos virulíferos.

Clones de plantas transgênicas de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis*), contendo fragmentos do genoma do *Citrus tristeza virus* (CTV) foram avaliados para resistência ao CTV por enxertia através de borbulhas infectadas e por afídeos (*Toxoptera citricida*) virulíferos. Resultados obtidos demonstraram que a avaliação da resistência por meio de afídeos foi mais adequada, identificando-se clones com baixa concentração do vírus, e que a avaliação pela enxertia de borbulhas foi muito drástica, uma vez que a pressão de inóculo foi muito alta e a maioria das plantas transgênicas apresentaram grande concentração do vírus (MUNIZ, 2008).

Com bases nestes resultados, a inoculação por afídeos parece ser mais adequada para avaliação de plantas transgênicas para resistência a vírus. Por esse motivo, no presente trabalho, a avaliação da resistência foi realizada por meio da inoculação do ZYMV-RI e do PRSV-W-C com afídeos (*Myzus nicotinae*) virulíferos, que transmitiram os vírus pela picada de prova.

Em plantas transgênicas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) contendo o gene AC1 do *Bean golden mosaic virus* (BGMV), numa construção gênica do tipo *hairpin*, após a inoculação do BGMV por meio de moscas brancas (*Bemisia tabaci*) foi identificada apenas uma linhagem resistente a esse vírus, denominada 5.1, das 18

linhagens transgênicas inoculadas (BONFIM, et al., 2007). Estes dados evidenciam que a obtenção e seleção de linhagens transgênicas resistentes a determinado vírus não é fácil, pois mesmo em plantas transgênicas, contendo uma construção do tipo *hairpin* que favorece a resistência baseada no silenciamento gênico pós-transcricional, pode-se verificar muitas linhagens suscetíveis ou com a infecção apenas minimizada.

5 CONCLUSÕES

- Foi estabelecido um protocolo de regeneração de plantas *in vitro*, via organogênese, para abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo*), utilizando-se como explante a região basal do cotilédono e um segmento do hipocótilo.

- Foi possível obter uma construção gênica do tipo *hairpin*, contendo fragmentos de 200 pb dos genes da proteína capsidial do ZYMV e PRSV-W para transformação genética de cucurbitáceas suscetíveis a esses dois vírus.

- Foram obtidas plantas transgênicas de abobrinha-de-moita e melancia, contendo fragmentos dos genes da proteína capsidial do ZYMV e PRSV-W. A avaliação da resistência da progênie destas plantas, ao ZYMV e ao PRSV-W, com inoculação por meio de afídeos virulíferos, não identificou até momento plantas resistentes.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, D.; WANG, M.B.; WATERHOUSE, P.M. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to *Barley yellow dwarf virus*. In: AUSTRALIAN BARLEY TECHNICAL SYMPOSIUM, 10., 2001, Canberra. **Proceedings...** Canberra: CSIRO, 2001. Disponível em: <<http://www.regional.org.au/au/abts/2001>>. Acesso em: 23 jan. 2009.

AMBION. RNA Interference Overview. Disponível em: <<http://www.ambion.com>>. Acesso em: 17 nov. 2006.

ANANTHAKRISHNAN, G.; XIA, X.; ELMAN, C.; SINGER, S.; GAL-ON, A.; GABA, V. Shoot production in squash (*Cucurbita pepo*) by *in vitro* organogenesis. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, p. 739-746, 2003.

ANANTHAKRISHNAN, G.; XIAODI, X.; AMUTHA, S.; SINGER, S.; MURUGANANTHAM, M.; YABLONSKY, S.; FISCHER, E.; GABA, V. Ultrasonic treatment stimulates multiple shoot regeneration and explant enlargement in recalcitrant squash cotyledon *in vitro* explants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 26, p. 267-276, 2007.

ARCE-OCHOA, J.P.; DAINELLO, F.; PIK, L.M. Field performance comparison of two transgenic summer squash hybrids to their parental hybrid line. **Hortscience**, Alexandria, v. 30, p. 492-493, 1995.

ATREYA, C.D.; RACCAH, B.; PIRONE, T.P. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. **Virology**, Amsterdam, v. 178, p. 161-165, 1990.

AYUB, R.; GUIS, M.; BEN-AMOR, M.; GILLOT, L.; ROUSTAN, J.P.; LATCHÉ, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J.P. Expression of *ACC oxidase* antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. **Nature Biotechnology**, London, v. 14, p. 862-866, 1996.

BARNETT, O.W. *Potyviridae*, a proposed family of plant viruses. **Archives of Virology**, New York, v. 118, p. 139-141, 1991.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function. **Cell**, Cambridge, v. 116, p. 281-297, 2004.

BAULCOMBE, D.C. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1833-1844, 1996.

BAULCOMBE, D.C. RNA silencing in plants. **Nature**, London, v. 431, p. 356-363, 2004.

BAULCOMBE, D.C. Of maize and men, or peas and people: cases histories to justify plants and other model systems. **Nature Medicine**, London, v. 14, p. 1046-1049, 2008.

BENDENDO, I. Vírus. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 6, p. 132-160.

BONFIM, K.; FARIA, J.C.; NOGUEIRA, E.O.P.L.; MENDES, E.A.; ARAGÃO, F.J.L. RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 20, p. 717-726, 2007.

BOUQUIN, T.; LASSERE, E.; PRADIER, J.; PECH, J.P.; BALAGUÉ, C. Wound and ethylene induction of the *ACC oxidase* melon gene CM-AC01 occurs via two direct and independent transduction pathways. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, p. 1029-1035, 1997.

BUCHER, E.; LOHUIS, D.; VAN POPPEL, P.M.J.A.; GEERTS-DIMITRIADOU, C.; GOLDBACH, R.; PRINS, M. Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct. **Journal of General Virology**, London, v. 87, p. 3697-3701, 2006.

BUCK, K.W. Virus resistant plants. In GRIERSON, D. **Plant genetic engineering**. New York: Chapman and Hall, 1991. p. 137-178.

BUSHMAN, F.D. RNA interference: applications in vertebrates. **Molecular Therapy**, London, v. 7, p. 9-10, 2003.

CAMARGO FILHO, W.P.D.; MAZZEI, A.R.; ALVES, H.S. Mercado de abóboras nas cidades de São Paulo e Buenos Aires: oportunidades de expansão. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 33, p. 61-65, 2003.

CASTELBLANQUE, L.; MARFA, V.; CLAVERIA, E.; MARTINEZ, I.; PEREZ-GRAU, L.; DOLCET-SANJUAN, R. Improving the genetic transformation efficiency of *Cucumis melo* subsp. *melo* 'Piel de Sapo' via *Agrobacterium* In: EUCARPIA MEETING ON GENETICS AND BREEDING OF CUCURBITACEAE, 9., 2008, Avignon. **Proceedings...** Avignon: INRA, 2008. p. 627-632.

CASTLE, S.J.; PERRING, T.M.; FARRAR, C.A.; KISHABA, A.N. Field and laboratory transmission of *Watermelon mosaic virus 2* and *Zucchini yellow mosaic virus* various aphid species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 235-240, 1992.

CEAGESP - COMPANHIA DE ENTREPÓSITOS E ARMAZÉNS GERAIS DE SÃO PAULO. **Anuário 2007**. São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.ceagesp.gov.br>>. Acesso em: 01 dez. 2008.

CHEE, P.P. Somatic embryogenesis and plant regeneration of squash *Cucurbita pepo* L. cv YC 60. **Plant Cell Reports**, Alexandria, v. 9, p. 620-622, 1991.

CHEE, P.P. Initiation and maturation of somatic embryos of *Cucurbita pepo*. **Hortscience**, Alexandria, v. 27, p. 59-60, 1992.

CHOI, P.I.L.; SOH, W.Y.; KIM, Y.S.; YOO, O.J.; LIU, J.R. Genetic transformation and regeneration of watermelon using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, p. 344-348, 1994.

CHO, M.A.; MOON, C.Y.; LIU, J.R.; CHOI, P.S. *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrullus lanatus*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 52, p. 365-369, 2008.

CLOUGH, G.H.; HAMM, P.B. Coat protein transgenic resistance to *Watermelon mosaic virus* and *Zucchini yellow mosaic virus* in squash and cantaloupe. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, p. 1107-1109, 1995.

COMPTON, M.E.; GRAY, D.J. Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, triploid, and tetraploid watermelon. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 118, p. 151-157, 1993.

COMPTON, M.E.; GRAY, D.J. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of tetraploid watermelon. **Hortscience**, Alexandria, v. 29, p. 211-213, 1994.

COMPTON, M.E.; GRAY, D.J.; GABA, V.P. Use of tissue culture and biotechnology for the genetic improvement of watermelon. **Plant, Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, p. 231-243, 2004.

COMPTON, M.E. Interaction between explant size and cultivar impacts shoot organogenic competence of watermelon cotyledons. **Hortscience**, Alexandria, v. 35, p. 749-750, 2000.

DABAUZA, M.; BORDAS, M.; SALVADOR, A.; ROIG, A.L.; MORENO, V. Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledon explants of *Citrullus colocynthis* (L.) Schad. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 888-892, 1997.

DIAS, P.R.P.; REZENDE, J.A.M. Problemas na premunização de melancia para o controle do mosaico causado pelo *Papaya ringspot virus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 651-654, 2001.

DOLJA, V.V.; HALDEMAN-CAHILL, R.; MONTGOMERY, A.E.; VANDENBOSH, K.A.; CARRINGTON, J.C. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. **Virology**, Amsterdam, v. 206, p. 1007-1016, 1995.

DOMÍNGUEZ, A.; CERVERA, M.; PÉREZ, R.M.; ROMEO, J.; FAGOAGA, C.; CUBERO, J.; LÓPEZ, M.M.; JUAREZ, J.A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Characterization of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 14, p. 171-183, 2004.

DONG, J.Z.; JIA, S. High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 9, p. 559-562, 1991.

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

EAMENS, A.; WANG, M.B.; SMITH, N.A.; WATERHOUSE, P.M. RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. **Plant Physiology**, Washington, v. 147, p. 456-468, 2008.

EDWARDSON, J.R.; CHRISTIE, R.G. Use of virus-induced inclusions in classification and diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 16, p. 31-55, 1978.

ELLUL, P.; RÍOS, G.; ATARÉS, A.; ROIG, L.A.; SERRANO, R.; MORENO, V. The expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *HAL 1* gene increases salt tolerance in transgenic watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsun. Nakai.]. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 107, p. 462-469, 2003.

FANG, G.; GRUMET, R. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskmelon plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 9, p. 160-164, 1990.

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

FAO. ProdStat - Crops. Roma, 2008. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> >. Acesso em: 01 dez. 2008.

FEBRES, V.J.; LEE, R.F.; MOORE, G.A. Transgenic resistance to *Citrus tristeza virus* in grapefruit. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 93-104, 2008.

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

FILGUEIRA, F.A.R. **Manual de olericultura**: cultura e comercialização de hortaliças. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1981. 336 p.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 2000. 402 p.

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

FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS. **Agrianual 2009**: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo, 2008. p. 377-379.

FUCHS, M.; GONSALVES, D. Resistance of transgenic hybrid squash ZW-20 expressing the coat protein genes *Zucchini yellow mosaic virus* and *Watermelon mosaic virus-2* to mixed infections by both potyviruses. **Nature Biotechnology**, London, v. 13, p. 1466-1473, 1995.

FUCHS, M.; MCFERSON, J.R.; TRICOLI, D.M.; MCMASTER, J.R.; DENG, R.Z.; BOESHORE, M.L.; REYNOLDS, M.L.; RUSSELL, P.F.; QUEMADA, H.D.; GONSALVES, D. Cantaloupe line CZW-30 containing coat protein of *Cucumber mosaic virus*, *Zucchini yellow mosaic virus*, and *Watermelon mosaic virus-2* is resistant to these three viruses in the field. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 3, p. 279-290, 1997.

FUCHS, M.; TRICOLI, D.M.; CARNEY, K.J.; SCHESSER, M.; MCFERSON, J.R.; GONSALVES, D. Comparative virus resistance and fruit yield of transgenic squash with single and multiple coat protein genes. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 1350-1356, 1998.

FUENTES, A.; RAMOS, P.L.; FIALLO, E.; CALLARD, D.; SÁNCHEZ, R.P.; RODRIQUEZ, R.; PUJOL, M. Intron-hairpin RNA derived from replication associated protein C1 gene confers immunity to *Tomato yellow leaf curl virus* infection in transgenic tomato plants. **Transgenic Research**, London, v. 15, p. 291-304, 2006.

GABA, V.; SCHLARMAN, E.; ELMAN, C.; SAGEE, O.; WATAD, A.A.; GRAY, D.J. *In vitro* studies on the anatomy and morphology of bud regeneration in melon cotyledons. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 35, p. 1-7, 1999.

GIAMPAN, J.S.; REZENDE, J.A.M. Transmissibilidade por afídeos e reação de diversas espécies vegetais às estirpes fracas premunizantes do PRSV-W. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, p. 279-283, 2001.

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

GONSALVES, C.; XUE, B.; YEPES, M.; FUCHS, M.; LING, K.; NAMBA, S. Transferring *Cucumber mosaic virus*-white leaf strain coat protein gene into *Cucumis melo* L. and evaluating transgenic plants for protection against infections. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 119, p. 345-355, 1994.

GONSALVES, D.; CHEE, P.; PROVIDENTI, R.; SEEM, R.; SLIGHTOM, J.L. Comparison of coat protein-mediated and genetically-derived resistance in cucumbers to infection by *Cucumber mosaic virus* under field conditions with natural challenge inoculations by vectors. **Nature Biotechnology**, London, v. 10, p. 1562-1570, 1992.

GONSALVES, C.; XUE, B.; GONSALVES, D. Somatic embryogenesis and regeneration from cotyledon explants of six squash cultivars. **Hortscience**, Alexandria, v. 30, p. 1295-1297, 1995.

GREBER, R.S. *Watermelon mosaic virus* 1 and 2 Queensland cucurbit crop. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 29, p. 1235-1245, 1978.

HACCIUS, B. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, Delhi, v. 28, p. 74-81, 1978.

HANNON, G.J. RNA interference. **Nature**, London, v. 418, p. 244-251, 2002.

JADÃO, A.S.; MONTEIRO A.C.B., MENDES B.M.J., VIEIRA M.L.C, REZENDE J.A.M. Avaliação da resistência 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 41º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2008, Apresentado em Belo Horizonte.

JAN, F.J.; PANG, S.Z.; TRICOLI, D.M.; GONSALVES, D. Evidence that resistance in squash mosaic comovirus coat protein-transgenic plants is affected by plant developmental stage and enhanced by combination of transgenes from different lines. **Journal of General Virology**, London, v. 81, p. 2299-2306, 2000.

JELASKA, S. Embryogenesis and organogenesis in pumpkin. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 31, p. 257-261, 1974.

JELASKA, S.; MAGNUS, V.; SERENTIN, M.; LACAN, G. Induction of embryogenic callus in *Cucurbita pepo* hypocotyl explants by indole-3-ethanol and sugar conjugates. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 64, p. 237-242, 1985.

JONES, L.; RATCLIFF, F.; BAULCOMBE, D.C. RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. **Current Biology**, London, v. 11, p. 747-757, 2001.

KANIEWSKI, W.; ILARDI, V.; TOMASSOLI, L.; MITSKY, T.; LAYTON, J.; BARBA, M. Extreme resistance to *Cucumber mosaic virus* (CMV) in transgenic tomato expressing one or two viral coat proteins. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 5, p. 111-119, 1999.

KATHIRAVAN, K.; VENGEDESAN, G.; SINGER, S.; STEINITZ, B.; PARIS, H.S.; GABA, V. Adventitious regeneration *in vitro* occurs across a wide spectrum of squash (*Cucurbita pepo*) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 85, p. 285-295, 2006.

KENNERDELL, J.R.; CARTHEW, R.W. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. **Cell**, Cambridge, v. 95, p. 1017-1026, 1998.

KIM, J.W.; HAN, S.K.; KNON, S.Y.; LEE, H.S.; LIM, Y.P.; LIU, J.W.; KWAK, S.S. High frequency shoot induction and plant regeneration from cotyledonary hypocotyl explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v. 157, p. 136-139, 2000.

KINTZIOS, S.E.; HIUREAS, G.; SHORTSIANITIS, E.; SERETI, E.; BLOUCHOS, P.; MANOS, C.; MAKRI, O.; TARAVIRA, N.; DROSSOPOULOS, J.B.; HOLEVAS, C.D. The effect of light on the induction, development and maturation of somatic embryos from various horticultural and ornamental species. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 461, p. 427-432, 1998.

KINTZIOS, S.E.; SERETI, E.; BLOUCHOS, P.; DROSSOPOULOS, J.B.; KITSAKI, C.K.; LIOPA-TSAKALIDIS, A. Growth regulator pretreatment improves somatic embryogenesis from leaves of squash (*Cucurbita pepo* L.) and melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, p. 1-8, 2002.

KLAS, F.E.; FUCHS, M.; GONSALVES, D. Comparative spatial spread overtime of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) and *Watermelon mosaic virus* (WMV) in fields of transgenic squash expressing the coat protein genes of ZYMV and WMV, and in fields of nontransgenic squash. **Transgenic Research**, London, v. 15, p. 527–541, 2006.

KRUG, M.G.Z.; STIPP, L.C.L.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. *In vitro* organogenesis of *Citrullus lanatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 861-865, 2005.

KRUG, M.G.Z. **Transformação genética de melancia para resistência ao *Papaya ringspot virus***. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

KUBOTA, K.; TSUDA, S.; TAMAI, A.; MESHI, T. *Tomato mosaic virus* replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, p. 11016-11026, 2003.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997. v. 2, cap. 29, p. 325-337.

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.

LECOQ, H.; LEMAIRE, J.M.; WIPF-SCHEIBEL, C. Control of *Zucchini yellow mosaic virus* in squash by cross protection. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, p. 208-211, 1991.

LEE, Y.K.; CHUNG, W.I.; EZURA, H. Plant regeneration via organogenesis in the Korean and the Japanese winter squash (*Cucurbita maxima*). **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 588, p. 299-301, 2002.

LEE, Y.K.; CHUNG, W.I.; EZURA, H. Efficient plant regeneration via organogenesis in winter squash (*Cucurbita maxima* Dush.). **Plant Science**, Limerick, v. 164, p. 413-418, 2003.

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

LIMA, J.A.A.; VIEIRA, A.C. Distribuição do vírus mosaico da abóbora em municípios cearenses e gama de hospedeiros de um isolado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 112-114, 1992.

LINDBO, J.L.; DOUGHERTY, W.G. Plant pathology and RNAi: a brief history. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 191-204, 2005.

LINDBO, J.A.; SILVA-ROSALES, L.; PROEBSTING, W.M.; DOUGHERTY, W.G. Induction of a high specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 1749-1759, 1993.

LOPES, J.F. Palestra de abertura. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 9, p. 98-99, 1991. Anais Simpósio Brasileiro sobre Cucurbitáceas, 1990, Apresentado em Campo Grande.

LOMONOSSOFF, G.P. Pathogen-derived resistance to plant viruses. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 323-343, 1995.

LOU, H.; KAKO, S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cucumber. **Hortscience**, Alexandria, v. 29, p. 906-909, 1994.

LOVISOLO, O. Virus and viroid diseases of cucurbits. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 88, p. 33-82, 1980.

METTE, M.F.; AUFSATZ, W.; VAN DER WINDEN, J.; MATZKE, M.A.; MATZKE, A.J.M. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 19, p. 5194-5201, 2000.

METWALLY, E.I.; MOUSTAFA, S.A.; EL-SAWY, B.I.; HAROUN, S.A.; SHALABY, T.A. Production of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo*. **Plant Cell, Tissue, Organ and Culture**, Dordrecht, v. 52, p. 117-121, 1998a.

METWALLY, E.I.; MOUSTAFA, S.A.; EL-SAWY, B.I.; SHALABY, T.A. Haploid plantlets derived by anther culture of *Cucurbita pepo*. **Plant Cell, Tissue, Organ and Culture**, Dordrecht, v. 52, p. 171-176, 1998b.

MIKI, B.; MCHUGH, S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 107, p. 193-232, 2004.

MISSIOU A.; KALANTIDIS, K.; BOUTLA, A.; TZORTZAKAKI, S.; TABLER, M.; TSAGRIS, M. Generation of transgenic potato plants highly resistant to *potato virus Y* (PVY) through RNA silencing. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 14, p. 185-197, 2004.

MITTER, N.; SULISTYOWATI, E.; DIETZGEN, R.G. *Cucumber mosaic virus* infection transiently breaks dsRNA-induced transgenic immunity to *Potato virus Y* in tobacco. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 16, p. 936-944, 2003.

MONTEIRO-HARA, A.C.B. de A.; TREVISAN, F.; JADÃO, A.S.; REZENDE, J.A.M.; MENDES, B.M.J. Avaliação da resistência de plantas transgênicas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* ao vírus do endurecimento dos frutos (PWV). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, S196, res. 0434, 2007. Resumos 40º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2007, apresentado em Maringá.

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 de São Paulo, Piracicaba, 2009.

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.

MURPHY, J.F.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, A.W.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. (Ed.). **Virus taxonomy**: classification and nomenclature. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Wien: Springer- Verlag, 1995. 435 p.

NADERI, M.; BERGER, P.H. Effects of chloroplast targeted *Potato virus Y* coat protein on transgenic plants. **Physiology Molecular Plant Pathology**, London, v. 50, p. 67-83, 1997.

NAGATA, T.; ALVES, D.M.T.; INOUE-NAGATA, A.K.; TIAN, T.Y.; KITAJIMA, E.K.; CARDOSO, J.E.; ÁVILA, A.C. de. A novel melon transmitted by whitefly. **Archives of Virology**, New York, v. 150, p. 379-387, 2005.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric *chalcone synthase* gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in *trans*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 2, p. 279-289, 1990.

NGO, H.; TSCHUDI, C.; GULL, K.; ULLU, E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, Washington, v. 95, p. 14687-14692, 1998.

NIEDZ, R.; SMITH, S.; DUNBAR, C.; STEPHENS, C.; HARRY, H. Factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo* L. **Plant Cell, Tissue, Organ and Culture**, Dordrecht, v. 18, p. 313-319, 1989.

OLIVEIRA, V.B.; QUEIRÓZ, M.A.; LIMA, J.A.A. Fontes de resistência aos principais potyvirus isolados de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 589-592, 2002.

PAL, S.P.; ALAM, I.; ANISUZZAMAN M.; SARKER, K.K.; SHARMIN, S.A.; ALAM, M.F. Indirect organogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). **Turkish Journal Of Agriculture And Forestry**, Ankara, v. 31, p. 63-70, 2007.

PANG, S.Z.; JAN, F.J.; TRICOLI, D.M.; RUSSELL, P.F.; CARNEY, K.J.; HU, J.S.; FUCHS, M.; QUEMADA, H.D.; GONSALVES, D. Resistance to squash mosaic comovirus in transgenic squash plants expressing its coat protein genes. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 6, p. 87-93, 2000.

PARK, S.M.; LEE, J.S.; JEGAL, S.; JEON, B.Y.; JUNG, M.; PARK, Y.S.; HAN, S.L.; SHIN, Y.S.; HER, N.H.; LEE, J.H.; LEE, M.Y.; RYU, K.H.; YANG, S.G.; HARN, C.H. Transgenic watermelon rootstock resistant to CGMMV (*Cucumber green mottle mosaic virus*) infection. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 24, p. 350-356, 2005.

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

PROVVIDENTI, R. Papaya ringspot virus - W. In: ZITTER, T.; HOPKINS, D.L.; THOMAS, C.E. (Ed.). **Compendium of cucurbit diseases**. Saint Paul: APS, 1996. p. 40.

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

PUIATII, M.; SILVA, D.J.H. da S. Abóboras e morangas. In: FONTES, P.C.R. (Ed.). **Olericultura – Teoria e prática**. Viçosa: UFV, 2005a. cap. 19, p. 279-297.

PUIATII, M.; SILVA, D.J.H. da S. Melancia. In: FONTES, P.C.R. (Ed.). **Olericultura – Teoria e prática**. Viçosa: UFV, 2005b. cap. 25, p. 383-406.

PURCIFULL, D.; EDWARDSON, J.; HIEBERT, E.; GONSALVES, D. *Papaya ringspot virus*. CMI/AAB. **Description of Plant Viruses**, Kew, n. 292, p. 1-8, 1984.

RABELO, L.C. **Seleção de uma estirpe fraca do *Zucchini yellow mosaic virus* e controle dos mosaicos comum (*Papaya ringspot virus*) e amarelo (ZYMV) por dupla premunização em abobrinha-de-moita.** 2002. 55 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

RABELO, L.C.; REZENDE, J.A.M. Seleção de uma estirpe fraca do *Zucchini yellow mosaic virus* com potencial para uso na premunização. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 30, p. 340-345, 2004.

RAHMAN, S.M.; HOSSAIN, M.; ISLAM, R.; JOARDER, O.I. Plant regeneration from internode segments of *Cucurbita maxima* Dush. X *Cucurbita moschata* Dush. **Current Science**, Bangalore, v. 65, p. 562-566, 1993.

REZENDE, J.A.M.; PACHECO, D.A. Control of *Papaya ringspot virus* type W1 in zucchini squash by cross-protection in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 171-175, 1998.

RODRIGUEZ, A.P.M; WETZTEIN, H.Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma**, Leipzig, v. 204, p. 71-83, 1998.

ROJAS, M.R.; ZERBINI, F.M.; ALLISON, R.F.; GILBERTSON, R.L.; LUCAS, W.J. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. **Virology**, London, v. 237, p. 283-295, 1997.

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

SHAH, P.; SINGH, N.K.; KHARE, N.; RATHORE M.; ANANDHAN, S.; ARIF, M.; SINGH, R.K.; DAS, S.C.; AHMED, Z.; KUMAR, N. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of summer squash (*Cucurbita pepo* L. cv. Australian green) with *cbf-1* using a two vector system. **Plant Cell, Tissue, Organ and Culture**, Dordrecht, v. 95, p. 363-371, 2008.

SHALABY, T.A. Factors affecting haploid induction through *in vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 115, p. 1-6, 2007.

SHUKLA, D.D.; FRENKEL, M.J.; WARD, C.W. Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 13, p. 178-191, 1991.

SIVAMANI, E.; BREY, C.W.; TALBERT, L.E.; YOUNG, M.A.; DYER, W.E.; KANIEWSKI, W.K.; QU, R. Resistance to *Wheat streak mosaic virus* in transgenic wheat engineered with the viral coat protein gene. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 11, p. 31-41, 2002.

SMITH, N.A.; SINGH, S.P.; WANG, M.B.; STOUTJESDIJK, P.A.; GREEN, A.G.; WATERHOUSE, P.M. Gene expression: total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. **Nature**, London, v. 404, p. 319-320, 2000.

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

STANGARLIN, O.S.; DIAS, P.R.P.; REZENDE, J.A.M. Levantamento das viroses em cucurbitáceas no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, p. 295, 2000. Resumos 23º Congresso Paulista de Fitopatologia, 2000, apresentado em Campinas.

STANGARLIN, O.S.; DIAS, P.R.P.; BURIOLLA, J.E.; REZENDE, J.A.M. Incidência de viroses em ensaios de avaliações de genótipos de abóboras e de pepino na região de Dourados/MS. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 532, 2001. Resumos 34º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2001, apresentado em São Pedro.

STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J.; PIEDADE, S.; RODRIGUEZ, A.P.M. *In vitro* morphogenesis of *Cucumis melo* var. *inodorus*. **Plant Cell, Tissue, Organ and Culture**, Dordrecht, v. 65, p. 81-89, 2001.

TABEI, Y.; KANNO, T.; NISHIO, T. Regulation of organogenesis and somatic embryogenesis by auxin in melon (*Cucumis melo* L). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 10, p. 225-229, 1991.

TABEI, Y.; KITADE, S.; NISHIZAWA, Y.; KIKUCHI, N.; KAYANO, T.; HIBI; AKUTSU, K. Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 17, p. 159-164, 1998.

TENNANT, P.F.; FERMIN, G.; FITCH, M.M.; MANSHARDT, R.M.; SLIGHTOM, J.L.; GONSALVES, D. *Papaya ringspot virus* resistance of transgenic Rainbow and SunUp is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 645-653, 2001.

TENNANT, P.F.; FITCH, M.M.; MANSHARDT, R.M.; SLIGHTOM, J.L.; GONSALVES, D. Resistance against *Papaya ringspot virus* isolates in coat protein gene transgenic papaya is affected by transgene dosage and plant development. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, p. 1359-1366, 1997.

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

TREVISAN, F.; MENDES, B.M.J.; MACIEL, 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.

TRICOLI, D.M.; CARNEY, K.J.; RUSSEL, P.F.; MCMASTER, J.R.; GROFF, D.W.; HADDEN, K.C.; HIMMEL, P.T.; HABBARD, J.P.; BOESHORE, M.L.; REYNOLDS, J.F.; QUEMADA, H.D. Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to *Cucumber mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus*. **Nature Biotechnology**, London, v. 13, p. 1458-1465, 1995.

TRICOLI, D.M.; CARNEY, K.J.; RUSSEL, P.F.; QUEMADA, H.D.; McMASTER, R.J.; REYNOLDS, J.F.; DENG, D.W. **Transgenic plants expressing DNA constructs containing a plurality of genes to impart virus resistance**. Kalamazoo, MI: Asgrow Seed Company, 2002. (US Patent No. 6.337.431).

VERCHOT, J.; KOONIN, E.V.; CARRINGTON, J.C. The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. **Virology**, Amsterdam, v. 185, p. 527-535, 1991.

WANG, X.; EGGENBERGER, A.L.; NUTTER JUNIOR, F.W.; HILL, J.H. Pathogen-derived transgenic resistance to *Soybean mosaic virus* in soybean. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 8, p. 119-127, 2001.

WATERHOUSE, P.M.; GRAHAM, M.W.; WANG, M.B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 95, p. 13959-13964, 1998.

WATERHOUSE, P.M.; HELLIWELL, C.A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. **Nature**, London, v. 4, p. 29-37, 2003.

WESLEY, S.V.; HELLIWELL, C.A.; SMITH, N.A.; WANG, M.B.; 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.

WIANY, F.; ZERNICKA-GOETZ, M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. **Nature Cell Biology**, London, v. 2, p. 70-75, 2000.

YALCIN-MENDI, N.Y.; IPEK, M.; KACAN, H.; CURUK, S.; SARI, N.; CETINER, S.; GABA, V. A histological analysis of regeneration of watermelon. **Journal Plant Biochemistry and Biotechnology**, Amsterdam, v. 12, p. 147-150, 2003.

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

YUKI, V.A. **Epidemiologia e controle do mosaico (VMM-Me) em abobrinha-de-moita**. 1990. 84 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1990.

YUKI, V.A.; COSTA, A.S.; NAGAI, V. Avaliação de perdas induzidas pelo mosaico da abobrinha-de-moita, causado pelo vírus do mosaico do mamoeiro - estirpe melancia (VMM-Me). **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 17, p. 40, 1991. Resumos 24º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 1991, apresentado no Rio de Janeiro.

YUKI, V.A.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W.; BARROSO, P.A.V.; KUNIYUKI, H.; GROPPPO, G.A.; PAVAN, M.A. Occurrence, distribution and relative incidence of five viruses infecting cucurbits in the state of São Paulo, Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 516-520, 2000.

ZERBINI, F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. A família *Potyviridae*: parte 1. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 7, p. 1-66, 1999.