

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

Transformação genética em macieira com o  
gene *bv1*

Raquel Rosa da Costa

Pelotas, 2011

**Raquel Rosa da Costa**

Transformação genética em macieira com o gene *bvI*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Biotecnologia Vegetal).

Orientador: José Antonio Peters  
Co-Orientador (es): Luciano da Silva Pinto  
Juliana Degenhardt

Pelotas, 2011

**Dados de catalogação na fonte:**

Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C837t      Costa, Raquel Rosa da  
              Transformação genética em macieira com o gene *bv1* /  
              Raquel Rosa da Costa. – 51f. : tab. – Dissertação (Mestrado).  
              Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade  
              Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico,  
              2011. – Orientador José Antônio Peters ; co-orientador  
              Juliana Degenhardt, Luciano da Silva Pinto.

              1.Biotecnologia vegetal. 2.Macieira. 3.*Malus domestica*  
              Borkh. 4.Lecitina. 5.*Coletotrichum gloeosporioides*.  
              6.*Agrobacterium*. 7.Regeneração. I.Peters, José Antônio.  
              II.Degenhardt, Juliana. III.Pinto, Luciano da Silva. IV.Título.

CDD: 634.11

**Banca examinadora:**

Dr. José Antônio Peters – Departamentode de Botânica/UFPeI

Dra. Elizete Beatriz Radmman – Departamento de Botânica/UFPEL

Dra. Fabiana Ross Nora - Centro de Desenvolvimento Tecnológico-CDTec

Dra. Luciana Bicca Dode – Centro de Desenvolvimento Tecnológico-CDTec

*À minha família...*

*Meus pais Aites Matias e Eni Rosa;*

*À todos que torceram para esta conquista, que acreditaram em mim, me apoiando e incentivando, nesta etapa importante da minha vida.*

*Dedico*

## Agradecimentos

A Deus pela saúde, força, sabedoria, fidelidade e por mais esta conquista.

Ao CNPQ pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Federal de Pelotas e ao programa de Pós Graduação em Biotecnologia pela oportunidade para a realização deste projeto.

A Embrapa, ABPM e FINEP pelo financiamento e oportunidade de novos conhecimentos.

A Pesquisadora Juliana Degenhardt pela confiança, amizade, confidências incentivo e ensinamento para a realização deste trabalho.

Ao prof. José Antonio Peters pelo incentivo, confiança, amizade, conselhos, dedicação, paciência, ensinamentos e lição de vida.

Ao prof. Luciano da Silva Pinto por ter aceitado ser meu co-orientador, pela amizade, incentivo, paciência, ensinamentos e pelas boas brincadeiras.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pela amizade.

Aos colegas Relber e Paula pelo companheirismo e solidariedade.

Aos amigos Rodrigo e William, pela ajuda, para a realização deste trabalho e pela amizade.

As amigas Elizete, Daiane, Letícia, Luciana, Isabel, Juliana, Monalize e Cibele pela amizade, companheirismo, momentos de alegria e aprendizado.

A amiga Tati pela amizade, ajuda nesta reta final, companheirismo e incentivo.

Aos Professores Valmor e Eugênia do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas que me acolheram com muita simpatia.

Aos amigos Michele, André, Tais, Camila, Isane, Luciana Kruger, Leticia, Ciane, Gabriela por estarem sempre ao meu lado me incentivando e pelos gestos de carinho e amizade.

Aos meus familiares, tios e tias , primos e primas pela compreensão, carinho e amor.

A Deus mais uma vez pelos pais maravilhosos, Eni e Aites que sempre estiveram ao meu lado me incentivando, dando força, amor, carinho, amizade, cumplicidade, por terem sempre compreensão em todos os momentos da minha vida.

## Resumo

COSTA, RAQUEL ROSA. Transformação genética em macieira, com o gene *bvI*. 2011. 48f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O objetivo principal do presente trabalho foi introduzir o gene *bvI* com potencial antifúngico confirmado da lectina de *Bauhinia variegata*, em macieira (*Malus domestica* Borkh), cv. Gala, para estabelecer resistência ao fungo *Coletotrichum gloeosporioides*, causador da Mancha Foliar. Foram realizados experimentos de multiplicação *in vitro*, regeneração de explantes foliares e, dois protocolos de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* visando a inserção do gene *bvI*. Na multiplicação de brotações o meio que apresentou melhores resultados foi o MS suplementado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA e 8,3 mg L<sup>-1</sup> de 2iP e, para a regeneração as melhores respostas foram obtidas com meio MS, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sorbitol, 0,5 mg L<sup>-1</sup> ANA e 5 mg L<sup>-1</sup> de TDZ, atingindo um percentual de 94,5% de regenerações. Quanto aos protocolos de transformação, o que apresentou melhores resultados foi o protocolo P1, no qual através da análise de PCR foram obtidas 15% de brotações contendo o gene *bvI*. No entanto, a expressão da proteína BVLI não foi detectada através de Dot Blot, indicando a necessidade de novos procedimentos, como refinamento do protocolo de extração de proteínas, bem como utilização de outras técnicas de análises, como Real Time.

Palavras-chave: Lectina, *Coletotrichum gloeosporioides*, *Agrobacterium*, Regeneração.

## Abstract

COSTA, RAQUEL ROSA. Genetic transformation in apple, with gene *bvI*. 2011. 48f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The main objective of this work was to introduce the gene *bvI* with confirmed potential antifungal of lectin from *Bauhinia variegata*, Apple Tree (*Malus domestica* Borkh) cv. Gala, to establish resistance to fungus *Coletotrichum gloeosporioides*, causing Leaf Spot. Multiplication experiments were performed *in vitro* regeneration of leaf explant culture and two protocols via *Agrobacterium tumefaciens* transformation aimed at inserting the gene *bvI*. The multiplication of shoots the medium that has best results was MS supplemented with 0.1 mg L<sup>-1</sup> ANA and 8.3 mg L<sup>-1</sup> 2iP and, for the regeneration of the best responses were obtained with using MS, supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> sorbitol, 0.5 mg L<sup>-1</sup> ANA and 5 mg L<sup>-1</sup> TDZ, reaching a rate of 94.5% of regenerations. As regards the processing protocols, which showed best results was the P1 Protocol, which through analysis of PCR were obtained 15% shoots containing the gene *bvI*. However, the expression of BVLI protein was not detected by Dot Blot, indicating the need for further procedure, such as refinement of protein extraction protocol, as well as utilization other techniques of analyses, such as Real Time.

Keywords: Lectin, *Coletotrichum gloeosporioides*, *Agrobacterium*, Regeneration.



## Lista de Figuras

### Capítulo 1 - OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE MULTIPLICAÇÃO E REGENERAÇÃO *in vitro* DE MACIEIRA, cv.GALA

- Figura 1      Regeneração explantes foliares de macieira, cv. Gala, aos 30 dias de cultivo em meio Reg2, suplementado com sorbitol 30 g L<sup>-1</sup>, 5 mg L<sup>-1</sup> TDZ e 0,5 mg L<sup>-1</sup> ANA.....24
- Figura 2      Brotações formadas a partir de explantes foliares de macieira, cv. Gala, aos 50 dias de cultivo em meio suplementado com sorbitol 30 g L<sup>-1</sup> e (A) 3 mg L<sup>-1</sup> 2iP, (B) 2 mg L<sup>-1</sup> 2iP.....26

### Capítulo 2 - TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA via *Agrobacterium tumefaciens* VISANDO A OBTENÇÃO DE PLANTAS RESISTENTES AO FUNGO *Colletotrichum gloesporioides*

- Figura 1      Representação da construção do vetor pGA643-*bvI*. O gene *bvI* foi inserido no sítio de múltipla clonagem entre as enzimas de restrição *XbaI* e *BglI*.....33
- Figura 2      Explantes foliares e brotações de macieira cv. Gala após a infecção por *A. tumefaciens* utilizando o Protocolo P1. (A) Explantes foliares após a infecção em meio de co-cultivo. (B) Controle negativo, com canamicina 50 mg L<sup>-1</sup>. (C) Controle positivo, sem canamicina. (D) Brotação infectada por *A. tumefaciens* aos 60 dias cultivada em meio MS com 2 mg L<sup>-1</sup> de 2iP. (E) Brotos em meio de multiplicação com 90 dias de cultivo, suplementado

com 0,1 ANA mg L<sup>-1</sup> 8,3 mg L<sup>-1</sup> de 2iP. (F) Clones de brotaçã  
sobreviventes em meio de multiplicação com canamicina 50 mg L<sup>-1</sup>.....39

Figura 3 PCR de clones macieira, cultivar Gala. Verificação da inserção do gene  
nos clones analisados. Análise do produto de PCR por eletroforese em  
gel. Marcador molecular (M) (100 pb DNA ladder), PC (gene *bvI* controle),  
(P 06, 11, 01) confirmação da inserção do  
gene.....40

Figura 4 Análise de Dot Blot para verificação da inserção de proteína, do gene *bvI*,  
nos clones da Planta 1 (3.3 e 1.1), utilizando como controle negativo  
Planta N.T (não transformada) e BSA e contole positivo BVL  
Nativa.....40

## Lista de Tabelas

### Capítulo 1 - OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE MULTIPLICAÇÃO E REGENERAÇÃO *in vitro* DE MACIEIRA, cv. GALA

Tabela 1	Composição meio de regeneração de brotações cv. Gala.....	20
Tabela 2	Análise de variância do número e comprimento médio de brotações, de macieira cultivar Gala, em diferentes meios de cultura.....	22
Tabela 3	Número médio de brotos formados e comprimento de explantes de macieira cultivar Gala, em diferentes meios de cultura.....	22
Tabela 4	Análise de variância para número médio de regenerantes e brotações de macieira cultivar Gala, em diferentes meios de cultura.....;	23
Tabela 5	Número de explantes regenerados e porcentagem de regeneração de brotações de macieira, cultivar Gala, em diferentes meios de cultura.....	23
Tabela 6	Análise de variância para número médio de brotações de macieira, cultivar Gala, em diferentes meios de cultura.....	25
Tabela 7	Número médio de brotações de macieira, cultivar Gala, em diferentes concentrações de 2iP T(1) – 0 mg L <sup>-1</sup> , T(2) – 2 mg L <sup>-1</sup> , T(3) - 3mg L <sup>-1</sup> .....	25
Tabela 8	Número médio de brotações de macieira, cultivar Gala, em diferentes dias de avaliação (7, 14, 21).....	26

Capítulo 2 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA via *Agrobacterium tumefaciens*  
VISANDO A OBTENÇÃO DE PLANTAS RESISTENTES AO FUNGO *Colletotrichum gloesporioides*

Tabela 1	Primers usados na construção do vetor pGA/bvII.....	33
Tabela 2	Composição do meio de co-cultivo e regeneração.....	36
Tabela 3	Eventos de transformação P1 somente com explantes regenerados aos 40 dias multiplicados aos 60 dias de macieira, cultivar Gala.....	38
Tabela 4	Eventos de transformação P2 com explantes regenerados aos 40 dias multiplicados aos 60 dias de macieira, cultivar Gala.....	39

## SUMÁRIO

1 Introdução Geral.....	14
2 CAPÍTULO 1 .....	17
OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE MULTIPLICAÇÃO E REGENERAÇÃO <i>in vitro</i> DE MACIEIRA, cv. GALA .....	17
2.1 Introdução .....	17
2.2 Materiais e Métodos .....	18
2.2.1 Efeito de diferentes citocininas e auxinas na multiplicação <i>in vitro</i> .....	18
2.2.2 Efeitos de diferentes citocininas e auxinas na indução e desenvolvimento de brotações. ....	19
2.2.3 Delineamento experimental e análise estatística .....	20
2.3 Resultados .....	21
2.3.1 Efeito de diferentes citocininas e auxinas na taxa de multiplicação.....	21
2.3.2 Efeitos de diferentes citocininas e auxinas na indução e desenvolvimento de brotações .....	22
2.4 Discussão .....	26
2.5 Conclusão .....	29
3. CAPÍTULO 2 .....	30
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> VISANDO A OBTENÇÃO DE PLANTAS RESISTENTES AO FUNGO <i>Colletotrichum gloesporioides</i> .....	30
3.1 Introdução .....	30
3.2 Materiais e Métodos .....	32
3.2.1 Material Vegetal .....	32

3.2.2 Construção do plasmídeo e clonagem do gene <i>bvl</i> em vetores de expressão em plantas .....	32
3.2.3 Transformação genética .....	34
3.2.4 Regeneração e multiplicação dos explantes foliares infectados .....	36
3.2.5 Análise de reação em cadeia polimerase (PCR) .....	36
3.2.6 Análise de Dot Blot .....	37
3.3 Resultados .....	37
3.3.1 Transformação genética .....	37
3.3.2 Análise de reação em cadeia polimerase .....	40
3.3.3 Análise Dot Blot .....	40
3.4 Discussão .....	41
3.5 Conclusão .....	43
3.6 Referências.....	44

## 1 Introdução Geral

A macieira (*Malus domestica* Borkh), pertence à família Rosaceae, originária das montanhas do Cáucaso, Oriente Médio e Leste Asiático. Bastante cultivada na Ásia e Europa desde os tempos mais antigos, é hoje cultivada em várias regiões do mundo (BLEICHER, 2006). A produção de maçã no mundo é de 64,3 milhões de toneladas, o que a torna, uma das principais frutíferas de clima temperado e a terceira mais produzida no mundo (FAO, 2009). O plantio de macieira no Brasil está concentrado nos estados da região Sul, onde a área plantada ultrapassa 30.000 ha, possuindo uma cadeia produtiva própria, que possibilitou o país passar da posição de importador para exportador.

Atualmente a produção brasileira se concentra em duas cultivares: Gala e Fuji e diversas mutações destas, que possuem características como coloração, sabor e facilidade de conservação, fazendo com que tenham grande aceitação do mercado consumidor. A cultivar Gala responde por mais de 50% da produção nacional e 95% da exportação e do consumo. A disponibilidade de maçãs ocorre praticamente durante todo o ano, com excessão apenas nos meses de janeiro e fevereiro (TODAFRUTA, 2006).

Apesar desta frutífera ser uma das espécies mais consumidas, várias são as dificuldades encontradas para o seu cultivo. No Brasil a cultura da macieira está sujeita ao ataque de inúmeras doenças típicas de clima tropical, devido às condições climáticas marginais que acarretam diminuição na produção e aumento o uso de bactericidas e fungicida conforme (PETRI, 2002). Dentre as doenças destaca-se a Mancha Foliar da Gala (MFG), conhecida também como Mancha Foliar de *Glomerella*, que é causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* e, que ocorre praticamente em todas as regiões produtoras de maçã no Brasil, causando um desfolhamento superior a 75% e diminuindo drasticamente a produção no ano seguinte (BONETI et al.2004; EPAGRI, 2002).

Assim, uma das prioridades atuais dos programas de melhoramento, é a obtenção de plantas com maior resistência a estresses bióticos e abióticos, através de cruzamentos entre cultivares que apresentem genes de resistência (FURLAN et al.,

2009). No entanto, estes métodos apresentam resultados precários quanto à obtenção de plantas resistentes a MFG (ALDWINCKLE, 2000). Além disso, os métodos tradicionais de melhoramento demandam longo prazo, pois, depende de vários cruzamentos e ciclos de seleção e também por ser restringido a espécies com reprodução sexuada (MONQUERO, 2005).

Tendo em vista as dificuldades decorrentes do melhoramento genético tradicional, ferramentas biotecnológicas, como a transformação genética que pode ser definida como, a introdução controlada de ácidos nucleicos exógenos em um genoma receptor alterando a estrutura genética de um organismo, sem comprometer a viabilidade celular, possibilitam a abertura de novas perspectivas aos programas de melhoramento, ampliando e disponibilizando novos genes (PEREIRA et al., 2000; SANTARÉN, 2000).

A transformação é uma técnica que pode auxiliar em programas de melhoramento genético pela introdução de uma nova característica ou a alteração de uma preexistente, em cultivares ou genótipos já melhorados, sem modificar a estrutura genética global da planta e possibilita o uso de alternativas genotípicas desejáveis não encontradas com facilidade na natureza. Plantas transgênicas são também importantes ferramentas para estudos moleculares de função e expressão de genes, de processos fisiológicos e de desenvolvimento vegetal (VALOIS, 2001).

Na transformação genética a introdução de genes de interesse acontece de forma direta ou indireta. A transformação indireta via *Agrobacterium tumefaciens* necessita de um vetor para intermediar este processo, pois ocorre a infecção natural nas células de plantas, transferindo e integrando um fragmento de DNA no genoma das células de plantas infectadas (LEE et al., 1995). Porém, a escolha do gene de interesse é uma etapa que também exerce grande importância, visto que, este será o portador das características de interesse a serem introduzidas na planta.

Dessa forma, a utilização de lectinas que possuem como funções interação entre plantas e microorganismos e defesa contra o ataque de fungos, vírus, bactérias e insetos, entre outros, torna-se uma alternativa para transformação genética. (LIENER et al., 1986; RUDIGER, 1998). Nesse sentido, vários estudos têm sido realizados com plantas de *Bahuinia variegata*, que é uma planta medicinal e portadora de pelo menos



duas isoformas, as lectinas (BVLI e BVLII) que se ligam a D-Lactose, D-Galactose e seus derivados apresentando vários efeitos biológicos, dentre eles, a capacidade de inibir o desenvolvimento inicial de fungos como o *Coletotrichum gloeosporioides* (PINTO et al., 2008).

Nesse contexto, a transformação genética aliada a cultura de tecidos, necessita de um protocolo eficiente de regeneração *in vitro* para a introdução do gene de interesse. A regeneração pode ocorrer através de organogênese e embriogênese, as quais podem ser diretas, sem formação de calos, ou indireta ocorrendo a partir de células do calo na região do corte, antes da formação do órgão (TELLES; BIASI 2005). A organogênese direta é a mais desejável quando se espera fidelidade genética, visto que, diminui a ocorrência de variação somaclonal (DHANDAPANI, 2008). No entanto, essas técnicas tornam-se altamente promissoras para a obtenção de avanços consideráveis, no melhoramento de macieira (SILVEIRA et al., 2001).

Diante do exposto acima, o presente trabalho objetivou a otimização de um protocolo de regeneração eficiente de plantas geneticamente modificadas, de macieira, cv. Gala, via *A. tumefaciens* e inserção do gene *bvI* visando a tolerância e/ou resistência ao fungo *C. gloeosporioides*.

## 2 CAPÍTULO 1

### OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE REGENERAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE MACIEIRA, cv. GALA

#### 2.1 Introdução

A macieira por ser uma das principais frutíferas de clima temperado, apresenta alto grau de heterozigosidade e longo ciclo reprodutivo, dificultando e aumentando o tempo necessário para obtenção de plantas com novas características, através de um programa de melhoramento genético por meio de métodos convencionais, necessitando a aplicação de tecnologias mais ágeis. Assim, a técnica de cultura de tecidos, através da micropropagação de plantas vem sendo aplicada rotineiramente para um grande número de espécies de importância econômica, e representa uma das formas mais viáveis de propagar plantas isentas de viroses na cultura de meristemas (PEREIRA et. al., 2005).

Na etapa de multiplicação *in vitro*, a capacidade dos explantes de sobreviverem, desenvolverem e se multiplicarem é consequência de vários fatores, como o genético, o estado fisiológico do explante, as concentrações endógenas de hormônios e condições ambientais de cultivo (MACHADO et al., 2004). Dentre esses fatores os reguladores de crescimento são de fundamental importância e, as citocininas são as mais destacadas nesta classe, por apresentarem a propriedade de superar a dominância apical dos brotos e aumentar a taxa de multiplicação (ERIG; SCHUCH, 2006; MORAES et al., 2010; SILVEIRA et al., 2001).

De acordo com Peres (2002), o efeito diferencial dos vários tipos de citocininas, quando aplicados ao meio de cultura, pode estar relacionado ao fato de cada um deles interferir de modo particular no metabolismo hormonal endógeno. Dentre as citocininas, a benzilaminopurina (BAP) é a que, em geral, tem se mostrado mais eficiente e apresentado melhores resultados na promoção da multiplicação *in vitro* de diversas espécies (VILLA et al., 2005). As concentrações utilizadas desta citocinina variam de 0,5 mg L<sup>-1</sup> a 5mg L<sup>-1</sup>, dependendo da espécie e condições do explante (SANTOS et al. 2005). Além disso, a concentração ótima empregada deve determinar uma taxa de

multiplicação satisfatória, com um mínimo de variação somaclonal (ERIG; SCHUCH, 2002).

Além das citocininas, as auxinas também atuam na multiplicação *in vitro* uma vez que possuem como função principal a, capacidade de induzir alongamento celular, contribuindo em proporções adequadas na formação de brotações (LEMUS et al., 2005). Dentre as auxinas mais utilizadas estão ácido  $\alpha$ - naftalenoacético (ANA), ácido indolilbutírico (AIB) e ácido 3 – indolilacético (AIA). A eficácia do AIB na multiplicação de brotações foi comprovada por SILVEIRA et al., (2001), em experimentos de multiplicação com o porta-enxerto de macieira M-7.

A regeneração é uma etapa importante para a transformação genética, e depende do genótipo, tipo e idade do explante, condições de cultura *in vitro* e tipos e concentrações de reguladores de crescimento (MAGYAR-TABORI et al., 2010). Para o porta-enxerto de macieira Murakaibo M-9, entrenós apresentaram melhor resposta organogenética do que folhas (SILVA et al., 2005), ao contrário de Schuch e Peters (2002) que obtiveram maior eficiência na regeneração quando utilizaram folhas escarificadas e os segmentos foliares.

Em função do exposto acima, o presente trabalho tem como objetivo melhorar os protocolos de multiplicação e regeneração para a cv. Gala, visando suas aplicações futuras nos processos de transformação genética.

## **2.2 Materiais e Métodos**

Foram utilizadas brotações de macieira, cv. Gala, oriundas de meristemas isolados *in vitro*, no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

### **2.2.1 Efeito de diferentes citocininas e concentrações de ANA na multiplicação *in vitro***

Foram utilizadas microestacas com 1,0 a 1,5 cm de comprimento, as quais foram inoculadas em meios básicos de Murashige & Skoog (1962) (MS), 30 g L<sup>-1</sup>, de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> mio-inositol e ágar 7,5 g L<sup>-1</sup>, contendo diferentes reguladores de

crescimento: M1 – 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP (ERIG; SCHUCH, 2006); M2 – 0,8 mg L<sup>-1</sup> BAP (ERIG; SCHUCH, 2006 modificado); M3 – 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA, 1mg L<sup>-1</sup> BAP, 3mg L<sup>-1</sup> Cinetina; e M4 – 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA, 8,3 mg L<sup>-1</sup> N6-(isopenteniladenina) (2iP), conforme protocolos utilizados no Laboratório do Dr. Herb Aldwinckle, Cornell University, USA. O pH dos meios foram ajustados para 5,7 e posteriormente autoclavados a 120°C e 1,5 atm por 20min.

Os frascos contendo os explantes foram transferidos para câmara de crescimento, com temperatura de 23±2°C, densidade de fluxo de fotons de 42 µmol.m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16hs. Após 30 dias em cultura, avaliou-se o comprimento e número médio de brotações/explante.

### **2.2.2 Efeitos de diferentes citocininas e auxinas na indução e desenvolvimento de brotações.**

#### **- Fase 1**

Para os experimentos de regeneração foi utilizado meio de cultura Murashige & Skoog (1962) (MS), suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> mio-inositol, gelrite 2,0 g L<sup>-1</sup>, diferentes reguladores de crescimento e fontes de carbono (Tabela 2), conforme Schuch e Peters, (2002) (Reg1), Szankowski et al., (2008) (Reg2) e Reg3 (Protocolo utilizado no Laboratório do Dr. Herb Aldwinckle, Cornell University). Foram utilizados como explantes, folhas obtidas de brotações multiplicadas por 04 semanas, nas quais foram realizadas três escarificações e uma raspagem na nervura central. Os explantes foram inoculados em placas de petri, contendo os diferentes meios de cultura e transferidos para câmara de crescimento, onde permaneceram por 15 dias no escuro. Após este período foram transferidos para a luz, por mais 15 dias e, permaneceram com as mesmas condições de luz e temperatura do item 2.4.1. Nesta primeira fase, ou seja, 30 dias após a inoculação dos explantes nos meios de cultura, foram avaliados número médio de explantes regenerantes e número médio de brotações por explante.

## **-Fase 2**

Com base nos resultados obtidos na primeira fase, os explantes foram cultivados inicialmente no meio Reg2 por 30 dias, sendo posteriormente transferidos para meios de desenvolvimento, por mais 21 dias, constituídos pelo meio básico de MS e diferentes concentrações de 2iP: (T1) = 2 mg L<sup>-1</sup>, (T2) = 3 mg L<sup>-1</sup>, e o controle utilizado não continha regulador de crescimento. Nas duas etapas, os pHs dos meios foram ajustados para 5,7 e posteriormente autoclavados a 120°C e 1,5 atm por 20min. Após 07, 14 e 21 dias, da transferência dos explantes para os meios de desenvolvimento, foram avaliados o número médio de brotações/explante.

Tabela 1 – Composição dos meio de cultura para regeneração de brotações cv. Gala

Reagentes	Reg1	Reg2	Reg3
Tiamina	-	-	0,4 mL L <sup>-1</sup>
Sacarose	40 g L <sup>-1</sup>	-	30 g L <sup>-1</sup>
Sorbitol	-	30 g L <sup>-1</sup>	
BAP	4 mg L <sup>-1</sup>	-	
TDZ	-	5 mg L <sup>-1</sup>	2 mg L <sup>-1</sup>
AIB	-	-	0,3 mg L <sup>-1</sup>
ANA	0,2 mg L <sup>-1</sup>	0,5 mg L <sup>-1</sup>	-

### **2.2.3 Delineamento experimental e análise estatística**

No experimento de multiplicação, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado e unifatorial composto de cinco repetições com cinco explantes em cada frasco. Após 30 dias de cultivo, avaliou-se o número médio de brotações/explante e comprimento médio das brotações, levando em consideração apenas o fator qualitativo, tratamento (meios de multiplicação).

Para os experimentos de indução e desenvolvimento o delineamento experimental também foi inteiramente casualizado. Na fase 1, foi realizada uma análise unifatorial representado pelos diferentes meios, tendo sua unidade experimental composta por cinco placas de petri com seis explantes. Na fase 2, a avaliação foi em esquema fatorial (3x3), representado pelas diferentes concentrações de 2iP (0, 2 e 3 mg L<sup>-1</sup>) e dias de avaliações (aos 7, 14 e 21 dias), sendo que apenas os explantes oriundos do meios de indução Reg2 foram submetidos a esta etapa.

Na fase 1 foi analisado o número médio de regenerantes e o número médio de brotações por explante e, na fase 2, o número médio de brotações/explante.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, sendo que para os fatores unifatoriais foi realizado o teste de médias com 5% de probabilidade de erro (Tukey) e para o fatorial 3x3, da fase de desenvolvimento, foi realizada análise de interação entre os fatores seguido de teste de médias, através do programa estatístico Winstat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003).

## **2.3 Resultados**

### **2.3.1 Efeito de diferentes citocininas e auxinas na taxa de multiplicação**

A análise de variância mostrou, pelo teste F, efeitos significativos ao nível de 5% de probabilidade, para as variáveis número e comprimento médio de brotações/explante (Tabela 2). A análise de dados através do teste de médias (Tabela 3), evidenciou que o meio M4, contendo 8,3mg L<sup>-1</sup> de 2iP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA foi significativamente superior aos demais meios de cultura utilizados, com valores de 14,20 e 2,12cm, para as variáveis números médios de comprimento e brotações/explante, respectivamente. Este meio foi, respectivamente, 60 e 24% superior ao meio M1, que continha somente 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, e apresentou valores de 8,87 e 1,71cm para as mesmas variáveis.

Tabela 2- Análise de variância do número e comprimento médio de brotações, de macieira cultivar Gala, em diferentes meios de cultura

Causas da Variação	GL	Quadrado	Médio
		Número de Brotações	Comprimento Explantes(cm)
Tratamento	3	85,26*	0,46*
Resíduo	56	1,33	0,01
Média geral		11,12	1,91
Coeficiente de variação		10,36	5,98

\*Significativo ao nível de 5%, pelo teste F.

Tabela 3 - Número médio de brotos formados e comprimento de explantes de macieira cultivar Gala, em diferentes meios de cultura

Meio de Cultura	Número Médio de Brotações	Comprimento de Explantes
M1	8,87 D	1,71 D
M2	9,7 C	1,83 C
M3	11,73 B	1,96 B
M4	14,2 A	2,12 A

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey( $\alpha$  0,05).

### 2.3.2 Efeitos de diferentes citocininas e auxinas na indução e desenvolvimento de brotações

#### - Fase 1

A análise de variância mostrou, pelo teste F, efeitos significativos ao nível de 5% de probabilidade, para as variáveis número médio de regenerantes e brotações/explante (Tabela 4, Figura 1). A análise das médias destas variáveis mostrou que, no meio Reg2 contendo 30 g L<sup>-1</sup> de sorbitol, 5mg L<sup>-1</sup> de TDZ e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, o número médio de explantes regenerados (85,05) e a porcentagem de regenerantes (94,5 %) foi significativamente superior aos demais meios de cultura utilizados, (Tabela 5). Estes resultados foram superiores aos obtidos com o meio Reg1, que continha 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Já o meio Reg3 com 30 g L<sup>-1</sup> de

sacarose e TDZ em concentração inferior ao meio Reg2 ( $2\text{mg L}^{-1}$ ) e AIB ( $0,3\text{ mg L}^{-1}$ ), mostrou-se significativamente inferior aos Reg2 e Reg1.

Tabela 4 - Análise de variância para número médio de regenerantes e brotações de macieira cultivar Gala, em diferentes meios de cultura

Causas da Variação	GL	Quadrado	Médio
		Número Médio de Regenerantes	Número Médio de Brotações
Tratamento	2	220,14*	248,42*
Resíduo	42	30,67	1,62
Média geral		3,4	4,55
Coeficiente de variação		25,13	27,98

\*- Significativo ao nível de 5%, pelo teste F.

Tabela 5 - Número de explantes regenerados e porcentagem de regeneração de brotações de macieira, cultivar Gala, em diferentes meios de cultura

Meios de Regeneração	Nº Total de Explantes Inoculados	Nº de Explantes Regenerados	% de Regenerantes
Reg1	90	62,10 B	69 B
Reg2	90	85,05 A	94,5 A
Reg3	90	6,00 C	6,7 C

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey( $\alpha 0,05$ ).



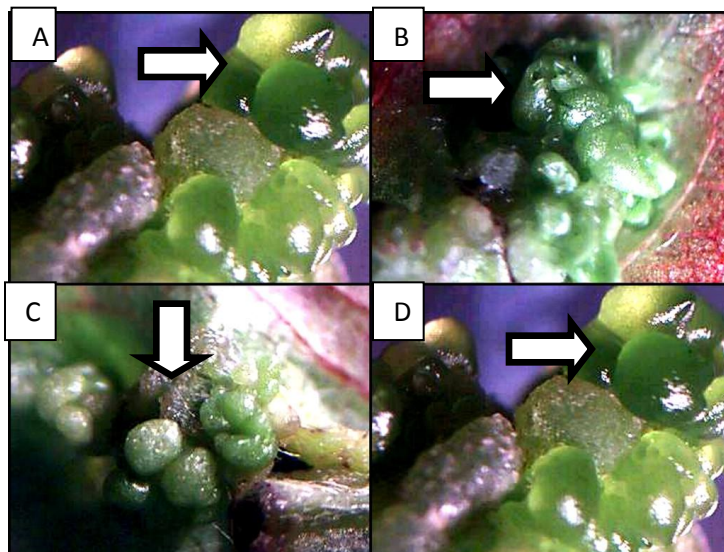


Figura 1- Formação de estruturas globulares em explantes foliares de macieira, cv. Gala, aos 30 dias de cultivo, cultivadas em meio Reg2 suplementado com sorbitol 30 g L<sup>-1</sup>. (A,B,C,D) Estruturas globulares formadas em 5 mg L<sup>-1</sup> TDZ e 0,5 mg L<sup>-1</sup> ANA.

## - Fase 2

A análise de variância mostrou, pelo teste F, efeitos significativos ao nível de 5% de probabilidade, para as variáveis número médio brotações/explante (Tabela 6). A análise das médias desta variável mostrou que o número médio de brotações/explante foi significativamente superior no meio T(3) (3 mg L<sup>-1</sup> de 2iP) quando comparado aos meios T(1) e T(2) que apresentavam, respectivamente, ausência e menor concentração deste fitohormônio (Tabela 7).

Observações visuais, mostraram que aos 7 dias todos os tratamentos já tinham desenvolvimento de gemas, sendo que os tratamentos 2 e 3 sempre apresentaram maiores quantidades de gemas/brotações/explante (Tabela 7). Nas avaliações realizadas aos 14 e 21 dias, o número de brotações foi superior nos T(2) e T(3), evidenciando que a interação dos fatores (tratamentos x dias de avaliação), não foi significativa. Já, na variável dias, não ocorreu diferenças significativas entre os tratamentos 2 e 3 (Tabela 8, Figura 2). No entanto, embora o meio T(3) tenha apresentado respostas mais elevadas quanto ao número de gemas/brotações/explante, estas eram de tamanho abaixo do necessário para uma manipulação posterior (repicagem e enraizamento).

Tabela 6- Análise de variância para número médio de brotações de macieira, cultivar Gala, em diferentes meios de cultura

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio
		Nº Médio Brotações
Concentração de 2iP	2	70.2*
Dias	2	26.6*
Concentração x Dias	4	1.6
Resíduo	36	1.17
Total	44	-
Coeficiente de variação	15.43	-

\*- Significativo ao nível de 5%, pelo teste F.

TABELA 7– Número médio de brotações de macieira, cultivar Gala, em diferentes concentrações de 2iP

Tratamentos			
T(1)	2,6 B	5,0 B	6,2 C
T(2)	6,8 A	7,8 A	8,2 B
T(3)	7,2 A	9,2 A	10,0 A

(T(1) - 0 mg L<sup>-1</sup>, T(2) – 2 mg L<sup>-1</sup>, T(3) - 3 mg L<sup>-1</sup> 2iP. Letras diferenciam estatisticamente ao nível de significância de 5 %.

TABELA 8 - Número médio de brotações de macieira, cultivar Gala, em diferentes dias de avaliação (7, 14, 21 dias)

Dias de Avaliação			
7	2,6 B	5,0 A	6,2 A
14	6,8 A	7,8 A	8,2 A
21	7,2 B	9,2 A	10,0 A

Letras diferenciam estatisticamente ao nível de significância de 5 % na linha.

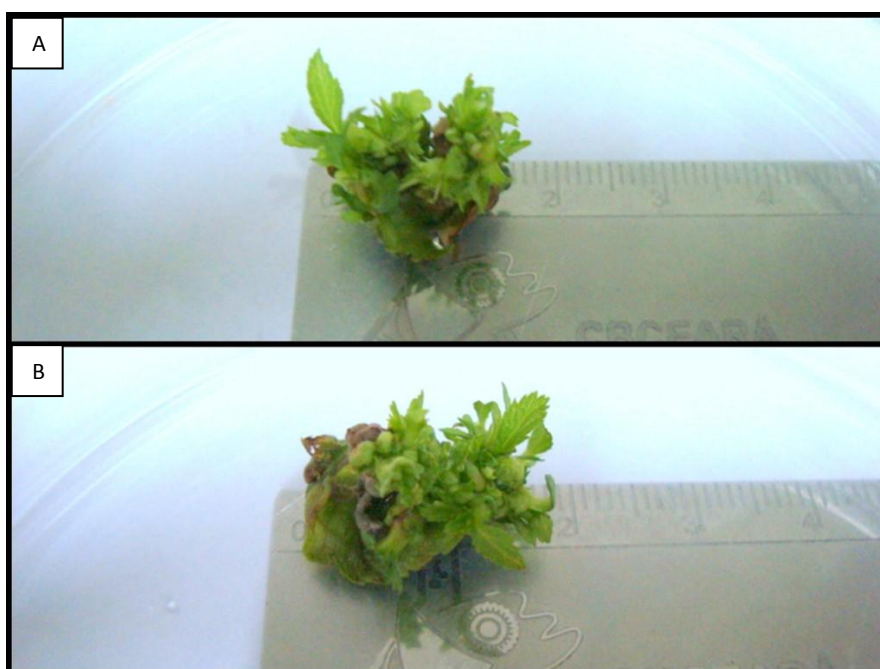


Figura 2- Brotações formadas a partir de explantes foliares de macieira, cv. Gala, aos 50 dias de cultivo, em meio suplementado com sorbitol 30 g L<sup>-1</sup>. (A, B) brotos desenvolvidos com (3 mg L<sup>-1</sup> 2iP e 2 mg L<sup>-1</sup> 2iP) e comprimento médio de (1,5 cm e 2,0 cm), respectivamente.

## 2.4 Discussão

Os resultados relatados neste trabalho mostraram uma maior eficiência na multiplicação de macieira, cultivar Gala, quanto ao comprimento e número médio de brotações quando se utilizou a interação de 2iP e ANA (M4). Silveira et al., (2009), relataram que a ação em conjunta dessas duas classes de reguladores de crescimento contribuem em proporções adequadas para a formação de brotações. Entretanto,

convém salientar que não existem relatos atuais da interação dos reguladores citados acima em macieira. Inclusive, estudo realizado por Sarwar et al., (1998) com 2iP isoladamente para as cultivares de macieira, McIntosh', 'Macspur' e 'Wijcik', apresentou resultados negativos para a variável alongamento de brotações. Efeito positivo do uso de 2iP com auxina tem sido relatado na multiplicação de outras fruteiras, como o mirtilo. Onde a combinação de AIB nas concentrações de 0,5 a 4 mg L<sup>-1</sup> e de 2iP de 10 a 15mg L<sup>-1</sup> tem apresentado efeitos positivos no alongamento e proliferação de brotações *in vitro* desta espécie (FILIPENYA; DOLGOV, 2000; KYTE; KLEYN, 2003; LITWIN'CZUK; WADAS, 2008).

Os resultados deste trabalho (Tabela 3) corroboram com Silveira et., al (2002), indicando que a concentração de auxina endógena desta cultivar é incapaz de suprir suas necessidades durante a fase de multiplicação, necessitando de concentrações adicionais desta classe de regulador, já que, a utilização deste atua estimulando o crescimento da parte aérea, colaborando com o aumento do comprimento e número médio de brotações do explante.

O 2iP, um regulador mais fraco que o BAP, atuando em conjunto com ANA tornou-se um dos fatores que contribuiu com o sucesso da multiplicação da cv. Gala. Evidenciando que a eficiência da multiplicação para esta cultivar foi dada pelo balanço auxina/citocinina.

Convém salientar que a utilização de BAP, como fonte de citocinina, nos meios M1 e M2 (1 e 0,8 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente) apresentou resultados inferiores, tanto para número e comprimentos de brotações, quando comparados aos obtidos com os meios M3 e M4 (tabela 3), que continham (0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA, 1mg L<sup>-1</sup> BAP, 3mg L<sup>-1</sup> Cinetina e 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA, 8,3 mg L<sup>-1</sup> 2iP), respectivamente. Estes resultados com ANA/2iP foram surpreendentes, pois o BAP é, normalmente e preferencialmente, a citocinina mais eficiente e utilizada em estudos de micropropagação em macieira (BRUM et al., 2002; ERIG; SHUCH, 2006; PEREIRA; ROGALSKI et al., 2003; VIEIRA et al., 2009).

Quanto a indução de regeneração em explantes foliares, o meio Reg2 contendo sorbitol, TDZ e ANA destacou-se em relação aos demais, com alta porcentagem de regenerantes (94,5%). Estes resultados confirmam e evidenciam que a regeneração de brotações a partir de tecidos somáticos diferenciados necessita da presença de uma

citocinina de alta atividade biológica e de uma auxina, neste estudo, TDZ e ANA, respectivamente (D'ONOFRIO; MORINI et al., 2005). Entretanto, Schuch e Peters (2002), trabalhando com a cultivar Gala obtiveram maior percentagem de regeneração de brotações quando utilizaram BAP e ANA nas concentrações de 4,0 a 5,0 mg L<sup>-1</sup> e 0,2 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Estes autores verificaram também que o TDZ induzia vitrificação e a maioria das brotações formadas eram muito pequenas e agrupadas, sendo que, estes efeitos não foram observados no presente estudo.

Outro aspecto a salientar é que o tipo e concentração da auxina empregada pode variar conforme a cultivar e as condições do explante. Szankowski et al., (2008); Degenhardt et al., (2006), obtiveram resultados superiores, para a variável número de regenerantes, utilizando AIB, como auxina, para a cultivar Elstar e Holsteiner.

Os explantes foliares, quando transferidos para os meios de desenvolvimento contendo 2iP, apresentaram maior número de brotações, aumentando a eficiência da regeneração. Ao fim do processo, através de observações visuais, verificou-se que a regeneração ocorreu através de organogênese indireta, pois houve formação de calos nos explantes.

Não foram encontrados relatos sobre a utilização de 2iP no desenvolvimento de brotações em macieira. Entretanto, em outras culturas como cafeeiro, o emprego de 2iP proporcionou a regeneração em 100% dos explantes, especialmente nas concentrações de 2,5 e 5,0 µM, indicando que esta citocinina proporciona bons resultados organogênicos para esta cultura (TEIXEIRA et al., 2004). Corroborando com a utilização de 2iP, Cassana et al.(2007), obtiveram sucesso no desenvolvimento de brotações de mirtilo.

Portanto, os resultados obtidos no presente estudo mostraram que o protocolo de multiplicação utilizando o (2iP e ANA) foram superiores, quando comparados com a utilização de BAP, e os protocolos de regeneração (fase 1 e 2), quando utilizou-se (sorbitol, TDZ e ANA) e, após complementou-se com 2iP para a formação de brotações mostraram eficiência na regeneração de explantes foliares de macieira.

## 2.5 Conclusão

O 2iP é a citocinina, em conjunto com o ANA, mais eficiente, na multiplicação da cultivar Gala.

O protocolo utilizando TDZ e ANA é eficiente para a regeneração da cultivar Gala.

O meio utilizando 2iP na concentração de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  foi eficiente para o desenvolvimento de brotações da cultivar Gala.

### 3. CAPÍTULO 2

#### TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA via *Agrobacterium tumefaciens* VISANDO RESISTÊNCIA A MANCHA FOLIAR

##### 3.1 Introdução

A maçã (*Malus domestica* Borkh) é um dos frutos mais importantes produzidos no Brasil, chegando a quase um milhão de toneladas na colheita de 2007/2008 (FINEP, 2009). No entanto, muitos fatores restringem a expansão desta cultura, dentre eles, a incidência da mancha foliar da Gala (MFG) causada pelo fungo *Colletotrichum gloesporooides*, sendo esta uma das doenças mais importantes na cultura da macieira no Sul do Brasil (KATSURAYAMA et al., 2000; ARAÚJO et al., 2008). No Rio Grande do Sul, as lesões em folhas e frutos correspondem a 75% da perda na produção, de modo que, os prejuízos causados por essa doença são graves, podendo ocorrer perda total da produção do ano e, comprometendo a produção do ano seguinte (CRUSIUS et al., 2002).

Em consequência da severidade de ataque e dos altos custos de controle, uma das prioridades atuais dos programas de melhoramento genético de macieira no Sul do Brasil é a obtenção de cultivares resistente à MFG. (FURLAN et al., 2010). Neste sentido, a engenharia genética oferece uma alternativa atraente para a criação de variedades resistentes, uma vez que é mais rápida, pode ser usado muitas fontes de genes e preserva as qualidades desejáveis da cultivar, quando comparada ao melhoramento genético (ALDWINCKLE; NORELLI, 2000).

A engenharia genética pode ser realizada por métodos diretos, sem a utilização de vetores intermediários, ou indireto utilizando o vetor *A. tumefaciens*, que possui capacidade de transformar um grande número de espécies de plantas (KARAMI et al., 2009). O sistema de transformação mediado por *A. tumefaciens*, facilita a integração precisa de um pequeno número de genes no genoma da planta e mostra maior grau de estabilidade do transgene (SHOU et al., 2004).

A inserção de genes que conferem resistência a fungos e outros patógenos na planta, esta vinculada a ganhos expressivos na qualidade final dos produtos, maior velocidade na obtenção de novos genótipos apropriados, em virtude de maior

homogeneidade, drástica redução do uso de agrotóxicos, , aumento da produção e produtividade com redução de custos relativos (SARTORETTO et al., 2008).

Entretanto, para que haja o estabelecimento de um eficiente sistema de transformação para qualquer espécie vegetal, são necessárias algumas etapas, tais como: a escolha da estirpe bacteriana e plasmídeos, um sistema eficiente de regeneração das células, competência de tecidos vegetais de destino para infecção, isolamento e introdução do DNA exógeno na célula, duração de co-cultivo após a infecção por *A. tumefaciens* e o uso de marcadores de seleção (antibióticos) para verificação do crescimento das células transformadas (SALAS et al., 2001; ZAMBRE et al., 2003; YU et al., 2002; OIHOFT et al., 2003, WU et al., 2003; CHENG et al., 2004, BŘÍZA et al., 2008; CHO et al., 2008).

A utilização da transformação genética como ferramenta para a produção de novos genótipos resistentes a doenças causadas por fungos, como *C. gloeosporioides*, pode ser agregada a utilização de plantas para a produção de proteínas recombinantes como as lectinas. E estas, são proteínas de grande interesse biológico e possuem genes que são expressos em vegetais com respostas a diferentes fitopatógenos. Possuem expressão heteróloga em plantas, por se tratar de um sistema eucariótico de expressão, com a maquinaria necessária para executar processamentos pós-traducionais, tais como: glicosilação e fosforização, além de propiciar a formação de complexos protéicos associados (PINTO et al., 2008).

Dentre estas proteínas, podemos citar a lectina encontrada em *Bauhinia variegata*. As lectinas isoladas de sementes de *B. variegata* (BVLI e BVL II) são proteínas, não imunológicas, semelhantes a outras lectinas galactose específicas (PINTO et al., 2008). Essa classe de proteínas acumula-se em órgãos e/ou tecidos mais suscetíveis ao ataque de organismos e que também são imprescindíveis para a sobrevivência individual e da espécie, como as sementes. Muitos trabalhos relatam a inibição do crescimento *in vitro* de fungos quando da utilização de lectinas (YE ; NG, 2001; YE et al., 2001; CHEN et al., 2005).

A lectina BVL torna-se capaz de reconhecer e se ligar a glicoconjugados de outros organismos, presentes na superfície de microrganismos (bactérias e fungos) (PINTO et al., 2008). Sendo assim, a utilização de um gene que codifica uma lectina,



possibilita a obtenção de um novo genótipo resistente a fungos, com grandes perspectivas para a produção de plantas suscetíveis a doenças, como a cultivar Gala (SAUVION et al., 2004; NAGADHARA et al., 2004; SHAH et al., 2005; PANG et al., 2004).

Considerando o exposto acima, o presente trabalho objetivou a obtenção de linhagens transgênicas de macieira, cv. Gala, via *A. tumefaciens* visando a inserção do gene de *Bauhinia variegata* L da lectina *bvl*, para resistência ao fungo *Coletotrichum gloeosporioides*.

### **3.2 Materiais e Métodos**

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratório de Biotecnologia de Plantas do Centro de Biotecnologia e o Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica/Instituto de Biologia, ambos na Universidade Federal de Pelotas - UFPel.

#### **3.2.1 Material Vegetal**

O material vegetal consistiu de folhas cultivadas *in vitro* de macieira, cv. Gala, as quais foram mantidas em meio de multiplicação contendo sais e vitaminas do meio MS (Murashige; Skoog, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 8,3 mg L<sup>-1</sup> de 2iP, 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH 5,7. As brotações foram cultivadas durante quatro semanas, em câmara de crescimento, com temperatura de 23±2°C, densidade de fluxo de fótons de 42 µmol.m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16hs.

#### **3.2.2 Construção do plasmídeo e clonagem do gene *bvl* em vetor de expressão em plantas**

A cepa utilizada neste estudo foi LBA4404. A clonagem do vetor de expressão em planta foi realizada a partir da amplificação de *bvl* por reação em cadeia polimerase (PCR), utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores contendo sítios de restrição

compatíveis com os sítios de múltipla clonagem do vetor (Tabela 1), onde BVLpGA F continha peptídeo sinal, para direcionar a proteína para a região específica, onde esta realiza a sua função biológica. O produto de PCR foi ligado ao vetor pGA643 usando-se a enzima DNA Ligase e denominado pGA-bvI e, foi transferido por eletroporação para a bactéria *Escherichia coli* Top10 para propagação do plasmídeo. A partir de *E. coli* contendo a construção pGA-bvI, isolou-se o plasmídeo usando-se o kit GFX™ Micro Plasmid Prep kit (GE Healthcare).

A transformação da bactéria *A. tumefaciens*, usando a construção pGA-bvI, foi realizada por choque térmico. A confirmação da integração do gene ao vetor foi verificada por PCR e por digestão dos plasmídeos usando-se as mesmas enzimas da fase de construção (Figura 1).

Tabela 1. Primers usados na construção do vetor pGA/bvI

Vetor	Primer	Sequência	Enzima
pGA643	BVLpGA F	GCTCTAGAATGACAAGCTCAACCTTA (com peptídeo sinal)	XbaI
	BVLpGA R	GGAAGATCTTTACATACTGGAATAAGAGG	BglII

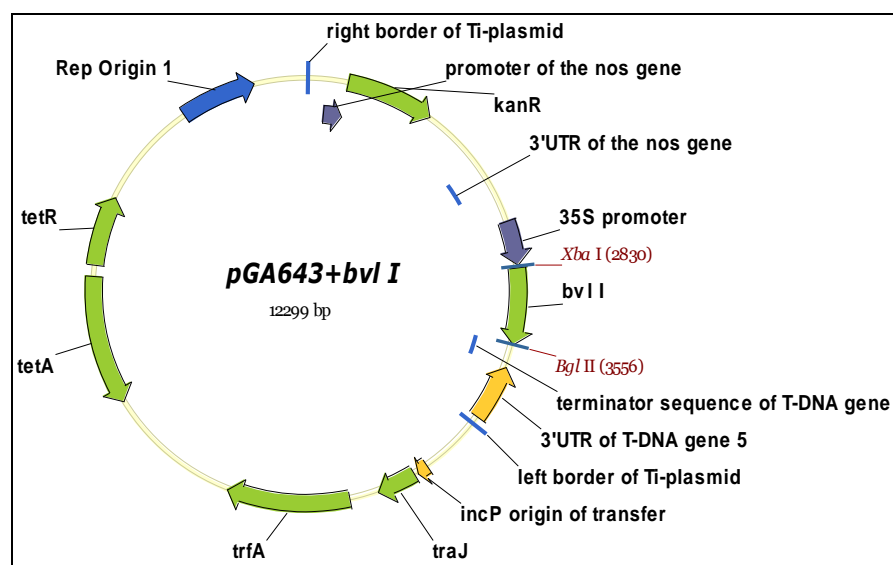


Figura 1- Desenho do plasmídeo pGA643-bvI em orientação antisense utilizado para transformação genética de macieira, cv Gala.

### 3.2.3 Transformação genética

Os explantes foliares foram preparados para a infecção em solução bacteriana com três escarificações e uma raspagem na nervura central. Foram testados dois protocolos para transformação genética via *A. tumefaciens*: Protocolo P1 (Degenhardt et al., 2006 modificado) e Protocolo P2 (conforme protocolo utilizado no Laboratório do Dr. Herb Aldwinckle, Cornell University).

#### - Protocolo **P1**

Foram realizados dois cultivos de *A. tumefaciens*. No primeiro, utilizou-se uma colônia de *A. tumefaciens* contendo o plasmídeo pGA643-*bv1l* em 10 mL de meio LB (Luria Broth) contendo os antibióticos (canamicina 50 mg L<sup>-1</sup>, rifampicina 30 mg L<sup>-1</sup> e streptomycin 300 mg L<sup>-1</sup>), overnight, sob agitação de 150 rpm e 28°C. Para o preparo do segundo cultivo, foi retirado 5 ml do primeiro e adicionado a 50 mL de meio LB e os mesmos antibióticos citados anteriormente. Após mais ou menos uma hora sob as condições de agitação e temperatura, já citadas, quando a cultura apresentava DO<sub>600</sub> de 0,7, foi iniciado o processo de inoculação.

Os explantes foliares escarificados permaneceram 10 min. em solução bacteriana sob agitação constante. Em seguida, as folhas foram secas com auxílio de papel filtro esterilizado e os explantes colocados em meio de co-cultivo (Tabela 2), com o lado adaxial em contato com o meio de cultura, por três dias, no escuro. Posteriormente os explantes foram lavados duas vezes com água destilada e autoclavada (sem antibiótico), por 15 minutos. O material vegetal foi seco novamente em papel filtro esterilizado e cultivado em meio de regeneração contendo canamicina 50 mg L<sup>-1</sup> e cefotaxima 100 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 2), por 15 dias, no escuro. Após este período os explantes foram transferidos para a luz (densidade de fluxo de ftons de 42  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), em câmara de crescimento, com temperatura de 23±2°C, e fotoperíodo de 16hs.

## - Protocolo **P2**

Neste protocolo foram preparadas cinco placas com meio LB semi sólido e antibióticos (canamicina 50 mg L<sup>-1</sup>, rifampicina 30 mg L<sup>-1</sup> e streptomicona 300 mg L<sup>-1</sup>) nas quais foram inoculadas uma colônia de *A. tumefaciens* e após incubadas em BOD por 3 dias a 28°C. Para a coleta do crescimento bacteriano, no terceiro dia, adicionou-se 3 mL do meio SIM (contendo 5,88 g L<sup>-1</sup> Ácido Cítrico + 20g L<sup>-1</sup> sacarose; o pH foi ajustado para 5,2 e adicionado mais 1μ 1M Fosfato de Betaina mL<sup>-1</sup> de meio 1μ 100mM acetoseringona mL<sup>-1</sup>), e através de raspagem transferiu-se para erlenmeyer, ao qual se adicionou mais 10 mL de meio SIM para uma DO<sub>600</sub> final de 0,7. Esta solução bacteriana permaneceu sob agitação (150 rpm, 28°C), por quatro horas. Após, retirou-se a solução do agitador e a esta, adicionados os explantes foliares, que permaneceram por 10 min. para a inoculação. Posteriormente os explantes foram secos e transferidos para meio de co-cultivo<sup>2</sup> (Tabela 2), mantido em BOD a 25°C por três dias, e após, os explantes foliares foram lavados em solução contendo cefotaxima 500 mg L<sup>-1</sup> e MS (somente sais e vitaminas) por 10 min. sob agitação. Posteriormente, as folhas foram secas e colocadas em meio de regeneração<sup>2</sup> com antibióticos canamicina 100 mg L<sup>-1</sup> e cefotaxima 500 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 2). O material permaneceu em câmara de crescimento por 21 dias no escuro e após foi transferido para a luz (densidade de fluxo de fótons de 42 μmol.m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), temperatura de 23±2°C, e fotoperíodo de 16hs.

Deve-se salientar que para os dois protocolos, tanto na fase de regeneração, como no desenvolvimento das brotações, os explantes eram transferidos para novos meios de 15 em 15 dias, para manter a viabilidade do antibiótico.

Como controle, em P1 e P2, utilizou-se cinquenta explantes que foram colocados em meio de regeneração sem antibióticos (controle positivo) e meio de regeneração com antibiótico (controle negativo), sem infecção por *A. tumefaciens*. Foram realizados 18 experimentos de transformação com P1 e 6 com P2, sendo cada evento constituído por dez placas de petri contendo oito explantes cada.

Tabela 2- Composição do meio de co-cultivo e regeneração.

Reagentes	*Meio Co-Cultivo	*Meio Co-Cultivo2	Meio Regeneração	Meio Regeneração2
Sais e vitaminas MS (g L <sup>-1</sup> )	4,4	-	4,4	-
MS solução (g L <sup>-1</sup> )	-	4,3	-	4,3
Mio-inositol (mg L <sup>-1</sup> )	100	100	100	100
Tiamina mL L <sup>-1</sup>		0,4		0,4
Sorbitol (g L <sup>-1</sup> )	30	-	40	-
Sacarose (g L <sup>-1</sup> )		30		30
TDZ (mg L <sup>-1</sup> )	5	2	5	2
ANA (mg L <sup>-1</sup> )	0,5	-	0,5	-
AIB (mg L <sup>-1</sup> )		0,3		0,3
Gelrite (g L <sup>-1</sup> )	2,5	2,5	2,5	2,5
Canamicina (mg L <sup>-1</sup> )	-	-	50	100
Cefotaxima (mg L <sup>-1</sup> )	-	-	100	500

(\*) Meio sem antibióticos.

### 3.2.4 Regeneração e multiplicação dos explantes foliares infectados

Após 40 dias em meio de regeneração, os explantes foram transferidos para o meio de cultura MS contendo 2 mg L<sup>-1</sup> de 2iP com canamicina 50 mg L<sup>-1</sup>, para o desenvolvimento das gemas/brotações. Vinte dias após a transferência para o meio de desenvolvimento, as brotações originadas dos explantes foram multiplicadas em MS, contendo 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 8,3 mg L<sup>-1</sup> de 2iP e canamicina 50 mg L<sup>-1</sup>. As brotações sobreviventes foram submetidas a análises moleculares, para verificar se houve a inserção e expressão do gene, na cv. Gala.

### 3.2.5 Análise de reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA genômico foi isolado, utilizando método de extração CTAB, (DOYLE; DOYLE, 1990). Os primers usados na amplificação dos fragmentos de *bvI* foram BVLpGA F e BVLpGA R, (Tabela 1). Para as amplificações foram preparadas reações

de 25 µl para cada amostra de DNA, utilizando termociclador BIORAD/INOVA. As condições para a reação de PCR utilizando o gene *bvI* foram de desnaturação inicial por 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 60s a 94 °C, 60s a 53 °C e 60s a 72 °C. No ciclo final, a reação foi mantida por 7 min a 72 °C. O produto da reação de PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1% e os fragmentos foram comparados com marcador (Ladder 100pb) da Ludwig.

### **3.2.6 Análise de Dot Blot**

A proteína foi extraída de folhas das brotações resistentes ao antibiótico conforme Silva e Souza (2009). A membrana de nitrocelulose (MN) foi dividida em cinco separações e aplicou-se 8 µL de amostras de RNA. As membranas foram então colocadas em estufa a 37 °C para secagem e posteriormente os sítios livres de ligação de proteínas presentes foram bloqueados pela adição de leite em pó 5%, sob agitação, por 60 minutos. Após este período, foi adicionado 20 mL da solução Anti-BVL por 60 minutos, e finalmente adicionado o anticorpo Anti-coelho durante 60 minutos. Entre cada etapa foram realizadas 5 lavagens com PBS-T (PBS mais tween 20 a 0,5%) e todas as etapas permaneceram sob agitação.

A revelação das amostras foi realizada pela adição de uma solução de (3,3'-Diaminobenzidine (DAB) 0,006g em 09 mL de TRIS HCl 50mM+ 1 mL Sulfato de Níquel 0,1M). Entre cada etapa foram realizadas 4 lavagens com PBS-T (PBS mais tween 20 a 0,5%). Posteriormente foi acrescentado 30 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5 minutos, em triplicata. Na leitura foram considerados positivos as reações de cor, fraca ou forte.

## **3.3 Resultados**

### **3.3.1 Transformação genética**

Os resultados apresentados mostraram que o protocolo P1 foi superior ao P2, com regeneração em todos os eventos de transformação, obtendo-se 15 explantes regenerantes num total de oitenta (Tabela 3). Por outro, quando utilizado o protocolo P2 somente um dos explantes iniciais apresentou explantes regenerados (Tabela 4).

Os explantes foliares após 15 dias, tanto para o P1 e P2 já apresentavam início de necrose em algumas folhas infectadas e, aos 30 dias necrose total. O antibiótico canamicina foi mantido nos meios de cultura durante o período de regeneração e desenvolvimento das brotações. Inclusive quando as brotações foram transferidas para o meio de multiplicação, fez-se uma modificação na concentração de canamicina aumentando para 100 mg L<sup>-1</sup>. No entanto, este aumento na quantidade de antibiótico não apresentou qualquer modificação visual nas brotações.

Considerando todos os eventos de transformação realizados a taxa de explantes regenerantes foi baixa, da ordem de 7,98% num total de 1490 explantes (Tabela 3).

O protocolo realizado neste trabalho com referência a lavagem dos explantes após o co-cultivo (duas lavagens sem antibiótico) mostrou-se efetivo, diminuindo a necrose precoce dos explantes, aumentando assim a possibilidade de regeneração de brotações (Figura 2).

Tabela 3- Eventos de transformação P1 com explantes regenerados aos 40 dias multiplicados aos 60 dias de macieira, cultivar Gala

Eventos Transf	Nº Expl.	Expl. Reg. 40dias	Expl. Multip. 60dias
Transf. 1	80	6	1
Transf. 2	80	3	0
Transf. 4	80	1	0
Transf. 5	80	15	2
Transf. 6	80	8	1
Transf. 7	80	10	3
Transf. 8	80	12	0
Transf. 9	80	6	2
Transf. 10	80	2	0
Transf. 11	80	14	4
Transf. 12	80	8	3
Transf. 13	80	6	0
Transf. 14	80	17	0
Transf. 15	80	3	2
Transf. 16	80	8	2

Tabela 4-Eventos de transformação P2 com explantes regenerados aos 40 dias multiplicados aos 60 dias de macieira, cultivar Gala

Eventos Transf	Nº Expl.	Expl. Reg. 40dias	Expl. Multip. 60dias
Transf. 1	80	1	0
Transf. 2	80	0	0
Transf. 4	80	0	0
Transf. 5	80	0	0
Transf. 6	80	0	0

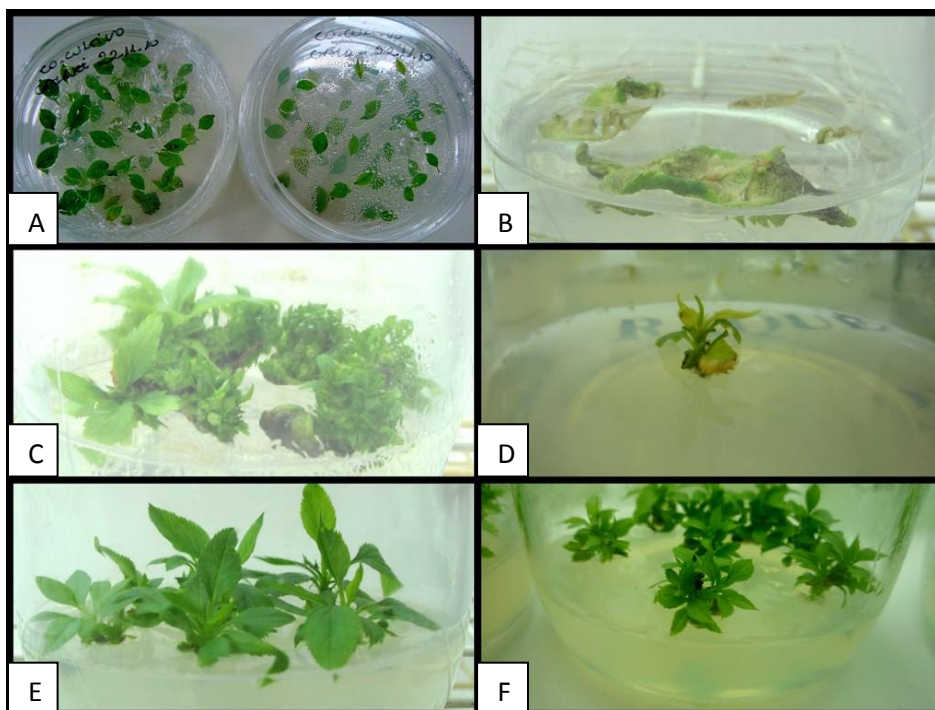


Figura 2- Explantes foliares e brotações de macieira cv. Gala após a inoculação por *A. tumefaciens* utilizando o Protocolo P1. (A) Explantes foliares após a infecção em meio de co-cultivo. (B) Controle negativo, com canamicina 50 mg L<sup>-1</sup>. (C) Controle positivo, sem canamicina. (D) Brotação infectada por *A. tumefaciens* aos 60 dias cultivada em meio MS com 2 mg L<sup>-1</sup> de 2iP. (E) Brotos em meio de multiplicação com 90 dias de cultivo, suplementado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA + 8,3 mg L<sup>-1</sup> de 2iP. (F) Clones de brotações sobreviventes em meio de multiplicação com canamicina 50 mg L<sup>-1</sup>.



### 3.3.2 Análise de reação em cadeia da polimerase

A análise de PCR do DNA das brotações transgênicas putativas confirmaram a presença do gene. Foram testadas 20 brotações, incluindo o clone destas, sendo que somente três plantas apresentaram característica de amplificação de 800 pb para *bvI* (Figura. 3), representando um percentual 15 % de brotações positivas.

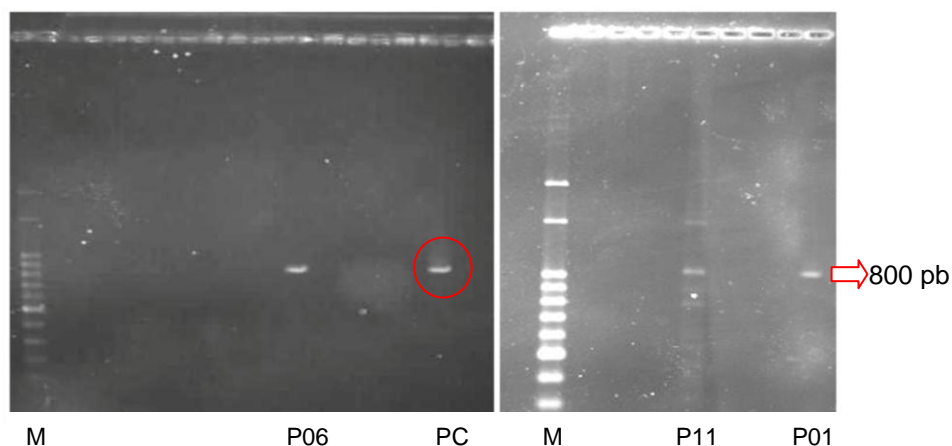


Figura 3- Eletroforese em gel de agarose, visando a confirmação da inserção do gene nos clones da cultivar Gala. Marcador molecular (M), PC (gene *bvI* controle), (P 06, 11, 01) confirmação da inserção do gene.

### 3.3.3 Análise Dot Blot

A análise de Dot Blot não detectou a presença de *bvI*, nos explantes avaliados (Fig. 4).



Figura 4- Análise de Dot Blot para confirmação da presença de *bvI*, do gene *bvI*, nos clones da Planta 1 (3.3 e 1.1), utilizando como controle negativo Planta N.T ( não transformada) e BSA e contole positivo BVL Nativa.

### 3.4 Discussão

O protocolo de transformação (P1) demonstrou ser eficiente, em comparação com o P2, embora, a obtenção de plantas contendo o gene *bv1* tenha sido baixa. A eficiência da transformação é afetada por alguns fatores e, dentre eles, esta a fonte de açúcar, que é o principal produto da fotossíntese e a forma principal de translocação de carbono em *Malus*. Diante disso, a utilização de sorbitol no protocolo (P1) no meio de regeneração e desenvolvimento mostrou grande influência na transformação genética pois, este já comprovou sua superioridade em relação a sacarose em trabalhos com macieira, que visavam o aumento de regeneração e multiplicação. (Zhu et al., 2001)

Este é o primeiro relato do uso da lectina (BVL), na tentativa de obtenção de macieira cv. Gala, resistente ao *C. gloeosporioides*. No entanto, a tolerância ao fungo *C. gloeosporioides*, foi comprovada em trabalhos realizados por YAN et al. (2005), que demonstraram a utilização de lectinas de *B. variegata* com ação antifúngica em *Colletotrichum* sp., comprovando a eficiência da sua ação inibitória em fungos. Por outro lado, trabalhos de transformação genética em macieira, com as cultivares Marshall McIntosh e Royal Gala, já foram realizados para aumentar a resistência a doenças fungicas, estes estudos utilizaram uma outra proteína, quitinase, que degrada a parede celular de fungos, (BOLAR et al.; 2000; BOLAR et al.; 2001; WONG et al.; 1999).

O uso do antibiótico cefotaxima ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), na etapa de lavagem dos explantes, provavelmente tenha causado fitotoxidade. Pois, observou-se visualmente necrose dos explantes e respectiva diminuição da taxa de regeneração, enquanto que na ausência do antibiótico isto ocorreu em menor proporção. Em trabalhos realizados com cefotaxima em explantes foliares em diferentes cultivares de macieira, conforme Modgil e Sharma, (2009), utilizando a concentração de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  não houve interferência no desenvolvimento, enquanto que, Yepes e Aldwinckle (1994) trabalhando com  $250 \text{ mg L}^{-1}$ , tiveram a regeneração afetada.

Visando a seleção de plantas resistentes, o uso de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina no meio de regeneração mostrou-se eficaz, pois selecionou as brotações com o gene de interesse. Porém para confirmar a presença do gene, antes das análises de PCR, a utilização da concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  canamicina, não provocou sensibilidade sobre os explantes. Schuch et al. (2002), trabalhando com a cultivar Gala, com o gene

codificante da ACCOxidase em orientação antisense, verificaram que tecidos desta cultivar são sensíveis a concentrações acima de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina, e obtiveram, a transformação genética de tecidos da cultivar Gala, confirmados através da expressão do gene GUS e por PCR.

A partir dos dados pode-se pressupor que houve a inserção do gene *bvI*, nas plantas analisadas (06,11,01) conforme Figura 3. No entanto, dados de (KOPROWSKI; YUSIBOV, 2001; MA et al., 2003; TWYMAN et al., 2003), mostram que a expressão de genes exógenos inseridos em plantas é muitas vezes baixa, além do que, a produção da proteína alvo pode chegar a representar apenas 0,1 a 1% do total de proteínas solúveis produzidas no vegetal. Com base nestes dados, optamos por verificar a produção da proteína BVLI nos clones positivos.

A utilização da análise de Dot Blot que é uma técnica similar ao Western Blot, apresentou reação positiva (Figura 4) para o precipitado (debris celulares), resultantes da extração das proteínas das folhas oriundas da cultura dos clones potencialmente transformados. A coloração obtida no precipitado tanto das folhas positivas quanto negativas demonstram que trata-se de um resultado falso positivo. Provavelmente esta coloração, semelhante a do controle positivo, deve-se aos pigmentos naturais das amostras, ricos em clorofila. Fuller et al., (2008), que a seleção das plantas transformadas pode ser dificultada pela correlação da quantidade detectável de lectinas sendo expressas, pois nem sempre há correlação com o grau de resistência do organismo patogênico.

Os resultados obtidos nas análises moleculares realizadas, permitem hipotetizar que, os clones testados por Dot Blot, podem estar expressando a proteína, como também, pode haver ocorrência do silenciamento do RNA, que acontece quando o transgene é reconhecido como um ácido nucleico invasor. Portanto, a realização de outras análises futuras é imprescindível, como Real Time, refinamento do protocolo de extração de proteínas e a utilização de mais amostras para as análises devem ser realizados em estudos futuros.

### 3.5 Conclusão

A inserção do gene *bv1* em macieira cv. Gala foi confirmada por PCR.

A expressão da proteína de *B. variegata* L. em macieira cv. Gala, não foi confirmada por Dot Blot.

É necessário a utilização de outras técnicas para que, os níveis de detecção da proteína *B. variegata* L. em macieira cv. Gala, sejam aperfeiçoados.

### 3.6 Referências

- ALDWINCKLE, H.; NORELLI, J. Improvement of Apple Varieties and Rootstocks by Biotechnology. In Presented at the 43<sup>rd</sup> Annual IDFTA Conference, Napier. New Zealand, p. 6-9, 2000.
- AIRES, P., S., R.; CARVALHO, J., M., F., C.; PIMENTEL, N., W.; SILVA, H. Efeito da citocinina 6-bencilaminopurina na micropropagação *in vitro* da mamona utilizando o genótipo BRS nordestina. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 8, n. 2, 2008.
- ARAÚJO, L.; BORSATO, L.,C.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.,M.; STADNIK M.,J. Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**. v.33, p.74-80, 2008.
- BLEICHER, J. História da Macieira. In. A cultura da macieira. Florianópolis-SC, EPAGRI. 2006. p. 29-36.
- BOLAR, J.,P.; NORELLI, J.,L.; WONG, K.,W.,; HAYES, CK.,; HARMAN, G.,E.; ALDWINCKLE, H.,S. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. **Phytopathology**. v.90, p.72–77, 2000.
- BOLAR, J.,P.; NORELLI, J.,L.; HARMAN, G.,E.; BROWN, S.,K.; ALDWINCKLE, H.,S. Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (T. harzianum) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. **Transgenic Res.** v.10, p.533–543, 2001.
- BONETI, J.,I.,S.; BECKER, W.,F.; KATSURAYAMA, Y. Sistema de previsão da mancha-foliar-da-gala em macieira, cultivar gala. **Agropecuária Catarinense**. v. 17, p.64-67, 2004.
- BŘÍZA, J.; PAVINGEROVÁ, D.; PŘIKRYLOVÁ, P.; GAZDOVÁ, J.; VLASÁK, J.; NIEDERMEIEROVÁ, H. Use of phosphomannose isomerasebased selection system for *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato and potato. **Biology Plant**. v.52, p.453- 461, 2008.
- BRUM, G.,R.; SILVA, A.,B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência Agrotécnica Lavras**. p.1403-1409, 2002.
- CABONI, E.; LAURI, P.; D'ANGELI, S. In vitro plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture . **Plant Cell Reports**. v.19, n. 8, p.755-760, 2000

CABONI, E.; D'ANGELI, S.; CHIAPPPPETTTTA, A.; INNOCOCENTI, A.,M.; VAN ONCKELEN, H.; DAMIANO, C. Adventitious shoot regeneration from vegetative shoot apices in pear and putative role of cytokinin accumulation in the morphogenetic process. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**.v. 70, n.2, p.199-206, 2002.

CARVALHO, D., C.; SILVA, A., L., L.; NAKAO TANNONII, G.; PURCINO, M.; BIASI, L., A. Organogênese a Partir de Segmentos Foliares e Internodais de Videira cv. Merlot **Ciência .Agrotécnica**. v.35, n.1, 2011.

CASSANA ,F., F.; PINTO, L., S.; POHL, S.; BIANCHI, V., J.; BRAGA, E., J., B.; PETERS, J., A. Regeneração de brotos a partir de folhas de Mirtilo cultivadas *in vitro* **Revista Brasileira de Biociências**. v.5, n.2, p.870-872, 2007.

CHEN, Z.; KAI, G.; LIU, X.; LIN, J.; SUN, X.; TANG, K. cDNA cloning and characterization of a mannose-binding lectin from *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) rhizomes. **Journal of Biosciences**, v. 30, n. 2, p. 101-108, 2005.

CHENG, M.; LOWE, B., A.; SPENCER, M., Ye, X.; ARMSTRONG, C.,L. Factors influencing *agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. - **In Vitro cellular and development Biology. Plant**. v.40, p.31-45, 2004.

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

COUTINHO, Camila. **Regeneração e infecção por agrobacterium tumefaciens em explantes de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. SR1**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Agrícola)Universidade Federal de Pelotas.

CRUSIUS, L.,U.; FORCELINI, C.,A.; SANHUEZA, R.,M.,V.; FERNANDES, J.,M.,C. Epidemiology of apple leaf spot. **Fitopatologia Brasileira**. v.27 p.65-70, 2002.

DHANDAPANI, M. KIM, D., H. HONG, S.,B. Efficient plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis from the explants of *Catharanthus roseus*. **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant**. v. 44, p.18–25, 2008.

D'ONOFRIO, C.; MORINI, S. Development of adventitious shoots from *in vitro* grown *Cydonia oblonga*. **Biologia Plantarum**. v.49, n.1, p.17-21, 2005.

DEGENHARDT, J.; POPPE, A.; MONTAG, J.; SZANKOWSKI, Iris. The use of the phosphomannose-isomerase/mannose selection system to recover transgenic apple plants. **Plant Cell Reports**. v.25, p.1149–1156, 2006.

FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos.Available: [http://www.finep.gov.br/inovacao\\_em\\_pauta\\_5\\_pag43147\\_macas.pdf](http://www.finep.gov.br/inovacao_em_pauta_5_pag43147_macas.pdf). Accessed: 15 maio 2011.

Epagri A cultura da macieira. Florianópolis SC. (2002)

ERIG, A., C.; SCHUCH, M., W. Ação da 6-benzilaminopurina e da qualidade da luz na multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus domestica* BORKH.) cvs. galaxy e mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**. v.12, n.2, p.151-155, 2006.

FAO (2009) <http://faostat.fao.org/site/567/Desktopdefault.aspx?PageID=567#ancor>

FURLAN, C., R., C.; DANTAS, A., C., M.; DENARDI, F.; BECKER, W., F.; MANTOVANI, A.; Resistência genética dos acessos do banco de germoplasma de macieira da Epagri à mancha foliar de glomerella (*Colletotrichum gloeosporioides*). **Revista Brasileira de Fruticultura**. (Jaboticabal, SP), v. 32, n. 2, p. 507-514, 2010.

FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos. Available: [http://www.finep.gov.br/impressa/revista/edicao\\_inovacao\\_em\\_pauta\\_5\\_pag43a47\\_macas.pdf](http://www.finep.gov.br/impressa/revista/edicao_inovacao_em_pauta_5_pag43a47_macas.pdf). Acesso em: 16 maio. 2011.

FULLER, V., L.; CATHERINE, J.; LILLEY, U., P., E. Nematode resistance. **New Phytologist**, 2008.

KARAMI, O.; ESNA-ASHARI, M., G.; KURDISTANI, K.; AGHAVALSI, B.; *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: the role of host. **Biologia Plantarum**. v.53 n.2, p.201-212, 2009.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J., I.; BECKER, W., F. Mancha foliar da Gala: principal doença de verão na cultura da macieira. **Agropecuária Catarinense**. v.13, n.3, p.14-19, 2000.

KOPROWSKI, H.; YUSIBOV, V.; The green revolution: plant heterologous expression vectors. **Vaccine**. v.19, p.2741–2745, 2001.

KYTE, L.; KLEYN, J.; Plants from test tubes. In: An Introduction to Micropropagation, 4th ed. Timber Press, Portland, Oregon, 2003, p. 192–193.

LEE, C., H.; HYUNG, N., I.; KIM, S., B. Foreign gene transfer using electroporation and transient expression in apple. **Acta Horticulturae**. v. 392, p.179-185, 1995.

Lemus, G. Control de la caída de flores en nogal ‘Serr’. **Tierra Adentro** 63:18-21, 2005.

LITWIN, CZUK, W.; WADAS, M. Auxin-dependent development and habituation of highbush blueberry (*Vaccinium x coveilleum* But. et Pl.) ‘Herbert’ *in vitro* shoot cultures. **Scientia Horticulturae**. v.119, p.41–48, 2008.

MA, J., K.; DRAKE, P., M., W.; CHRISTOU, P.; The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. **Nature**. v. 4, p.794 – 805, 2003.

MACHADO, A., A.; CONCEIÇÃO, A.R. Sistema de análise estatística para Windows. Winstat. Versão 2.0. UFPel, 2003.

MAGYAR-TA'BORI, K.; DOBRA'NSZKI, J.; SILVA, J., A.; T.; ILDIKO'HUDA'k, S., M., B. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v.101, p.251–267, 2010.

MARTINS, PEREIRA, L., M., A., M., S.; FRANÇA, S., C.; BERTONI, B., W. Micropropagação e conservação de *Macrosyphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg. em banco de germoplasma *in vitro*. **Ciência Rural Santa Maria**. on line, 2010.

MODGIL, M.; SHARMA, R. Effect of antibiotics on regeneration and elimination of bacteria during gene transfer in apple. **Acta Horticulturae**. v.839, 2009.

MONQUERO, P., A. plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. **Bragantia**. v.64, n.4, p.517-531, 2005.

MORAES, A., M. ALMEIDA, F., A., C.; BRUNO, R., L., A.; FILHO, J., C.; NUNES, S., T.; GOMES, J., P. Micropropagação de abacaxizeiro cv. Emepa. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.14, n.9, p.932–936, 2010.

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

NAGADHARA, D.; RAMESH, S.; PASALU, I.,C.; RAO, Y.,K.; KRISHNAIAH, N.,V.; SARMA, N.,P.; BOWN, D.,P.; GATEHOUSE, J.,A.; REDDY, V.,D.; RAO, K.,V. Transgenic indica rice plants resistant to sap-sucking insects. **Plant Biotechnology**. v.1, p.231–240, 2004.

Olhoft, P.M., Flaye, L.E. and Sowers, D.A. (2004). T-DNA locus structure in a large population of soyabean plant transform using the Agrobacterium-mediated cotyledonary-node methods.-Plant Biotechnology Journal 2: 289-300.

PANG, Y.; SHEN, G.; QI, H.; TAN, F.; SUN, X.; TANG, K. Transgenic tobacco expressing *Zephyranthes candida* agglutinin showing enhanced resistance to aphids. **Engineering in Life Sciences**. v. 4, p. 155-159, 2004.

PEREIRA, J., E., S.; FORTES, G.,R., L.; SILVA, J., B. Efeito da aplicação de baixa temperatura em plantas de macieira sobre o crescimento durante a aclimatização **Pesquisa. Agropecuária. Brasileira**.v. 36, n. 1, p. 89-95, 2000

PEREIRA, J., E., S. FRANÇA, R., B.; DANTAS, A., C.,M.; FORTES, G., R.,L. Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata. **Horticultura Brasileira**. v.23, n.1, 2005.



PERES, L.,E.,P. As bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*: um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n.25, p.44-48, 2002.

PETRI, J.L. Fatores edafoclimáticos. In: A Cultura da Macieira. Florianópolis, 2002. 743p.

PINTO, L., S.; NAGANO, C., S.; OLIVEIRA, T., M.; MOURA, T., R.; SAMPAIO, A.,H.; DEBRAY, H.; PINTO, V., P.; DELLAGOSTIN, O., A.; CAVADA, B., S.; Purification and molecular cloning of a New galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. **Journal Bioscience**. v.33, n.3, p.355-363, 2008

RADMANN, E., B.; FACHINELLO, J., C.; PETERS, J., A. efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9.' **Revista Brasileira Fruticultura**, (Jaboticabal, SP). v.24, n.3, p.624-628, 2002.

RIBEIRO, C., S., N.; SILVA, H.; SANTOS, J., W.; CARVALHO, J., M., F., C. Efeito do tiadiazuron na micropropagação *in vitro* de dois genótipos de mamona via organogênese. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.14, n.4, p.366–371, 2009.

ROGALSKI, M.; GUERRA M., P.; SILVA, A., L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira 'santa rosa': efeito da citocinina bap. **Revista Brasileira.de Fruticultura**. (Jaboticabal, SP), v.25, n.2, p.365-367, 2003.

SALAS, M.,G.; PARK, S.,H.; SRIVATANAKUL, M.; SMITH, R.,H. Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. **Plant Cell Report**. v.20, p.701-705, 2001.

SANTARÉM, E., R. Métodos Eficientes para a Transformação Genética de Plantas **Revista de Ciência & Tecnologia**. v. 15, p. 81-90, 2000.

SANTOS, A.,S., A.; MACHADO, I.,S.; LEÃO, A.,L.; RAMOS, A., A. Concentrações de BAP e TDZ na propagação *in vitro* de Carauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 8, n.35, p.62-65, 2005.

SARTORETTO, L., M.; SALDANHA, C., W.; PIMENTEL, M.; CORDER, M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural, Santa Maria**. v.38, n.3, p. 861-871, 2008.

SARWAR, M.; SKIRVIN, R.,M.; KUSHAD, M. Selecting dwarf apple (*Malus domestica* Borkh.) trees *in vitro*: multiple cytokinin tolerance expressed among three strains of 'McIntosh' that differ in their growth habit under field conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 54, p.71–76, 1998.

SAUVION, N.; NARDON, C.; FEBVAY, G.; GATEHOUSE, A., M., R.; RAHBÉ, Y. Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. **Journal of Insect Physiology**. v.50, p.1137-1150, 2004b.

SCHUCH, M., W.; PETERS, J., A.; Regeneração de brotações de macieira (*Malus domestica*, Borkh.) cv. Gala. **Revista. Brasileira Fruticultura**, (Jaboticabal, SP), v.24, n.2, p.301-305, 2002.

SHAH, P., A.; GATEHOUSE, A., M., R.; CLARK, S., J.; PELL, J., K.; Wheat containing snowdrop lectin (GNA) does not affect infection of the cereal aphid *Metopolophium dirhodum* by the fungal natural enemy *Pandora neoaphidis*. **Transgenic Research**., v.14, n.4, p.473-476, 2005.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. v. 14, n.11, p.53-62, 2004.

SHOU, H.; FRAME, B., R.; WHITHAM, S., A.; WANG, K. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. - *Molecular Breed.* v.13, p.201-208, 2004.

SILVA, K., R., G.; SCHUCH, M., W.; AFONSO, A., P., S.; SOUZA, J., A.; SOARES, A., P.; SCHIRMBECK, E. Explante, citocinina e luz: fatores que afetam a organogênese de porta enxerto de macieira cultivar M-9. **Revista. Brasileira. Agrociência**. v.11, n.3, p.365 -367, 2005.

SILVEIRA, C., A.; CITADIN, I.; FORTES, G., R. Multiplicação in vitro do porta-enxerto de macieira M-7 (*Malus* sp.) sob diferentes tipos e concentrações de auxinas. **Revista Brasileira de Agrociência**. v.7, n.2, p.107-109, 2001.

SILVEIRA, C., A., P. FORTES, G., R., L.; FACHINELLO, J., C.; RODRIGUES, A., C.; CITADIN, I.; QUEZADA, A., C.; SILVA, J., B. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero prunus sob baixas concentrações e diferentes tipos de auxinas. **Revista. Brasileira Fruticultura**, (Jaboticabal – SP), v.24, n.3, p.608-610, 2009.

SZANKOWSKI, I.; WAIDMANN, S.; DEGENHARDT, J.; PATOCCH, A. Functional characterization of the native promoter of the apple scab resistance gene *HcrVf2*. In *Biotechfruit ISHS First International Symposium on Biotechnology of Fruit Species*. September 1-5. Julius-Kühn Institut, Bundesanstalt für Kulturpflanzen (JKI), Dresden, Germany. 2008.

TELLES, C., A.; BIASI, L., A. Organogênese do caquizeiro a partir de ápices meristemáticos, segmentos radiculares e foliares. **Acta Scientiarum Agronomy**. v. 27, n. 4, p. 581-586, 2005.

TEIXEIRA, J., B.; JUNQUEIRA, C., S.; PERERIRA, A.,J., P., C.; MELLO, R., I., S.; SILVA, A., P., D.; MUNDIM D., A. Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L) via embriogenesis somática. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2004. 39 p.

TODA FRUTA. Informações econômicas sobre o maracujá. Available from: <<http://www.todafruta.com.br>>. Acesso em: 14 Junho. 2011.

TWYMAN, R.,M.; STOGER E.; SCHILLBERG, S.; CHRISTOU, P.;FISCHER, R. Molecular farming in plants:host systems and expression technology.**Trends Biotechnology**. v.21, p.570–578, 2003.

VALOIS, A., A., A. Importância dos transgênicos para a agricultura. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**. v.18, n.1, p.27-53, 2001.

VIEIRA, R., A.; SILVA, C., M.; SOUTO, E., R.; HATA, F., T.; MACHADO, M., F., P., S.; MARCUZ, F., S. Diferentes concentrações de 6- benzilaminopurina e cinetina na micropropagação *in vitro* das variedades RB867515 e RB855156 de cana-de-açúcar. **Campo Digital, Campo Mourão**. v.4, n.1, p.122-126, 2009.

VILLA, F.; ARAÚJO, A.,G.; PIO, L.,A.,S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência Agrotecnologia, Lavras**,. v.29, n.3, p.582-589, 2005.

WONG, K.,W.; HARMAN, G.,E.; NORELLI, J.,L.; GUSTAFSON, H.,L.; ALDWINCKLE H.,S.. Chitinase-transgenic lines of 'Royal Gala' apple showing enhanced resistance to apple scab. **Acta Horticulturae**. v.484, p.595-599, 1999.

WU, A. Carbohydrate structural units in glycoproteins and polysaccharides as important ligands for Gal and GalNAc reactive lectins. **Journal of Biomedical Science**, v.10, p.676-688, 2003.

YAN, Q.; JIANG, Z.; YANG, S.; DENG, W.; HAN, L.; A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. **Archives of Biochemistry Biophysics**. v.442, p.72-81, 2005.

YE, X., Y.; NG, T., B.; TSANG, P., W., K.; WANG, J. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Journal of Protein Chemistry**. v.20, n.5, p.367-374, 2001.

YE, X., Y.; NG, T., B. Isolation of Unguilin, a cyclophilin-like protein with anti-mitogenic, antiviral, and antifungal activities, from black-eyed pea. **Journal of Protein Chemistry**. v.20, n.5, p.353-358, 2001.

YEPES, L.,M.; ALDWINCKLE, H.,S. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.37, n.3, p.257-269, 1994.

YU, C.; HUANG, S.; CHEN, C.; DENG, Z.; LING, P.; GMITTER, F.,G. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of sweet orange and citrange. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v.71, p.147-155, 2002.

ZAMBRE, M.; TERRYN, N.; DE CLERC, Q., J.; DE BUCK, S.; DILLEN, W.; MONTAGU, M.,V.; STRAETEN, D.,V.,D.; ANGENON, G. Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium*. **Planta**. v.216, p580-586, 2003.

ZHU, L., H.; HOLEFORS, A., AHLMAN, A., Xue, Z-T., WELANDER, M. Transformation of the apple rootstock M.9:29 with the *rolB* gene and its influence on rooting and growth. **Plant Science**. v.160, p. 433–439, 2001