

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

Uso de genes anti-apoptóticos na construção de plantas de maracujá transgênicas e análise da atividade de diferentes promotores em células vegetais e de insetos

Daniele Scandiucci de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Co-orientador: Dr. Manoel Teixeira Souza Jr.

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular

Brasília
2006

Senhor, fazei de mim um instrumento de vossa paz;

Onde houver ódio, que eu leve o amor;

Onde houver discórdia, que eu leve a união;

Onde houver dúvidas, que eu leve a fé;

Onde houver erros, que eu leve a verdade;

Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;

Onde houver desespero, que eu leve a esperança;

Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;

Onde houver trevas, que eu leve a luz.

Ó Mestre, fazei com que eu procure mais

Consolar que ser consolado

Compreender, que ser compreendido;

Amar, que ser amado;

Pois é dando que se recebe;

É perdoando, que se é perdoado;

E é morrendo que se vive para a vida eterna.

Oração de São Francisco

“Nunca tenha medo de tentar algo novo. Lembre-se de que um amador solitário construiu a Arca. Um grande grupo de profissionais construiu o Titanic.”

Luis Fernando Veríssimo

A Deus e Nossa Senhora,

à família:

meus pais,

Maria Eunice Scandiucci de Freitas (*in memoriam*) e

João Batista de Freitas;

meu marido,

Regis

minha irmã e cunhado,

Tica e Renato.

Com amor,

Dedico

Este trabalho foi realizado no Laboratório de microscopia Eletrônica e Virologia do Departamento de Biologia Celular e do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob orientação do Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro e do Centro Nacional de Recursos Genéticos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária sob orientação do pesquisador Dr. Manoel T. Souza Jr , contando com o apoio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes);
- Universidade de Brasília;
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Centro Nacional de Recursos Genéticos da (EMBRAPA/CENARGEN).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de uma forma direta ou indireta, tornaram possível a realização deste trabalho, especialmente:

À Universidade de Brasília, particularmente ao Departamento de Biologia Celular;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Centro Nacional de Recursos Genéticos da (EMBRAPA/CENARGEN);

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa por seis meses do doutorado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa durante três anos de doutorado;

À Ana, secretária do curso, obrigada pela ajuda;

Ao professor Bergmann, muito obrigada pela paciência;

Marly, minha irmã, “conselheira” de trabalho e espiritual;

A todos os amigos dos laboratórios que trabalhei, discutindo desde experimentos que teimam em não sair até coisas banais; amigos de trabalhos diurnos, vespertinos, noturnos e de final de semana no laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB (Aline, Anabele, Aninha, Bruno, Caren, Claudinha, Erica, Hugo

(s), Isabela, Juliana, Leonora, Marcelo, MH, Mari, Maria, Malu e Artur, Marina, Myrce, Natália, Nayara, Núbia, Pedro, Pinedo, Raimundo, Roberto, Simone, Susane, Tati, Thiago, Zezinho, Zinho), nos laboratórios de Genética de Plantas (Andreia Raposo, Andréia S., Andri, Aninha, Antonio, Bete, Clarissa, Eva, Joema, Juliano, Manu, Marília, Marcão, Marco, Marivânia, Natália (s), Neide, Sandra, Valci, Vânia, Yamá), Bacteriologia (Dra. Abi, Joanice, Luciano) e Nutrigenômica (Aline, Cristiane, Elisa, Fabiana, Helena, Dona Isabel, Leandro, Marilia, Mitsue, Naia, Paulo César e Paulo Paiva) do Cenargen;

Ao amigo Eder, com quem aprendi muito sobre biologia molecular na prática;

Às amigas Elizangela, Letícia e Lílian sempre perseverante;

Às amigas D. Irene, Michelle e Valeria, o apoio e os conselhos preciosos;

Aos pesquisadores da Embrapa/ Cenargen, em especial Dra. Abi, Dra. Ana Ciampi, Dra. Elionor, Dra. Damares, Dr. Francisco Aragão, Dr. Giovanni, Dr. Matsumoto, Dra. Natália, pela ajuda;

Meus tios (Margalho, Lúcia, Elza, Toninha e Rubens), padrinhos, Ilda e Otacílio, sempre torcendo e rezando por mim;

A Deus e Nossa Senhora, meus pais, minha irmã e meu marido que sempre estiveram comigo me incentivando e apoiando,

Muito obrigada!

Este trabalho foi realizado no Laboratório de microscopia Eletrônica e Virologia do Departamento de Biologia Celular e do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob orientação do Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro e do Centro Nacional de Recursos Genéticos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária sob orientação do pesquisador Dr. Manoel T. Souza Jr , contando com o apoio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes);
- Universidade de Brasília;
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Centro Nacional de Recursos Genéticos da (EMBRAPA/CENARGEN).

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	II
RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Baculovirus	3
2.2. Apoptose	8
2.3. Genes anti-apoptóticos	12
2.4. Promotores	13
2.5. Plantas transgênicas	17
2.6. Plantas transgênicas e genes anti-apoptóticos	21
2.7. Cultura do maracujazeiro	23
2.8. Doenças do maracujazeiro.....	24
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Estratégias utilizadas	29
4.1. Construção de plantas transgênicas expressando genes anti- apoptóticos	30
4.1.1. Oligonucleotídeos.....	30
4.1.2. Plasmídeos	33
4.1.3. Construções gênicas.....	34
4.1.3.1. Promotor UBQ3 e gene <i>p35</i>	34
4.1.3.2. Promotor 35S e gene <i>p35</i>	35
4.1.3.3. Promotor 35S e gene <i>iap-3</i>	39

4.1.3.4. Promotor UBQ3 e gene <i>iap-3</i>	40
4.1.4. Preparo dos explantes e bombardeamento	43
4.1.5. Detecção de plantas transgênicas	44
4.1.5.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	44
4.1.5.2. Southern blot	45
4.1.6. RT-PCR.....	46
4.1.7. Teste de resistência a vírus	47
4.1.8. Teste de resistência à bactéria	47
4.1.9. Teste de tolerância a herbicida	49
4.2. Análise da atividade do promotor IE1 de baculovirus em células	
vegetais	50
4.2.1. Células animais e tecido vegetal.....	50
4.2.2. Construção dos cassetes gênicos contendo o promotor IE-1 do baculovírus AgMNPV e promotores de planta (UBQ3 e 35S) comandando a expressão dos genes da luciferase (<i>luc</i>) de Renilla	50
4.2.3. Análise transiente do promotor do gene IE-1 de Anticarsia gemmatilis multiple nucleopolyedrovirus em fumo (<i>Nicotiana tabacum</i>)	53
4.2.4. Análise da expressão do gene da luciferase (<i>rluc</i>) de Renilla sob o comando de promotores de plantas (UBQ3 ou 35S) ou de inseto (IE-1) em células UFL-AG-286.....	53
5. RESULTADOS.....	55
5.1. Construção e detecção de plantas transgênicas	55
5.1.1. PCR e Southern blot	55
5.1.2. Análise da transcrição do gene <i>p35</i> nas plantas transformadas	57
5.2. Teste de resistência a vírus (CABMV) em plantas transformadas com o gene <i>p35</i>	60
5.3. Teste de resistência à bactéria <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	64
5.4. Teste tolerância a herbicida para plantas <i>p35+</i>	66
5.4.1. In vitro	66
5.4.2. In vivo.....	67

5.5. Análise da atividade dos promotores de planta (35S e UBQ) e do promotor IE-1 de <i>Anticarsia gemmatalis</i> nucleopoliedrovirus em células de inseto em cultura	70
5.6. Expressão transiente do promotor IE-1 em plantas de fumo	73
6. DISCUSSÃO	75
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	83
8. REFERÊNCIAS.....	84
ANEXOS	100

LISTA DE FIGURAS

1. Seqüência do gene <i>p35</i>	31
2. Seqüência do gene <i>iap-3</i>	32
3. Construção do plasmídeo pBSAN236	37
4. Construção dos plasmídeos pEPT8 <i>p35</i> e pBSAN236 <i>p35</i>	38
5. Construção do plasmídeo pEPT8 <i>iap-3</i> e pBSAN236 <i>iap-3</i>	42
6. Mapa dos plasmídeos IE-1AgpNULL, 35SpNULL e UBQ-3pNULL	52
7. Detecção do gene <i>p35</i> e transcritos nas plantas regeneradas	58
8. Eletroforese em gel de agarose (0.8%) do produto de PCR das plantas bombardeadas com o gene <i>iap-3</i> e regeneradas	59
9. Sintomas observados nas plantas inoculadas com o vírus CABMV após 20 dias de inoculação	62
10. Progresso da infecção viral induzida por CABMV em maracujazeiro transgênico (<i>p35+</i>)	63
11. Lesões induzidas por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>passiflorae</i> em maracujazeiros transgênicos e não transgênicos	65
12. Efeito (<i>in vitro</i>) do herbicida glifosinato em maracujazeiros transgênicos e não transgênicos	68
13. Plantas não-transgênicas e transgênicas pulverizadas com 0,06% de herbicida.....	69
14. Análise dos promotores de plantas 35S e UBQ-3 em células Sf9.....	72
15. Análise da expressão transiente do promotor IE-1 de baculovirus e dos promotores de plantas 35S e UBQ-3 em tecido de fumo.....	74

LISTA DE TABELAS

1. Seqüência dos oligonucleotídeos sintetizados para detecção do gene *p35* e *iap-3* nas plantas transgênicas30
2. Plasmídeos utilizados durante o desenvolvimento do trabalho33
3. Número de plantas de maracujá bombardeadas e regeneradas com as construções contendo os genes *p35*57
4. Sintomas observados nas plantas transgênicas e não transgênicas inoculadas com vírus CABMV de acordo com tempo após a inoculação....61
5. Inoculação da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae* em maracujazeiros transgênicos e não transgênicos 64
6. Sintomas nas plantas de maracujá *p35+*, após 6 dias de incubação do herbicida *in vitro* e aplicação do herbicida *in vivo* 67
7. Análise da expressão do gene *rluc* sob o comando do promotor CMV, IE-1, UBQ3 ou 35S em células de inseto *A. gemmatalis* (UFL-AG-286)..... 71
8. Luminescência verificada nos promotores UBQ3 ou 35S comandando a expressão do gene *rluc* em fumo 73

RESUMO

As plantas normalmente são hospedeiras de mais de um patógeno. O maracujazeiro, por exemplo, é infectado por diversos vírus, bactérias e fungos, que limitam consideravelmente a sua produção. Devido a isso, o uso dos sistemas de controle de doenças que confirmam amplo espectro de resistência é cada vez mais necessário. Trabalhos recentes demonstraram que plantas de fumo ou tomate expressando genes anti-apoptóticos são resistentes a estresses abióticos e a vários patógenos necrotróficos, isto é, patógenos que matam a célula da planta hospedeira como parte do seu processo de infecção. Neste trabalho, os genes *p35* e *iap-3* de baculovirus foram separadamente introduzidos no genoma de plantas de maracujá usando biobalística. Os genes estrangeiros estavam sob o comando transcricional dos promotores 35S ou UBQ3. As plantas transgênicas foram regeneradas e selecionadas pela presença do transgene usando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e/ou Southern blot. Somente plantas *p35+* foram selecionadas pela análise por PCR e/ou Southern-blot. Onze plantas regeneradas mostraram a presença do gene *p35*. Análises transcricionais de plantas regeneradas mostraram a presença de transcritos específicos para o gene *p35* em 9 delas. As plantas regeneradas, contendo o gene *p35*, foram inoculadas com o vírus Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, e o herbicida glufosinato (Syngenta). Nenhuma das plantas mostrou resistência ao CABMV. Plantas regeneradas (*p35+*) continham

menos da metade do número de lesões detectadas nas plantas não-transgênicas, quando inoculadas com *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e algumas plantas *p35+* mostraram tolerância aumentada ao herbicida glufosinato, quando comparadas às plantas não-transgênicas. Além disso, no presente trabalho, é demonstrado que um promotor de baculovírus (promotor IE-1) é ativo em células vegetais e que, promotores usados em biotecnologia de plantas (UBQ e 35S) são também, ativos em células de inseto quando analisados em ensaios transientes de expressão onde o gene repórter luciferase (*rluc*) de *Renilla reniformis* estava sob o comando transcricional de cada promotor.

ABSTRACT

Plants are usually hosts for more than one pathogen. The passion flower, for example, can be infected by a many virus, bacteria and fungi, which limit fruit yield considerably. Due to this, the use of diseases control systems that allow a wide range of disease resistance is needed. Recent work have shown that tobacco or tomato plants containing anti-apoptotic genes were more resistant to abiotic stresses and several necrotrophic pathogens, which are pathogens that kill the plant host cell as part of their infection process. In this work, the *p35* and *iap-3* genes from baculoviruses were separately introduced into the genome of passion fruit plants by biobalistics. The foreign genes were under the transcriptional control of the 35S or UBQ3 promoters. The transgenic plants were regenerated and screened for the presence of the transgene by PCR and/or Southern blot. Only *p35+* plants were confirmed by PCR and/or Southern-blot analysis. Eleven regenerated plants showed the presence of the *p35* gene. Transcriptional analysis of regenerated plants showed the presence of specific *p35* transcripts in 9 of them. Regenerated plants containing the *p35* gene were inoculated with the cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, and the herbicide, glufosinate, (Syngenta). None of the plants showed resistance to CABMV. Regenerated plants (*p35+*) showed less than half of local lesions showed by non-transgenic plants when inoculated with *X. axonopodis* and some *p35+* plants showed increased tolerance to the glufosinate herbicide when

compared to non-transgenic plants. Furthermore, we have shown that a baculovirus promoter (IE-1 promoter) is active in plant cells and promoters used in plant biotechnology (UBQ and 35S) are also active in insect cells by transient expression assays using the luciferase gene (*rluc*) from *Renilla reniformis* under the transcriptional control of each promoter.

1. INTRODUÇÃO

O uso do melhoramento genético clássico de plantas tem sido feito, com sucesso, há muitos anos no intuito de desenvolver espécies com características agronômicas ou nutricionais importantes. Porém, há limitações que foram superadas pela tecnologia do DNA recombinante. Essa nova tecnologia trouxe ganhos genéticos ao melhoramento de plantas, que não seriam possíveis com técnicas de melhoramento tradicionais (Muniz *et al.*, 2003).

Muitas pesquisas têm sido realizadas na área de transformação de plantas. O exemplo disso é que o número de espécies transformadas é crescente, desde frutas, hortaliças, oleaginosas, entre outras, variando a característica introduzida, como, por exemplo, resistência a fungo, bactéria, vírus e à herbicida (Takahashi, 2002).

Dickman *et al.* (2001) verificaram que plantas de fumo expressando genes anti-apoptóticos de baculovirus (*iap*), nematóides (*ced-9*) e humanos (*bcl-2*) conferem resistência a vários fungos patogênicos e a Tomato spotted wilt virus (TSWV), que em condições normais resultam em necrose. Lincoln *et al.* (2002) produziram plantas de tomate transformadas com o gene *p35* de baculovírus; os autores relataram que as plantas transgênicas foram resistentes a toxina Aal, produzida por *Alternaria alternata*, a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. tomato e ao fungo *Colletotrichum caccodes*, ambos induzem necrose em plantas não transformadas.

O Brasil possui a maioria das espécies de maracujazeiro existentes no mundo, apresentando um potencial da cultura bastante amplo. Todavia, tratamentos culturais adequados, utilização de progênies ou porta-enxertos resistentes a doenças, além de trabalhos de melhoramento genético são imprescindíveis para que seja desenvolvido todo esse potencial (Ruggiero, 1980).

Com a expansão e intensificação do cultivo do maracujá, várias doenças vêm adquirindo importância na cultura do maracujazeiro, sendo a bacteriose, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, considerada uma das principais doenças da parte aérea, ocorrendo de forma generalizada em todas as regiões tradicionalmente produtoras de maracujá (Pio-Ribeiro & Mariano, 1997).

O endurecimento dos frutos é considerado a virose economicamente mais importante da cultura do maracujá. A doença começou a ser detectada em regiões produtoras no Brasil, a partir da década de 1970, afetando severamente a produtividade da cultura, valor comercial dos frutos e período economicamente produtivo (Yamashiro & Chagas, 1979).

Neste trabalho, foram produzidos maracujazeiros transgênicos contendo genes anti-apoptóticos de baculovírus (*iap-3* e *p35*), a partir de hipocóticós de maracujazeiros por biobalística visando amplo espectro de resistência a doenças. Também foi realizada a análise da atividade do promotor *IE-1* de baculovirus em células vegetais, visando verificar sua eficiência neste tipo de células.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Baculovirus

Baculovirus pertencem a um grupo de vírus cujo círculo de hospedeiros é restrito a artrópodos. É muito utilizado como controle biológico de lepidópteros, havendo diversos programas de controle de pragas em vários países, envolvendo várias culturas e florestas (Miller, 1997). No entanto, o maior programa de uso de um vírus para o controle de insetos foi implantado no Brasil, a partir do início da década de 1980, tendo como alvo a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*, um inseto de importância nacional e que demanda cerca de 60% das aplicações de inseticidas realizadas na soja no país (Moscardi, 1999; Moscardi & Souza, 2003).

Ramachandran e *et al.* (2001) comentam que os baculovirus representam a solução biológica perfeita para controlar populações de inseto-praga, respeitando, simultaneamente, o balanço ambiental. Como bioinseticida, os vírus podem ser aplicados em forma de pó sobre a cultura para serem ingeridos pelas lagartas-alvo. Há muitas vantagens em sua utilização como bioinseticida:

- 1) agem diretamente sobre o inseto-alvo,
- 2) seguro para o manuseio,
- 3) não polui o meio ambiente

Além de sua importância como controle biológico de pragas, os baculovírus também têm sido utilizados como vetores de expressão de proteínas heterólogas em células de insetos (Ramachandran *et al.*, 2001; Jarvis *et al.*, 1996b) e recentes pesquisas têm mostrado boas perspectivas em sua utilização na terapia gênica (Ghosh *et al.*, 2002; Ramachandran *et al.*, 2001; Sarkis *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2006).

Os baculovirus possuem genoma de DNA, circular, fita dupla, pertencendo à família Baculoviridae. São divididos em dois gêneros: os Nucleopolyhedrovirus (NPV), que contem um grande corpo de oclusão com vários vírions e os Granulovirus (GV), contem apenas um ou poucos vírions dentro de um pequeno corpo de oclusão. Uma das principais características desses vírus é a presença de uma oclusão cristalina, de origem protéica que envolve o nucleocapsídeo, denominada de poliedro ou grânulo, dependendo do gênero (Mikhailov, 2003; Ramachandran *et al.*, 2001; Miller, 1997; Jarvis *et al.*, 1996a; Thiem *et al.* 1996).

Durante o ciclo de infecção, o vírus pode apresentar-se na forma não-ocluída, também chamada de vírus extracelular ou “budded virus - BV” (nucleocapsídeo envelopado, formado na fase inicial da infecção, ou seja, a partir de 10 a 12 horas após infecção (p.i.), em cultura de células de inseto), ou na forma ocluída, também chamado de poliedro ou “occluded virus”, “OV” (nucleocapsídeo envelopado, envolto por uma matriz protéica cristalina; formando-se na fase tardia da infecção, a partir de 18 a 20h p.i., no núcleo da célula infectada). Essa matriz é constituída de uma proteína, a poliedrina nos NPV e granulina, nos GV, envolvendo os vírions. A formação do poliedro é crucial para a sobrevivência do

vírus no ambiente sob estresses ambientais e para a infecção viral nos insetos (Ramachandram, 2001).

O conhecimento destas duas formas foi importante para entender como ocorre a infecção em cultura de células e a patologia no inseto hospedeiro. Os BV são responsáveis por disseminar a infecção para outros tecidos do inseto e também em cultura de células; já os poliedros são infecciosos apenas no intestino do inseto hospedeiro, sendo responsáveis pela infecção entre insetos (Jarvis *et al.*, 1996a; Thiem *et al.*, 1996; Miller, 1997; Mikhailov, 2003).

A rota natural de infecção no hospedeiro é através da ingestão do poliedro presente no alimento, ou seja, na superfície de folhas. No ambiente alcalino do intestino do inseto, o poliedro é dissolvido e as partículas virais liberadas. Estas partículas encontram receptores de membrana específicos nas células colunares do intestino do hospedeiro e entram por fusão de membrana. Em seguida, o vírus é transportado para o núcleo da célula onde ocorre a replicação. A infecção é espalhada também para a hemolinfa e traquéia, infectando os hemócitos, células musculares e tegumento. Na fase final da infecção, os poliedros são formados dentro do núcleo da célula infectada. Em poucos dias a larva morre, o tegumento rompe-se facilmente, liberando milhares de poliedros ao meio ambiente, servindo de inóculo para infectar outros insetos hospedeiros (Soares & Ribeiro, 2005).

A estratégia comum entre os vírus de DNA de animais é expressar um potente trans-regulador que funciona estimulando a expressão de genes virais precoces no período que antecede a replicação do DNA viral, quando a

concentração do DNA molde é baixa. O processo de expressão dos genes virais é regulado temporalmente, com pelo menos três fases: precoce (“early”), tardia (“late”) e muito tardia (“very late”). Os genes precoces do baculovírus mais estudados, *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), são dependentes da RNA polimerase II do hospedeiro para serem expressos e estão envolvidos no processo de replicação. Os genes tardios estão envolvidos na montagem do vírus e os genes muito tardios no processo de oclusão das partículas virais nos OV (Jarvis *et al.*, 1996a; Thiem *et al.*, 1996; Miller, 1997).

Imediatamente após a infecção, um subgrupo de genes virais precoces são expressos. Estes genes são denominados de precoces imediatos (“immediate early”) e transcritos pela RNA polimerase II (pol II) da hospedeira e não requerem fatores virais de transcrição (Jarvis *et al.*, 1996a). Nos baculovirus, quatro genes trans-reguladores (*ie-0*, *ie-1*, *ie-2* e *pe-38*) foram identificados por sua capacidade de estimular a expressão de genes virais precoces, sendo o *ie-1*, o mais estudado. Este gene foi identificado pela capacidade da proteína IE-1, codificada por ele, de trans-ativar o gene precoce 39K do baculovírus AcMNPV em experimentos de co-transfecção com plasmídeos contendo o promotor 39K fusionado a o gene marcador CAT (Cloranfenicol acetil transferase) (Friesen, 1997).

A expressão da proteína IE-1 durante este estágio permite a transcrição de uma classe de genes denominados de precoces retardados (“delay-early”), que também são dependentes da pol II. Muitos genes precoces retardados codificam proteínas requeridas para replicação viral e expressão de genes tardios (Jin *et al.* ,

1998); portanto, o produto do gene *ie-1* é um potente trans-ativador da expressão de genes precoces e tardios (Choi & Guarino, 1995).

Durante a fase precoce da infecção são expressos os genes envolvidos na cascata de regulação da replicação, como *ie-0*, *ie-1*, *ie-2*, *pe-38*, e os envolvidos em prevenir uma resposta do hospedeiro contra a infecção, como o gene *p35*. O padrão de transcrição dos genes precoces pode variar.

Uma característica do genoma viral é a presença de regiões homólogas (hr) dispersas ao longo do genoma, comum aos baculovirus, as quais muitos trabalhos atribuem como sendo origens de replicação. Uma típica hr possui cerca de 70 nucleotídeos e contém uma palíndrome imperfeita, de cerca de 28 a 30 nucleotídeos. Estas seqüências parecem funcionar não apenas como origem da replicação, mas também ativadores da expressão gênica ("enhancers") (Mikhailov, 2003).

O primeiro estágio da replicação do genoma dos baculovirus ocorre em certas regiões do núcleo. No centro da replicação viral ocorre acúmulo de fatores de replicação, em particular IE-1, IE-2, LEF-3 e DBP (do inglês: "DNA binding protein"). Os fatores essenciais para a replicação são a DNA polimerase (gene da *dnapol*), helicase (gene *hel*), IE-1 (gene *ie-1*) e fatores de expressão tardia (do inglês: "late expression factors"- *lef*) 1, 2 e 3 (genes *lef-1*, *lef-2* e *lef-3* respectivamente). Compõem os fatores estimulantes da expressão precoce, a proteína P35 (gene *p35*), IE-2 (gene *ie-2*), PE38 (gene *pe38*) e LEF-7 (gene *lef-7*). Os genes tardios estão relacionados com a montagem e oclusão da partícula viral

e sua expressão é dependente da expressão de genes precoces e da replicação do genoma viral (Mikhailov, 2003; Ramachandram, 2001; Miller, 1997).

Baculovirus como sistema de expressão é reconhecido como uma excelente ferramenta para a produção de proteínas recombinantes. No início da década de 80, foram realizados experimentos utilizando O AcMNPV como vetor de expressão para produzir β -interferon humano em células de inseto e desde então, vários outros genes têm sido expressos utilizando este sistema. Baculovirus como sistema de expressão de genes é particularmente usado para a produção em grande quantidade de proteínas que necessitam de um ambiente eucariótico apropriado para o seu dobramento e/ou modificação pós-tradução para a sua atividade biológica (Luckow & Summers, 1988).

Alguns sistemas de expressão de genes em baculovirus utilizam um promotor viral forte, o qual é ativado na fase muito tardia da infecção para dirigir a expressão gênica. Os promotores virais mais utilizados são: o promotor da poliedrina (Ppolh) e o promotor do gene *p10* (Pp10), estes promotores são expressos na fase tardia, porem são muito fortes (Ramachandran *et al*, 2001; Wang *et al*, 1991).

2.2. Apoptose

A apoptose é um processo normal para a maioria das células eucarióticas. Em animais, a morte celular programada (do inglês: "programmed cell death" -

PCD), ou seu equivalente morfológico, a apoptose, é uma forma de suicídio celular geneticamente programado. A apoptose é um processo complexo, essencial para o desenvolvimento e manutenção da homeostasia celular, bem como defesa contra vários fatores bióticos e abióticos (Clem, 2001; Dickman *et al.*, 2001; Hawkins *et al.*, 1998; Khurana *et al.*, 2005; Rotari *et al.*, 2005; Woltering *et al.*, 2002).

A apoptose induz características morfológicas e alterações bioquímicas nas células, resultando numa disjunção orquestrada de uma forma não inflamatória. Durante este processo ocorre alteração na permeabilidade da membrana celular, condensação e fragmentação do núcleo, há a formação de corpos apoptóticos que logo são fagocitados por macrófagos ou outras células vizinhas. Há similaridade entre apoptose em plantas e animais, como por exemplo, clivagem do DNA, condensação e fragmentação nuclear (Woltering *et al.*, 2002; Dickman *et al.*, 2001; Vucic *et al.*, 1997).

Vários estímulos podem induzir a apoptose, entretanto sua ativação e execução em animais se dão por endoproteínases citoplasmáticas chamadas de caspases. Estas proteases possuem esta denominação, pois são compostas por uma cisteína em seu centro ativo e clivam seus substratos na região antes de um ácido aspártico. São expressas na forma inativa, sendo necessária a clivagem do peptídeo N-terminal para apresentar-se na forma ativa (Tschopp *et al.*, 1998).

A primeira caspase identificada em mamífero foi a “interleukin-1 β -converting enzyme”, conhecida por caspase 1 ou ICE, que é um importante regulador da

resposta inflamatória. Atualmente são conhecidas catorze caspases de mamíferos, destas, pelo menos sete são importantes no processo de apoptose. Porém, o envolvimento das caspases no processo de morte celular programada foi descoberto no nematóide *Caenorhabditis elegans*, sendo a proteína CED-3 (do inglês: “cell-death abnormality-3”); uma cisteíno protease semelhante à proteína ICE de mamíferos (Riedl & Yigong, 2004).

Em plantas, nenhum gene homólogo a caspase de células animais foi encontrado até o momento. Trabalhos recentes indicam dois tipos de cisteíno-protease com homologia estrutural aos das caspases, as metacaspases e “legumains”. Estas proteases provavelmente funcionam de forma semelhante às caspases de animais, mediando eventos envolvidos na morte celular geneticamente programada. Há pelo menos seis proteínas com atividade de caspase em plantas. A maioria destas atividades tem sido detectada em diferentes tipos de tecidos de várias espécies (Rotari *et al.*, 2005; Woltering *et al.*, 2002; Grenberg & Yao, 2004).

Tanto em interações compatíveis quanto não-compatíveis entre planta-patógeno, podem ocorrer morte da célula da hospedeira; entretanto, sabe-se pouco sobre o mecanismo e as vias relevantes. Em ambos os casos, a alteração produzida pelo patógeno pode ocasionar a morte das células da planta. O processo de morte celular programada implica em um sinal específico e em processo bioquímico celular autônomo que uma célula executa (Li & Dickman, 2004; Dickman *et al.*, 2001).

Há características semelhantes entre o mecanismo de infecção microbiana em animais e plantas. Recentes trabalhos têm revelado características comuns entre a resposta de defesa de plantas, insetos e mamíferos, apesar de utilizarem estratégias de defesa diferente dos animais, pois as plantas não têm um sistema circulatório nem produzem anticorpos. Em plantas, algumas características de apoptose têm sido detectadas durante a morte celular associada ao desenvolvimento (xilogêneses, formação de aerênquima, processo reprodutivo) senescência, ataque de patógenos e estresse induzido por fatores abióticos (Rahme *et al.*, 2000; Keen *et al.* 2000, Al-Kaff *et al.*, 1998; Cook, 1998; Woltering, *et al.*, 2002; Li and Dickman, 2004; Khurana *et al.*, 2005, Yamada *et al.*; 2004).

Diferentes genes estão associados ao desenvolvimento da morte celular em plantas induzida por patógenos e estresses. Uma estratégia usada para evitar a ação do patógeno na planta é a resposta de hipersensibilidade. A resposta de hipersensibilidade é um tipo de morte celular programada, definida como uma morte celular rápida e localizada da planta associada com resistência ao ataque do patógeno, seja vírus, bactéria, fungo ou nematóide (Dickman *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 1998).

Com o avanço da biologia molecular, tem sido possível identificar os genes e os produtos de genes envolvidos nas interações entre patógenos e hospedeiros que levam ao processo de infecção e doença, com isso, já é possível traçar estratégias de controle das mesmas (Cook, 1998).

2.3. Genes anti-apoptóticos

Vários organismos possuem genes que atuam inibindo a apoptose; podemos citar, por exemplo, os genes *ced-9* em nematóides e *bcl-2* em humanos. Os baculovirus possuem dois tipos de genes anti-apoptóticos, o *p35* e o *iap* (do inglês: "inhibitor of apoptosis"), ambos contribuem para a sobrevivência da célula infectada, interferindo na atividade proteolítica das caspases como, por exemplo, os genes *iap-3* de OpMNPV e *p35* de AcMNPV que inibem a morte celular nas células infectadas por esses vírus (Woltering *et al.*, 2002; Vaux & Silke, 2005).

Muitas proteínas IAP são inibidoras de caspases, mas algumas não tem função anti-apoptótica. Em leveduras e nematóides, as proteínas IAP estão envolvidas na divisão celular. Entretanto, o mecanismo da IAP de baculovirus para a supressão de morte celular ainda não está esclarecido, pois não se conhece as proteases alvo (Dickman *et al.*, 2001).

A proteína IAP foi inicialmente identificada em baculovirus. Todos os baculovirus que infectam lepidóptera possuem pelo menos um gene *iap*, por exemplo, AcMNPV possui 3, *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus (EppoMNPV) possui 4, mas apenas um deles tem sido relatado como possuindo atividade anti-apoptótica. Todas as IAP, tanto de vírus como de animais vertebrados e invertebrados possuem de um a três motivos BIR (do inglês: "baculovirus iap repeats") e um motivo RING finger. As seqüências BIR são encontradas perto do amino terminal da proteína. Um BIR (individual) possui aproximadamente sessenta e cinco aminoácidos e tem um motivo CysX₂Cys (o X

pode ser qualquer aminoácido) perto do centro seguido por um motivo HisX₂Cys (Maguire *et al.*, 2000; Tschopp *et al.*, 1998; Crook *et al.*, 1993).

A proteína P35 é outra proteína de baculovírus que, assim como a proteína IAP, inibe a apoptose. A P35 de baculovirus contém uma sequência (DQMDG) que age como substrato para muitas caspases. Depois de clivada, a P35 se liga e inibe a caspase de forma irreversível. Outra característica do gene *p35* é que codifica um dos 18 fatores de expressão tardia envolvidos na regulação da replicação do DNA viral e expressão de genes tardios em AcMNPV (Clem, 2001; Bump *et al.*, 1995).

A P35 é uma inibidora de caspases, sendo capaz de prevenir a apoptose em outros organismos; como *Drosophila* sp (inseto), *Caenorhabditis elegans* (nematóide) e células neurais de mamíferos (Lee *et al.*, 1998; Clem, 2001).

Clem e Miller (1994) demonstraram que células infectadas por baculovirus que não possuíam o gene *p35* morriam mais rápido. Também foi verificada a inibição da apoptose em tomateiros transformados com o gene *p35* e inoculados com a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. tomato (Lincoln *et al.*, 2002).

2.4. Promotores

A regulação do início da transcrição é mediada por proteínas que reconhecem sítios específicos do DNA que interagem com a RNA polimerase para iniciar a transcrição (Gatz & Quail, 1970).

A tecnologia de transformação de plantas permite a introdução de genes de outras espécies de plantas, outras espécies de organismos e até mesmo seqüências sintéticas de DNA em uma planta alvo. As construções geralmente usam promotores, regiões regulatórias de genes necessárias para a transcrição do mesmo, mais ativos que promotores de genes endógenos. Para entender o mecanismo de expressão gênica tecido-específica em plantas, vários promotores e fatores de transcrição estão sendo estudados (Petruccelli *et al.*, 2001).

Em biotecnologia de plantas, um dos promotores mais utilizados é o promotor 35S, do vírus do mosaico da couve-flor (Cauliflower Mosaic Virus, CaMV), que confere alta taxa de expressão na maioria das células quando transferidos para vegetais (Benfey & Chua, 1990).

O vírus do mosaico da couve-flor é um vírus de DNA, fita dupla, não envelopado, de simetria icosaédrica, com 50 nm de diâmetro e é transmitido por afídeos ou mecanicamente. Possui como hospedeiras, as plantas, principalmente, da família brassicaceae, porém, também infecta plantas da família solanaceae e resedaceae. Esse vírus possui dois promotores responsáveis em produzir transcritos nas plantas infectadas: o 19S e o 35S. O promotor 35S é ativo em protoplastos isolados tanto de monocotiledôneas como em dicotiledôneas (Lam *et al.*, 2001; Benfey & Chua, 1990), é um promotor constitutivo forte na maioria dos órgãos em plantas transgênicas, mesmo em plantas não susceptíveis ao vírus CaMV (Ow *et al.*, 1987).

Deleções do promotor 35S foram analisadas utilizando protoplastos ou plantas regeneradas de fumo transgênico como sistema experimental e utilizando o gene *gus* como marcador, tem revelado que a região entre -90 e -46 é importante para a expressão máxima do promotor 35S. A deleção da região -90 à montante, resulta em uma maior expressão nas raízes do que nas folhas (Lam *et al.*, 2001).

Alguns trabalhos têm relatado a eficiência do promotor 35S em células animais. Abe *et al.* (2005) observaram a eficiência do promotor 35S comandando o gene da luciferase em um vírus recombinante AcMNPV. A expressão do gene foi altamente ativada durante a replicação do recombinante em células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9). Em oócitos de *Xenopus* o gene repórter *cat* (clorofenicol acetil-transferase) sob o comando do promotor 35S, apresentou altos níveis de expressão, assim como em extratos de células HeLA (Ho *et al.*, 2000).

Outro promotor, também utilizado em biotecnologia vegetal, é o promotor do gene UBQ3, que é um gene de poli-ubiquitina originário de *Arabidopsis thaliana* (Callis *et al.*, 1995). A ubiquitina é uma proteína encontrada em células de eucariotos e sua seqüência é altamente conservada entre os diversos organismos. A proteína está envolvida em processos como degradação de proteína, controle do ciclo celular, reparo do DNA, respostas de estresses como, por exemplo, choque térmico (Christensen & Quail, 1996).

Com relação aos promotores de baculovirus, há relatos do uso do promotor IE-1 de AcMNPV, e *gp64* de *Orgyia pseudotsugata multiple nucleopolyedrovirus*

(OpMNPV) para a expressão estável em células de lepidóptera; o promotor *IE-1* de AcMNPV também tem sido usado para a expressão de genes exógenos em células de *Aedes albopictus* e *Drosophila melanogaster* (Miller, 1997; Jarvis *et al.*, 1996b). O promotor *IE-1* é ativo mesmo na ausência de outros fatores codificados pelo vírus. Assim, o promotor *IE-1* tem sido utilizado no desenvolvimento de vetores plasmidiais para a expressão de genes heterólogos em células de lepidópteras estavelmente transfectadas (Choi. & Guarino, 1995; Theilmann & Stewart, 1991). O plasmídeo pIB/V5 (Invitrogen) também contém um promotor de baculovirus, o promotor do gene *ie-2* do baculovirus OpMNPV, o qual é comercializado pela companhia Invitrogen. Também já foi relatada a eficiência do gene *ie-1* como um potente transativador envolvido, não apenas na ativação de promotores precoces em células de insetos, mas também, em células de mamíferos (Murges *et al.*, 1997). Até o momento não há relato do uso destes promotores em plantas.

Atualmente, em experimentos que visam teste de promotores tem-se utilizado o gene da luciferase (*luc*). O gene *luc* tem sido amplamente utilizado como gene repórter fusionado a vários promotores em vários sistemas como, por exemplo, animais, virais, vegetais (Barnes, 1990; Lo *et al*, 2002; Langridge *et al.*, 1996). O gene repórter da luciferase do vaga-lume (*Photinus pyralis*) ou de *Renilla reniformis* indica a atividade do promotor a ele ligado por meio de uma reação luminosa. A luz é produzida pela oxidação da luciferina, substrato da reação, (Promega). Comparado a outros genes repórteres, o ensaio do gene da luciferase do vaga-lume é extremamente específico e de 10 a 1000 vezes mais sensível do

que ensaios de CAT (cloramfenicol acetil-transferase) e *lacZ* (Langridge *et al.*, 1996).

2.5. Plantas transgênicas

O mundo se encontra na era do supermercado transgênico, alimentos com os genes modificados chegaram ou estão em vias de chegar à mesa dos consumidores, como a cenoura mais doce e contendo doses extras de beta-caroteno, o arroz com mais proteínas, a batata com retardo de escurecimento, o melão com maior resistência a doenças, o milho resistente a pragas, a soja com genes de castanha-do-pará que aumenta seu valor nutritivo, o tomate longa vida, tendo sido o primeiro alimento transgênico a ser comercializado e a ervilha com genes que permitem sua conservação por mais tempo (Cavalli, 2001).

A tecnologia do DNA recombinante, associada com outras técnicas convencionais de melhoramento genético e manejo, apresenta enorme potencial para aumentar a produtividade agrícola, beneficiar o meio ambiente e melhorar a qualidade dos alimentos. O melhoramento genético clássico de plantas tem sido usado, com sucesso, há muitos anos no intuito de desenvolver espécies com características agrônômicas ou nutricionais importantes. No entanto, sempre existiram limitações, que foram superadas pela tecnologia do DNA recombinante. Essa nova tecnologia trouxe ganhos genéticos substanciais ao melhoramento genético de plantas, difíceis de se alcançar com técnicas de melhoramento genético tradicional (Muniz *et al.*, 2003).

Por meio da engenharia genética de plantas, é possível alterar importantes rotas metabólicas e, com isso, promover a alteração no tipo e composição de açúcares, óleos, proteínas, vitaminas, etc (Muniz *et al.*, 2003; Binsfeld, 2000). O objetivo destas transformações é:

- 1) elevar o valor nutricional dos alimentos,
- 2) melhorar o processamento industrial e a comercialização dos produtos,
- 3) desenvolver plantas transgênicas que funcionem como biorreatores, onde seja possível produzir polipeptídeos de valor farmacêutico, como, por exemplo, vacinas na forma de antígenos de vírus ou anticorpos, e;
- 4) produzir inúmeras proteínas para fins industriais.

O Brasil possui muita competência, tanto no setor privado como público na área de transgenia. O setor público conta com pesquisas mais diversificadas, como por exemplo: Embrapa (soja tolerante ao herbicida glifosato, batata com resistência a pragas e fatores abióticos, e mamão resistente a vírus), Coopersucar (cana-de-açúcar tolerante a herbicida - glifosato, glifosinato de amônio, a insetos, ao vírus do mosaico da cana-de-açúcar, ao vírus do amarelecimento da cana-de-açúcar); Universidade Federal de Viçosa (eucalipto resistente ao glifosato e maracujá resistente a vírus) (Paterniani, 2001).

Outros produtos ou espécies agrícolas que também estão sendo objeto de pesquisa no Brasil são: milho (aumento na produção e resistência à praga), algodão (resistência a pragas, aumento na produção e na qualidade da fibra, no

teor de óleo), fumo (resistente a vírus), feijão (resistência ao vírus do mosaico dourado, principal doença que acomete a cultura), mamão (resistência ao vírus da mancha anelar), braquiária, (maturidade precoce), alface (vacina contra leishmaniose), cenoura, trevo, jurubeba roxa, milho, pimentão, citros, maracujá (resistência a vírus), crisântemo, tomate (longa vida de prateleira, sabor e cor mais acentuado), berinjela, alfavaca, alho, abóboras, melão (longa vida de prateleira) entre outras (Monquero, 2005; Muniz *et al.*, 2003).

Em 2003 produtos transgênicos desenvolvidos pela Embrapa foram liberados para testes em campo: o mamão transgênico resistente ao vírus da mancha anelar; o feijão transgênico resistente ao vírus do mosaico dourado e a batata resistente ao vírus “Y”, além da soja tolerante a herbicida (Monquero, 2005).

As culturas transgênicas de alimentos autorizados para comercialização são inúmeras: na Argentina, a soja em 1996, o milho e o algodão em 1998; no Canadá, o milho e o algodão em 1996, a canola em 1997, a soja e o melão em 1998, a batata e o trigo em 1999; nos Estados Unidos, o melão, a soja, o tomate, o algodão e a batata em 1994, a canola e o milho em 1995; no Japão, a soja, a canola, a batata e o milho em 1996, o algodão e o tomate em 1997; na União Européia, o tomate e a canola em 1995, a soja em 1996, o milho em 1997, a batata e o algodão em 1998 (Cavalli, 2001).

Várias espécies frutíferas já foram transformadas, destacando-se uva, pêsego, ameixa, maçã, pêra, banana, abacaxi, *Citrus spp* e mamão. As

características induzidas são diversas como, por exemplo, resistência a herbicida, a vírus e à bacteriose (Takahashi, 2002).

Manders *et al.* (1994), relataram pela primeira vez a transformação genética do maracujazeiro via *Agrobacterium tumefaciens*. Braz *et al.* (1998), isolaram e seqüenciaram genes da proteína capsidial e da replicase de PWV e transformou maracujazeiros também via *Agrobacterium*. Otoni *et al.* (1996) utilizou biobalística para transformar maracujazeiros com o gene repórter *gus* (β - glucuronidase).

Plantas transformadas com porções do genoma viral ou até mesmo de bactéria ou fungos patogênicos, freqüentemente dão origem a linhagens de plantas que exibem resistência ao patógeno do qual a seqüência foi derivada (do inglês: "pathogen-derived resistance", PDR). O primeiro caso de PDR foi relatado em 1986, com a produção de plantas de fumo que expressavam a proteína capsidial (CP) do vírus do mosaico do fumo (*Tobacco mosaic virus*, TMV) e eram resistentes a esse vírus (Powell-Abel *et al.*, 1986). A resistência mediada pela CP tem sido amplamente utilizada, provavelmente por ter sido um dos primeiros relatos e também por aparentemente fornecer um amplo espectro de resistência quando comparada a outros genes virais (Fitchen & Beachy, 1993).

Além da CP, outras seqüências virais podem conferir resistência, como o gene da replicase viral (Jones *et al.*, 1998), proteases, como as proteínas HC-Pro e NIa dos *Potyvirus* (Maiti *et al.*, 1993), proteínas de movimento célula-a-célula de *Tobamo-*, *Bromo-* e *Potexvirus* (Beck *et al.*, 1994). Isso sugere que, provavelmente, qualquer parte do genoma viral é uma fonte em potencial de PDR.

Mais recentemente tem-se utilizado genes não derivados de patógeno também visando à resistência, como por exemplo, atacina A, gene derivado de mariposa que tem atividade bactericida (Takahashi, 2002); Nakamura *et al.* (1994) mostraram que a expressão de interferons de mamíferos em plantas de batata confere proteção contra potato virus X (PVX).

2.6. Plantas transgênicas e genes anti-apoptóticos

Plantas de fumo expressando genes anti-apoptóticos de baculovírus (*iap*), nematóides (*ced-9*) e humanos (*bcl-2*) foram estudadas por Dickman *et al.* (2001). Estes autores verificaram que esses genes, quando expressos em fumo, conferem resistência a vários fungos patogênicos e a Tomato spotted wilt virus (TSWV), que em condições normais resultam em necrose. Possivelmente, o fungo patogênico interage com a hospedeira disparando a via de morte celular; a inibição desta via pelo produto do gene anti-apoptótico previne a infecção e o determinante de virulência. No caso de vírus, o TSWV, a formação de lesão no sítio de inoculação não previne a invasão sistêmica na planta. Entretanto, a planta transgênica não apenas preveniu a resposta necrótica local típica quando inoculada, mas também limitou seu movimento e replicação. Apenas as plantas transgênicas foram resistentes relacionando a resistência com a expressão do gene antiapoptótico (Dickman *et al.*, 2001).

Tomateiros transformados com o gene *p35* de baculovírus apresentaram resistência contra a toxina Aal, produzida por *Alternaria alternata*, a bactéria

Pseudomonas syringae pv. tomato e ao fungo *Colletotrichum caccodes*, ambos induzem necrose em plantas não transformadas (Lincoln *et al.*, 2002).

Em 2003, Awada *et al.* publicaram que *Nicotiana tabacum* L. Glurk, transformadas com os genes anti-apoptóticos *bcl-xl* ou *ced-9* mostraram maior tolerância ao estresse hídrico que plantas não transformadas. Esses mesmos genes foram utilizados por Xu *et al.* (2004) para transformar tomateiros. Os autores observaram que as plantas transgênicas foram tolerantes ao Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) RNA satélite D, em plantas não transgênicas induz a morte da planta.

A resistência a herbicida em plantas de fumo transformadas com os genes *bcl-2*, *bcl-xl* e *ced-9* foram verificadas por Chen e Dickman (2004). Os testes foram realizados com herbicida cujo sítio de ação eram os cloroplastos e sua ação ativa a morte celular programada. Todos os trabalhos citados relatam a resistência ou tolerância contra patógenos necrotróficos ou estresse hídrico ou térmico de plantas transgênicas contendo genes anti-apoptóticos. Contudo, plantas de fumo NN transformadas com o gene *p35* induziram a quebra da resistência ao TMV (*Tobacco mosaic virus*). Fumo NN quando inoculado com TMV apresenta apenas lesão local, não possibilitando a infecção sistêmica do vírus na planta. Já as plantas transformadas com o gene *p35* apresentaram clareamento das nervuras, deformação foliar e nanismo (Del Pozo & Lam, 2002).

2.7. Cultura do maracujazeiro

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá e entre os estados mais produtivos, destacam-se: Pará, Bahia, São Paulo, Minas Gerais e Sergipe (Meleti *et al.*, 2000). Em termos de produção de frutos, de acordo com dados do IBGE em 2003, a área colhida foi de 335.078 ha, com uma produtividade de 485.342 toneladas de frutos. Os plantios comerciais são formados basicamente por maracujá amarelo que é responsável por 95% dos pomares brasileiros. A produção brasileira de maracujá amarelo tem sido destinada à produção de suco concentrado e à comercialização de frutas *in natura*, sendo aproximadamente 70% da produção paulista de maracujá destinada ao consumo *in natura* e o restante destinado à indústria (Takahashi, 2002). O rendimento da cultura depende de fatores como clima, solo, espaçamento, tratamentos culturais, adubação e controle fitossanitário.

O maracujá (*Passiflora* spp.) pertence à família Passifloraceae, da ordem *Passiflorales*, que compreende 12 gêneros e mais ou menos 500 espécies, com distribuição principalmente nos trópicos, na América, Ásia e África. No Brasil, a família é representada por apenas 2 gêneros: *Passiflora* e *Dilkea* (ITAL, 1995). O gênero *Passiflora* é originário da América do Sul e tem o seu maior centro de distribuição geográfica no Centro-Norte do Brasil (Manica, 1981).

Apesar do elevado número de espécies que formam o gênero *Passiflora*, apenas algumas são realmente de importância econômica devido à qualidade de

seus frutos ou à sua adaptabilidade como planta trepadeira ornamental, ou ainda, pelas suas propriedades medicinais (Comunicado Técnico 86, 2003).

A ocorrência de patógenos tem aumentado bastante nos últimos tempos, notadamente pelo incremento das áreas de cultivo e devido à grande suscetibilidade dos materiais utilizados no plantio, em razão da escassez de trabalhos de pesquisa que procurem obter cultivares resistentes aos principais patógenos que ocorrem na cultura. Dessa forma, a cultura do maracujá precisa de maiores estudos na área de melhoramento genético, resistência a doenças, viabilizando o aumento na produtividade e a adequada qualidade de frutos (Bruckner, 1997).

2.8. Doenças do maracujazeiro

Muitas doenças do maracujazeiro já foram identificadas e, em certas circunstâncias, podem causar prejuízos expressivos. Apesar de sérias, algumas doenças de origem fúngica, bacteriana e causadas por nematóides são passíveis de controle por produtos químicos ou práticas culturais. Já as viroses, sempre foram encaradas com preocupação, por causa da imprecisão das informações a seu respeito e também pelos eventuais prejuízos causados por elas (Kitajima *et al.*, 1986). Exemplos de doenças afetando o maracujazeiro são: tombamento, mela ou "damping off", antracnose, verrugose ou cladesporiose, bacteriose, definhamento precoce, podridão do colo e murcha ou fusariose. Tombamento, mela ou "damping off" - caracteriza-se por uma lesão no colo da planta,

provocando seu tombamento e morte, é uma doença causada pelo fungo *Phytophthora* sp (Comunicado Técnico 86, 2003). A mancha bacteriana é conhecida como bacteriose-do-maracujá ou morte precoce, essa doença é relativamente recente no Brasil, tendo sido descrita a pouco mais de 30 anos em Araraquara-SP e, nesse tempo, já se disseminou entre alguns estados das regiões Sudeste e Nordeste. O agente causal da doença é uma bactéria em forma de bastonete, gram negativa e móvel por um único flagelo polar denominada *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Surtos severos dessa doença podem comprometer seriamente a cultura, causando elevados prejuízos. O nome morte precoce reflete a drástica redução da vida da planta afetada que passa de 7-8 anos para 12-18 meses (Ponte,1996).

As condições favoráveis para a *X. axonopodis* pv. *passiflorae* induzir a doença são temperatura superior a 30° C e umidade relativa do ar elevada. A disseminação entre áreas pode se dar por meio das sementes e entre plantas pela água de irrigação e pelas chuvas. O controle é realizado por meio de podas, limpeza do terreno plantado e aplicação de fungicida cúprico associado a um bactericida (Comunicado Técnico 86, 2003).

O endurecimento dos frutos pode ser causado por duas espécies de vírus: *Passionfruit woodiness vírus* - PWV e *Cowpea aphid-borne mosaic virus* –CABMV. Essas são as principais viroses e uma das principais doenças dessa cultura (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Ambos os vírus pertencem à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, são vírus de partícula filamentosa, flexuosa, medindo cerca de 750 nm de comprimento e 12 nm de largura, não envelopado. A principal característica

desta família é a presença de inclusões cilíndricas em forma de cata-vento induzido no citoplasma da célula infectada (Shukla & Ward, 1988).

O *Passionfruit woodiness virus* (PWV) foi descrito como agente causador do endurecimento dos frutos por Cobb, na Austrália, em 1901 (citado por Shukla & Ward, 1988). O nome do vírus deriva da formação de frutos pequenos, deformados e duros, além dos sintomas de mosaico e distorção foliar induzidos pela infecção viral. Esse vírus é facilmente transmissível mecanicamente e por afídeos (*Myzus persicae* Sulz. e *Aphis gossypii* Glover) (Taylor, 1959; Greber, 1966).

No Brasil, a doença do endurecimento dos frutos do maracujazeiro foi encontrada inicialmente em Feira de Santana (BA) (Yamashiro & Chagas, 1979; Chagas *et al.*, 1981), tanto em *Passiflora edulis* (maracujá amarelo) como em *Passiflora alata* (maracujá doce). Posteriormente, a doença foi constatada em várias regiões onde o maracujazeiro é cultivado, entre elas o Ceará, Pernambuco, Sergipe, Distrito Federal, São Paulo e Minas Gerais (Rezende, 1994).

Os sintomas induzidos tanto pelo PWV como pelo CABMV são semelhantes, tanto que em todos os casos da doença do endurecimento do fruto do maracujazeiro, o PWV foi identificado como agente etiológico da doença, com base em características biológicas e sorológicas (Inoue *et al.*, 1995; Bezerra *et al.*, 1995). Entretanto, estudos realizados por Braz *et al.* (1998) baseados em análise comparativa da seqüência de aminoácidos da capa protéica (CP) de diversos isolados brasileiros de potyvirus causadores de endurecimento dos frutos do

maracujazeiro, previamente identificados como PWV, apontaram alta identidade das seqüências desses isolados com isolados de CABMV, e baixa identidade com isolados de PWV.

Nascimento *et al.* (2004), sequenciaram a proteína capsidial de vírus isolados de plantas de maracujazeiros provenientes da Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco e São Paulo e verificaram tratar-se do vírus CABMV. Até o presente, todos os isolados brasileiros seqüenciados pertencem a essa espécie, e a detecção molecular do PWV no Brasil ainda aguarda confirmação (Nascimento *et al.*, 2006).

Na Austrália, o controle do PWV tem sido feito com uso de pré-imunização com estirpes fracas. Não há trabalhos de avaliação dos danos e das perdas causadas pela doença do endurecimento do fruto do maracujazeiro na cultura do maracujá (Novaes & Rezende, 1999).

Ainda não há conhecimento de fontes de resistência em plantas do gênero *Passiflora* para a doença. Porém, o controle desse vírus pode ser feito com a utilização de mudas obtidas em viveiros situados em locais livres do vírus e eliminação de hospedeiros alternativos do patógeno, como algumas leguminosas. A pré-imunização com uma estirpe fraca do vírus pode exercer um certo controle, com aumentos da produção e qualidade do fruto (Pio-Ribeiro & Mariano, 1997). Alfenas *et al.* (2005), construíram plantas transgênicas expressando RNA correspondente à região 3' do gene *Nib* e 5' do gene *CP* do isolado brasileiro CABMV – MG1 que foram resistente a este vírus.

Os grandes prejuízos causados por fitopatógenos em praticamente todas as plantas cultivadas têm levado à busca do desenvolvimento de métodos de controle para doenças de plantas, buscando sempre alternativas rápidas, eficientes e de menor custo. Uma das estratégias que tem sido muito estudada é o uso de plantas transgênicas para a obtenção de resistência a fungos, bactérias e principalmente viroses fitopatogênicas. Devido à sua rapidez e versatilidade, esta técnica vem mostrando ser promissora no controle fitossanitário. Comparando a técnica de obtenção de plantas transgênicas ao melhoramento genético convencional, a estratégia de plantas transgênica mostra-se vantajosa devido à possibilidade de se identificar, isolar, transferir (em um único passo) e expressar um gene de resistência a um ilimitado número de variedades comerciais (Rezende, 1994).

3. OBJETIVOS

- Obter maracujazeiros transgênicos contendo genes anti-apoptóticos de baculovírus (*iap-3* e *p35*), visando amplo espectro de resistência a doenças.
- Analisar a atividade do promotor IE-1 de baculovirus em células vegetais.

3.1 Estratégias utilizadas

Genes anti-apoptóticos

Construção de plasmídeos contendo genes anti-apoptóticos (*p35* ou *iap-3*) sob o comando de diferentes promotores (UBQ3 ou 35S).



Preparo dos explantes de maracujá e bombardeamento.



Seleção de plantas transgênicas por testes moleculares (PCR, Southern blot, RT-PCR).



Teste de resistência a patógenos (*X. axonopodis* pv *axonopodis* e CAMV) e tolerância a herbicida (glifosinato).

Promotor IE-1

Construção de plasmídeos contendo o promotor IE-1 e os promotores de plantas, UBQ3 ou 35S (controles), comandando, separadamente, a expressão do gene da luciferase.



Análise transiente dos diferentes promotores (UBQ3 ou 35S ou IE-1) comandando o gene *rluc* em fumo.



Análise dos diferentes promotores (UBQ3 ou 35S ou IE-1) comandando o gene *rluc* em célula UFL-AG-286.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Construção de plantas transgênicas expressando genes anti-apoptóticos

4.1.1. Oligonucleotídeos

Oligonucleotídeos foram desenhados e sintetizados para a amplificação e detecção dos genes anti-apoptóticos *p35* de AcMNPV (tabela 1 e fig. 1) e *iap-3* de OpMNPV (tabela 1 e fig. 2). As posições de cada oligonucleotídeo nas seqüências dos genes *p35* e *iap-3* são mostradas nas figuras 1 e 2, respectivamente. Os genes anti-apoptóticos estavam inseridos nos plasmídeos pPRM-35KORF (gene *p35*) e prm IAPHA6 (gene *iap-3*), respectivamente.

Tabela 1. Seqüência dos oligonucleotídeos sintetizados para detecção do gene *p35* e *iap-3* nas plantas transgênicas. O número presente junto aos nomes de cada primer significa a posição em que esse se anela no gene de interesse, *p35* ou *iap-3*.

Par de oligonucleotídeos	Seqüência	Finalidade
443Acp35R Acp35 1 a 22F	5' TAGTCGTTGCGTTCGTCGACC 3' 5'ATGTGTGTAATTTTTCCGGTAG 3'	usados para detectar o gene <i>p35</i> nas plantas bombardeadas.
p35F433 p35R533	5'- GCAACGACTACTACGTGGC-3' 5'- AACTTTGTTACCAATCGGG -3'	usados para detectar o gene <i>p35</i> nas plantas bombardeadas.
T1 T2	5'CCTGCAGGATCCTTAGGTTTTTTTTTT TTTTTTTT3' 5'-CCTGCAGGATCCTTAGGTT-3'	T1 foi usado na reação de RT e T2 (idêntico às primeiras 19 bases do T1) na reação de PCR para amplificação do cDNA do gene <i>p35</i> juntamente com o primer p35F433.
IAP-5' <i>Bam</i> HI IAP- 3' <i>Bam</i> HI	5'-CTAGTGGATCCCCCGGGCTG-3' 5'CCTCGAGGGATCCGGTATCG-3'	Usados para amplificar a seqüência inteira do gene <i>iap-3</i> .
OpiapF OpiapR	5' GGGTTCTACTACTTGGG 3'- 5'GGGTTCTACTACTTGGG-3'	Usados para detectar plantas transgênicas

Acp35 1 a 22F

1 **ATGTGTGTAATTTTTCCGGTAG**AAATCGACGTGTCCAGACGATTATTCGAGATTGTCAG

61 GTGGACAAACAAACCAGAGAGTTGGTGTACATTAACAAGATTATGAACACGCAATTGACA

121 AAACCCGTTCTCATGATGTTTAAACATTTCCGGTCTTATACGAAGCGTTACGCGCAAGAAC

181 AACAATTTGCGCGACAGAATAAAATCAAAAGTCGATGAACAATTTGATCAACTAGAACGC

241 GATTACAGCGATCAAATGGATGGATTCCACGATAGCATCAAGTATTTTAAAGATGAACAC

301 TATTCGGTAAGTTGCCAAAATGGCAGCGTGTGAAAAGCAAGTTTGCTAAAATTTTAAAG

361 AGTCATGATTATACCGATAAAAAAGTCTATTGAAGCTTACGAGAAATACTGTTTGCCCAA

p35F433

421 **TTGGTCGACGAACGCAACGACTACTACGTG**GCCGGTATGCGTGTTGAAGCCGGGATTTGAG

443Acp35R

p35R533

481 AACGGCAGCAACCAAGTGCTATCTTTTCGAGTACA**ACCCGATTGGTAACAAAGT**TATTGTG

541 CCGTTTGCTCACGAAATTAACGACACGGGACTTTACGAGTACGACGTCGTAGCTTACGTG

601 GACAGTGTGCAGTTTGATGGCGAACAATTTGAAGAGTTTGTGCAGAGTTTAATATTGCCG

661 TCGTCGTTCAAAAATTCGGAAAAGTTTTATATTACAACGAAGCGTCGAAAAACAAAAGC

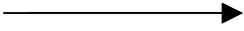
721 ATGATCTACAAGGCTTTAGAGTTTACTACAGAATCGAGCTGGGGCAAATCCGAAAAGTAT

781 AATTGGAAAATTTTTGTAAACGGTTTTATTTATGATAAAAAATCAAAAGTGTTGTATGTT

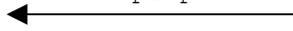
841 ATGTAAGTACTAGTGCCTCAACAAAATGTAATATTAACACAATTAATAA

Figura 1. Seqüência do gene *p35*. As setas indicam a posição e direção (5' para 3') dos oligonucleotídeos usados para as reações de PCR para detecção de plantas transgênicas *p35+*.

1 ATGAGCTCCCGAGCAATTGGCGCGCCGCAAGAAGGCGCAGACATGAAAAACAAAGCCGCG
 61 CGTCTCGGCACGTACACCAATTGGCCCGTCCAGTTTTTTGGAGCCGAGCCGCATGGCCGCC

OpiapF


121 AGCG**GGTTCTACTACTTGGG**CCGCGGGCGACGAGGTGCGCTGCGCGTTTTTGCAAGGTAGAG
 181 ATTACGAATTGGGTAAGGGGCGACGACCCGAAACGGACCACAAGCGGTGGGCGCCGCGAG
 241 TGTCCGTTTTGTGCGCAACAACGCGCACGACACGCCACACGACCGCGCCCCGCCGGCGCGG
 301 TCGGCGGCCGCGCACCCGAGTATGCCACGGAAGCCGCGCGTTTTGCGCACCTTTGCGGAG
 361 TGGCCCCGCGGGTTGAAACAGCGGCCCGAAGAGTTGGCCGAGGCCGGATTCTTTTACTACT
 421 GGCCAGGGCGACAAGACGCGGTGCTTTTTGCTGCGACGGCGGTCTGAAGGATTGGGAACCC
 481 GACGACGCGCCGTGGCAGCAACACGCCCCGCTGGTACGACCGCTGCGAGTACGTGCTGCTC
 541 GTCAAGGGCCGCGACTTTGTGCAGCGGGTGATGACTGAGGCGTGTGTGGTTTCGCGACGCG
 601 GACAACGAACCGCACATTGAGCGGCCCGCCGTTGAAGCGGAGGTGGCGGATGACCGGCTG
 661 TGCAAGATTTGCCTCGGCGCCGAAAAGACCGTGTGCTTTGTGCCCTGCGGGCACGTGGT**G**

OpiapR


721 **GCGTGCGGCAAGTGC**CGCTGCGGGCGTGACCACGTGGCCCGTTTTGCCGCGGTCAGTTAGAC
 781 AAAGCGGTGCGCATGTACCAAGTGTA

Figura 2. Seqüência do gene *iap-3*. As setas indicam a posição dos oligonucleotídeos usados para as reações de PCR para detecção de plantas transgênicas.

4.1.2. Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados nesse trabalho estão descritos na tabela 2. Técnicas básicas de clonagem e manipulação genética (Sambrook *et al.*, 1989) foram utilizadas para construções dos diferentes plasmídeos.

Tabela 2. Plasmídeos utilizados durante o desenvolvimento do trabalho.

pEPT8 (fig. 4A e 5A)	Plasmídeo gerado a partir do plasmídeo pUC18. Possui o promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV), um sítio múltiplo de clonagem. Contém ainda, o gene de resistência a ampicilina como gene de seleção e o <i>lac-Z</i> como gene marcador (Souza Jr & Gonsalves 1999).
PBSAN167 (fig. 3A)	Plasmídeo foi construído por Pinto (2001). Possui o promotor UBQ3 comandando a expressão do gene Magainin 2, inseridos no sítio múltiplo de clonagem. Contém o gene de resistência a ampicilina como gene de seleção e o <i>lac-Z</i> como gene marcador
pSAN236 (fig. 3B)	Plasmídeo foi construído por Alan Blowers (NY). Possui o promotor UBQ10 inserido no sítio múltiplo de clonagem. Contém os genes de resistências a ampicilina e canamicina como genes de seleção e o <i>lac-Z</i> como gene marcador (Callis <i>et al.</i> , 1995).
PBSAN236 (fig. 3C, 4C e 5C)	Derivado do plasmídeo pSAN236 possui o promotor UBQ3 no lugar do UBQ10. Desenvolvido durante a execução do trabalho.
pGEM-T	Plasmídeo vendido comercialmente (Promega). Possui gene de resistência a ampicilina e gene marcador <i>lac-Z</i> . É adquirido na forma linear e contém em suas extremidades timina para a clonagem de produto de PCR.
pPRM-35KORF (figura 4B)	Plasmídeo cedido pelo Dr. Friesen (Univ. Wisconsin, Madison, USA). Possui o gene <i>p35</i> de AcMNPV inserido no sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo pBluescript SK+ (Stratagene). Contém o gene de resistência a ampicilina como gene de seleção
prm IAP HA6	Plasmídeo gerado a partir do pBluescrip (KS+), possui o peptídeo HA fusionado ao gene <i>iap-3</i> de OpMNPV e ambos inserido no sítio múltiplo de clonagem. Contém o gene de resistência a ampicilina como gene de seleção (Manji <i>et al.</i> , 1997)
pGEM-T <i>iap-3</i> (fig. 5B)	Derivado do plasmídeo pGEM-T e contém o gene <i>iap</i> amplificado por PCR para a introdução de um sítio de <i>Bam</i> HI em seu final. Foi desenvolvido durante a execução do trabalho.
pEPT8 <i>p35</i> (fig. 4C)	Derivado do plasmídeo pEPT8 e contém o gene <i>p35</i> inserido no sítio de <i>Bam</i> HI. Foi desenvolvido durante a execução do trabalho.
pEPT8 <i>iap-3</i> (fig. 5C)	Derivado do plasmídeo pEPT8 e contém o gene <i>iap-3</i> inserido no sítio de <i>Bam</i> HI. Foi desenvolvido durante a execução do trabalho.
PBSAN236 <i>p35</i> (fig. 4E)	Derivado do plasmídeo pBSAN236 e contém o gene <i>p35</i> inserido no sítio de <i>Bam</i> HI. Foi desenvolvido durante a execução do trabalho.
PBSAN236 <i>iap-3</i> (fig. 5E)	Derivado do plasmídeo pBSAN236 e contém o gene <i>iap-3</i> inserido no sítio de <i>Bam</i> HI. Foi desenvolvido durante a execução do trabalho.

4.1.3. Construções gênicas

4.1.3.1. Promotor UBQ3 e gene *p35*

O promotor UBQ3 foi retirado do plasmídeo pBSAN167 (fig 3A) digerindo-o com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Hind* III; realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 1% com este material e a banda correspondente ao promotor UBQ3, cerca de 1,3 pKb, foi eluída, utilizando o kit GFX Gel Band Purification (Amersham Biosciences), seguindo as especificações do fabricante. Estas mesmas enzimas foram usadas para digerir o plasmídeo pSAN236 (fig. 3B), o qual continha o promotor UBQ10. Após a digestão e eletroforese em gel de agarose, a banda foi eluída, utilizando o mesmo kit e metodologia citada anteriormente. Foi realizada a ligação do promotor UBQ3 ao plasmídeo pSAN236, usando T4 DNA ligase (Promega), segundo as especificações do fabricante. No dia seguinte, realizou-se a transformação de células competentes de *E. coli* por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). O material transformado foi plaqueado em LB sólido (Sambrook *et al.*, 1989) previamente autoclavado e, no dia seguinte, as colônias obtidas formadas foram selecionadas e crescidas em meio LB líquido autoclavado (Sambrook *et al.*, 1989) por, pelo menos, 16 h. No dia seguinte, fez-se uma mini extração do DNA plasmideal (Sambrook *et al.*, 1989) e em seguida uma eletroforese usando 2 µl (100 ng/ µL) do DNA extraído. Após a obtenção do plasmídeo pBSAN236 (fig. 3D) purificado, este foi novamente digerido com a enzima *Bam* HI (Promega), seguindo especificações do fabricante. Paralelamente, o plasmídeo pPRM-35KORF (fig. 4B), cedido pelo Dr. Paul Friesen (Universidade de Wisconsin, USA), contendo o gene *p35* de AcMNPV flanqueado por sítios

múltiplos de clonagem também foi digerido com esta mesma enzima. Após eletroforese em gel de agarose 1%, a banda correspondente ao tamanho do gene *p35*, aproximadamente 0,9 pares de quilobases (pKb), foi eluída (Sephaglass Band Prep Kit, Amersham Biosciences). O fragmento foi ligado ao pBSAN236 (fig. 4D), usando-se a enzima T4 DNA ligase e seguindo as instruções do fabricante. Foi realizada a transformação no dia seguinte e feito os procedimentos de clonagem como descrito acima até a extração do DNA plasmideal. Os plasmídeos selecionados e purificados foram digeridos com a enzima *Spe I* para verificação da orientação do gene e seleção dos clones recombinantes. O plasmídeo final foi chamado pBSAN236*p35* (fig. 4E).

4.1.3.2. Promotor 35S e gene *p35*.

O DNA do plasmídeo pEPT8 (fig. 4A) contendo o promotor 35S foi digerido com a enzima *Bam HI* e desfosforilado. Paralelamente, o plasmídeo pPRM-35KORF (fig. 4B) foi também digerido com a enzima *Bam HI*. Após eletroforese em gel de agarose 1%, a banda correspondente ao tamanho do gene *p35*, aproximadamente 0,9 pares de quilobases (pKb), foi eluída (Sephaglass Band Prep Kit, Amersham Biosciences) e o fragmento ligado ao vetor pEPT8, usando-se a enzima T4 DNA ligase e seguindo as instruções do fabricante. A ligação foi, então, usada para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen), por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). O material foi plaqueado em LB sólido previamente autoclavado e, posteriormente, acrescido de ampicilina (50mg/mL),

no dia seguinte, as colônias obtidas formadas foram selecionadas e crescidas em meio LB líquido autoclavado acrescido de ampicilina (50mg/mL) por 16 h. No dia seguinte, fez-se uma mini extração do DNA plasmideal (Sambrook *et al.*, 1989) e em seguida uma eletroforese usando 5 μ l (50 ng/ μ L) de cada DNA extraído. A presença e posição do inserto clonado foram confirmadas por uma digestão do DNA plasmideal com as enzimas de restrição *Nco* I e *Kpn* I, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen). O plasmídeo obtido foi denominado de pEPT8p35. (fig. 4C).

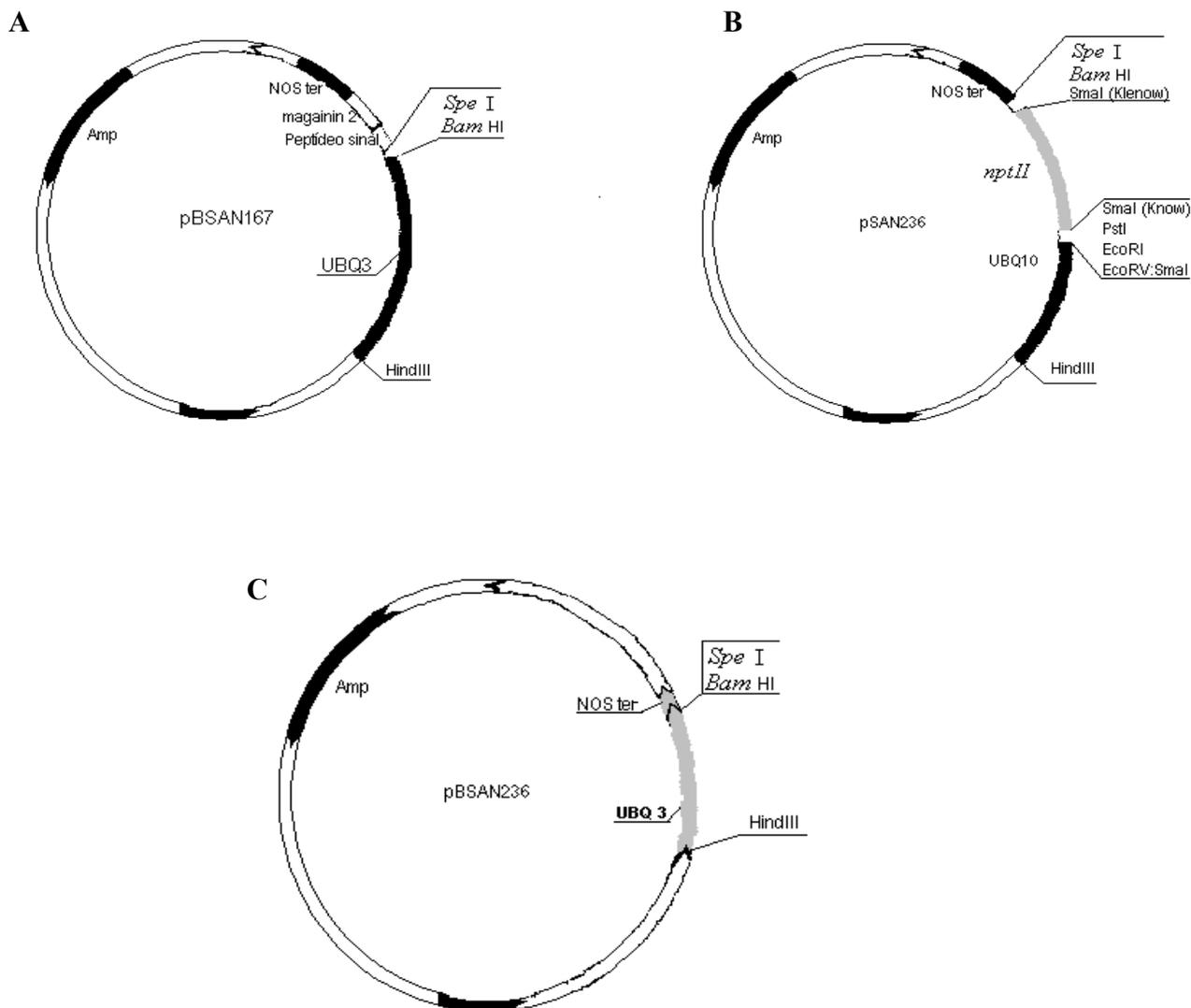


Figura 3. Construção do plasmídeo pBSAN236. O plasmídeo pBSAN167 (A) foi digerido com as enzimas *Bam* HI e *Hind* III para remoção do promotor UBQ3 que, por sua vez foi clonado no plasmídeo pSAN236 previamente digerido com as mesmas enzimas e desprovido do promotor UBQ10 (B) para construção do plasmídeo pBSAN236 (C). O plasmídeo pBSAN236 foi, então, digerido com *Bam* HI e usado para a clonagem do gene *p35* e do gene *iap-3* ambos derivados dos fragmentos de *Bam* HI dos plasmídeo pPRM35K-ORF e prmlAPHA6 respectivamente.

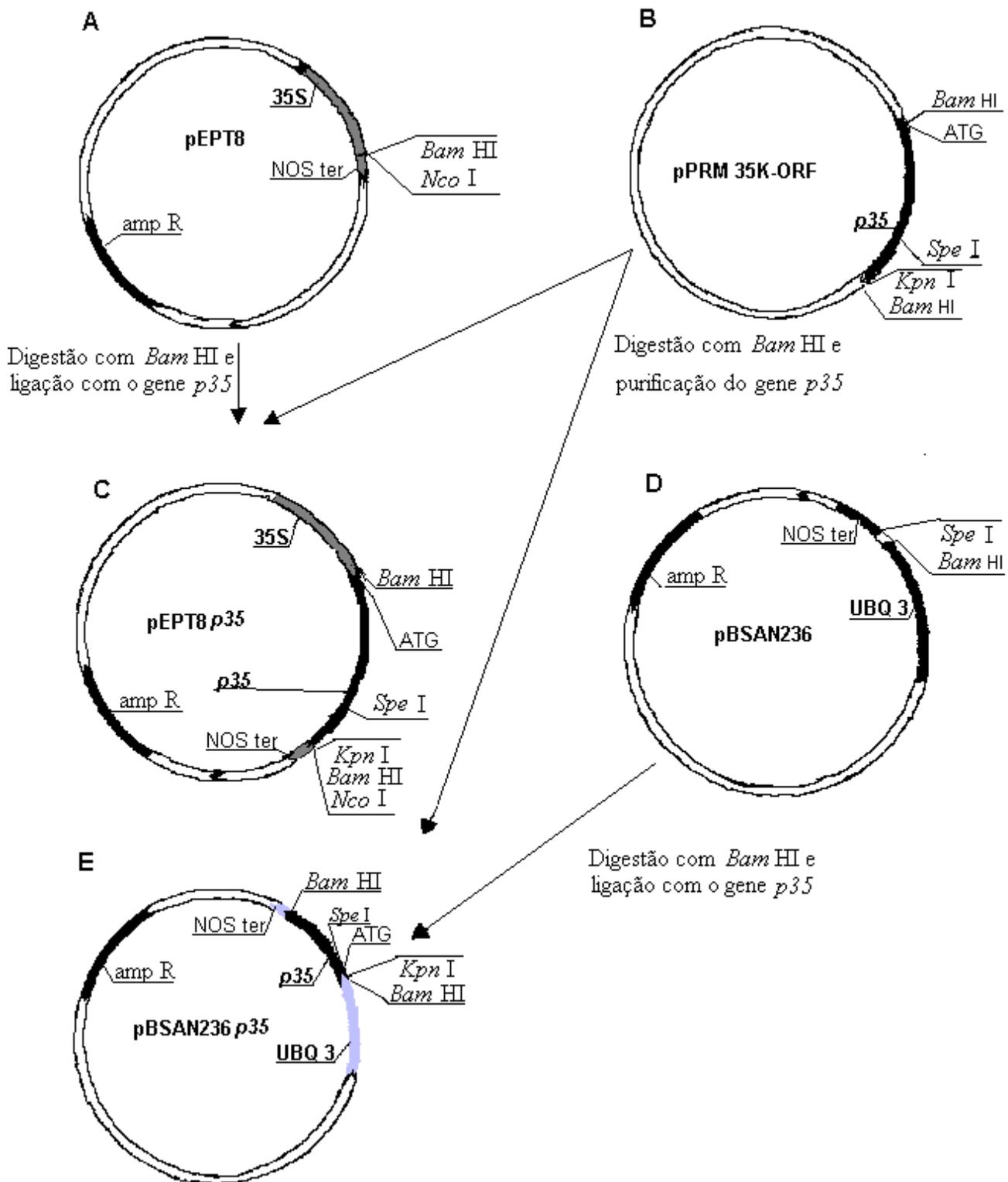


Figura 4. Construção dos plasmídeos pEPT8*p35* e pBSAN236*p35*. . (A) Mapa dos plasmídeos pEPT8, contendo o promotor 35S, (B) pPRM 35K-ORF, contém o gene *p35*, (C) pEPT8*p35*; (D) pBSAN236, plasmídeo com o promotor UBQ3 e (E) pBSAN236*p35*.

4.1.3.3. Promotor 35S e gene *iap-3*

Para a obtenção tanto do plasmídeo pEPT8*iap-3* como pBSAN236*iap-3* foi necessário introduzir um sítio de *Bam* HI no final do gene *iap-3*. Isto foi obtido através da técnica de PCR, usando os pares de primers: IAP-5'-*Bam* HI e IAP3'-*Bam* HI (tabela 1). O primer IAP-5'-*Bam* HI se anela no plasmídeo prmiAPHA6, na região à montante do gene *iap-3*, incluindo a região do sítio de *Bam* HI; já o primer IAP3'-*Bam* HI, anela-se na região imediatamente após o gene *iap-3*, inserindo um sítio de *Bam* HI. A reação foi preparada usando os seguintes reagentes da Promega: 3 μ L de tampão 10X (sem cloreto de magnésio), 0,9 μ L de cloreto de magnésio (50 mM) e 0,24 μ L de dNTPs (25 mM) e 1 μ L de Taq DNA polimerase (5u/ μ L); foi adicionado a esta mistura, 1 μ L de cada primer (10 μ M) citado acima, 1 μ L do plasmídeo prmiAP-HA6 (50ng/ μ L), acrescentou-se água deionizada para um volume final de 30 μ L. A reação de PCR foi submetida ao seguinte programa na máquina de PCR (Gene Amp PCR System 2400, Applied Biosystems): 94°C por 5 min, 10 ciclos de 94°C por 1 min para a desnaturação; 56°C por 1 min e 30 s para o anelamento e 72°C por 1 min e 30 s para a extensão; seguido de 30 ciclos de 94°C 1 min e 30 s; 60°C por 1min e 30 s; 72°C 1min e 30 s; para terminar extensão a 72°C por 10 min.

O produto obtido da PCR foi verificado em um gel de agarose 1%, a banda correspondente ao tamanho do gene *iap-3*, cerca de 1 pKb, foi eluída e em seguida feito a ligação no vetor pGEM-T (Promega), utilizando T4 DNA ligase (Promega), seguindo as especificações do fabricante. No dia seguinte, foi feita a

transformação por choque térmico em células competentes DH5 α (Invitrogen); o material foi plaqueado em LB sólido estéril acrescido de ampicilina (50 mg/mL), no dia seguinte, as colônias obtidas formadas foram selecionadas e colocadas para multiplicação em meio LB líquido estéril acrescido de ampicilina (50mg/mL) por 16 h. No dia seguinte, fez-se uma mini extração do DNA plasmideal pGEM-*Tiap-3* (fig. 5B) utilizando a metodologia de Sambrook *et al.*. (1989). O DNA extraído foi digerido por 2h a 37°C com a enzima *Bam* HI (Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante. A mostra digerida foi analisada em gel de agarose 1% e a banda correspondente ao gene *iap-3*, próximo de 1 pKb, foi eluída usando o kit GFX Gel Band Purification (Amersham Biosciences), seguindo as orientações do fabricante. O plasmídeo pEPT8 (fig. 5A) foi digerido com a enzima *Bam* HI e desfosforilado para que o gene *iap-3*, agora com sítios de *Bam* HI em suas extremidades, fosse ligado a ele (como descrito acima). O plasmídeo obtido contendo o gene *iap-3*, o pEPT8*iap-3*, foi digerido com as enzimas *Sal* I e *Eco* RV para confirmação da posição correta do gene (fig.5C).

4.1.3.4. Promotor UBQ3 e gene *iap-3*

Para clonagem do gene *iap-3* sob o comando do promotor UBQ3, o vetor utilizado foi o pBSAN236 (fig. 5D), o qual contém o promotor UBQ3, conforme descrito anteriormente. O plasmídeo pGEM-*Tiap-3* (fig. 5B) foi digerido com a enzima *Bam* HI e após eletroforese em gel de agarose 1%, o gene *iap-3*, próximo a 1 pKb, foi eluído usando o kit GFX Gel Band Purification (Amersham

Biosciences), seguindo as orientações do fabricante. O plasmídeo pBSAN236 foi digerido com a enzima *Bam* HI e desfosforilado, para que o gene *iap-3* fosse inserido. Após realização dos procedimentos de clonagem (como descrito acima), o plasmídeo obtido contendo o gene *iap-3*, o pBSAN236*iap-3* (fig. 5E), foi digerido com as enzimas *Eco* RV e *Sac* II para confirmação da posição do gene.

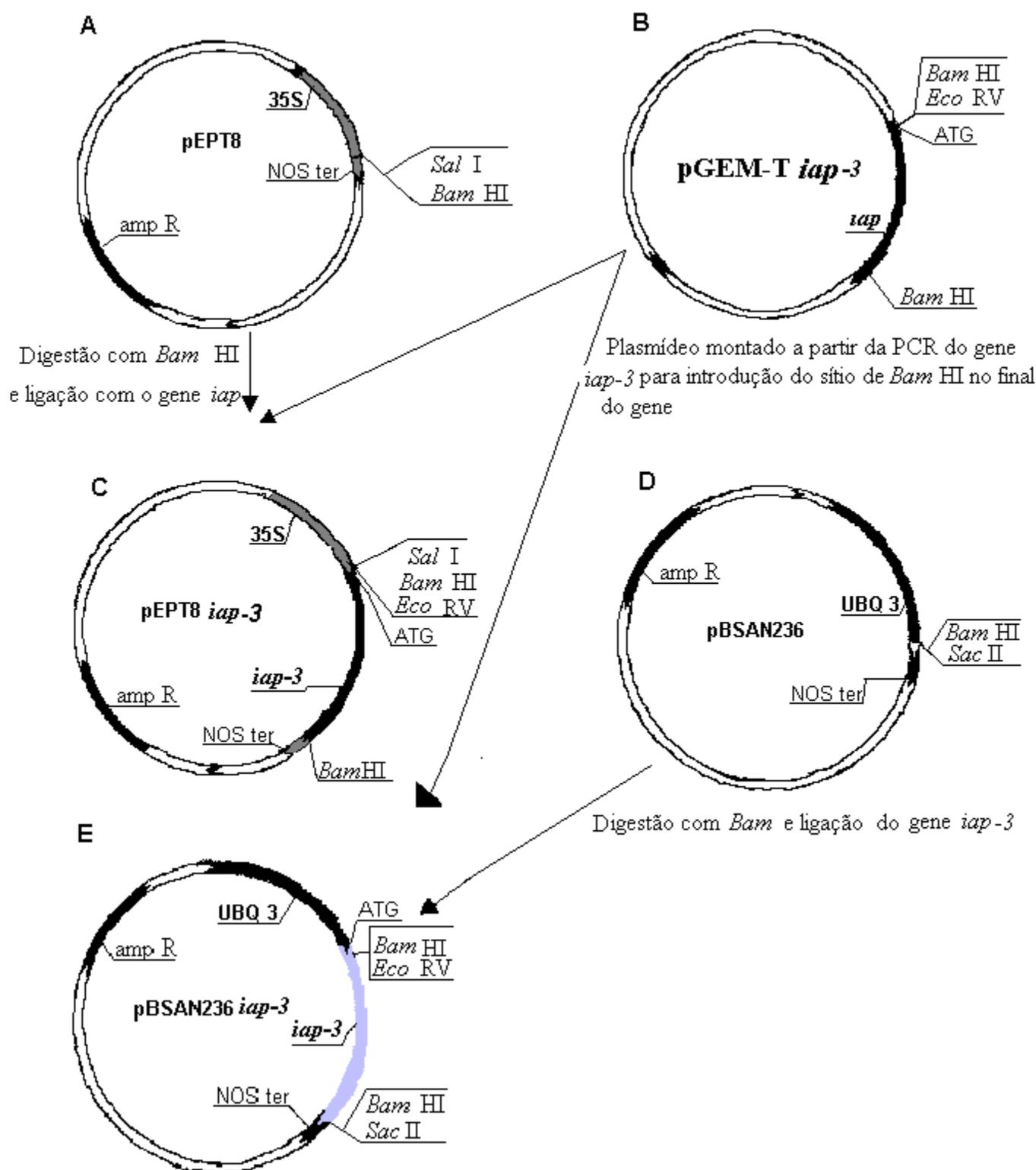


Figura 5. Construção do plasmídeo pEPT8*iap-3* e pBSAN236*iap-3*. Plasmídeo pmi1APHA6 (B); plasmídeo pEPT8 contém o promotor 35S (A); plasmídeo pEPT8*iap-3* (C); plasmídeo pBSAN236, contém o promotor UBQ3 (D) plasmídeo pBSAN236*iap-3* (E). Sítios de restrição, genes de resistência a antibióticos, regiões regulatórias e genes marcadores estão indicados na figura.

4.1.4. Preparo dos explantes e bombardeamento

Hipocótilos de maracujá, cujas sementes foram germinadas e após a germinação as plântulas foram mantidas *in vitro*, foram cortados em tamanhos de aproximadamente 4 mm e colocados 8 segmentos por placa de Petri contendo meio de regeneração (MR) autoclavado. No dia seguinte, os hipocótilos foram bombardeados com as construções contendo o promotor 35S ou UBQ3 comandando a expressão do gene *p35* ou *iap*. Cada construção foi preparada individualmente para o bombardeamento da seguinte forma: uma alíquota de 50 μL da suspensão de micropartículas de tungstênio (60 $\mu\text{L}/\text{mL}$) foi transferida para um tubo de 1 mL, adicionado de 5 a 8 μL de DNA (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e homogeneizado. Foram acrescentados 50 μL de CaCl_2 2,5 M e 20 μL de espermidina 0,1 M (homogeneizado após o acréscimo de cada solução). O material foi incubado à temperatura ambiente sob agitação lenta durante 10 min. Após este procedimento, o material foi centrifugado, descartado o sobrenadante e lavado por 3 vezes com 150 μL de etanol absoluto. Foram adicionados 24 μL de etanol absoluto e as amostras foram submetidas a um sonicador modelo Branson 1210 (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, USA) por 1 a 2 s. Alíquotas de 3,2 μL foram distribuídas na região central de 6 membranas carreadoras (disco KaptonTM de 24 mm de diâmetro e 50 μm de espessura, DuPont), previamente posicionada no suporte da membrana e mantidas em dessecadores até serem usadas (no mesmo dia), conforme descrito em Aragão *et al.* (1996). O bombardeamento foi feito utilizando equipamento de biobalística, modelo PDS-1000 (Bio-Rad), mantido em câmara de fluxo, sob ambiente estéril. Foram realizados 6 bombardeamentos por

construção gênica, com três repetições e cada repetição recebeu três tiros. Após o bombardeamento, os tecidos foram cultivados em meio de cultura MR e os explantes transferidos a cada 15 dias para um meio de cultura novo. Conforme ocorria a regeneração, as plântulas iam sendo passadas para tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de alongamento . Ao atingir cerca de 5 cm de altura e já ter formado raiz, cada plântula foi transferida para copos de 300 mL contendo 75% (p/ p) de terra e 25% (p/ p) de vermiculita e aclimatadas em casa de vegetação. Após 45 dias, as plantas foram transferidas para vasos contendo a mesma proporção de terra e vermiculita usada anteriormente.

4.1.5. Detecção de plantas transgênicas

4.1.5.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a detecção do gene *p35* nas plantas transformadas e regeneradas, fez-se a extração do DNA total de cada uma das plantas regeneradas (Sambrook *et al.*, 1989) para a realização da PCR. Cerca de 50 ng de DNA total extraído foi utilizado na reação. Os primers usados foram 443Acp35R e Acp35 1 a 22F (ver tabela 1 e fig. 1). Usou-se para cada reação 5µL de tampão 10X (sem cloreto de magnésio), 2µL de cloreto de magnésio a 50mM (Promega) e 6,0µL de dNTPs (2,5mM) e 5 U da enzima Taq DNA polimerase. Foi adicionado a esta mistura 1µL de cada primer (10 µM), 1 µL de DNA extraído de planta, e água deionizada para um volume final de 50 µL. Foram utilizados como controles positivo e negativo, 0,5 µL do plasmídeo pPRM-35KORF (50 ng/ uL) e 1 µL do DNA extraído de

plantas não transformadas (50ng/ μ L). O programa usado no termociclador (Gene Amp PCR System 2400, Applied Biosystems) foi: 96°C por 10 min e 30 ciclos de 96°C por 1 min, 46°C por 1 min. e 72°C por 1 min . As reações de PCR foram analisadas a por eletroforese em gel de agarose 1%, seguindo o protocolo descrito em Sambrook *et al.* (1989).

A detecção de plantas transgênicas, transformadas com o gene *iap-3* foi feita pela técnica da PCR, como descrito acima. O DNA total destas plantas foi extraído (Sambrook *et al.*, 1989) para a detecção por PCR, utilizando os pares de oligonucleotídeos OpiapF e OpiapR (tabela 1). O programa usado foi: 96°C por 10 min e 30 ciclos de 96°C por 1 min, 46°C por 1 min. e 72°C por 1 min. (Gene Amp PCR System 2400) tabela 1, fig. 2.

4.1.5.2. Southern blot

Os géis de agarose, nos quais foram feitas as eletroforeses das amostras de PCR (para plantas transformadas como gene *p35*), foram incubados em HCl 0,2 N sob agitação suave por 10 min e lavados rapidamente com água. Logo a seguir, foram incubados por 30 min., sob agitação suave, em solução de desnaturação e lavados com água destilada antes de serem submetidos à incubação por 30 min em solução de neutralização e lavados novamente com água destilada. O DNA presente no gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose por capilaridade usando o protocolo descrito em Sambrook *et al.* (1989). No dia seguinte, a membrana foi fixada, utilizando luz ultravioleta. A pré-

hibridização foi feita adicionando cerca de 100 mL de solução pré-hibridização, 5 mL de solução Denhardt 50X, 2,5 mL de SDS 10%, 10 mg/mL de DNA de esperma de salmão, H₂O qsp 50m L} à membrana e mantida sob agitação por 1 a 2 h a 65 °C. Nesse período, a sonda (cerca de 25 ng do gene *p35* retirado do plasmídeo pPRM-35KORF digerindo-o com a enzima *Bam* HI e eluído) foi preparada, utilizando o Kit Random Primers (Promega), seguindo as especificações do fabricante. A sonda marcada foi acrescentada à solução de pré-hibridização e à membrana e incubada por 16 h a 65 °C. No dia seguinte, a membrana foi submetida por duas vezes à solução de lavagem I por 15 min, à temperatura ambiente e depois, uma vez com a solução de lavagem II e III por 15 min a 65 °C cada uma, respectivamente. Em seguida, em uma câmara escura, colocou-se a membrana em um cassete com telas intensificadoras juntamente com um filme de Raio X (Kodak). Após uma semana a 80 °C negativos, o filme foi revelado segundo protocolo descrito em Romano (1998).

4.1.6. RT-PCR

Para a detecção da transcrição do gene *p35* nas plantas transgênicas, fez-se a extração do RNA total (Sambrook *et al.*, 1989) de cada uma das plantas transformadas, tendo como base os resultados preliminares da PCR. O cDNA foi sintetizado utilizando um primer específico para a cauda poliA, primer T1 (tabela 1) e a enzima transcriptase reversa Mu-MLV (Invitogen), de acordo com as instruções do fabricante. A reação de PCR foi feita usando os primers T2 e 433Facp35 (ver tabela 1 e fig. 1). O programa usado foi: 96 °C por 10 min e 30

ciclos de 96 °C por 1min, 56 °C por 1min e 72°C por 1min (Gene Amp PCR System 2400, Applied Biosystems).

4.1.7. Teste de resistência a vírus

Plantas de maracujá infectadas com CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*) foram fornecidas pelo Dr. Nilton Junqueira, Embrapa Cerrados. O inóculo viral foi preparado com cerca de 1g de folha de plantas infectadas maceradas em 10 mL de tampão fosfato a 0,02 M, pH 7,0. Foram inoculadas as plantas que foram positivas para a presença do gene *p35* na PCR e, como controle positivo, duas plantas não transformadas. O teste foi repetido por duas vezes. A folha a ser inoculada com o extrato de folhas infectado foi previamente polvilhada com abrasivo e, em seguida, o extrato foliar foi aplicado manualmente; o excesso foi enxaguado com água destilada e as plantas foram mantidas em casa de vegetação e observadas diariamente. Como plantas controle negativo, o mesmo procedimento de inoculação foi feito em cada repetição, utilizando duas plantas não transformadas; como inóculo foi utilizado extrato de folhas de plantas saudáveis (1g de folha sadia macerada em 10 mL de tampão fosfato).

4.1.8. Teste de resistência à bactéria

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae* isolado UnB 712 do laboratório de Fitopatologia da Universidade de Brasília foi usada para o teste de resistência. Antes da inoculação das plantas transgênicas, a bactéria foi inoculada

em uma planta selvagem para recuperação da patogenicidade. Assim que apareceram os sintomas, a bactéria foi re-isolada em meio de cultura. Este re-isolado foi utilizado para a inoculação das plantas testes. As plantas transgênicas foram mantidas em câmara úmida por 24 h antes da inoculação. Para a inoculação foi preparada uma suspensão bacteriana em água destilada estéril, a partir de uma cultura de 48h em meio sólido. A concentração de uma suspensão estoque foi ajustada para 10^8 ufc/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro), utilizando o valor de transmitância de 69% obtido de uma curva de calibração previamente estabelecida. A partir da suspensão estoque foi preparada, por diluição, a suspensão inóculo para aproximadamente 10^7 ufc/mL. A concentração do inóculo foi confirmada pela contagem das colônias em meio sólido, resultantes do plaqueamento de suspensão em diluição seriada, obtendo-se o resultado de $7,9 \times 10^6$ ufc/mL, próximo ao esperado. Em cada planta foram inoculadas duas folhas. Considerando-se que a bactéria penetra no tecido foliar por ferimento foi aplicada, manualmente, uma leve camada de abrasivo antes da inoculação. O inóculo foi aplicado por aspersão, sendo uma folha inoculada com uma concentração de 10^6 e outra 10^8 ufc/mL. As plantas foram mantidas em casa de vegetação sob câmara úmida por 48h e observadas diariamente. A análise foi feita em função do tempo de aparecimento de lesões locais e do número dessas lesões locais.

4.1.9. Teste de tolerância a herbicida

Folhas das plantas transgênicas e não transgênicas (controle negativo) foram coletadas (procurou-se pegar folhas novas, já expandidas), lavadas em álcool 70% por 1 min, 15 min em 0,25% água sanitária (hipoclorito de sódio) e enxaguadas três vezes em água estéril. Após a limpeza, cada folha foi cortada em pedaços de, aproximadamente, um cm² com o auxílio de pinça e bisturi e colocados em placas de Petri contendo meio MR e 0,06% de glufosinato (do produto comercial). Foram realizadas três repetições do experimento. Os parâmetros utilizados nas avaliações foram comparações de plantas não transgênicas sem aplicação de herbicida e plantas não transgênicas com aplicação de herbicida.

4.2. Análise da atividade do promotor IE1 de baculovirus em células vegetais

4.2.1. Células animais e tecido vegetal

Células de insetos de *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286) (Sieburth & Maruniak, 1988) foram cultivadas em meio TC-100 (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino a 27 °C.

Folhas de fumo, *Nicotiana tabacum*, proveniente de cultura *in vitro*, foram colocadas em placas de Petri (5 em cada) contendo meio de regeneração MR cerca de 24 horas antes de serem bombardeadas.

4.2.2. Construção dos cassetes gênicos contendo o promotor IE-1 do baculovírus AgMNPV e promotores de planta (UBQ3 e 35S) comandando a expressão dos genes da luciferase (*luc*) de *Renilla*

Um fragmento de aproximadamente 460 pb, contendo o promotor do gene *ie-1*, IE-1 do vírus AgMNPV (fig. 6), foi removido do plasmídeo pGEMIE-1 (Carpes *et al.*, 2005) pela digestão com a enzima de restrição *Eco* RI e separado por eletroforese em um gel de agarose 1%. Paralelamente, o plasmídeo pRL-Null (Promega Corporation), contendo o gene *luc* proveniente de *Renilla reniformis* e um sítio de multiclonagem para inserção de promotores antes do sítio de início da tradução, foi também linearizado com a enzima *Eco* RI e desfosforilado. Após eletroforese, os fragmentos foram eluídos do gel de agarose usando-se o kit GFX band prep kit (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante e ligados com o uso da enzima T 4 DNA ligase (Promega), seguindo as instruções

do fabricante. A ligação foi usada para transformar células de *E. coli* XL1 Blue (Stratagene) por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989), seguindo as instruções do fabricante. Após a transformação, as células foram cultivadas e plaqueadas em meio de cultura LB, contendo ampicilina e crescidas durante a noite. As colônias obtidas foram crescidas individualmente em meio LB líquido para posterior purificação do DNA plasmidial (Sambrook *et al.*, 1989). Todos estes processos de manipulação de ácidos nucléicos e clonagem foram realizados de acordo com os protocolos já descritos na literatura (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1992).

As mesmas técnicas de biologia molecular foram utilizadas para a clonagem dos promotores UBQ3 e 35S no plasmídeo pRL-Null. As enzimas usadas para a retirada do promotor UBQ3 do plasmídeo pBSAN167 (Pinto, 2001) foram *Eco* RI e *Hind* III. Após eletroforese em gel de agarose (0,8%), a banda de cerca de 1,2 pKb foi eluída e feita a ligação no plasmídeo pRL-null, cortado com as mesmas enzimas e desfosforilado (Sambrook *et al.*, 1989). Para a retirada do promotor 35S do plasmídeo pEPT8 (Pinto, 2001), usou-se as enzimas *Sal* I e *Hind* III. Após eletroforese em gel de agarose e eluição da banda de cerca de 800 pb, esta foi ligada, separadamente, ao plasmídeo pRL-Null digerido com as mesmas enzimas (Promega Corporation) (fig 6).

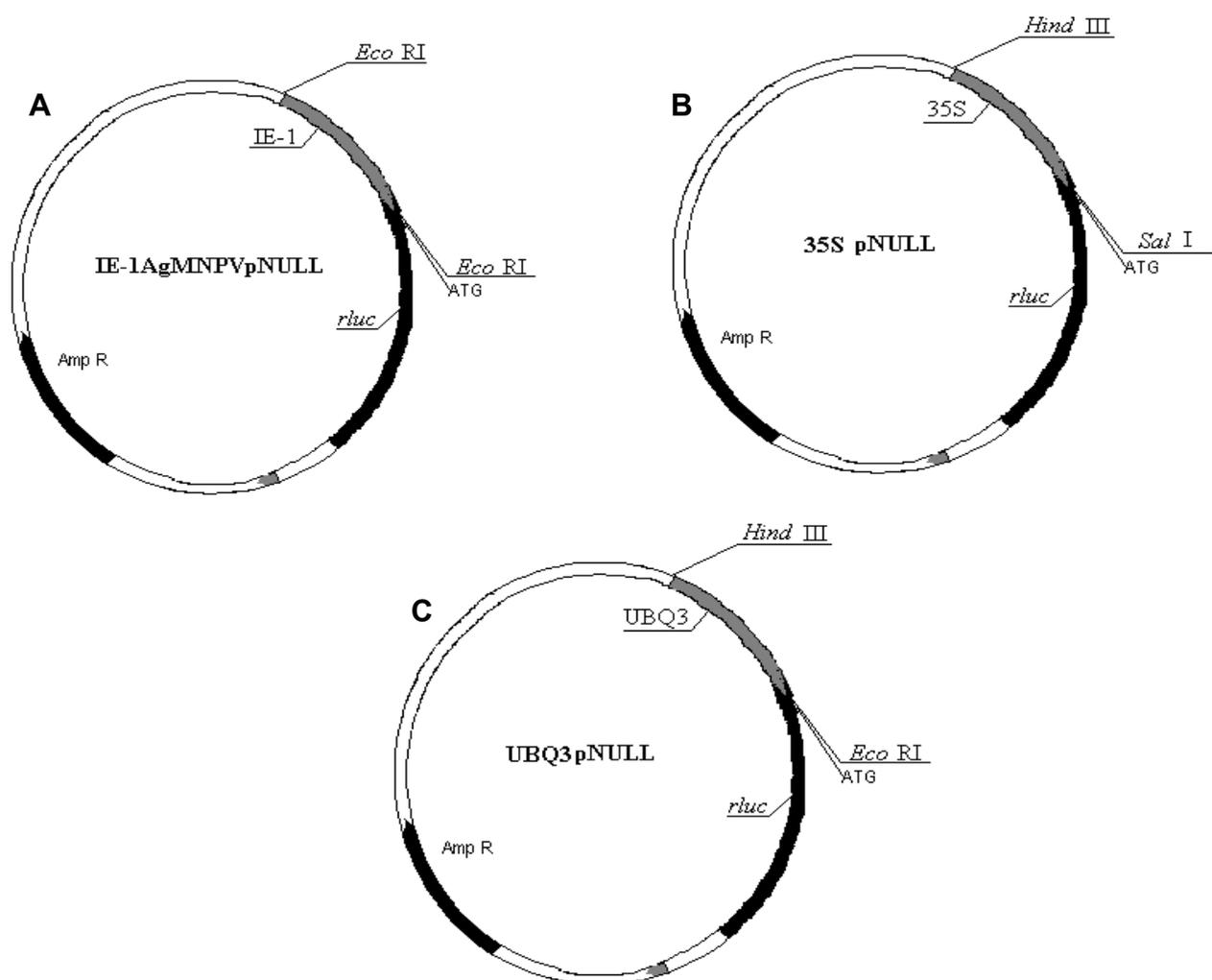


Figura 6. Mapa dos plasmídeos IE-1AgpNULL (A), 35SpNULL (B) e UBQ3pNULL (C). Os promotores IE-1, 35S e UBQ3 foram removidos, respectivamente dos plasmídeos pGEMIE-1, pEPT8 e pBSAN167 com enzimas de restrição apropriadas e ligados, separadamente no vetor pRL Null (Promega) para construção dos vetores mostrados na figura. A posição de cada promotor, gene da luciferase de *Renilla* e sítios de restrição são mostrados na figura.

4.2.3. Análise transiente do promotor do gene IE-1 de *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyedrovirus em fumo (*Nicotiana tabacum*)

Folhas de fumo, em placas de Petri (5 em cada) contendo meio de regeneração MR foram bombardeadas, separadamente, com os plasmídeos contendo diferentes promotores comandando a expressão do gene *rluc*: IE-1AgpNULL, 35SNULL ou UBQ3NULL. Cada construção foi preparada individualmente para o bombardeamento, seguindo a metodologia relatada por Aragão *et al.* (1996). Foram bombardeadas três repetições de cada construção. Após o bombardeamento, os tecidos foram cultivados em meio de cultura MR por três dias em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 °C \pm 2 °C. Após este período, fez-se a análise da expressão da enzima luciferase: as folhas foram maceradas em tampão de lise e o extrato celular analisado para a expressão, usando o kit Dual-Luciferase Reporter assay (Promega) e um luminômetro TD-20/20 (Turner Designs Sunnyvale, CA, EUA), seguindo as instruções dos fabricantes.

4.2.4. Análise da expressão do gene da luciferase (*rluc*) de *Renilla* sob o comando de promotores de plantas (UBQ3 ou 35S) ou de inseto (IE-1) em células UFL-AG-286

Os plasmídeos pIE-1AgpNULL, 35SpNULL e UBQ3pNULL, contendo, respectivamente, o gene da *rluc* sob o comando dos promotores IE-1, 35S e

UBQ3 (fig.6), foram transfectados em células de inseto. As células de insetos derivadas de *A. gemmatalis* (UFL-AG-286) foram adicionadas (1×10^6 células) em placa de 96 poços e mantidas a 27 °C por pelo menos 1 h, para adesão das células ao fundo da placa. A transfecção foi feita utilizando-se 100 a 300 μ L de DNA (300ng/ μ L) de cada plasmídeo contendo as construções descritas acima, contendo os diferentes promotores comandando o gene *rluc*. Para o controle negativo foram feitos os mesmos procedimentos usados na transfecção, mas sem a adição de qualquer plasmídeo; como controle positivo, usou-se o plasmídeo contendo o promotor CMV de citomegalovirus, conforme indicado pelo fabricante do kit Dual-Luciferase Reporter assay (Promega). Em um microtubo foram colocados 3 μ L de HBS por μ L de DNA, em outro tubo colocou-se 3 μ L de HBS/0,5 μ L de lipofectina (Invitrogen) por poço; misturou-se as duas substâncias dos dois tubos, esperou-se 15 min e cada poço recebeu 20 μ L dessa mistura. As transfecções foram feitas em triplicatas. Após o período de transfecção, a solução de transfecção foi removida e adicionado meio TC-100 novo contendo 10% de soro fetal bovino. Doze horas pós-transfecção (p.t.), as amostras foram infectadas com o vírus selvagem e como comparação, mantiveram-se não infectadas três repetições de células transfectadas com cada um dos três plasmídeos. Após 24h, 48h e 72h de infecção foram coletadas amostras das células transfectadas, infectadas e não infectadas. Os extratos celulares foram analisados para a expressão da enzima luciferase, usando o kit Dual-Luciferase Reporter assay (Promega Corporation) e o luminômetro TD-20/20, seguindo as instruções dos fabricantes.

5. RESULTADOS

5.1. Construção e detecção de plantas transgênicas

5.1.1. PCR e Southern blot

Explantos de maracujazeiro foram bombardeados, separadamente, com as construções contendo o gene *p35* sob o comando dos promotores 35S ou UBQ3 (fig. 4). Trinta plantas foram regeneradas e analisadas para a presença do gene heterólogo via PCR, usando os oligonucleotídeos Acp351-22F e 443Acp35R, cujo fragmento esperado é de 443 pb. Nesta reação de PCR, embora tenham ocorrido bandas inespecíficas, foram detectadas 15 plantas transgênicas devido à presença de um fragmento esperado de 443 pb.(fig.7A). Os géis contendo os fragmentos amplificados pela PCR foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose e a membrana hibridizada com uma sonda radioativa para o gene *p35*. Utilizando esta técnica de Southern blot, foi possível confirmar que 11 (A, B, C, D, E, F, G,H, I, J e K) das 15 plantas continham o gene *p35*, pois a banda de 443 pb foi detectada especificamente. Na figura 7A, correspondente à eletroforese do produto de PCR, pode-se observar algumas bandas inespecíficas. Esta inespecificidade foi comprovada com o Southern blot, uma vez que só houve hibridação da sonda na mesma região do tamanho correspondente ao tamanho do produto amplificado do controle, que é de 443 pb, conforme o esperado (7B).

Como o resultado da PCR utilizando os oligos Acp351-22F e 443Acp35R produziu vários fragmentos inespecíficos, a PCR foi novamente realizada utilizando novos oligonucleotídeos (p35F433 e p35R533), que são específicos

para o gene *p35* e amplificavam uma seqüência de 100 pb (fig. 7C). Com essa nova PCR, foi possível confirmar a presença do gene *p35* nas mesmas plantas detectadas anteriormente.

As plantas bombardeadas com construções contendo o gene *iap-3* (pEPT8*iap* e pBSAN236*iap*), também foram analisadas por PCR. Várias reações de PCR foram realizadas visando obter apenas um fragmento específico de 600 pb, sem êxito (fig. 8). Portanto, no desenvolvimento deste trabalho, utilizou-se apenas as plantas transformadas com o gene *p35*. As plantas bombardeadas e regeneradas com o gene *iap-3* continuam em casa de vegetação para posterior análise.

Ao todo foram bombardeadas, com as construções contendo o gene *p35* sob o comando do promotor 35S ou UBQ3, seis placas de Petri contendo oito explantes de maracujá em cada. Durante o processo de regeneração, três placas de cada construção foram contaminadas. Num total de 30 plantas regeneradas, onze, foram transgênicas (tabela 3).

As plantas transformadas com os genes *p35* não apresentaram nenhum tipo de diferença morfológica quando comparada com plantas não transformadas, ou seja, não houve alteração no tamanho das folhas e haste; também não houve alteração no desenvolvimento.

Tabela 3. Número de plantas de maracujá bombardeadas e regeneradas com as construções contendo os genes *p35*.

Plasmídeo bombardeado	Nº de explante bombardeado/placa	Nº de placas	Nº de placas contaminadas	Nº de plantas regeneradas	Nº de plantas PCR+
35Sp35	8	6	3	7	3
UBQ3p35	8	6	3	23	8

5.1.2. Análise da transcrição do gene *p35* nas plantas transformadas

O RNA total das plantas que foram positivas para o gene *p35*, via PCR (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e K), foi usado para detecção da transcrição do gene heterólogo por RT-PCR. A análise por RT-PCR, detectou um produto de até 3 fragmentos de aproximadamente 400, 500 e 700 pb, respectivamente (fig. 7D). As plantas G e J, diferente das demais, que apresentaram três produtos de amplificação, apresentaram apenas dois: um produto de amplificação de cerca de 500 pb e um de 400 pb; já as plantas L, M e N não apresentaram nenhum produto de amplificação, conforme esperado, uma vez que estas, embora tenham sido bombardeadas, não estavam transformadas e foram utilizadas como controles negativos. A distância do primer utilizado para a reação de RT-PCR até o final do gene *p35* é de 467 nucleotídeos. Desta forma, as bandas de 500 e 700 pb podem representar formas diferentes do mesmo mRNA com diferentes tamanhos da cauda de poli-A ou apenas uma das bandas pode ser a específica e as outras serem amplificações inespecíficas.

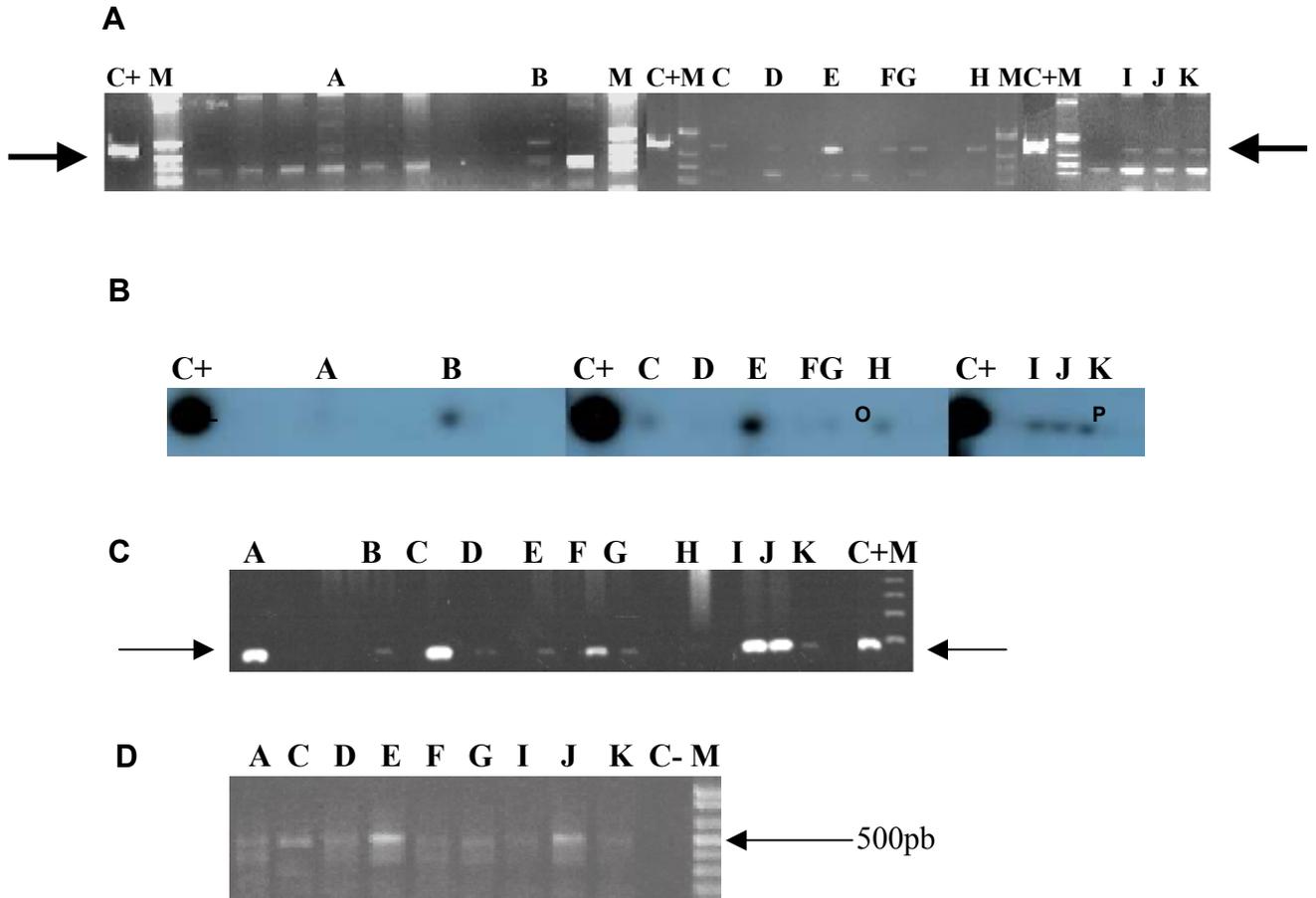


Figura 7. Detecção do gene *p35* e transcritos nas plantas regeneradas. A) Eletroforese do produto de PCR das plantas regeneradas. O produto amplificado esperado é de 457 pb (seta), observado em 11 plantas (A, B, C D, E, F, G, H, I, J e K) e 4 plantas (L, N, O, P), aparentemente, apresentavam um produto de amplificação esperado. C+ mostra a amplificação do gene *p35* usando o plasmídeo pEPT8*p35* como controle positivo. M indica o marcador de massa molecular, 1 Kb DNA ladder (Invitrogen). B) Southern-blot usando a membrana contendo DNA do gel de agarose mostrado na figura A. Apenas as plantas que tinham o fragmento de PCR específico de 457 pb foram marcadas. C) Eletroforese do produto de PCR de plantas regeneradas. O produto amplificado esperado é 100 pb (seta) foi amplificado o DNA das mesmas 11 plantas detectadas na primeira reação de PCR. M indica o marcador de massa molecular 123 pb DNA marker (Invitrogen). C+ é igual na fig. A. D) Eletroforese do produto de RT-PCR de mRNA extraído de maracujazeiros regenerados. As plantas A, C, D, H, F, G, I, J e K apresentaram um fragmento esperado de cerca de 500bp, indicando a possível transcrição do gene *p35* nessas plantas. M = marcador de massa molecular 100 pb DNA ladder (BioLabs).

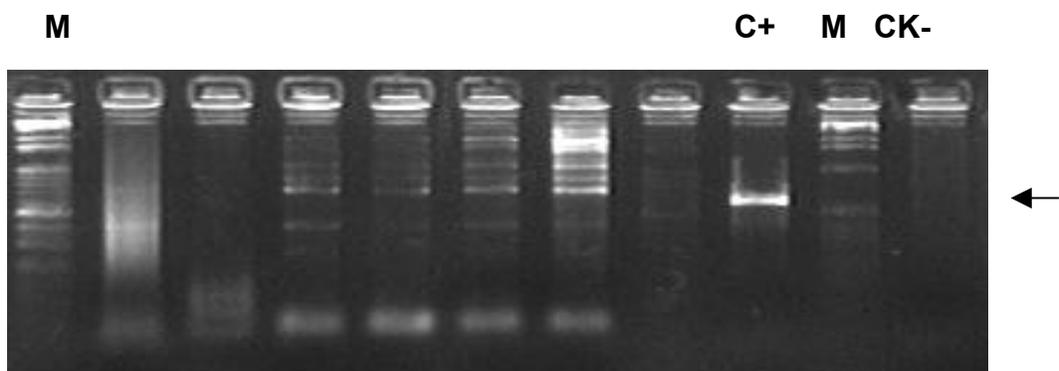
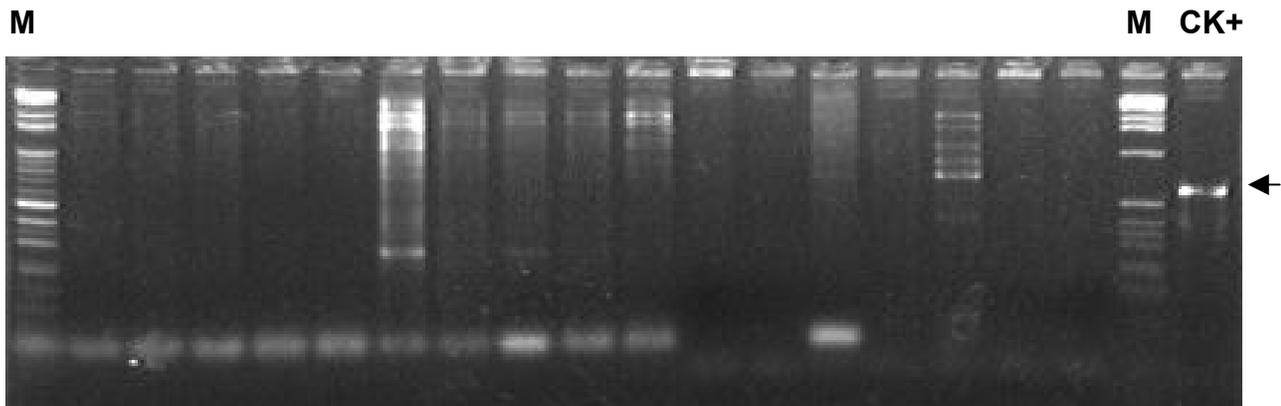


Figura 8. Eletroforese do produto de PCR das plantas bombardeadas com o gene *iap-3* e regeneradas. O produto amplificado esperado é de 600 pb (seta). C+ mostra a amplificação do gene *iap-3* contido no plasmídeo prmlAP-HA6 como controle positivo. CK- PCR controle negativo utilizando DNA de planta não transformada. M indica o marcador de massa molecular, 1 Kb DNA ladder (Invitrogen).

5.2. Teste de resistência a vírus (CABMV) em plantas transformadas com o gene *p35*.

Neste experimento, foi analisada a reação das plantas transformadas com o gene *p35* quando infectadas com o vírus CABMV, que é um sério problema para a cultura do maracujá no país, porém, este vírus não induz necrose. Foram inoculadas para este teste as plantas A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e K. Após 15 dias de inoculação, observou-se início de sintoma de mosaico nas plantas não bombardeadas (controle) e nas plantas D, E, H, I, J e K. As plantas A, B, C, F e G (20 dias após a inoculação) começaram a apresentar clorose e encarquilhamento (fig 9). Depois de 1 mês de inoculação, estas plantas apresentaram morte da gavinha e do broto apical. Aos 45 dias após a inoculação, as brotações que se desenvolviam começaram a apresentar sintomas de mosaico (semelhante aos das plantas não transformadas) (fig. 10), apresentando mosaico e deformação foliar (tabela 4). Nenhuma das plantas havia morrido até 6 meses após a inoculação.

Tabela 4. Evolução dos sintomas observados nas plantas transgênicas e não transgênicas inoculadas com o vírus CABMV de acordo com o tempo após a inoculação.

Planta	Sintomas observados nas plantas inoculadas com o vírus CABMV no decorrer do tempo			
	20 dias início dos sintomas	30 dias	45 dias	60 dias
Não transformada	Mosaico	Mosaico sistêmico	Mosaico sistêmico	Mosaico sistêmico
A	clorose e encarquilhamento	Morte da gavinha e do broto apical	Início de mosaico	Mosaico sistêmico
B	clorose e encarquilhamento	Morte da gavinha e do broto apical	Início de mosaico	Mosaico sistêmico
C	clorose e encarquilhamento	morte da gavinha e do broto apical	Início de mosaico	Mosaico sistêmico
D	Mosaico	Mosaico sistêmico	Mosaico sistêmico	Mosaico sistêmico
E	Mosaico	Mosaico sistêmico	Mosaico sistêmico	Mosaico sistêmico
F	clorose e encarquilhamento	morte da gavinha e do broto apical	Início de mosaico	Mosaico sistêmico
G	clorose e encarquilhamento	morte da gavinha e do broto apical	Início de mosaico	Mosaico sistêmico
H	Mosaico	Mosaico sistêmico	Mosaico sistêmico	Mosaico sistêmico
I	Mosaico	Mosaico sistêmico	Mosaico sistêmico	Mosaico sistêmico
J	Mosaico	Mosaico sistêmico	Mosaico sistêmico	Mosaico sistêmico
K	Mosaico	Mosaico sistêmico	Mosaico sistêmico	Mosaico sistêmico

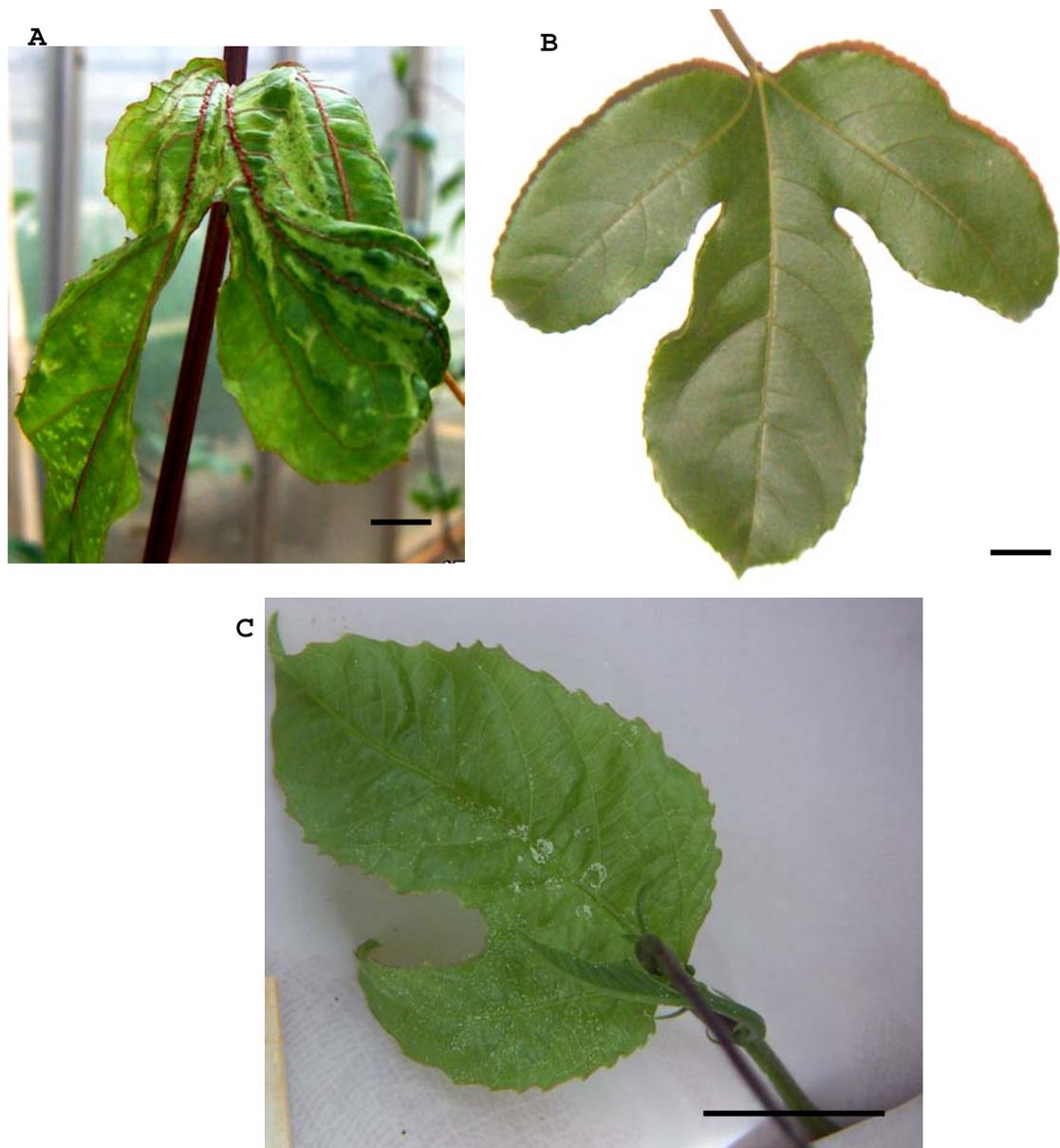


Figura 9. Sintomas observados nas plantas inoculadas com o vírus CABMV após 20 dias de inoculação. A) Mosaico com deformação foliar observado nas plantas não transformadas (controle) e nas plantas transgênicas D, E, H, I, J e K. B) Planta não transformada e não inoculada. C) Clorose e encarquilhamento observado apenas nas plantas transgênicas A, B, C, F e G. Barra = 2 cm

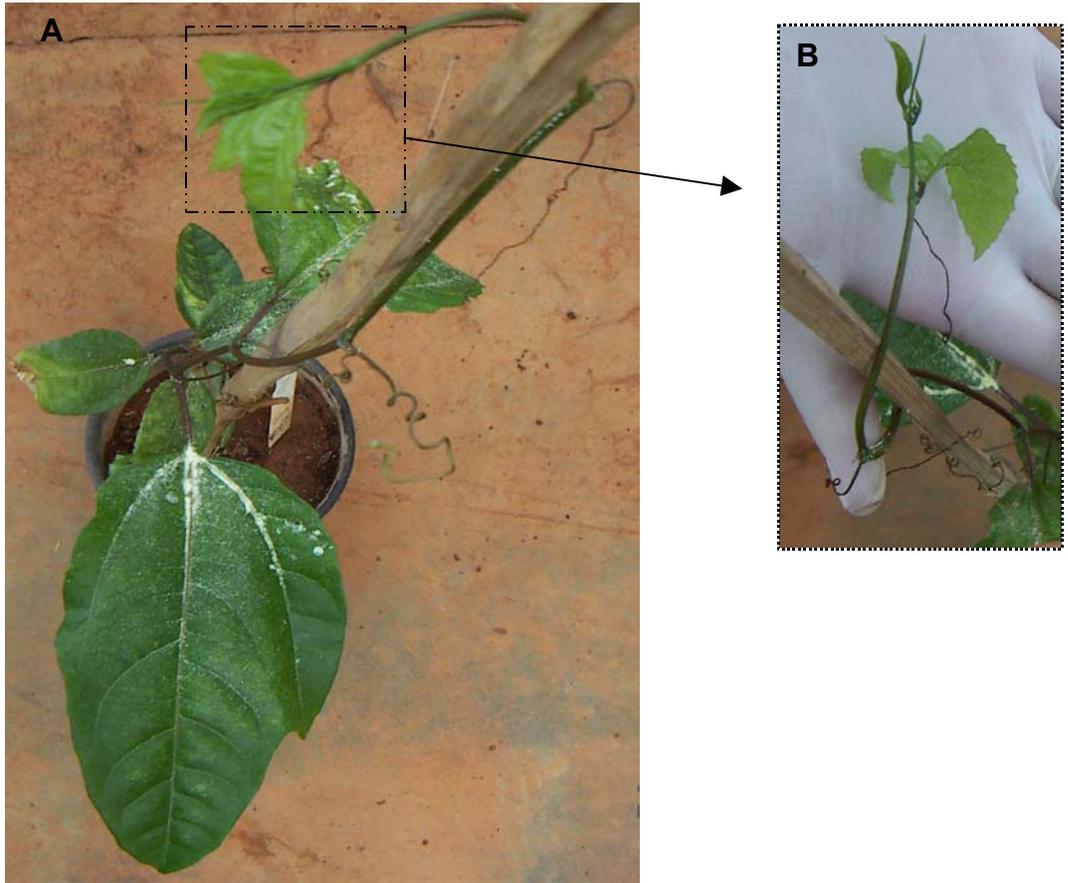


Figura 10. Progresso da infecção viral induzida por CABMV em maracujazeiro transgênico (*p35+*). A) Clorose e encarquilhamento começam a aparecer 20 dias após a inoculação nas plantas A, B, C, F e G. B) Detalhe mostrando clorose e rebrotamento foliar.

5.3. Teste de resistência à bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

Duas concentrações de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*: 10^6 e 10^8 ufc/mL, suficientes para infectar uma planta foram inoculadas em 2 folhas de cada uma das plantas p35+ (A, C, F, I, J, K) e duas plantas não transformadas (CK-). Na maioria das plantas transformadas, o número de lesões locais (pequenas lesões de 1 a 2 mm encharcadas), foi menos da metade do número de lesões locais que as plantas não transformadas (tabela 5). O tempo de aparecimento das lesões também foi diferente, as plantas transformadas demoraram cerca de três dias a mais em relação às plantas não transformadas para o aparecimento das lesões. Nas plantas não transformadas, as lesões iniciaram com cerca de 7 dias. Nas plantas transformadas, estas tiveram início após o décimo dia de inoculação (Fig. 11).

Tabela 5. Reação dos maracujazeiros transgênicos e não transgênicos à Inoculação da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.

Planta	Número de lesões/folha inoculada	
	10^6	10^8
Controle 1 (planta não transgênica)	23	80
Controle 2 (planta não transgênica)	20	88
A	11	32
C	3	30
F	10	40
I	2	42
J	3	6
K	13	18

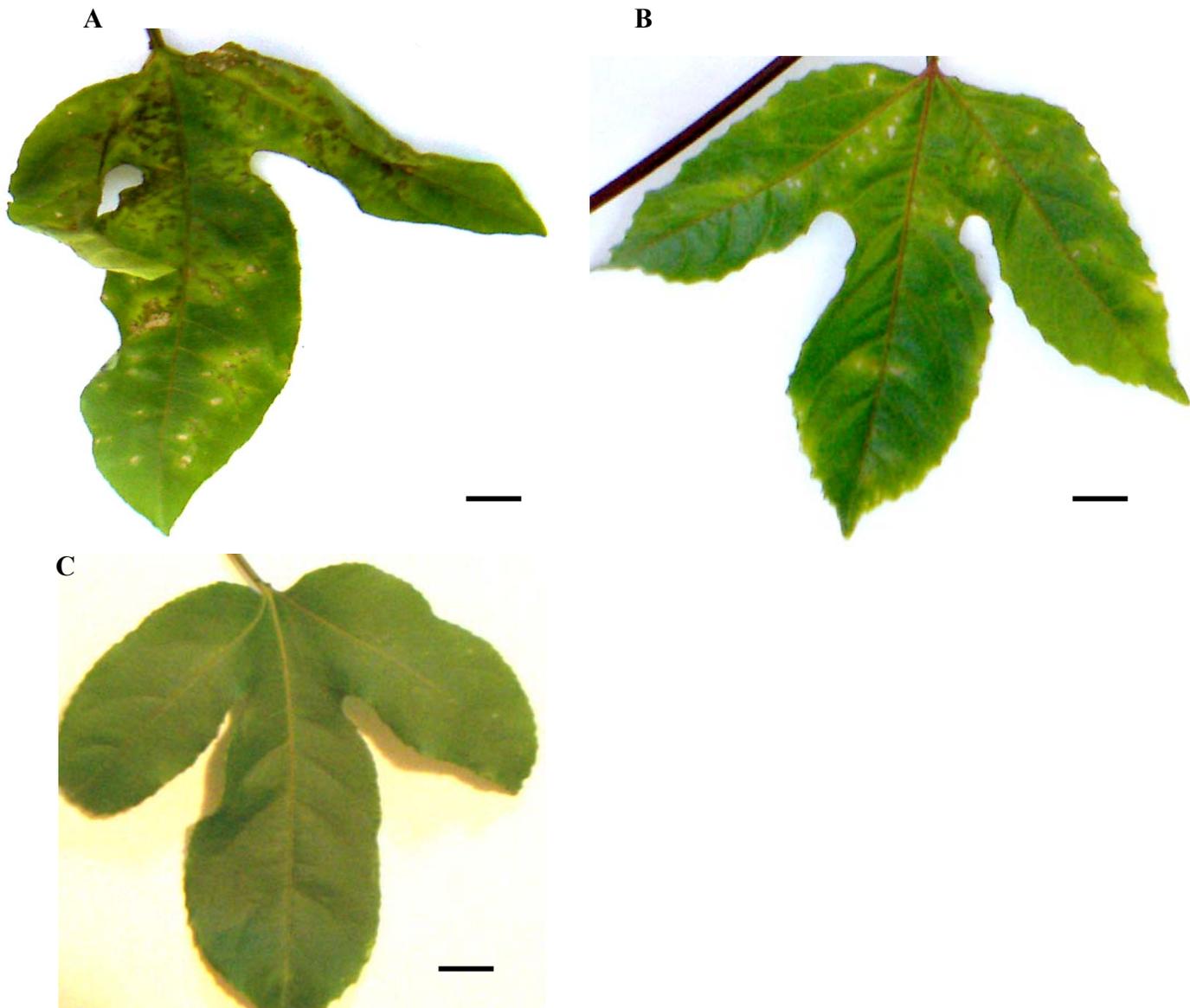


Figura 11. Lesões induzidas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em maracujazeiros transgênicos e não transgênicos. As plantas foram inoculadas por aspersão, uma concentração de 10^6 ou 10^8 ufc/mL e apresentaram lesões encharcadas, medindo cerca de 1 a 2 mm, típica da bactéria. A) Planta não transformada, sete dias após a inoculação. B) Planta transformada ($p35+$), dez dias após a inoculação. Os sintomas demoraram um pouco mais para aparecer e o número de lesões foi menor que nas plantas não transformada. C) Planta não transformada, não inoculada. Barra = 2 cm

5.4. Teste tolerância a herbicida para plantas p35+

Pedaços de folhas de plantas não transformadas e de plantas p35+ (A, B, C, E, F, e J), de aproximadamente um cm² foram incubados em placas de Petri contendo o herbicida glufosinato (0,06%) em meio MR. As plantas foram avaliadas após 3 e 6 dias do tratamento. O teste foi repetido três vezes. Além disso, três clones das plantas A, B, C, E, F e J e três plantas não transformadas também foram inoculadas com o herbicida *in vivo* pulverizando a mesma concentração de herbicida aplicado nos testes *in vitro*.

5.4.1. In vitro

As folhas das plantas controles positivos, isto é, plantas não transformadas e com aplicação de herbicida (CK- G+) apresentaram perda da clorofila bem acentuada. Já as folhas das plantas C e F foram bem mais tolerantes ao herbicida, tendo a aparência muito semelhante ao controle negativo (não-transformada e não-inoculada). Já as folhas das plantas transformadas A e J apresentaram tolerância ao herbicida maior que as plantas não-transformadas; as plantas B e E apresentaram perda da clorofila semelhante às plantas não transformadas (tabela 6, fig.12).

5.4.2. In vivo

Foram analisadas as seguintes plantas: A, B, C, E, F e J. Os sintomas da aplicação do herbicida começaram a aparecer cerca de sete dias após a aplicação, as plantas A, C, F e J apresentaram áreas de seca nas folhas, principalmente da borda foliar e perda de algumas folhas (tabela 6, fig.13). Após vinte dias começou a perda acentuada de folhas e, após trinta dias, as plantas começaram a morrer. Contudo, estas plantas transgênicas apresentaram uma sobrevivência maior quando comparada as não transgênicas, tendo um tempo de vida 3 vezes maior. As plantas B e E (p35+) apresentaram perda de folhas no terceiro dia, semelhante às plantas não transformadas.

Tabela 6. Sintomas nas plantas de maracujá p35+, após 6 dias de incubação do herbicida *in vitro* e aplicação do herbicida *in vivo*.

	Sintomas após 6 dias de aplicação do herbicida	
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Controle sem herbicida (planta não transgênica)	Folha verde	Planta normal
Controle com herbicida (planta não transgênica)	Perda acentuada da clorofila	Planta sem folhas
Planta p35+		
C e F	Folha verde	Áreas foliares secas, algumas folhas caíram
A e J	Ligeira perda de clorofila	Áreas foliares secas, algumas folhas caíram
B e E	Perda acentuada da clorofila	Áreas foliares secas e perda acentuada de folhas

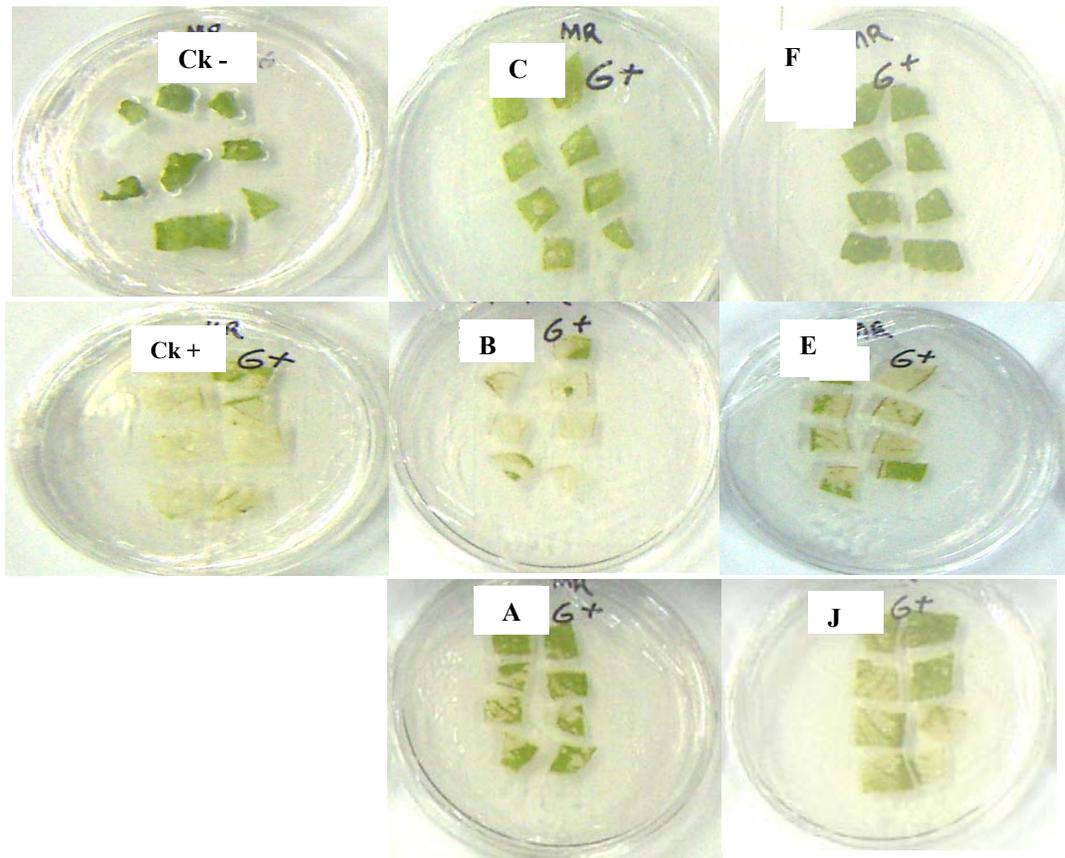


Figura 12. Efeito do herbicida glifosinato em maracujazeiros transgênicos e não transgênicos. Pedacões de um cm² de folhas não transformadas (CK+) e transformadas (A, B, C, E, F e J) foram incubadas e placas de Petri contendo MR e 0,06% de herbicida. Como controle negativo (CK-) plantas não transformadas colocadas em placas de Petri contendo apenas MR. As plantas foram observadas todos os dias e avaliadas após seis dias. As folhas C e F tratadas com herbicida não apresentaram perda de clorofila, resultado semelhante ao das folhas controle (CK-), que não foram tratadas com herbicida. As folhas B e E apresentaram perda acentuada de clorofila semelhante ao controle positivo (CK+). Já as folhas A e J apresentaram perda de clorofila, uma característica entre o controle negativo e positivo, não se enquadrando em nenhum dos dois controles, mas entre eles.

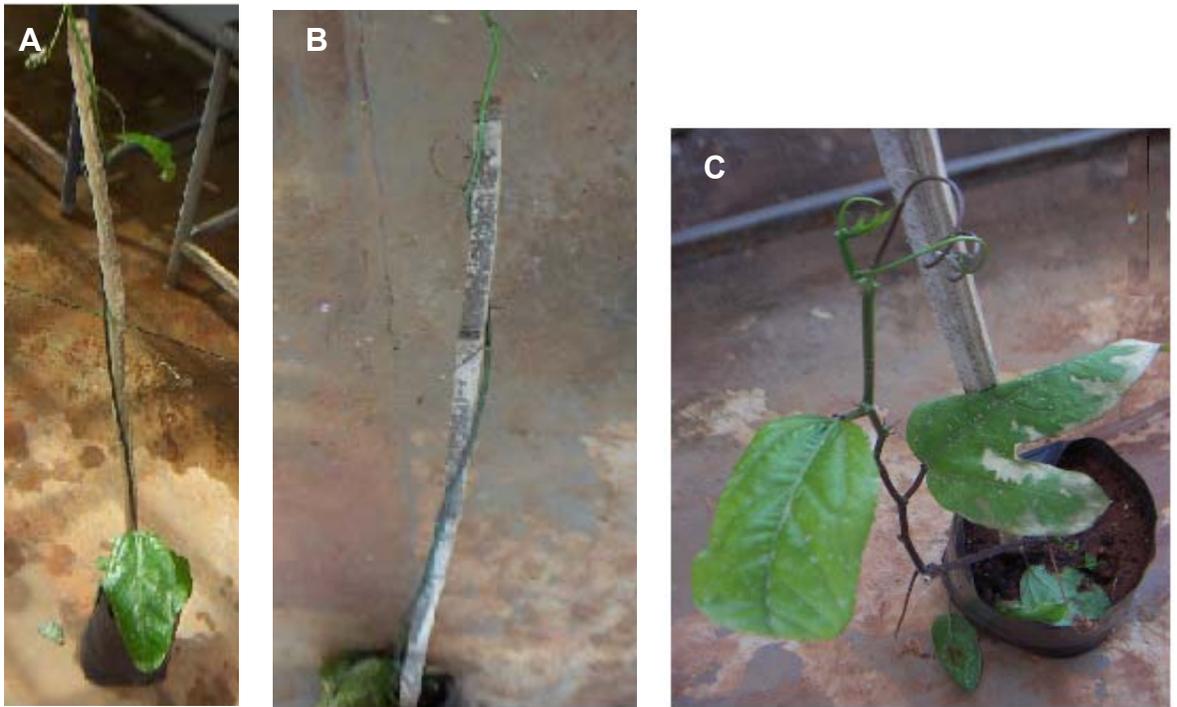


Figura 13. Plantas não-transgênicas e transgênicas pulverizadas com 0,06% de herbicida. A) plantas não transformadas três dias após a aplicação de herbicida já haviam caído quase todas as folhas. B) planta não transformada, seis dias após a aplicação do herbicida todas as folhas já haviam caído e, após dez dias, a planta estava morta. C) Planta transformada. Seis dias após a aplicação do herbicida a planta apresentou áreas secas e queda de algumas folhas.

5.5. Análise da atividade dos promotores de planta (35S e UBQ) e do promotor IE-1 de *Anticarsia gemmatalis* nucleopoliedrovirus em células de inseto em cultura

Os promotores de plantas 35S e UBQ3 mostraram atividade em células de insetos transfectadas com plasmídeos contendo o gene *rluc* sob o comando desses promotores (fig. 14 A e B). A expressão do gene *rluc* sob o comando do promotor IE-1 de AgMNPV foi próxima aos valores obtidos com os promotores de plantas, obtendo, após 24h de transfecção, em células não infectadas. O valor da unidade relativa de luminescência (URL) do promotor IE-1 foi de 38 URL, do promotor UBQ3 foi de 37 URL e do promotor 35S foi de 40 URL (tabela 7). Muito embora, após 24 h de infecção, tanto em células não infectadas como infectadas, com nenhum dos promotores (IE-1, UBQ3 ou 35S) foi obtida uma expressão tão alta quanto a do promotor controle positivo, o promotor CMV de citomegalovirus. No controle negativo, células de inseto UFL-AG-286, transfectadas sem plasmídeo, observou-se uma expressão sempre abaixo de 18 URL.

Mesmo quando as células são infectadas com o vírus selvagem AgMNPV os valores são próximos entre os promotores IE-1Ag, UBQ3 e 35S. Na figura 14B observa-se que há uma melhora na eficiência da expressão do *rluc* sob o comando do promotor UBQ3 em 48h após a infecção com o vírus selvagem e o mesmo ocorre com o promotor 35S após 72h. Em ambos os gráficos podem-se observar a atividade dos promotores de plantas em células de insetos,

constatando que a eficiência dos mesmos foi semelhante à eficiência do promotor IE-1 do baculovírus AgMNPV.

Tabela 7. Análise da expressão do gene *rluc* sob o comando do promotor CMV, IE-1, UBQ3 ou 35S em células de inseto *A. gemmatalis* (UFL-AG-286). Células de inseto sem plasmídeo (CK-) foram usadas como controle negativo.

Promotor analisado	URL medida em diferentes períodos fixados p.i.					
	Células de insetos não infectadas			Células de insetos infectadas		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
IE-1	38	36	32	37	31	29
UBQ3	37	35	34	31	33	24
35S	40	37	33	32	31	35
CMV	50	35	28	36	27	28
CK-	13	18	14	15	18	11

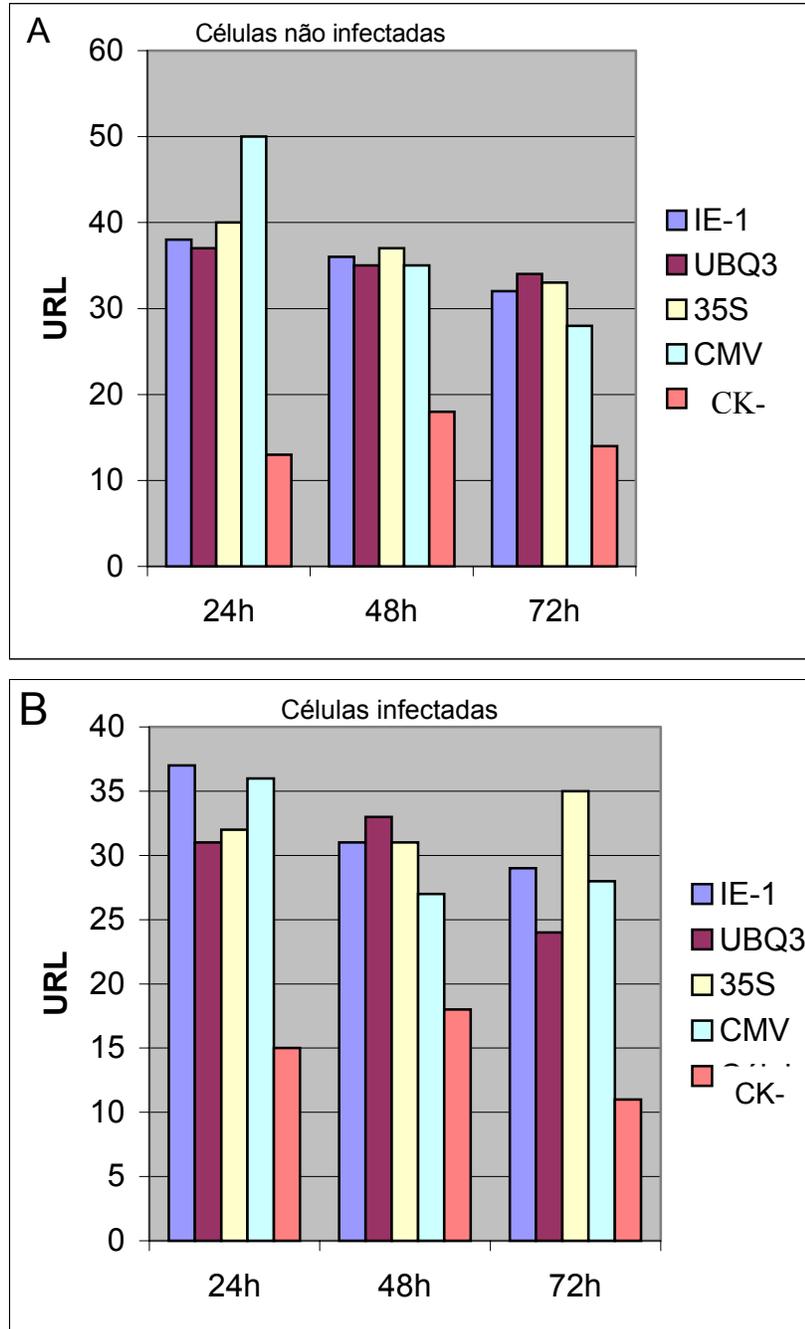


Figura 14. Análise dos promotores de plantas 35S e UBQ3 em células UFL-AG-286, comandando a expressão do gene *rluc*. Controles positivos: promotores IE-1 de baculovirus e CMV de citomegalovirus. Controle negativo (CK-): células UFL-AG-286 transfectadas sem plasmídeo. As análises foram feitas 24, 48 e 72h após a infecção do grupo de células infectadas. Cada valor de unidade relativa de luminescência foi obtida da média de três valores obtidos na avaliação do experimento. A) Células não infectadas; B) Células infectadas com AgMNPV.

5.6. Expressão transiente do promotor IE-1 em plantas de fumo

Folhas de fumo bombardeado com plasmídeos contendo os promotores IE-1, 35S ou UBQ3 comandando a expressão do gene *rluc* foram analisadas para a verificação da expressão da enzima luciferase. Análise realizada seguindo o protocolo indicado pelo kit Dual-Luciferase Reporter assay (Promega) e um luminômetro TD-20/20 (Turner Designs). Os valores obtidos neste experimento indicam uma alta expressão do gene *rluc* sob o comando do promotor de baculovírus IE-1 em células de fumo. Observou-se uma eficiência do promotor IE-1 até melhor que a dos promotores 35S e UBQ3. Contudo, a expressão do promotor UBQ3 foi a menor entre os promotores analisados. O controle negativo apresentou uma URL baixa, conforme é mostrado na tabela 8. Observando a figura 15 pode-se verificar a média dos valores obtidos na leitura da luminescência de cada promotor e do controle negativo, mostrado também na tabela 8.

Tabela 8. Luminescência verificada nos promotores UBQ3 ou 35S comandando a expressão do gene *rluc* em fumo.

Promotor	Unidade Relativa de Luminescência (URL) medida			
	Repetição1	2	3	média
Planta não bombardeada (controle negativo)	0,705	0,030	0,503	0,413
IE1	3,901	4,552	1,236	3,230
UBQ3	1,020	0,652	2,4	1,357
35S	2,483	3,056	2,015	2,518

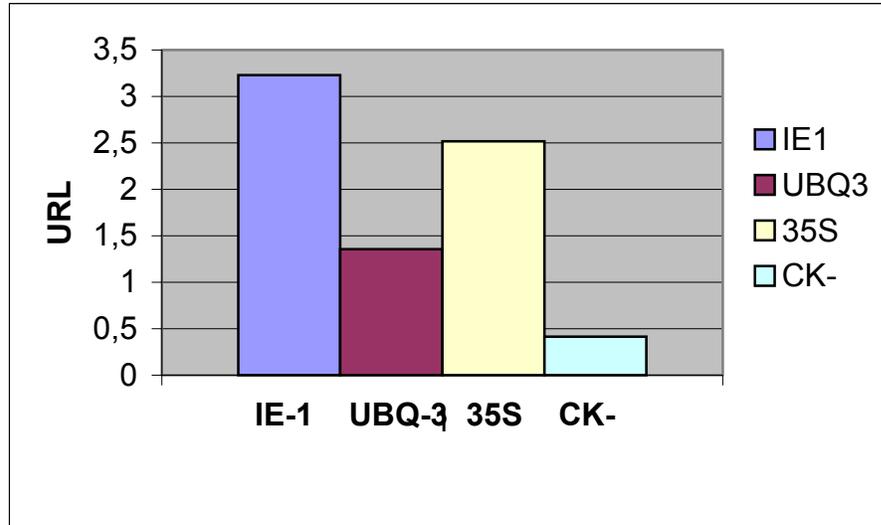


Figura 15. Análise da expressão transiente do promotor IE-1 de baculovirus e dos promotores de plantas 35S e UBQ3 em tecido de fumo. Os promotores comandam, separadamente, a expressão do gene *rluc*. A análise foi feita por comparação entre o promotor IE-1 de baculovirus e os promotores de planta (35S e UBQ3), usados como controle positivo. Como controle negativo, usou-se tecido de fumo não bombardeado. As medições de luminescência foram feitas três dias após o bombardeamento. Cada valor de unidade relativa de luminescência (URL) foi calculado da média de três valores obtidos na avaliação do experimento. Os extratos celulares foram analisados, separadamente, para a expressão da enzima luciferase.

6. DISCUSSÃO

Na construção de plantas transgênicas é geralmente comum o uso de genes que conferem resistência a antibiótico como marcador. Atualmente, o uso genes conferindo resistência a antibióticos vem diminuindo, devido a possíveis efeitos deletérios da presença de antibióticos sendo expressos em plantas transformadas. Há esforços para que as próximas gerações de plantas transgênicas utilizadas na alimentação não contenham este tipo de gene na “planta produto final” (Goldstein *et al.*, 2005). Os plasmídeos construídos e usados na transformação de hipocótilos de maracujazeiro neste trabalho não continham nenhum gene marcador ou de seleção para identificação de plantas transformadas. A seleção das plantas transformadas foi feita através de técnicas moleculares como PCR, Southern blot e RT-PCR.

As plantas transgênicas expressando o gene *p35* do baculovírus AcMNPV não apresentaram alterações morfológicas quando comparadas com plantas não transformadas, ou seja, não houve alteração no tamanho das folhas e haste; também não houve alteração no desenvolvimento, nem em seu crescimento. Xu *et al.* (2004) observaram que plantas transgênicas de tomate expressando os genes *bcl-xL* e *ced-9* (de humano e de nematóide, respectivamente), apresentaram o crescimento reduzido, má formação das folhas e pouca ou nenhuma formação de sementes. Características semelhantes também foram relatadas por Dickman *et al.* (2001) em; os autores relataram que plantas expressando os *bcl-xL* ou *ced-9*

apresentaram nanismo e má formação e as plantas expressando o gene *bcl-2* apresentaram, além dos sintomas descritos, macho esterilidade. Essas características não foram relatadas em plantas transgênicas de fumo ou tomateiros expressando os genes *iap* ou *p35* (Del Polzo & Lam, 2002).

Fumo expressando os genes *bcl-2*, *bcl-xL* e *ced-9* apresentaram um número menor de lesões locais e foram eficientes em evitar a invasão sistêmica do vírus TSWV, quando comparado a plantas não transformadas (Dickman *et al.*, 2001). Resultados semelhantes foram verificados em tomateiros expressando os genes *bcl-xL* e *ced-9*, quando inoculadas com CMV/D (DNA satélite de cucurbit mosaic vírus), que é letal em tomate não-transgênico. As plantas transgênicas apresentaram até 50% de sobrevivência ao patógeno; já as plantas inoculadas apenas com o vírus CMV, sem o DNA satélite, desenvolveram mosaico, sintoma típico da doença em tomateiro. Portanto, a expressão de genes anti-apoptóticos suprimiu a morte celular e atenuou os sintomas induzidos pelo CMV/D (Xu *et al.*, 2004). Muitos dos trabalhos citados relatam a resistência ou tolerância contra patógenos necrotróficos, herbicidas, estresse hídrico ou estresse térmico de plantas transgênicas contendo genes anti-apoptóticos. Neste trabalho, as plantas transformadas com o gene *p35* e infectadas com o vírus CABMV apresentaram dois tipos de sintomas: as plantas D, E, H, I, J e K, verificou-se início de sintoma de mosaico típico da infecção por este vírus; as plantas A, B, C, F e G (20 dias após a inoculação) começaram a apresentar clorose e encarquilhamento. Um mês após a inoculação, estas plantas apresentaram morte da gavinha e do broto apical. Aos 45 dias após a inoculação, as brotações que se desenvolviam

começaram a apresentar sintomas de mosaico (semelhante aos das plantas não transformadas). Del Pozo & Lam (2002) trabalharam com plantas de fumo NN transformadas com o gene *p35* e verificaram a quebra da resistência ao TMV (*Tobacco mosaic virus*) nas plantas transformadas. Fumo NN quando inoculado com TMV apresenta apenas lesão local, não possibilitando a infecção sistêmica do vírus na planta. Já nas plantas de fumo NN transformadas com o gene *p35* ocorre a quebra da resistência, as plantas apresentaram clareamento das nervuras, deformação foliar e nanismo, sintoma típico da infecção por TMV.

Os maracujazeiros transformados com o gene *p35*, quando inoculado com a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, apresentaram sintomas típicos da doença induzida por este patógeno, cerca de 10 dias após a inoculação. Este tempo de aparecimento das lesões foi diferente em relação às plantas não transgênicas. As plantas transformadas demoraram cerca de três dias a mais em relação às plantas não transformadas para o aparecimento das lesões. Nas plantas não transformadas as lesões iniciaram com cerca de sete dias após a inoculação. Além disso, o número de lesões locais, pequenas lesões de 1 a 2 mm encharcadas, nas plantas transgênicas foi menos da metade do número de lesões locais que as plantas não transformadas. Estes resultados são consistentes com os obtidos por Lincoln *et al.* (2002), onde tomateiros expressando P35 produziram lesões menores induzidas por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* quando comparado com as plantas não transformadas. Os autores relataram também, que as plantas (tomateiros) transformadas com o gene *p35* foram inoculadas com uma micotoxina hospedeiro-específica, a Aal, produzida por *Alternaria alternata* f. sp

lycopersici (a inoculação feita na raiz) e os frutos inoculados com o fungo *Colletotrichum caccodes*, ambos induzem necrose em plantas não transformadas. As raízes expressando a proteína P35 não foram afetadas pela toxina, não apresentando nenhum sinal de morte celular, diferente das raízes que não expressavam a proteína. Observou-se nos frutos que apresentaram lesões, o tamanho era, pelo menos, 50% menor que nos frutos não transgênicos; em alguns frutos houve formação de lesões.

Segundo Sah *et al.* (1999), a presença da proteína P35 é requerida antes do início da apoptose induzida por estresse oxidativo, isto significa que a proteína intercepta o estresse oxidativo uma via acima, antes da indução da apoptose, agindo como um dreno para as ROS (espécies reativas de oxigênio). A proteína P35 age seqüestrando espécies reativas de oxigênio, inibindo assim a morte celular induzida por estresse oxidativo. Isso explicaria a maior tolerância que as plantas transformadas, com o gene *p35* demonstraram ao herbicida glifosinato. O herbicida glifosinato de amônia inibe a glutamina sintase, causando o acúmulo de amônia, induzindo a formação de ROS, que é fitotóxico. Nossos resultados são compatíveis com os resultados obtidos por Chen e Dickman (2004), os quais obtiveram plantas transformadas com genes anti-apoptóticos (*ced-9*, *bcl-2* e *bcl-xL*) resistentes à herbicida, cujo sítio de ação eram os cloroplastos e sua ação ativa a morte celular.

Pesquisadores têm sugerido que os cloroplastos desempenham um papel importante na morte celular geneticamente programada. A evidência disto é que o uso de herbicidas, cujo sítio primário de ação são os cloroplastos, em fumo resulta

na morte celular com características de morte celular programada. Entretanto, plantas de fumo expressando genes anti-apoptóticos não foram resistentes ao glifosato, porém este herbicida não induz a formação de ROS (espécies reativas de oxigênio) e as células não exibem características de morte celular programada. A luz é requerida para que a célula morra; plantas de fumo transgênicos foram resistentes a herbicidas cujo alvo são os cloroplastos e não apresentaram nenhuma característica de morte celular programada, já os mutantes que não expressavam a proteína anti-apoptótica não apresentaram resistência. Vários trabalhos têm demonstrado que genes anti-apoptóticos conferem resistência a “stress” oxidativo, embora a forma que isto ocorre não seja clara (Chen & Dickman, 2004). A morte celular induzida por patógenos em células animais e vegetais geralmente é um importante fator de defesa do hospedeiro que limita a replicação e invasão sistêmica de certos patógenos. A resposta de hipersensibilidade ocorre no sítio de entrada do patógeno e envolve morte celular em volta do sítio de infecção. Isso é um tipo de defesa da planta que age na tentativa de confinar o patógeno, protegendo assim a planta (Xu *et al.*, 2004; Khurama *et al.*, 2005).

Embora o papel da morte celular na defesa contra fungos e bactérias não seja claro, parece retardar a proliferação do patógeno. Muito embora no caso de patógenos necrotróficos, a indução da morte celular pode ser usada pelo patógeno para sua invasão na planta (Lam *et al.*, 2001). A morte celular pode servir também para amplificar outras respostas de defesa ou promover uma maior agressividade do patógeno ou ainda, disseminação de alguns patógenos (Grenberg & Yao,

2004). Os genes anti-apoptóticos podem ser uma ferramenta importante contra patógenos necrotróficos (McDowell & Woffenden, 2003).

Os promotores de plantas 35S e UBQ3 foram eficientes em células de inseto (UFL-AG-286), obtendo uma expressão do gene marcador *rluc* similar ao promotor IE-1 do baculovirus AgMNPV. Nos experimentos descritos neste trabalho, foi possível observar um aumento na expressão do gene *rluc* sob o comando do promotor 35S após 72h de transfecção nas células infectadas com baculovirus, porém, em células não infectadas isso não ocorre, a expressão maior ocorre em 24h. O promotor UBQ3 comandando a expressão do gene *rluc* não apresentou diferenças em células infectadas e não infectadas, porém verificou-se melhor expressão do gene *rluc* nas primeiras 48h, enquanto no promotor 35S, em células infectadas com baculovirus, a melhor expressão é após 72h. Abe *et al.* (2005) construíram um baculovirus recombinante (rAcMNPV), contendo o promotor 35S comandando a expressão do gene da luciferase. Os autores observaram que o promotor foi eficiente e possivelmente age como um promotor tardio de baculovirus, pois possui um motivo TAAG, presente nos promotores de baculovirus das fases de expressão tardia e muito tardia (Miller, 1997). Promotores de genes das fases tardia e muito tardia de baculovirus têm um motivo TAAG conservado, onde ocorre o início da transcrição. Análise do promotor 35S indicou há esta seqüência e está localizada no nucleotídeo 26 à jusante do início da transcrição e uma outra no nucleotídeo 25 à montante (Abe *et al.*, 2005).

Experimentos quantitativos comparando a eficiência entre os promotores 35S e UBQ3 indicam que a expressão do gene da β -glucuronidase (*uid A*) em

plantas de fumo é um pouco maior quando o promotor utilizado é o 35S (Odell *et al.*, 1985). Melhor eficiência do promotor 35S comparando com o promotor UBQ3 também foi conferida em experimentos utilizando *Gladiolus* (uma planta ornamental) transgênica expressando o gene *uid A* (Komo *et al.*, 2000).

Os plasmídeos contendo os diferentes promotores (IE-1, 35S ou UBQ3) e usados para bombardear plantas de fumo apresentaram valores que indicam uma boa expressão do gene *rluc* sob o comando do promotor de baculovirus IE-1 em células de fumo. Observou-se uma eficiência do promotor IE-1, similar à expressão com os promotores 35S e UBQ3. Contudo, a expressão do promotor UBQ3 foi a menor entre os promotores analisados. A forma de análise da expressão gênica foi destrutiva, isto é, após três dias de bombardeamento, as folhas bombardeadas foram maceradas em tampão (seguindo as especificações do fabricante, Promega). Barnes (1990) verificou diferentes padrões de expressão do gene da luciferase de vaga-lume em folhas de fumo transgênicos. Algumas folhas tiveram a expressão do gene apenas nas nervuras, outras na folha inteira. O autor comenta que a análise destrutiva do tecido pode mascarar os resultados, uma vez que mistura áreas de alta expressão com áreas de baixa expressão gênica. Isto pode ter ocorrido também com as folhas de fumo bombardeadas com o gene *rluc* sob o comando dos diferentes promotores. Um dos procedimentos que poderia até ter minimizado este fator seria a realização de medidas separando as nervuras dos demais tecidos da folha.

A combinação de técnicas de biologia molecular, culturas de tecidos "in vitro" e transferência exógena de genes representa uma ferramenta poderosa para

introduzir novas características em uma determinada planta (Monquero, 2005). O uso dessa técnica no melhoramento de plantas permitirá aumentar a produção, reduzir perdas na pós-colheita, obter culturas mais tolerantes ao estresse ambiental, obter culturas que usem mais eficientemente nitrogênio e fósforo; aumentar o valor nutricional dos alimentos; obter plantas resistentes a herbicidas, pragas e ou doenças; desenvolver alternativas para indústrias como as de combustíveis e farmacêutica. Para que estas realizações continuem são necessários o incentivo à pesquisa e ao conhecimento.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os maracujazeiros transgênicos, transformados com o gene *p35*, conferiram certa tolerância à bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e tolerância ao herbicida glifosinato, muito embora as plantas tenham sido susceptíveis ao vírus CABMV. Outros testes analisando a tolerância a estresse por temperatura e resistência a outros patógenos necrotróficos podem apresentar resultados tão interessantes quanto os já obtidos.

O promotor IE-1 comandando o gene *rluc* em folhas de em fumo teve uma boa eficiência, parece ser uma alternativa viável para a produção de plantas transgênicas, contudo necessita de mais estudos.

Pretende-se continuar a seleção de plantas transformadas com o gene *iap* e fazer os testes de tolerância e resistência nas plantas transformadas com este gene.

8. REFERÊNCIAS

- Abe, T; Miake, N.; Nishijima, Y.; Fujita, R.; Sahara, K.; Asano, S. And Bando, H. (2005) Enhancement of cauliflower mosaic virus promoter in insect cells with infected baculovirus. *Virus Research*. 112:38-41.
- Alfenas, P. F.; Braz, K. A. S.; Torres, L. B.; Santana E. N.; Nascimento, A. V. S.; Carvalho, M. G.; Otoni, W. C. and Zerbini, F. M. (2005). Transgenic Passionfruit Expressing RNA Derived from *Cowpea aphid-borne mosaic virus* Is Resistant to Passionfruit Woodiness Disease *Fitopatol. bras.* 30 (1): 33-38.
- Al-Kaff, N. S.; Covey, S. N.; Kreike, M. M. Page, A. M.; Pinder, R. and Dale, P. J. (1998). Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science*. 279:2113-2115.
- Aragão, F. J. L; Barros, L. M. G; Brasileiro, A. C. M; Ribeiro, S. G; Smith, F. D; Sanford, J. C; Faria, J. C. and Rech, E. L. (1996). Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics*. 93:142-150.
- Ausubel, F. A.; Brent, R.; Kingston, R, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A. and Struhl, K. (1992). *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing and Willey Interscience, New York, USA.

- Awada, T.; Dunigan, D. D.; Dickman, M. B. (2003). Animal antiapoptotic genes ameliorate the loss of turgor in water-stressed transgenic tobacco. *Canadian Journal of plant Science* 83: 499-506.
- Barnes, W. M. (1990) Variable patterns of expression of luciferase in transgenic tobacco leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:9183-9187.
- Beck, D.L.; Dolleweerd, C.J.V.; Lough, T.J.; Balmori, E.; Voot, D.M.; Andersen, M.T.; O'Brien, I.E.W. and Forster, R.L.S. (1994) Disruption of Virus Movement Confers Broad-Spectrum Resistance Against Systemic Infection by Plant Viruses with a Triple Gene Block. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:10310-10314.
- Benfey, P. N. & Chua, N. (1990). The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 250:959 - 966.
- Bezerra, D.R., Lima, J.A.A. e Xavier Filho, J. (1995). Purificação e caracterização de um isolado cearense do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro. *Fitopatologia Brasileira* 20:553-560.
- Binsfeld, P. C. (2000) Análise diagnóstica de um produto transgênico *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento Brasília*, 2(12):16-19.
- Braz, A.S.K., Santana, E.N., Zambolim, E.M., Costa, A.F., Otoni, W.C. and Zerbini, F.M. (1998). Molecular characterization of two isolates of South African *Passiflora* virus infecting passionfruit in Brazil. *Virus Reviews and Research* 3:146. 1998.

- Bruckner, C.H. (1997) Perspectivas do melhoramento genético do maracujazeiro. In: São José, A. R.; Bruckner, C.H.; Manica, I. E Hoffmann, M. (Eds) Maracujá: temas selecionados(1); melhoramento, morte prematura, polinização, Taxonomia. Porto Alegre: Cinco Continentes.
- Bump, N. J.; Hackett, M.; Hugunin, M.; Seshagiri, S.; Brady, K.; Chen, P., Ferenz, C.; Franklin, S.; Ghayur, T.; Li, P.; Licari, P.; Mankovitch, J.; Shi, L.; Greenberg, A. H.; Miller, L. K. and Wong, W. W. (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 269: 1885-1888.
- Callis, J.; Carpenter, T.; Sun, C. and Vierstra, R. D. (1995). Structure and evolution of genes encoding poly-ubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Genetics* 139: 921-939.
- Carpes, M. P. Castro; M. E. B.; Soares, E. F.; Villela, A. G.; Pinedo, F. J. R. and Ribeiro, B. M. (2005) The inhibitor of apoptosis gene (iap-3) of *Anticarsia gemmatalis* multcapsid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) encodes a functional IAP.
- Cavalli, S. B. (2001) Segurança alimentar: a abordagem dos alimentos transgênicos. *Revista de Nutrição* 14 suppl.
- Chagas, C. M. Kitajima, E. W.; Lin, M. T.; Gama, M. I. C. S. & Yamashiro, Y. (1981) Grave moléstia do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) Deg. no Estado da Bahia causada por um isolado do vírus do "woodiness" do maracujá. *Fitopatologia Brasileira*, 6: 259-268.

- Chen, S. and Dickman, M. B. (2004). Bcl- family members localize to tobacco chloroplasts and inhibit programmed cell death induced by chloroplast-targeted herbicides. *Journal of Experimental Botany*. 8:1-7.
- Choi, J. and Guarino, L. A. (1995). Expression of the IE1 Transactivador of *Autographa californica* nuclear polyedrosis virus during viral infection. *Virology* 209:99-107.
- Clem, R.J. (2001). Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death Differ* 8:137-43.
- Clem, R. J. and Miller, L. (1994). Control of programmed cell death by the baculovirus genes *p35* and *iap*. *Molecular and Cellular Biology* 14(8): 5212-5222.
- Comunicado Técnico 86. Principais doenças do Maracujazeiro na Região Nordeste e seu Controle ISSN 1679-6535. Outubro, 2003. Fortaleza, CE
- Cook, R. M. (1998). The molecular mechanisms responsible for resistance in plant-pathogen interactions of the gene-for-gene type function more broadly than previously imagined. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 95(17): 9711-9712.
- Christensen, A. H. and Quail, P. H. (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or markers gene in monocotyledonous plants. *Transgenic Res.* 5(3): 213-218.
- Crook, N. E.; Clem, R. J. & Miller, L. K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J. Virol.* 67: 2168-2174.

- Del Pozo, O. and Lam, E. (2002). Expression of the Baculovirus p35 protein in tobacco affects cell death progression and compromises N gene-mediated disease resistance response to Tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 16: 485-494.
- Dickman, M. B.; Park, V. K.; Oltersdorf, Li, W.; T.; Clemente, T. and French, R. (2001). Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:6957-6962.
- Friesen, P.D. (1997). Regulation of Baculovirus Early Gene Expression. p.141-170. Em: Lois K. Miller. (1997) *The Baculoviruses*.. New York; Plenum Press. 447 p.
- Fitchen, J. H. and Beachy, R. N. (1993). Genetically Engineered Protection Against Viruses in Transgenic Plants. *Annual Review of Microbiology*. 47: 739-763.
- Gatz, C. and Quail, P. Q. (1970) Tn10-encoded tet repressor can regulate an operator –containing plant promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:1394-1397.
- Goldstein, D.A.; Tinland, B.; Gilbertson, L.A.; Staub, J.M.; Bannon, G.A.; Goodman, R.E.; McCoy, R.L. and Silvanovich, A. (2005). Human safety and genetically modified plants: a review of antibiotic resistance markers and future transformation selection technologies. *J. Applied Microbiology* 99: 7–23.
- Ghosh S.; Parvez K.M.; Banerjee K.; Sarin S.K. and Hasnain S.E. (2002) Baculovirus as Mammalian Cell Expression Vector for Gene Therapy: An Emerging Strategy. *Molecular Therapy* 6(1): 6-11.

- Greber, R. S. (1966) Passionfruit woodiness virus as a cause of passion vine tip blight disease. Qd. J. Agric. Anim. Science 23: 533-538. In: Kitajima, E. W.; Chagas, C. M. & Crestani, O. A. (1986) Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiros no Brasil. Fitopatologia Brasileira, 11: 409-432.
- Grenberg, J. T. and Yao, N. (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions Cellular Microbiology 3: 201-211.
- Hawkins, C. J.; Uren, A. G.; Häcker, G.; Medcalf R. L. and Vaux, D. L. (1998) Inhibition of interleukin 1-converting enzyme-mediated apoptosis of mammalian cells by baculovirus IAP. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 13786-13790.
- Instituto De Tecnologia De Alimentos - ITAL. (1995) Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. Frutas Tropicais, Vol. 9. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, Campinas. 267p.
- Ho, M.; Ryan, A. and Cummins, J. (2000) CaMV promoter fragmentation hotspot confirmed, and it is active in animals. Microbial Ecology in Health and Disease 12:189.
- Inoue, A.K.; Mello, R.N.; Nagata, T. and Kitajima, E.W. (1995). Characterization of Passionfruit woodiness virus isolates from Brasília and surrounding region, Brazil. Fitopatologia Brasileira. 20:479-485.

- Jarvis, D. L.; Reilly, L. M.; Hoover, K.; Schultz, C.; Hammock, B. D. and Guarino, L. A. (1996a). Construction and characterization of immediate early baculovirus pesticides. *Biological Control*. 7:228-235.
- Jarvis, D. L.; Weinkauff, C. and Guarino, L. A. (1996b). Immediate-early baculovirus for foreign gene expression in transformed or infected insect cells. *Protein Expression and Purification*. 8:191-203.
- Jin, J.; Dong, W.; Guarino, L. A. (1998). The LEF-4 subunit of baculovirus RNA polymerase has RNA 5'-triphosphate and ATPase activities. *J. Virol.* 72 (12):10012-10019.
- Jones, A. L.; Johansen, I.E.; Bean, S.J.; Bach, I. and Maule, A.J. (1998). Specificity of resistance to pea seed-borne mosaic potyvirus in transgenic peas expressing the viral replicase (NIb) gene. *Journal of General Virology*, 79: 3129-3137.
- Keen, N.; Staskawicz, B.; Mekalanos, J.; Ausubel, F. and Cook, R. J. (2000). Pathogens and hosts: The dance is the same, the couples are different. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 (16):8752-8753.
- Khurana, S. M. Paul, Pandey, K.; Sarkar, D. and Chanemougasoundharam, A. (2005). Apoptosis in plant disease response: a close encounter of pathogen kind. *Current Science*. 740-752.
- Kitajima, E. W.; Chagas, C. M. & Crestani, O. A. (1986) Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiros no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 11: 409-432.

- Komo, K.; Blowers, A. and McElroy, D. (2000) Effect of the Cauliflower mosaic virus 35S, actin and ubiquitin promoters on *uidA* expression from bar-uid-A fusion gene in transgenic *Gladiolus* plants. *In vitro Cellular and Development Biology – Plant*. 36(1): 13-20.
- Lam, E., Kato, N and Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*. 411: 848-853.
- Langridge L.W.H.R.; Krausovab, V.I.; Szalay, A.A. and Fodora, I. (1996). Detection of baculovirus gene expression in insect cells and larvae by low light video image analysis. *Journal of Virological Methods* 61: 151-156.
- Lee, J. C.; Chen, H.H.; Chao, Y. C. (1998). Persistent baculovirus infection results from deletion of the apoptotic suppressor gene *p35*. *J. Virol.* 72(11):9157-9161.
- Li, W. and Dickman M.B. (2004) Abiotic stress induces apoptotic-like features in tobacco that is inhibited by expression of human Bcl-2. *Biotechnology Letters* 26: 87–95.
- Lincoln J.E.; Richael C.; Overduin B.; Smith, K.; Bostock R. and Gilchrist D.G. (2002) Expression of the antiapoptotic baculovirus *p35* gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15217–15221.
- Liu Y, Chu C, Wu T (2006) Baculovirus ETL promoter acts as a shuttle promoter between insect cells and mammalian cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 27: 321-327.

- Lo, H.; Chou, C.; Wu, T. Yuen, J. P. and Chao, Y. (2002) Novel baculovirus DNA elements strongly stimulate activities of exogenous and endogenous promoters. The Journal of Biological Chemistry. 277(7): 5256-5264.
- Luckow, V.A. and Summers, M.D., (1988). Trends in the development of baculovirus expression vector. Bio/Technology 119: 184-189.
- Maguire, T.; Harrison, P.; Hyink, O.; Kalmakoff, J. and Ward, V. K. (2000). The inhibitors of apoptosis of *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus. Journal of General Virology, 81, 2803-2811.
- Maiti, J.; Shaw, F.; Murphy, J.G. and Hunt, A.G. (1993) Plants that Express a Potyvirus Proteinase Gene are Resistant to Virus Infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 6110-6114.
- Manders, G.; Otón, W. C.; Vaz, F. B. D.; Blackhall, N. M.; Power, J. B. and Davey, M. R. (1994). Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports 13:697-702.
- Manica, I. Fruticultura Tropical: 1. Maracujá. São Paulo, Agronômica Ceres, 1981. 160 p.
- Manji, G. A.; Hozak, R. R.; LaCount, D. J. and Friesen, P. D. (1997) Baculovirus inhibitor of apoptosis functions at or upstream of the apoptotic suppressor P35 to prevent programmed cell death. J Virol 71(6): 4509–4516.

- McDowell, J. M. and Woffenden, B. J. (2003). Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology*. 21 (4) 179-183.
- Meleti, L.M.; Santos, R.R. e Minami, K. (2000) Melhoramento do maracujazeiro amarelo: obtenção do cultivar composto IAC-27. *Scientia Agrícola* 57:491-498.
- Mikhailov, V. S. (2003). Replication of the baculovirus genome. *Molecular Biology* 37(2): 250–259.
- Miller, L. K. (1997). *The baculoviruses*. New York: Plenum.
- Monquero, P. A. (2005) Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. *Bragantia* .64 (4) 517-531.
- Moscardi, F. e Souza, M. L. (2003). Baculovirus para o controle de pragas: panacéia ou realidade. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*.
- Moscardi F. (1999) Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 257-289.
- Muniz, C. R.; Freitas, C. A. S.; Campelo, W. F.; Maia, G. A. e Brasil; I. M. (2003) Alimentos transgênicos: segurança, riscos alimentares e regulamentações. *Boletim CEPPA* 21 (2) 209-222.
- Murges, D.; Kremer, A. and Knebel, D. (1997) Baculovirus transactivator IE1 is functional in mammalian cells. *Journal of General Virology*, 78, 1507–1510.

Nascimento A.V.S.; Santana E.M.; Braz A.S.K.; Alfenas P.F.; Pio-Ribeiro G.; Andrade G.P.; Carvalho M.G. and Zerbini F.M. (2006) Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. *Arch. Virol.* Published online April 7, 2006.

Nascimento, A.V.S.; Souza, R.R.; Alfenas, P.F.; Andrade, G.A.; Carvalho, M.G.; Pio-Ribeiro, G. and Zerbini, F. M. (2004) Análise Filogenética de Potyvírus Causando Endurecimento dos Frutos do Maracujazeiro no Nordeste do Brasil *Fitopatol. bras.* 29(4): 378-383.

Nakamura, S.; Yoshikawa, M.; Taira, H.; Ehara, Y. (1994). Plants transformed with mammalian 2' - 5' oligoadenylate synthetase gene show resistance to virus infections. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 60:691-693.

Novaes, Q. S. & Rezende, J. A. M. (1999) Possível aplicação do DAS-ELISA indireto na seleção de maracujazeiro tolerante ao "Passionfruit Woodiness Virus". *Fitopatologia Brasileira*, 24 (1): 76-79.

Odell, J. T.; Nagy, F. . and Chua, N. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter *Nature* 313, 810 – 812.

Otoni, W.C.; Casali, V.W.D.; Power, J.B. e Davey, M.R. (1996) Expressão transitória do gene *gus* em maracujazeiro (*Passiflora giberti* N. E. Brown) mediada pelo bombardeamento de partículas. *Revista Ceres.* 43: 326-335.

- Ow, D. W.; Jacobs, J. D. and Howell, S. H. (1987) Functional regions of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter determined by use of the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 4870-4874
- Paterniani, E. (2001) Das plantas silvestres às transgênicas. Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília 18(1):169-179.
- Petrucelli, S.; Dai, S.; Carcamo, R.; Yin, Y.; Chen, S. and Beachy, R. N. (2001). Transcription factor RF2a alters expression of the rice tungro bacilliform virus promoter in transgenic tobacco plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98(13):7635-7640.
- Pinto, A. A. (2001) Análise exploratória do uso da engenharia genética para obtenção de fruteiras resistentes a fungos. Tese de Mestrado. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina.
- Pio-Ribeiro, G. & Mariano, L. R. Doenças do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). (1997) In: Kimati, H. *et al.* Manual de Fitopatologia, Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas. 3ª edição, Editora Agronômica Ceres, São Paulo-SP.
- Ponte, J.J. da. clinica de doenças de plantas. Fortaleza: Editora UFC, 1996. 871p.
- Powell-Abel, P.; Nelson, R. S.; Hoffmann, H.; Rogers, N.; Stephen, G.; Fraley, R. T. and Beachy, R. N. (1986). Delay of Disease Development in Transgenic Plants that Express the Tobacco Mosaic Virus Coat Protein Gene. Science 232: 738-743.

- Rahme, L. G.; Ausubel, F. M.; Cao, H.; Drenkard, E.; Goumnerov, B. C.; Lau, G. W.; Mahaian-Miklos, S.; Plotnikova, J.; Tan, M. W.; Tsongalis, J.; Walendziewicz, C. L. and Tompkins, R. G. (2000). Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97 (16):8815-8821.
- Ramachandran, A.; Bashyam, M. D.; Viswanathan, P.; Ghosh, S.; Senthil K. M. S. and Hasnain, S. E. (2001) The bountiful and baffling baculovirus: The story of polyhedrin transcription. *Current Science* 81 (8) 998-1010.
- Rezende, J.A.M. Doenças de vírus e micoplasma do maracujazeiro no Brasil. (1994) In: São José, A.R. (Ed.) *Maracujá: produção e mercado*. Vitória da Conquista: UESB. pp.116-125.
- Riedl, S. J. and Yigong, S. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Molecular Cell Biology* 5:897-907.
- Rotari, V. I.; He, R.; Gallois, P. (2005). Death by proteases in plants: whodunit. *Physiologia Plantarum*. 123: 376-385.
- Ruggiero, C. Considerações Gerais. (1980). In: Ruggiero, C. *A cultura do maracujazeiro*. p.3-6.
- Sah N.K.; Taneja T.K.; Pathak N.; Begum R.; Athar M. and Hasnain S.E. (1999) The baculovirus antiapoptotic *p35* gene also functions via an oxidant-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96: 4838-4843.

- Sambrook, L. Fritsch, E. F. and Maniats, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sarkis C.; Serguera C.; Petres S.; Buche D.; Ridet J.L.; Edelman L. and Mallet J. (2000) Efficient transduction of neural cells in vitro and in vivo by a baculovirus-derived vector. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 14638–14643.
- Shukla, D.D. and Ward, C.W. (1988) Amino acid sequence homology of coat protein as a basis for identification and classification of the potyvirus group. Journal of General Virology 69:2703-2710.
- Sieburth, P.J. and Maruniak, J.E. (1988). Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). In Vitro Cell. Dev. Biol. 24:195-198.
- Soares, J. S. and Ribeiro, B. M. (2005) Pathology of *Anticarsia gemmatalis* larvae infected by two recombinant *A. Gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedroviruses. Research in Microbiology 156:263-269.
- Souza Jr M.T. and Gonsalves D. (1999) Genetic engineering resistance to plant virus diseases, an effort to control *Papaya ringspot virus* in Brasil. Fitopatol. Bras. 24:485-509.
- Takahashi, E. K. (2002). Transferência do gene da atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística. 137 f. Tese Doutorado - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

- Taylor, R. H. An investigation of the viruses which cause woodiness of passionfruit (*Passiflora edulis* Sims.). J. Aust. Inst. Agric. Sci. 25: 71, 1959 (Thesis abst.).
In: Kitajima, E. W.; Chagas, C. M. & Crestani, O. A. (1986) Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiros no Brasil. Fitopatologia Brasileira, 11: 409-432.
- Theilmann, D.A. and Stewart, S. (1991). Identification and characterization of the IE-1 gene of *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. Virology 180: 492-508.
- Thiem, S.M; Du, X. and Quentin, M. A. (1996) Identification of a baculovirus gene *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in nonpermissive insect cell line. Journal of Virology 70 (4): 2221-2229.
- Tschopp, J.; Thome, M.; Hofmann, K. and Meinel, E. (1998) The fight of viruses against apoptosis. Current Opinion in Genetics & Development 8:82-87.
- Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E., Estes, M.K., Lemon, S., Maniloff, J., Mayo, J.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. and Wickner, R. (Eds.) (2000) Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. New York: Academic Press.
- Vaux, D.L. and Silke, J. (2005). IAPs, Rings and ubiquitylation. Molecular Cell Biology. 6:287-297.

- Vucic, D.; Kaiser, W. J.; Harvey, A. J. and Miller, L. K. (1997). Inhibition of Reaper-induced apoptosis by interaction with inhibitor of apoptosis proteins (*IAPs*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:10183-10188.
- Wang, X.; Ooi, B. G. and Miller, L. K. (1991). Baculovirus vectors for multiple gene expression and for occluded virus production. *Gene* 100:131-137.
- Woltering; E.J.; Bent A.V.D. and Hoeberichts F.A. (2002) Do Plant Caspases Exist? *Plant Physiol.* 130: 1764-1769.
- Xu P.; Rogers S.J. and Roossinck M.J. (2004) Expression of antiapoptotic genes *bcl- xL* and *ced- 9* in tomato enhances tolerance to viral-induced necrosis and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 15805–15810.
- Yamada, M. K.; Ohori, O. and Uchimiya, H. (2004). Dissection of *Arabidopsis* Bax Inhibitor-1 Suppressing Bax–, Hydrogen Peroxide–, and Salicylic Acid–Induced Cell Death. *The Plant Cell*, (16) :21-32.
- Yamashiro, T. & Chagas, C. M. Ocorrência de grave moléstia virótica em maracujá amarelo no Est. Bahia. *Anais 5º Congresso Brasileiro de Fruticultura* 915-917, 1979. In: Kitajima, E. W.; Chagas, C. M. & Crestani, O. A. (1986) *Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiros no Brasil.* *Fitopatologia Brasileira*, 11: 409-432.
- Yu, I.; Parker, J. and Bent, A. F. (1998). Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 (13): 7819-7824.

ANEXOS

1. Meios de cultura

1.1. Meios de cultura para cultivo de células de *Escherichia coli*

1.1.1. Meio LB

Tripton, 10g de extrato de levedura, 5g Cloreto de sódio, 10g H₂O, qsp 1 litro
pH 7,0 (autoclavar antes do uso)

1.1.2. Meio LB com ampicilina

Meio LB Ampicilina (50mg/mL) 100 µL

1.1.3. Meio LB sólido

LB acrescido de 1,6% (p/v) de agar bacteriológico
(autoclavar antes do uso)

1. 2. Meios de cultura para tecidos vegetais

1. 2.1. Meio de Regeneração (MR)

4,3g Murashige & Skoog Salt Mixture (Gibco BRL)
10 mL de vitamina B5, 0,1g de inositol, 2,8 g de fitagel, 30 g de sacarose, 1 mg de
BAP 4 g de phytagar, H₂O qsp 1 litro, pH 5,7

1. 2.2. Meio de alongamento

4,3g Murashige & Skoog Salt Mixture (Gibco BRL)
0,05g de myo inositol, 4 g de phytagar, 10 g de sacarose, 50 µL Thiamina HCl, 0,69
mL GA3, 0,093 mL de ANA, H₂O qsp 1 litro, pH 5,7

2. Soluções para southern Blot

2.1. Solução de desnaturação:

25 mL de NaOH 10 N, 150 mL de NaCl 5 M, H₂O qsp 500 mL

2.2. Solução de neutralização:

250 mL de Tris-HCl 1 M, pH 7,2, 150 mL de NaCl 5 M, H₂O qsp 500 mL

2.3. Solução SSC 20X:

175,3 g de NaCl, 88,2 g de Citrato de sódio, H₂O qsp 1L

2.4. Solução Denhardt 50X:

1g de BSA, 1g de Ficoll, 1g de PVP, H₂O qsp 100mL

2.5. Solução pré-hibridização:

12,5 mL de SSC 20X, 5 mL de solução Denhardt 50X, 2,5 mL de SDS 10%, 10 mg/mL de DNA de esperma de salmão, H₂O qsp 50mL

2.6. Solução de lavagem I:

50 mL de SSC 20X, 5 mL de SDS 10%, H₂O qsp 500mL

2.7. Solução de lavagem II:

25 mL de SSC 20X, 5 mL de SDS 10%, H₂O qsp 500mL

2.8. Solução de lavagem III:

2,5 mL de SSC 20X, 5 mL de SDS 10%, H₂O qsp 500mL

Introduction of the anti-apoptotic baculovirus *p35* gene in passion fruit induces herbicide tolerance, reduced bacterial lesions, but does not inhibits passion fruit woodiness disease progress induced by cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)

Daniele Scandiucci de Freitas · Marly C. Felipe Coelho ·
Manoel T. Souza Jr. · Abi Marques · Bergmann Morais Ribeiro

Received: 7 July 2006 / Revised: 25 August 2006 / Accepted: 25 August 2006
© Springer Science+Business Media B.V. 2006

Abstract The introduction of anti-apoptotic genes into plants leads to resistance to environmental stress and broad-spectrum disease resistance. The anti-apoptotic gene (*p35*) from a baculovirus was introduced into the genome of passion fruit plants by biobalistics. Eleven regenerated plants showed the presence of the *p35* gene by PCR and/or dot blot hybridization. Transcriptional analysis of regenerated plants showed the presence of specific *p35* transcripts in 9 of them. Regenerated plants containing the *p35* gene were inoculated with the cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, and the herbicide, glufosinate, (Syngenta). None of the plants showed resistance to CABMV. Regenerated plants (*p35+*) showed less than half of local lesions showed by non-transgenic plants when inoculated with *X. axonopodis* and some *p35+* plants showed increased tolerance to the glufosi-

nate herbicide when compared to non-transgenic plants.

Keywords Apoptosis · Baculovirus · Herbicide tolerance · *Passiflora* · *p35* gene

Introduction

Brazil is the biggest producer of passion fruit (*Passiflora* spp). The total planted area in 2002, according to the Brazilian Institute for Statistics and Geography (IBGE), was 34,778 ha, with a yield of 478,652 fruits. The yield of a crop is dependent on several factors, including climate, soil and phytopathogen control. Phytopathogens cause yield losses in practically all cultivated crops and new, more efficient and cheaper methods for disease control have been developed. One such method is the construction of transgenic crops resistant to fungi, bacteria and viruses.

Programmed cell death (PCD) provides a means to eliminate redundant, damaged or microbe-infected cells; PCD is a physiological and genetically controlled process involved in the selective elimination of unwanted cells during development of multicellular organisms and in their responses to biotic and abiotic stresses (Del Pozo and Lam 2003, Khurana et al. 2005).

In animals, PCD is characterized by a number of hallmark features including cell shrinkage,

D. S. de Freitas · B. M. Ribeiro (✉)
Departamento de Biologia Celular, Univesidade de
Brasília, Brasília, DF CEP 70910-900, Brasil
e-mail: bergmann@unb.br

M. C. F. Coelho · M. T. Souza Jr. A. Marques
Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia
Parque Estação Biológica, PqEB, Av. W5 Norte
(final), Caixa Postal 02372, Brasília, DF 70770-900,
Brasil

plasma membrane blebbing, nuclear condensation, inter-nucleosomal cleavage and externalization of plasma membrane phosphatidylserine, which leads to fragmentation of DNA and formation of apoptotic bodies that migrate to the periphery of the cell for eventual phagocytosis by neighbouring macrophages (Chen and Dickman 2004). In plants, several tissues or whole organs undergo cell death as part of their normal development. Although the mechanisms of plant PCD are far less clear, several morphological and biochemical similarities between PCD in animals and plants have been described in different experimental systems, including condensation and shrinkage of the nucleus and cytoplasm, DNA laddering, and cytochrome c release from mitochondria (Chichkova et al. 2004).

Baculoviruses belong to a group of viruses restricted to arthropod hosts and have been used around the world as biological control agents, expression vectors for foreign genes in insect cells and potential non-human viral vectors for gene therapy (Ghosh et al. 2002). Baculoviruses have two types of anti-apoptotic genes: *p35* and inhibitor of apoptosis (*iap*) genes. They are able to inhibit apoptosis not only in infected insect cells, but also in different organisms. Other organisms also have anti-apoptotic genes, for example the *ced-9* gene in *Caenorhabditis elegans* and the *Bcl-2* gene in humans. These anti-apoptotic genes code for proteins that inhibit directly or indirectly the activity of members of a family of cysteine proteases called caspases (Clem 2001).

The expression of anti-apoptotic genes such as *iap*, *p35*, *bcl-2* and *ced-9* in tobacco or tomato plants suppressed the extensive cell death caused by necrotrophic fungal pathogens and also enhanced resistance to some abiotic stresses such as wounding, salt, cold, UV, and herbicide (Paraquat) treatment (Xu et al. 2004; Chen and Dickman 2004; Lincoln et al. 2002; Dickman et al. 2001; Li and Dickman 2004).

In this work, we have introduced the *p35* gene of a baculovirus into the genome of passion fruit plants and demonstrated that the transformed plants were more tolerant to an herbicide and a bacterial pathogen, *Xanthomonas axonopodis*, pv *passiflorae*. However, no resistance or tolerance was observed for the

infection with the virus cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV).

Materials and methods

Plasmid construction and plant transformation

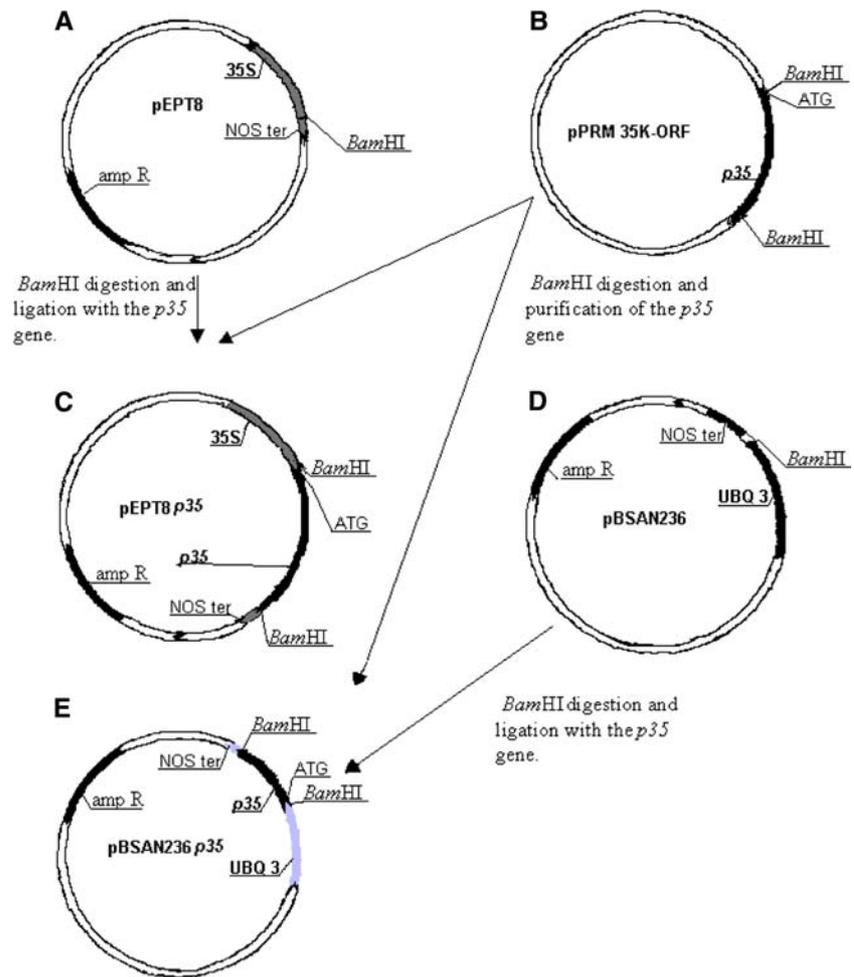
The *p35* gene of the baculovirus, *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), was excised from the plasmid pPRM-35KORF (Hershberger et al. 1994) by *Bam*HI digestion and cloned into the *Bam*HI site of the pEPT8 plasmid (Souza Jr and Gonsalves 1999), under the 35S cauliflower mosaic virus promoter and into the pBSAN236 plasmid (Callis et al. 1995), under the UBQ3 promoter from *Arabidopsis thaliana* (Fig. 1) using standard molecular cloning techniques (Sambrook et al. 1989). The positive clones containing the *p35* gene (pEPT8*p35* and pBSAN236*p35*, respectively) were confirmed by sequencing (ABI Prism 3700, Applied Biosystems).

Passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) hypocotyles were cultivated *in vitro*, and pieces of around 4 mm were removed and transferred to regeneration medium [4.3 g Murashige & Skoog Salt Mixture (Invitrogen), 10 ml B5 vitamin, 0.1 g myo-inositol, 2.8 g Phytigel (Sigma-Aldrich Biotechnology), 30 g sucrose, 1 mg BAP (6-benzilaminopurine), in one liter of water, pH 5.7]. They were maintained at 27° C ± 2 °C with 16/8 h light/dark periods in an environmental chamber. The explants were then bombarded with pEPT8*p35* or pBSAN236*p35*, as described by Aragão et al. (1996) and, after 24 h, the explants were transferred to new regeneration medium. Every 15 days the medium was changed until the plants were regenerated (around 60 days). The regenerated plants were transferred to elongation medium (Murashige & Skoog Salt Mixture and 1 mg zeatin I⁻¹) and when the plants were 5 cm tall, they were transferred and maintained in recipients containing 75%(w/w) soil, 25% (w/w) sand and acclimated in a greenhouse.

DNA analysis of regenerated plants

DNA from regenerated plants were extracted following the protocol described in Sambrook

Fig. 1 Construction of the pEPT8 $p35$ and pBSAN236 $p35$ plasmids used for the transformation of passion fruit plants. Schematic representation of the plasmids pEPT8 (A), pPRM 35K-ORF (B), pEPT8 $p35$ (C), pBSAN236 (D) and pBSAN236 $p35$ (E). The plasmids pEPT8 and pBSAN236 were digested with *Bam*HI and ligated to the $p35$ gene that was removed from the plasmid pPRM 35K-ORF by digestion with the same enzyme. The figure also shows the position of restriction sites, the 35S and UBQ3 promoters, the ampicillin resistance gene (*amp*R) and transcription termination site (NOSter). The plasmids are not drawn to scale



et al. (1989) and a PCR reaction was set up using 50 ng total DNA and $p35$ specific oligonucleotides Acp351-22F (5'-ATGTGTGTAATTTT-TCGGTAG-3') and 443Acp35R (5'-TAGTCGTTGCGTTCGTCGACC-3') or p35F433 (5'-GCAACGACTACTACGTGGC-3') and p35R533 (5'-GCAACGACTACTACGTGGC-3'). As a positive control, 25 ng of the plasmid pPRM-35KORF and, as a negative control DNA, 50 ng from non-transformed plants. The following PCR programmes were used for the two sets of oligonucleotides: 96°C/10 min and 30 cycles of 96°C/1 min, 46°C/1 min and 72°C/1 min (for the first set) or 96°C/10 min and 30 cycles of 96°C/1 min, 56°C/1 min and 72°C/1 min (for the second) in a Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems). The amplified fragments

were analyzed by 1 % agarose gel electrophoresis as described in Sambrook et al. (1989). After electrophoresis, the amplified PCR fragments from the PCR reaction using the pair of oligonucleotides Acp351-22F and 443Acp35R, were transferred to a nitrocellulose membrane (Sambrook et al. 1989), which was incubated with a $p35$ -specific radioactive probe using standard protocols (Sambrook et al. 1989). The radioactive probe was constructed by digesting the plasmid pPRM-35KORF with *Bam*HI, separating the digested fragments in a 1% agarose gel by electrophoresis, and purifying the fragment containing the $p35$ gene using the GFX band prep kit (GE Healthcare) following the manufacturer's instructions. The purified fragment was used for the production of the probe using the Random

Primers Kit (Promega), following the supplier's instructions. The membrane was incubated for 16 h at 65°C with the probe and washed under stringent conditions. The membrane was then exposed to an X-ray film (Kodak) for a week at –80°C and the film was developed as described in Sambrook et al. (1989).

Transcription analysis

Total RNA from transgenic (*p35+*) and non-transgenic plants (0.2 g of fresh leaves) were extracted as described in Sambrook et al. (1989) and used for the production of cDNA using the poli-A specific oligonucleotide T1 (5'-CCTGCAGGATCCTTAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') and the Mu-MLV reverse transcriptase (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. A PCR reaction was set up using Taq DNA Polymerase (Invitrogen), the constructed cDNA and the oligonucleotides T2 (5'-CCTGCAGGATCCTTAGGTT-3'), which is identical to the first 19 bases of the oligonucleotide T1 and the *p35* gene specific oligonucleotide, 433Fcp35 (5'-GCAACGACTACTACGTGGC-3'), which anneals at positions +433 to +451 relative to the start codon of the *p35* gene (GeneBank accession number: M16821). The PCR programme used was the same used for the amplification of the *p35* gene from the transgenic plant genome (see above). In order to confirm the specificity of the transcripts, the amplified PCR fragments were subjected to a new PCR reaction using the p35F433 and p35R533 pair of oligonucleotides following the protocol described above.

Virus inoculation

Leaves (5g) were removed from passion fruit plants infected with passion fruit woodiness disease (PWD), caused by cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) and grinded in 10 ml phosphate buffer pH 7.0 (0.02 m) and the extracts were mechanically inoculated in transgenic and non-transgenic plants (previously treated with an abrasive, carborundum). The inoculated plants were then maintained in a green house and observed daily.

Herbicide treatment

Leaves from one year old passion fruit plants (transgenic and non-transgenic) were collected and washed in 70 % (v/v) ethanol for 1 min, 0.25 % sodium hypochlorite for 15 min and rinsed three times in sterile H₂O. The leaves were then cut into 1 cm² pieces and transferred to Petri dishes containing regeneration medium and 0.06% glufosinate (Syngenta). They were evaluated after 3 and 6 days post-incubation. The experiment was repeated three times.

Bacteria inoculation

Xanthomonas axonopodis pv *passiflorae*, from the Phytopatology Laboratory at University of Brasília, Brazil, was first inoculated in a non-transgenic passion fruit plant for amplification and evaluation of pathogenicity. As soon as the first symptoms appeared (necrotic lesions), bacteria were recovered in culture media and used to inoculate *p35+* plants. All plants were maintained in a humid chamber from 24 to 48 h prior to bacterial inoculation. Two different samples at approximately 10⁶ and 10⁸ cfu of *X. axonopodis*/ml were inoculated by aspersion onto two leaves each. The plants were incubated in a greenhouse and local lesions were counted at day 10.

Results

Construction and selection of transgenic passion fruit plants

The *p35* gene of the baculovirus AcMNPV was introduced into the plasmids pEPT8 and pBSAN236 under the transcriptional control of the 35S and UBQ3 promoters, respectively (Fig. 1). Thirty passion fruit plants from explants bombarded with the plasmids pEPT8*p35* and pBSAN236*p35* were regenerated. DNA analysis by PCR using two sets of oligonucleotides (Acp351-22F/443Acp35R and p35F433/p35R533) and Southern blotting of amplified fragments from one set of oligos (Acp351-22F/443Acp35R) showed the presence of the *p35* gene in 11 regenerated plants (A, B, C, D, E, F, G, H, I,

J, and K) (Fig. 2). Eight out of 11 regenerated plants (A, B, C, D, E, F, G, H) had the *p35* gene under the control of the UBQ3 promoter and three (I, J, K) under the 35S promoter. Another PCR reaction using another set of oligonucleotides (p35F433 and p35R533) showed the presence of a single band of the expected size (100 bp) in the same 11 regenerated plants (Fig. 2C).

The transgenic plants containing the *p35* gene did not show any morphological or developmental alterations when compared to non-transgenic plants.

Transcription analysis

Total RNA from eleven PCR positive plants that were positive for the presence of the *p35* gene were used in a RT-PCR reaction using a poly-A

specific oligonucleotide and a *p35* specific oligonucleotide. An amplification product of around 500 bp was detected in 9 of the 11 transgenic plants (A, C, D, E, F, G, I, J, K) (Fig. 2D). The specificity of the amplified fragment was confirmed by PCR using the p35F433 and p35R533 oligo pair (not shown).

CABMV infection analysis

Eleven regenerated plants (*p35*+) and control plants were inoculated with CABMV-infected passion fruit leaf extracts and analyzed for symptoms. None of the transformed plants showed resistance to CABMV. Fifteen days after incubation, control plants and some regenerated plants (B, E, H, I, J and K) showed mosaic symptoms (Fig. 3). Twenty days after inoculation some regenerated plants (A, C, D, F and G) showed

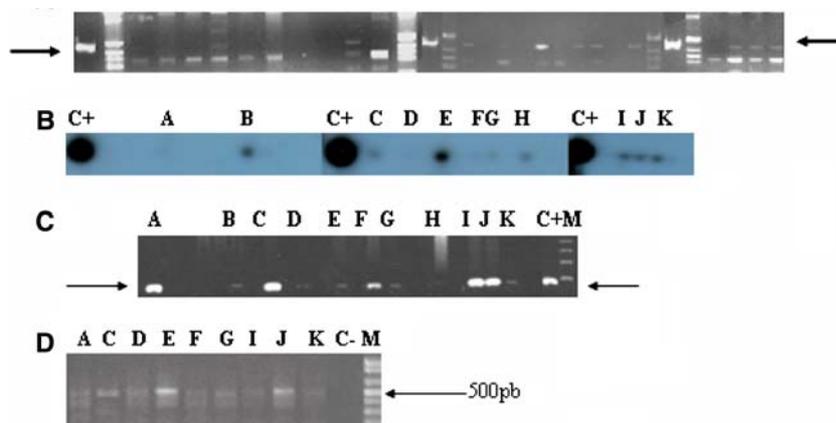
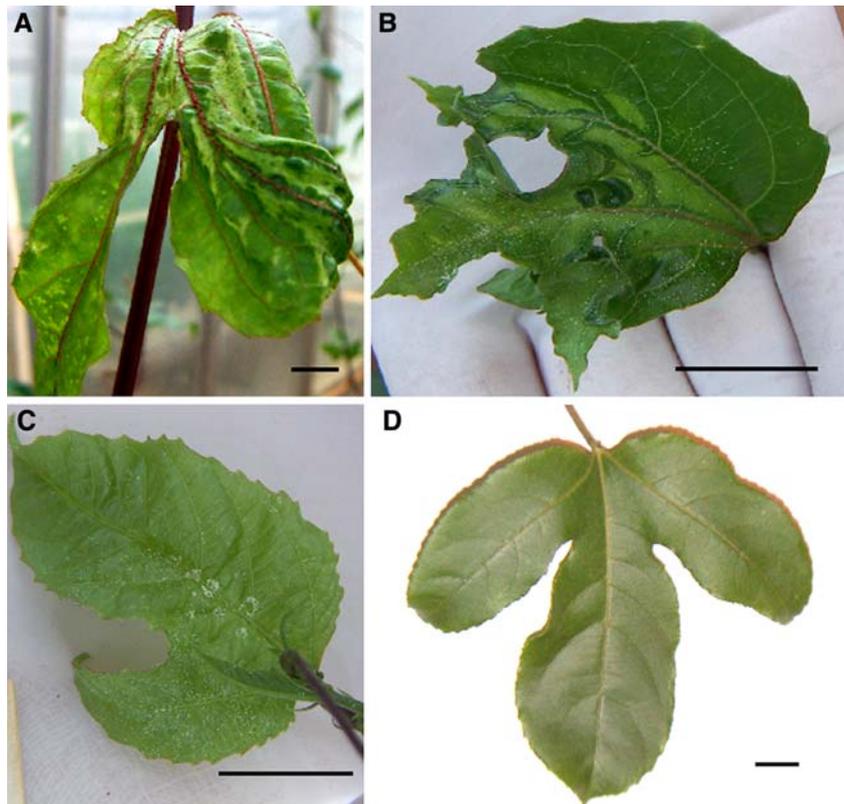


Fig. 2 Detection of the *p35* gene and *p35* transcripts in regenerated passion fruit plants. **(A)** Agarose gel (0.8%) electrophoresis of PCR products from regenerated plants using oligonucleotides specific for the *p35* gene (Acp351–22F and 443Acp35R). The expected amplified product of 457 bp (arrow) and non-specific fragments were amplified in 11 plants (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J and K). C+ shows the amplification of the *p35* gene using the same oligonucleotides and DNA from the plasmid pEPT8*p35* as a positive control. M indicates the molecular mass marker 1 Kb DNA ladder (Invitrogen). **(B)** Autoradiograph of a Southern blot using a membrane containing the DNAs from the agarose gel shown in A. Only the plants that showed the expected PCR fragment were labelled, indicating the specificity of the amplified fragment. The probe was constructed using the *p35* gene radiolabelled with P^{32} . **(C)** Agarose gel (0.8%) electrophoresis of PCR

products from regenerated plants using a second pair of oligonucleotides specific for the *p35* gene (p35F433 and p35R533). The expected amplified product of 100 bp (arrow) was amplified from the DNA of the same 11 plants detected with the first PCR reaction using a different pair of oligonucleotides. M indicates the molecular mass marker 123-bp DNA marker (Invitrogen). C + is the same as in A. **(D)** Agarose gel electrophoresis (0.8%) of RT-PCR products from mRNA extracted from regenerated passion fruit plants. Eight (A, C, D, E, F, G, I, J and K) out of eleven plants yielded an expected amplicon of around 500 bp, indicating the *p35* gene was transcribed in these plants. M = molecular mass marker 100 bp DNA ladder (BioLabs). The specificity of the amplified fragment was confirmed by PCR using the p35F433 and p35R533 oligo pair (not shown)

Fig. 3 Leaf symptoms in transgenic and non-transgenic passion fruit plants induced by *cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). Transgenic and non-transgenic plants were inoculated with CABMV and analyzed for symptoms during 45 days. All plants (transgenic and non-transgenic) showed the presence of mosaicism (**A** and **B**), leaf malformation (**B**) and chlorosis (**C**). (**D**) shows a healthy (not inoculated) leaf from a non-transgenic plant. Bar = 2 cm



chlorotic and deformed leaves (Fig. 3). One month after inoculation, the same plants that showed chlorotic leaves and malformation had progressed to death of tendril and apical bud. At 45 days after inoculation, the new buds from these regenerated plants started showing mosaic symptoms and deformed leaves, similar to non-transgenic control plants.

Herbicide treatment

One square centimetre pieces of leaves from control and eleven regenerated plants (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, and K) were incubated on Petri dishes with or without 0.06% glufosinate. Leaf pieces from control plants incubated with the herbicide (Ck+) showed a substantial fading of the green colour (chlorophyll). Leaf pieces from some regenerated plants (C, F and I) treated with herbicide showed results similar to control plants that were not treated with herbicide, that is, little or no chlorophyll loss. Other

leaf pieces (A, D, G, J and K) showed some loss of chlorophyll and leaf pieces B, E and H showed the same loss as control plants treated with herbicide (Fig. 4). Transgenic plants pulverized with the herbicide (0.06% glufosinate) showed small lesions on leaves after seven days. Conversely, non-transgenic plants lost all leaves in seven days and died in up to ten days (data not shown). Furthermore, transgenic plants survived three times longer than non-transgenic ones (data not shown).

Bacteria inoculation

Leaves of seven *p35+* regenerated plants (A, B, D, F, I, J and K) and two control plants were inoculated, respectively with 10^6 and 10^8 cfu of *X. axonopodis*/ml. Most of the leaves (A, D, F, I, J and K) displayed small local lesions (1–2 mm) that were in number less than half of the amount of lesions in non-transgenic plants (Table 1). Furthermore, the lesions in *p35+*

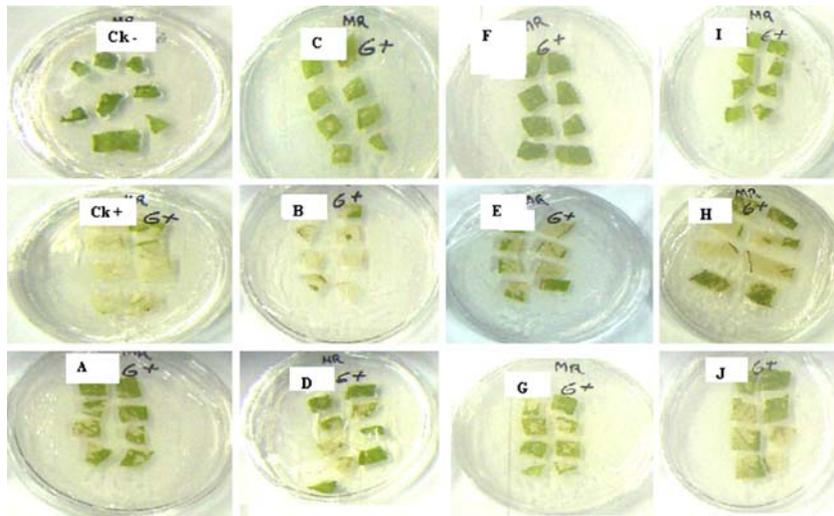


Fig. 4 Herbicide effects on leaves from transgenic and non-transgenic plants. One square centimetre leaf pieces from control and eleven regenerated plants (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J and K) were incubated on Petri dishes with or without 0.06% glufosinate. Leaf pieces from control plants incubated with the herbicide (Ck+) showed a remarkable fading of their green colour (chlorophyll). Leaf pieces

from some regenerated plants (C, F and I) treated with herbicide showed similar results as the control plants that were not treated with herbicide, with little or no loss of chlorophyll. Other leaf pieces [A, D, G, J and K (not shown)] showed some loss of chlorophyll whereas pieces B, E and H showed the same loss of chlorophyll as the control plants treated with herbicide

Table 1 Number of *X. axonopodis* induced lesions on leaves of transgenic and non-transgenic passion fruit plants. Around 10^6 and 10^8 cfu of *X. axonopodis*/ml were inoculated by aspersion on two leaves each and the plants were incubated in greenhouses and observed daily for the appearance of local lesions. The number of lesions was counted at day 10. The results are the average of lesion number of the two leaves

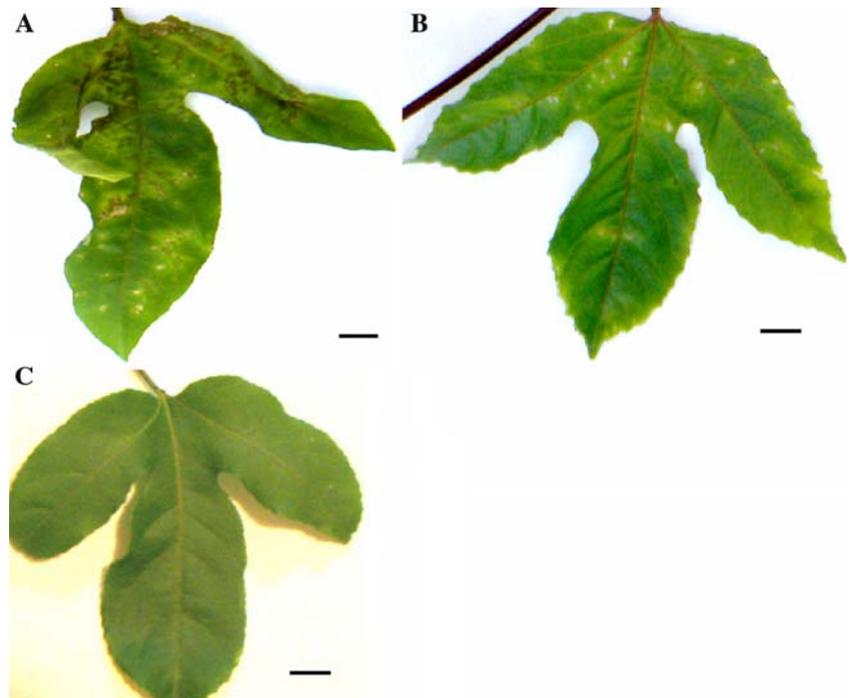
Plant	Number of leaf lesions caused by inoculation with <i>X. axonopodis</i> at:	
	10^6 c.f.u./ml	10^8 c.f.u./ml
Non-transgenic plant 1	23	80
Non-transgenic plant 2	20	88
A	11	32
C	3	30
F	10	40
I	2	42
J	3	6
K	13	18

plants appeared later (10 days after inoculation) than in non-transgenic plants (7 days after inoculation) (Fig. 5). Lesions in two *p35+* plants (B and H) were of comparable size to those in control plants.

Discussion

Plants undergo programmed cell death in response to several stimuli, such as senescence, or in response to pathogens and environmental stresses. Transgenic plants expressing anti-apoptotic genes show resistance to environmental stresses and necrotrophic pathogens (Khurana et al. 2005). In this work, we have introduced the anti-apoptotic *p35* gene from a baculovirus into the genome of passion fruit and analyzed the response of transgenic plants to viral and bacterial infections and to herbicide treatment. None of the transgenic plants showed developmental alteration when compared to non-transgenic plants. Xu et al. (2004), constructed transgenic tomato plants containing anti-apoptotic genes *bcl-xL* and *ced-9* and demonstrated that those plants had a reduced growth. This effect was also observed in transgenic tobacco plants containing the *bcl-2*, *bcl-xL* or *ced-9* genes (Dickman et al. 2001). However, Del Polzo and Lam (2003), like us, could not detect changes on growth of tobacco plants expressing baculovirus anti-apoptotic genes (*iap* or *p35*).

Fig. 5 Bacterial lesions on leaves of transgenic and non-transgenic passion fruit plants. Leaves of seven *p35+* regenerated plants and control plants were inoculated with 10^6 and 10^8 cfu of *Xanthomonas axonopodis*/ml respectively. Most *p35+* plants (**B**) showed small local lesions (1–2 mm) 10 days after inoculation, and their number was half of that observed in control plants (**A**), which appeared 7 days after inoculation. (**C**) Healthy, non-transgenic and not inoculated leaf. Bar = 2 cm



The infection by CABMV is characterized by the development of deformed small hard fruits and also mosaic symptoms in leaves; infected plants show low yield of fruits and die sooner (Nascimento et al. 2006). None of the transformed plants was resistant to CABMV, all of them showing the presence of chlorosis, mosaicism and leaf malformation (Fig. 3). However, initial symptoms in some plants (A, C, D, F, G) were somewhat different from non-transformed plants (not shown) and showed chlorotic leaves as first symptom and then their growth was delayed until the establishment of disease at 45 days post inoculation. Tobacco plants expressing the anti-apoptotic genes *bcl-2*, *bcl-xL* and *ced-9* showed increased resistance to the tomato spotted wilt virus (TSWV), with fewer local lesions and preventing of the systemic spread of the virus (Dickman et al. 2001). Similar results were obtained with tomatoes expressing the *bcl-xL* and *ced-9* genes, when inoculated with cucumber mosaic virus D satRNA (CMV/D), demonstrating that in transgenic plants the expression of anti-apoptotic genes suppressed tomato PCD and altered the necrotic phenotype that occurs in CMV/D-infected non-transgenic

tomato into more attenuated symptoms (Xu et al. 2004).

The herbicide glufosinate inhibits the glutamine synthetase enzyme, causing accumulation of ammonia, which in turn induces free radicals production that are toxic to plants (Chen and Dickman 2004). We observed glufosinate tolerance in eight plants (A, C, D, F, G, I, J and K), whereas three were not tolerant (B, E and H). Some transgenic plants (C, F and I) showed more tolerance than others. The P35 protein from AcMNPV is capable of inhibiting programmed cell death induced by different stimuli, including oxidative stress (Sah et al. 1999). Therefore, this could explain the increased tolerance of the transgenic passion fruits plants to the herbicide used in this work. Chen and Dickman (2004) also obtained increased herbicide tolerance in tobacco expressing anti-apoptotic genes (*bcl-2*, *bcl-xL* or *ced-9*).

Xanthomonas axonopodis can cause severe disease in passion fruit and a great reduction in longevity, from the normal 3 to 4 years to something between 12 and 18 months (Ponte, 1996). The early death occurs at the end of the rainy season, and the pathogen induces small

lesions in the leaves of around 1–2 mm in diameter, usually close to the venation. In severe infections, it can cause complete loss of leaves and death of the affected part or the whole plant itself. *X. axonopodis* induced fewer lesions in leaves from *p35+* plants when compared to non-transgenic plants. Lincoln et al. (2002), also showed that transgenic *p35+* tomato plants were protected against cell death induced by a fungal toxin (AAL-toxin from *Aternaria alternata* f. sp *lycopersici*) and other necrotrophic pathogens (*Pseudomonas syringae* pv tomato and *Colletotrichum coccodes*), leading to protection against the diseases caused by these pathogens.

We did not detect *p35* transcripts in only two *p35+* plants (B and H). These two plants and another one (E) also were not tolerant to herbicide and *X. axonopodis*. These differences in tolerance may be attributable to different expression levels of P35 in the transgenic plants, which could reflect differences in the insertion of the *p35* gene into the plant genome and in copy number.

This work shows for the first time that the introduction of a baculovirus anti-apoptotic gene into the genome of passion fruit results in an increased tolerance to a herbicide and to *Xanthomonas axonopodis*.

Acknowledgements We would like to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for a PhD grant to Daniele S. Freitas. We also acknowledge Dr. Nilton Junqueira from Embrapa Cerrados for the CABMV virus samples and Dr. Marisa Ferreira from the Phytopathology Department in University of Brasília for the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*. We are also much indebted to Hugo Costa Paes for text draft revision.

References

- Aragão FJL, Barros LMG, Brasileiro ACM, Ribeiro SG, Smith FD, Sanford JC, Faria JC, Rech EL (1996) Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theor Appl Genet* 93:142–150
- Callis J, Carpenter T, Sun C, Vierstra RD (1995) Structure and evolution of genes encoding poly-ubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Genetics* 139:921–939
- Chen S, Dickman MB (2004) Bcl- family members localize to tobacco chloroplasts and inhibit programmed cell death induced by chloroplast-targeted herbicides. *J Exp Bot* 8:1–7
- Chichkova NV, Kim SH, Titova LS, Kalkum M, Morozov VS, Rubtsov YP, Kalinina NO, Taliansky ME, Vartapetian AB (2004) A Plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *The Plant Cell* 16:157–171
- Clem RJ (2001) Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death Differ* 8:137–43
- Del Pozo O, Lam E (2002) Expression of the Baculovirus p35 protein in tobacco affects cell death progression and compromises N gene-mediated disease resistance response to Tobacco mosaic virus. *Mol Plant-Microbe Interac* 16:485494
- Dickman MB, Park VK, Oltersdorf T, Li W, Clemente T, French R (2001) Abrogation of disease development in plants expressing animal anti-apoptotic genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6957–6962
- Ghosh S, Parvez KM, Banerjee K, Sarin SK, Hasnain SE (2002) Baculovirus as Mammalian Cell Expression Vector for Gene Therapy: An Emerging Strategy. *Mol Ther* 6:6–11
- Hershberger PA, La Count DJ, Friesen PD (1994) The apoptotic suppressor P35 is required early during baculovirus replication and is targeted to the cytosol of the infected cells. *J Virol* 68:3467–3477
- Khurana PSM, Pandey SK, Sarkar D, Chanemougasoundharam A (2005) Apoptosis in plant disease response: a close encounter of pathogen kind. *Curr Sci* 88:740–752
- Li W, Dickman MB (2004) Abiotic stress induces apoptotic-like features in tobacco that is inhibited by expression of human Bcl-2. *Biotechnol Lett* 26:87–95
- Lincoln JE, Richael C, Overduin B, Smith K, Bostock R, Gilchrist DG (2002) Expression of the anti-apoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15217–15221
- Nascimento AVS, Santana EM, Braz ASK, Alfenas PF, Pio-Ribeiro G, Andrade GP, Carvalho MG, Zerbini FM (2006) Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. *Arch Virol* Published online April 7, 2006
- Ponte JJ (1996) *Clinica de doenças de plantas*. Editora UFC, Fortaleza
- Sah NK, Taneja TK, Pathak N, Begum R, Athar M, Hasnain SE (1999) The baculovirus anti-apoptotic p35 gene also functions via an oxidant-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4838–4843
- Sambrook L, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Souza Jr MT, Gonsalves D (1999) Genetic engineering resistance to plant virus diseases, an effort to control Papaya ringspot virus in Brasil. *Fitopatol Bras* 24:485–509
- Xu P, Rogers SJ, Roossinck MJ (2004) Expression of antiapoptotic genes bcl- xL and ced- 9 in tomato enhances tolerance to viral-induced necrosis and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15805–15810