



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CAMILA CHABI DE JESUS

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE REGENERAÇÃO
POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E TRANSFORMAÇÃO
GENÉTICA DO MAMOEIRO**

**CRUZ DAS ALMAS
2013**

CAMILA CHABI DE JESUS

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE REGENERAÇÃO
POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E TRANSFORMAÇÃO
GENÉTICA DO MAMOEIRO**

Monografia apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, outorgado pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Edna Lôbo Machado

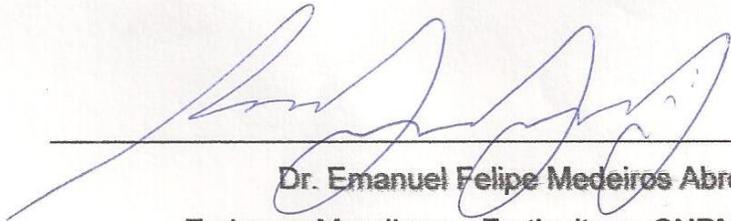
Co-orientador: Dr. Emanuel Felipe M. Abreu

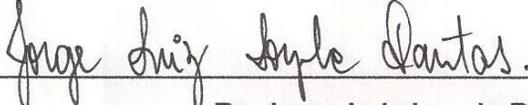
**CRUZ DAS ALMAS – BA
2013**

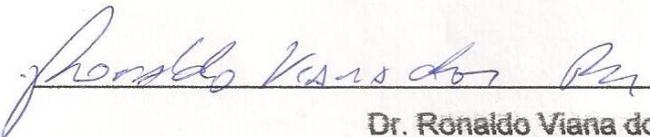
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BANCA EXAMINADORA DA MONOGRAFIA DA DISCENTE
CAMILA CHABI DE JESUS


Dr.ª Edna Lôbo Machado
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- UFRB
(Orientadora)


Dr. Emanuel Felipe Medeiros Abreu
Embrapa Mandioca e Fruticultura- CNPMF
(Co-orientador)


Dr. Jorge Luiz Loyola Dantas
Embrapa Mandioca e Fruticultura-CNPMF


Dr. Ronaldo Viana dos Reis
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- UFRB

FICHA CATALOGRÁFICA

J58

Jesus, Camila Chabi de.

Estabelecimento de protocolo de regeneração por embriogênese somática e transformação genética do mamoeiro / Camila Chabi de Jesus. Cruz das Almas, BA, 2013.

68f.; il.

Orientadora: Edna Lôbo Machado.

Coorientador: Emanuel Felipe Medeiros Abreu.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Mamão – Cultura. 2.Mamão – Biotecnologia. 3.Células – Estudo de caso. I Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 634.651

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo propósito de vida traçado por Ele para mim;

À minha família, especialmente aos meus pais, pelo amor incondicional demonstrado a cada dia;

À UFRB e aos Professores do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, pela oportunidade para realização do curso e pelo crescimento acadêmico absorvido nesta Instituição;

À Embrapa e a FUNARBE, pela oportunidade e apoio na minha vida profissional; Aos funcionários e amigos dos Laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais e de Virologia, pela amizade, sugestões e conselhos concedidos a mim. Em especial a amiga Maria Inês, que esteve sempre presente e disposta a colaborar;

Aos colegas do Laboratório de Transferência de Genes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) pelo acolhimento e ajuda, em especial à Carolina, Fran e Maria Elaine. Aos Dr^s. Glaucia Cabral e Francisco Aragão pela oportunidade e conhecimentos transmitidos;

À minha Orientadora Dr^a. Edna Lôbo, pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho;

Ao meu Co-orientador, Dr. Emanuel Abreu, pela oportunidade, orientação, ensinamentos e incentivos à minha carreira profissional;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos: I- desenvolver um protocolo de regeneração por embriogênese somática (ES) para o mamoeiro (*Carica papaya* L.), espécie frutífera da América Tropical; II- Estabelecer uma curva de seleção com o herbicida glufosinato de amônia (GA) e III- transformar células embriogênicas, pelo método de biobalística. Para tanto, embriões zigóticos imaturos foram utilizados para o estabelecimento da ES, células embriogênicas foram utilizados na curva de seleção com GA, para futura seleção de embriões transformados. Células embriogênicas foram bombardeadas utilizando o vetor plasmidial pBI426, estas passaram por ensaio histoquímico utilizando o reagente X-Gluc. As plântulas de mamoeiro regeneradas encontram-se em estágio de enraizamento; para a curva de seleção com GA, concentrações acima de 5mg/L inibiram o crescimento das células embriogênicas. O método de biobalística mostrou-se eficiente pelo ensaio histoquímico. A partir destes resultados, pode-se inferir que os protocolos propostos foram eficiente na indução do ES e na transformação genética por biobalística.

Palavras-Chave: Biotecnologia. Transgênicos. Biobalística. Biologia do desenvolvimento.

ABSTRACT

This study aimed to: I- to develop a protocol for regeneration by somatic embryogenesis (ES) of papaya (*Carica papaya* L.), fruit species native from tropical America; II- establish a curve selection with the herbicide glufosinate ammonia (GA) and III- embryogenic cells transformed by biolistic method. Therefore, immature zygotic embryos were used for the establishment of ES, and embryogenic cells were used in the curve selection with GA for future selection of transformed embryos. Embryogenic cells were bombarded using the plasmid vector pBI426, these underwent histochemical assay using the reagent X-Gluc. The plantlets regenerated of papaya are in the stadium rooting; curve for selection with GA, concentrations above 5 mg / L inhibited the growth of embryogenic cells. The biolistic method was efficient by histochemical assay. From these results it can be concluded that the proposed protocols have been efficient in the induction of ES and by biolistic gene transformation.

KeyWords: Biotechnology. Transgenic. Biolistic. Developmental biology.

LISTA DE ABREVIações

2,4-D: 2,4-diclorofenoxiacético;
ABA: ácido abicísico;
AIA: endógena ácido indol-3-acético;
BAG: Banco Ativo de Germoplasma;
ES: embriogênese somática;
GA: glufosinato de amônia;
GS: glutamina sintetase;
MS: Murashige e Skoog (1962);
NptII: neomicina fosfotransferase II;
OGM: organismo geneticamente modificado;
PAT: phosphinothricin-N-acetyltransferase;
Ri: plasmídeo *Ri* (de *Root-inducing*);
T-DNA: DNA de transferência;
Ti: plasmídeo *Ti* (de *Tumor-inducing*);
X-Gluc: 5-bromo- 4-cloro-3-indolil glucuronida.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1-** Embriogênese somática do mamoeiro da variedade Sunrise Solo.....44
- Figura 2-** Indução da maturação e germinação de embriões somáticos.....46
- Figura 3-** Plântulas de mamoeiro em estágio de alongamento.....47
- Figura 4-** Plântulas de mamoeiro após 15 dias em meio de enraizamento.....47
- Figura 5-** Avaliação dos tratamentos após 60 dias.....49
- Figura 6-** Experimento com diferentes métodos de desinfestação.....50
- Figura 7-** Curva de seleção de calos embriogênicos de mamoeiro presentes em meio suplementado com diferentes concentrações de glufosinato de amônia.....52

CAPÍTULO II

- Figura 1-** Mapa do vetor pBI426 utilizado na transformação por biobalística.....61
- Figura 2-** Ensaio histoquímico com o reagente X-Gluc.....64
- Figura 3-** Mapa do vetor pBSPAPVirBAR.....66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA.....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 Aspectos gerais de <i>C. papaya</i> L.....	15
3.2 Importância econômica.....	16
3.3 Melhoramento genético do mamoeiro.....	17
3.4 Embriogênese somática no mamoeiro.....	18
3.5 Transformação genética do mamoeiro.....	21
4. OBJETIVOS.....	24
4.1 Objetivo geral.....	24
4.2 Objetivos específicos.....	24
REFERÊNCIAS.....	25

CAPÍTULO I

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ESTABELECIMENTO DA CURVA DE SELEÇÃO COM O HERBICIDA GLUFOSINATO DE AMÔNIA PARA O MAMOEIRO

1. INTRODUÇÃO.....	37
2. OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo geral.....	38
2.1Objetivos específicos.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Estabelecimento do protocolo de regeneração por embriogênese somática.....	39
3.1.1 Coleta dos frutos e desinfestação.....	39
3.1.1.1 <i>Experimento com diferentes desinfestações utilizando embriões zigóticos imaturos.....</i>	40
3.1.2 Desenvolvimentos dos embriões somáticos primários.....	41
3.1.3 Desenvolvimentos dos embriões somáticos secundários.....	41
3.1.4 Maturação dos embriões somáticos.....	41

3.1.5 Germinação dos embriões somáticos.....	42
3.1.6 Indução do enraizamento de enraizamento dos embriões somáticos.....	42
3.2 Estabelecimento da curva de seleção com o herbicida glufosinato de amônia utilizando embriões somáticos de mamoeiro.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 Estabelecimento do protocolo de regeneração por embriogênese somática.....	43
4.2 Experimento com diferentes desinfestações utilizando embriões zigóticos imaturos.....	48
4.3 Estabelecimento da curva de seleção com o herbicida glufosinato de amônia utilizando embriões somáticos.....	50
5. CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS.....	53

CAPÍTULO II

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO MAMOEIRO PELO MÉTODO DE BIOBALÍSTICA

1. INTRODUÇÃO.....	58
2. OBJETIVOS.....	59
2.1 Objetivo geral.....	59
2.1 Objetivos específicos.....	59
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
3.1 Transformação de colônias de <i>E. coli</i> por eletroporação e isolamento do vetor plasmidial pBI426.....	60
3.2 Transformação genética do mamoeiro pelo método de biobalística.....	62
3.2.1 Ensaio histoquímico com as células embriogênicas recém-transformadas utilizando o reagente X-Gluc.....	63
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5. CONCLUSÃO.....	66
REFERENCIAS.....	67

1. INTRODUÇÃO

Carica papaya L. (Caricaceae) é uma espécie frutífera nativa da América Tropical (KOEHLER, 2004), destacando-se como o segundo maior produtor mundial de mamão, superado pela Índia. Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization*, 2013) os principais países produtores em 2011, foram a Índia, Brasil, Indonésia, República Dominicana, Nêgeria e Mèxico.

Em 2010 o Brasil lucrou em torno de US\$ 35,12 milhões com as exportações da fruta, sendo que no ano seguinte (2011) houve aumento de 10% nas vendas de mamão para o mercado externo (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2012). Os principais estados produtores no Brasil são a Bahia (50 %), o Espírito Santo (30 %), o Ceará (6 %), o Rio Grande do Norte (3,7%) e Minas Gerais (2,4 %) (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE, 2013). O Brasil produz 15,7 % da produção mundial de mamão (FAO, 2013). O mamão é a sétima fruta *in natura* mais exportada no país, sendo cultivado em aproximadamente 30 mil hectares (ABREU, 2010).

Atualmente, as variedades de mamoeiro mais cultivadas comercialmente pertencem aos grupos Solo e Formosa. De uma maneira geral, variedades do grupo Solo, desenvolvidas no centenário programa de melhoramento genético da Universidade do Havaí, dominam os plantios comerciais no mundo (CARMO, 2003). As variedades do grupo Solo são exploradas em várias regiões do mundo, por produzirem frutos preferidos no processo de exportação, com tamanho menor (DANTAS e OLIVEIRA, 2009). Sendo a variedade Sunrise Solo, umas das mais utilizadas no mercado nacional e internacional.

O interesse na cultura de *C. papaya* reside em dois principais produtos: o fruto e o látex. O mamão é conhecido como umas das frutas mais ricas em vitamina A e C. Além do aspecto alimentar, que é o mais direto e conhecido, frutos, folhas e sementes da planta fornecem produtos de amplo uso medicinal e de utilização na indústria e nos segmentos alimentícios, têxtil e cosmético, como a papaína, uma enzima proteolítica e a carpaína, um alcalóide empregado como ativador do músculo cardíaco. A papaína é produzida nos laticíferos distribuídos no corpo da planta, encontrada em grande quantidade principalmente nos frutos imaturos (KOEHLER, 2004).

O desenvolvimento da cultura do mamoeiro tem sido limitado por fatores relacionados à sua natureza dióica, à heterozigose, à suscetibilidade a doenças e à falta de métodos de multiplicação vegetativa. Segundo Drew (1987), o mamoneiro é

uma espécie alógama, fato que eleva a taxa de heterozigose nos plantios comerciais. Em consequência, há uma mistura de genótipos com considerável variação em relação ao rendimento, qualidade dos frutos e susceptibilidade a várias doenças (FERNANDO et al., 2001).

A propagação do mamoeiro pode ser feita mediante sementes, estacas, enxertia ou ainda utilizando as técnicas de cultura *in vitro*. Neste último caso, plantas são regeneradas via organogênese ou embriogênese somática, podendo-se obter milhares de mudas com alto padrão de qualidade (LIMA, 2003), mais homogêneas e geneticamente idênticas (clones).

A embriogênese somática apresenta como principal vantagem a multiplicação em larga escala de embriões geneticamente idênticos, via ciclos repetitivos de divisão celular. Segundo Jiménez (2001), a embriogênese somática (ES) é o meio pelo qual células somáticas se desenvolvem em estruturas que se assemelham aos embriões zigóticos com uma série de estádios embriológicos característicos, sem fusão de gametas. A ES tanto pode ser empregada para a propagação clonal *in vitro* como também, na tecnologia de transferência gênica e regeneração de células transformadas (ABREU, 2010).

A transformação genética é a transferência controlada de ácidos nucleicos exógenos para o genoma de um organismo vivo por via não sexual (TORRES et al., 2000). Esse método biotecnológico permite não somente reduzir o tempo da obtenção de variedades com novas características, mas também transmitir propriedades de espécies que, normalmente, são sexualmente incompatíveis.

Por muitos anos, o único método disponível para a introdução de características de interesse em plantas foi o melhoramento clássico, envolvendo cruzamentos, seguidos pela seleção de plantas com fenótipo desejável. Porém, esse processo é lento, necessitando vários anos para produzir e liberar comercialmente uma nova variedade (MALDANER, 2009).

Segundo Santarém (2000), vários métodos para a transferência de genes em plantas têm sido propostos, possibilitando a produção de plantas transgênicas das espécies de maior importância no mundo, mamoeiro (*C. papaya*) via *Agrobacterium* (FITCH (1993); CABRERA-PONCE et al. (1996); CHENG et al. (1996), e por

biobalística (CAI et al. (1999) e SOUZA JR (1999), bananeira (*Musa sp*) por biobalística (MORAIS et al.,1999), videira (*Vitis vinifera L.*) por *Agrobacterium* (PERL et al., 1996);, soja (*Glycine max L.*) por *Agrobacterium* (HINCHEE et al., 1988) e biobalística (McCABE et al., 1988); feijão (*Phaseolus vulgaris*) por biobalística (ARAGÃO et al., 1996).

A transferência de genes para espécies vegetais tem sido possível graças à manipulação genética de células, utilizando métodos indiretos ou diretos de transformação (MALDANER, 2009). No método indireto é necessária a utilização de um vetor, a exemplo do *Agrobacterium tumefaciens*, para a transferência do DNA exógeno (BRASILEIRO e DUSI, 1999). Com o intuito de obter métodos de transformação independentes do genótipo várias técnicas de transferência direta de DNA foram desenvolvidas (ANDRADE, 2003). A transformação direta consiste no uso de métodos químicos ou físicos e, atualmente os dois principais são biobalística (SANFORD, 1988) e a eletroporação (SANTARÉM, 2000). Esses métodos não requerem a utilização de vetores biológicos e são os mais utilizados na transformação genética de plantas.

2. JUSTIFICATIVA

O Brasil nos últimos anos vem se destacando como um dos principais produtores de mamão, destinado tanto para o mercado interno como externo. Dantas et al. (2012) destacam a participação do Estado da Bahia, com 58,34% da produção nacional, seguido do Espírito Santo.

O cultivo do mamoeiro está limitado principalmente à suscetibilidade a doenças virais, como vírus da meleira (“Papaya meleira vírus”) e a mancha anelar (*Papaya ringspot virus*), causadores de enormes prejuízos aos produtores do fruto. Diferentes estratégias têm sido utilizadas, sem sucesso, no controle destas viroses. O controle é bastante difícil, dispendioso e com opções restritas. O manejo empregado depende da virose alvo, para a meleira utiliza-se estratégias para reduzir a população do inseto vetor sem empregar inseticidas. Para todas as viroses é importante à produção controlada de mudas, que em alguns locais tem sido feita em telados a prova de

insetos, plantações em locais isolados, assim como a realização da desinfestação de ferramentas de corte e “*rouging*” em toda a região produtora.

A produção de cultivares de mamoeiros resistentes à infecção por estes vírus é a opção mais promissora e desejável para ser utilizada em um manejo integrado de pragas. Para isto, programas de melhoramento têm buscado genes que induzam resistência do tipo imunidade ou tolerância a esses vírus, entretanto, até então não foi encontrado fontes naturais de resistência genética aos vírus da meleira e da mancha anelar.

Uma alternativa à busca e incorporação de genes de resistência é a utilização de estratégias biotecnológicas para o desenvolvimento de variedades de mamoeiro resistentes. Uma destas estratégias é o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes às doenças virais. Apesar da existência de uma grande variedade de técnicas de transformação, não existe ainda um sistema de transferência de genes que possa ser comumente utilizado para todas as espécies vegetais. Assim, faz se necessários, para o mamoeiro, o estabelecimento de um protocolo de regeneração por embriogênese somática e a transformação genética para posterior obtenção de plantas ecológicas e agronomicamente desejáveis.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos Gerais de *Carica papaya* L.

O mamoeiro cultivado comercialmente pertence à classe Dicotyledoneae subclasse Archichlamydeae, ordem Violales, subordem Caricaceae, família Caricaceae e gênero *Carica*. A pequena família Caricaceae está dividida em cinco gêneros, dos quais quatro são americanos e um africano, com 34 espécies: *Carica* (21 espécies), *Cylicomorpha* (2 espécies), *Horovitzia* (1 espécie), *Jacaratia* (7 espécies), e *Jarilla* (3 espécies) (DANTAS et al., 2012).

Dentre essas espécies, o mamoeiro, *Carica papaya*, $2n=18$ cromossomos (KUMAR e ABRAHAM, 1942), é a mais importante economicamente. Trata-se de uma planta herbácea frutífera, originária da América Central, mas com ocorrência

principalmente em regiões tropicais e subtropicais da América e África (MING et al., 2007).

De uma forma geral, conforme o tipo de fruto, as cultivares de mamão mais exploradas no Brasil são classificadas em dois grupos, o grupo Solo (sendo as variedades Sunrise Solo e a Golden as mais cultivadas') e Formosa ('Tainung nº 1') (DANTAS et al., 2012). As plantas 'Sunrise Solo' iniciam a floração aos três ou quatro meses de idade, com altura de inserção das primeiras flores variando de 70 a 80 cm. Planta precoce, iniciando a produção oito a dez meses após o plantio, produtiva, com produtividade média de 45 t/ha/ano. Frutos de casca lisa e firme com polpa vermelho-alaranjada, de boa qualidade, de tamanho pequeno, com peso médio de 500 g, formato piriforme a ovalado e cavidade interna estrelada.

A principal forma de propagação utilizada, em escala comercial é por sementes (MARANCA, 1992). Entretanto, algumas variedades apresentam elevada taxa de heterozigose. A estaquia e a enxertia, que são empregados em muitas culturas, não são métodos eficientes para a propagação em larga escala do mamoeiro (SAKER et al., 1999), em razão do baixo rendimento e da dificuldade de enraizamento das estacas (VIANNA, 1996).

3.2 Importância Econômica

Atualmente, os principais países produtores mundiais de mamão são: Índia (4.180.080 toneladas), Brasil (1.854.340 toneladas), Indonésia (958.251 toneladas), República Dominicana (891.731 toneladas) e Nêgeria (705.000 toneladas) (FAO, 2013). De acordo com esses dados, o Brasil figura como o segundo maior produtor mundial de mamão com uma produção de 1,85 milhões de toneladas (15,7% da produção mundial), apenas atrás da Índia, líder absoluta com 4,18 milhões de toneladas (35,3%). A Bahia contribui com 50% da produção brasileira, sendo o maior estado produtor do país (IBGE, 2013). O mercado interno absorve a grande parte deste mercado, que também observa perdas de cerca de 20% da produção, o que representa, em valor da produção (IBGE, 2013), um desperdício de aproximadamente R\$ 250 milhões.

Segundo Koehler (2004), o interesse na cultura de *C. papaya* reside em dois principais produtos, o fruto e o látex. O mamão *papaya* é suculento e apresenta sabor

agradável, características que atraem a preferência de muitos consumidores. Além de ser ingerido *in natura*, o fruto também é utilizado em saladas, sucos, doces e em uma variedade de bebidas (ABREU, 2010). Além de importante em termos econômicos, a cultura do mamão também apresenta grande importância social, com geração de empregos diretos e indiretos, tendo em vista que os tratos culturais, colheita e a comercialização ocorrem durante o ano todo, garantindo a permanência do homem do campo na zona rural e diminuindo significativamente o êxodo rural.

Independente da forma, o consumo do mamão é recomendado por ser um alimento rico nutricionalmente. Constitui-se numa das principais fontes de vitaminas A, C e do complexo B (folato, tiamina, niacina, riboflavina), fósforo, potássio, ferro, cálcio e fibra (MING et al., 2007). Além do aspecto alimentar, o látex do mamoeiro contém a enzima proteolítica papaína, utilizada nas indústrias alimentícias, têxteis, farmacêuticas, de laticínios e de perfumes (BAJPAI e SINGH, 2006); e a carpaína, um alcalóide empregado como ativador do músculo cardíaco (PARASNIS et al., 1999); ambos de grande importância comercial (ABREU, 2010).

3.3 Melhoramento genético do mamoeiro

Para atender as exigências dos mercados nacional e internacional, os programas de melhoramento do mamoeiro buscam linhagens que sejam, sobretudo, hermafroditas, resistentes a patógenos, ricas em papaína e látex, e que produzam frutos com maturação uniforme e resistentes à conservação e ao transporte (KOEHLER, 2004). No entanto, ainda não existe um método prático e barato para determinação sexual precoce do mamoeiro. Então, faz-se necessária a busca por alternativas na produção em larga escala de plantas hermafroditas de *C. papaya* (SCHMILDT et al., 2007).

Os trabalhos de melhoramento genético do mamoeiro têm como base os estudos feitos por Hofmeyer (1938), Storey (1938), Awada (1953), Horovitz (1954) e outros. Segundo Hofmeyer (1938), Storey (1953) e Horovitz (1954) existe uma grande diversidade de tipos de mamoeiro, com características desejáveis para um programa de melhoramento. Entretanto, existem poucas linhagens realmente melhoradas ou mesmo consideradas como variedades definidas, em função da propagação de plantas por sementes, durante sucessivas gerações, sem o devido controle das polinizações

(DANTAS et al., 2012). A inserção de genes de resistência ao vírus da mancha anelar e da meleira em variedades comerciais de mamoeiro pelo melhoramento tradicional, até então, não apresentou resultados satisfatórios. Sendo assim, novos métodos de proteção baseados em engenharia genética e transferência de genes têm sido investigados (FITCH, 1995).

Segundo Oliveira et al. (1996), nas últimas décadas diversas técnicas biotecnológicas têm sido desenvolvidas e empregadas com sucesso para gerar subsídios aos programas de melhoramento do mamoeiro, a exemplo da cultura de tecidos. A cultura de tecidos vegetais consiste no conjunto de técnicas que possibilitam a manutenção ou o cultivo de plântulas, embriões, órgãos, tecidos e células in vitro, em meio de cultura apropriado e asséptico, sob condições controladas de temperatura, umidade, fotoperíodo e intensidade luminosa. Essas técnicas têm sido empregadas no desenvolvimento e propagação de cultivares ecológica e/ou agronomicamente relevantes (TORRES et al., 1998).

A embriogênese somática (CHEN et al., 1987; FITCH e MANSARDT, 1990; YANG e YE, 1992; FITCH, 1993; JORDAN e VELOZO, 1996; VIANNA, 1996; CASTILLO et al., 1998; ALMEIDA et al., 2000 e 2001; FERNANDO et al., 2001; RENUKDas et al., 2003; ASCENCIO-CABRAL et al., 2008; HOMHUAN et al., 2008), a micropropagação (DREW e MILLER 1989), o isolamento e cultivo de protoplastos (CHEN e CHEN 1992, CHEN 1994), a transformação genética (YANG et al., 1996; CARMO e JÚNIOR, 2003), a produção de sementes sintéticas (CASTILLO et al., 1998), resgate de embriões e a cultura de anteras (RIMBERIA et al. 2005, 2006) são algumas das ferramentas da cultura de tecidos que vêm sendo aplicadas em explantes de mamoeiro objetivando o melhoramento genético da cultura.

3.4 Embriogênese somática no mamoeiro

Em apoio aos programas de melhoramento genético do mamoeiro têm sido empregados com sucesso diversas técnicas de biotecnologia tais como: como resgate de embriões, cultura de anteras, isolamento e cultivo de protoplastos, produção de sementes artificiais, micropropagação, marcadores moleculares e transformação genética, têm sido empregadas com sucesso (OLIVEIRA, 1996).

A cultura de tecidos no cultivo do mamão tem uma importância considerável e diferentes protocolos têm sido propostos (CLARINDO et al., 2008). Dentre os procedimentos da cultura de tecidos, a embriogênese somática tem se constituído um sistema alternativo e competitivo para a multiplicação e a manutenção em larga escala de plântulas de *C. papaya* com características de grande interesse agrônômico, a exemplo do sexo hermafrodita (FITCH, 1993).

A embriogênese somática, também conhecida como embriogênese adventícia ou assexual, consiste na formação de embriões e sua conversão em plantas a partir de haplóides ou células somáticas por meio de estímulos especiais (KOEHLER, 2004). Segundo Jiménez (2001), a embriogênese somática apresenta como principal vantagem a multiplicação em larga escala de embriões geneticamente idênticos via ciclos repetitivos de divisão celular.

Para que ocorra o processo de ES, as células diferenciadas devem, antes de tudo, ser desdiferenciadas depois da divisão celular, para serem determinadas como células embriogênicas e posteriormente serem rediferenciadas (PASQUAL et al., 1997). As mudanças no desenvolvimento do embrião são visíveis, passando pelos estádios típicos da embriogênese zigótica, isto é, estágio globular, codiforme e torpedo, em dicotiledôneas; globular e cotiledonar, em monocotiledôneas; globular, cotiledonares precoces e tardios, em coníferas (DONG e DUNSTAN, 2000); essas estruturas terminam por se converter em plantas completas, através de uma série de processos que correspondem aos que ocorrem nos embriões zigóticos (TISSERAT et al., 1979).

A ES tem sido bem estudada em vários cultivares comerciais de mamoeiro. Entretanto, a literatura relata a dificuldade de sincronização nos processos de maturação dos embriões, do surgimento de anomalias (...), as baixas taxas de germinação e hiperidricidade (KOEHLER, 2004), que são desordens metabólicas decorrente do acúmulo anormal de água no interior das células e tecidos. Geralmente, o processo de ES é induzido por tratamentos com auxinas, especialmente o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Esses reguladores de crescimento são essenciais na aquisição de competência embriogênica pelas células (ABREU, 2010).

A partir da década de 80 a embriogênese somática no mamoeiro vem sendo melhor estudada e explorada para a propagação clonal *in vitro*. No entanto, pode-se

também incluir aplicações para a tecnologia de transferência gênica e para a regeneração de células transformadas (ALMEIDA et. al, 2001).

A embriogênese somática também tem sido bem documentada para outras espécies do gênero, tais como *Carica stipulata* V.M. Badillo (LITZ e CONOVER, 1978), *Carica pentagona* Heilborn (VEGA de ROJAS e KITTO, 1991; JORDAN e VELOZO, 1997), e *Carica pubescens* (JORDAN e VELOZO, 1996; 1997), todas pertencentes a um grupo de espécies conhecido como “papaya shighland”, particularmente comuns em algumas regiões subtropicais (CARDENAS, 1989). O interesse nessas espécies reside principalmente na procura de genes de resistência a doenças e tolerância a baixas temperaturas (KOEHLER, 2004). Embriões somáticos de mamoeiro de varias cultivares já foram induzidos a partir de explantes como pecíolos, caules, folhas, raízes e embriões zigóticos (CHEN et al., 1987; FITCH e MANSARDT, 1990; YANG e YE, 1992; FITCH, 1993; KHATOOM e SULTANA, 1994; MONDAL, 1994).

Diversas fontes de explantes têm sido utilizadas para obtenção de embriões somáticos de mamoeiros: ápice caulinar (MEDHI e HOGAN, 1976), óvulos (LITZ, 1986), raízes (CHEN et al., 1987; LIN e YANG, 2001), embriões imaturos (FITCH e MANSARDT, 1990), protoplastos (CHEN e CHEN, 1992), tegumentos de sementes imaturas (MONMARSON et al., 1995), pecíolos (YANG et al., 1996), gema axilar (JORDAN e VELOZO, 1996), folha ou cotilédone (CABRERA-PONCE et al. 1996, HOMHUAN et al. 2008), segmentos de hipocótilo (ALMEIDA et al., 2001), embriões zigóticos maduros (FERNANDO et al., 2001) e antera (RIMBERIA et al., 2006).. Segundo Monmarson et al. (1995) na maioria dos trabalhos observa-se a utilização de embriões zigóticos imaturos, visto que este tipo de explante apresenta alto potencial embriogênico e baixo índice de contaminação bacteriana e fúngica, ao contrário de tecidos adultos.

Independente do explante explorado, o mamoeiro *C. papaya* tem respondido bem às técnicas de ES, desde que esses explantes sejam oriundos de plantas saudáveis, vigorosas, mantidas em crescimento ativo, sem estresse ambiental (VIANNA, 1996), e que as condições in vitro sejam adequadas para o desenvolvimento da ES (DREW, 2003). Observa-se, portanto, que a maioria dos trabalhos em ES utiliza embriões zigóticos imaturos, visto que este tipo de explante apresenta alto potencial

embriogênico e baixo índice de contaminação bacteriana e fúngica, ao contrário de tecidos adultos (MONMARSON et al., 1995).

3.5 Transformação genética do mamoeiro

O processo de transformação genética é definido como a introdução controlada de ácidos nucleicos em um genoma receptor sem comprometer a viabilidade das células (MALDANER, 2009). Como resultado do processo de transformação genética, obtém-se um organismo geneticamente modificado (OGM), também denominado organismo transgênico, que entre os benefícios gerados por essa nova tecnologia para a agricultura mundial, inclui-se a possibilidade de aumentar a produção de alimentos com maior teor nutricional (BATISTA et al., 2005).

Existem diversas técnicas de transformação genética de plantas, agrupadas em duas categorias: transferência direta e indireta de genes. O método de transferência indireta de genes é mediado pela *Agrobacterium* que é uma bactéria de solo, Gram negativa, aeróbica, pertencente à Família *Rhizobiaceae* (ZAMBRISKY, 1988). A técnica consiste em colocar o explante na presença do vetor de transformação (*Agrobacterium*) contendo o gene de interesse onde eles são co-cultivados (MALDANER, 2009). As bactérias possuem plasmídeos que recebem denominações de acordo com a alteração de desenvolvimento vegetal que provocam: *Ti*, indutor de tumores, e *Ri*, indutor de raízes. Atualmente, *A. tumefaciens* é a mais usada para estudos de transformação. Durante a infecção por *A. tumefaciens*, uma parte do plasmídeo *Ti*, denominada T-DNA ou DNA de transferência, é transferida para a célula vegetal e integrada no genoma (HOHN, 1992).

Os métodos de transferência direta de genes utilizam processos físicos ou químicos, causando modificações nas paredes e membranas celulares, facilitando a introdução de DNA exógeno. Diversos métodos diretos têm sido propostos, variando em sua eficiência e praticidade. Entre eles, os métodos que resultaram em maior número de espécies transformadas foram a eletroporação de protoplastos e a aceleração de partículas (FISK e DANDEKAR, 1993).

Até o momento somente dois sistemas de transformação foram utilizados para a produção de mamoeiros transgênicos, a transformação mediada por *Agrobacterium* e

por biobalística (CARMO, 2003). Existe a possibilidade de realizar a transformação por eletroporação, mas até então células transformadas não foram produzidas por essa técnica (CHEN, 1994).

O método de eletroporação foi desenvolvido como alternativa à transformação via *Agrobacterium*, proposto inicialmente para transformação de cereais e posteriormente, estendida a outras espécies vegetais. Esse método consiste no emprego de pulsos elétricos curtos de alta voltagem que modificam, temporariamente, a estrutura da membrana plasmática, induzindo a formação de poro ao longo de sua superfície (ANDRADE, 2003). Dessa maneira, é possível aumentar a permeabilidade da membrana, possibilitando a entrada do gene exógeno.

Outro método que é bastante utilizado e apresenta vantagens em relação as demais estratégias é o bombardeamento de partículas. Este método foi desenvolvido por Sanford et al. (1987) e colaboradores na Universidade de Cornell. Foi denominado biobalística (biológico + balística = biobalística) em razão da alta velocidade imprimida aos microscópicos projéteis revestidos com DNA (BORÉM, 1998). Esta é uma técnica que apresenta uma vantagem sobre as demais, uma vez que pode ser utilizada em tecidos intactos, além disso, o procedimento não requer cultura de células ou pré-tratamento dos tecidos a serem bombardeados (RAVEN, 1999).

O método consiste na aceleração de micropartículas que atravessam a parede celular e a membrana plasmática, de forma não letal, carregando substâncias adsorvidas, como DNA, RNA ou proteínas, para o interior da célula (SANFORD, 1988) rompendo a barreira da parede celular e da membrana plasmática, sem o uso de vetores biológicos. Para isso, microprojéteis de ouro ou tungstênio, cobertos com moléculas de DNA, são acelerados a alta velocidade pelo acelerador de micropartículas que produz uma força propulsora, usando pólvora, gás hélio ou eletricidade, o que possibilita sua penetração em células intactas (MALDANER, 2009). Após o bombardeamento, uma proporção de células atingidas permanece viável; o DNA é integrado no genoma vegetal e incorporado aos processos celulares de transcrição e tradução (SANTARÉM e FERREIRA, 1997).

Para a aceleração das micropartículas, diferentes sistemas foram desenvolvidos e construídos, como a onda de choque gerada por uma explosão química, utilizando

pólvora seca (SANFORD et al., 1987); a vaporização de uma gota de água decorrente de descarga elétrica com alta voltagem e baixa capacitância (McCABE et al., 1988), por uma descarga de ar comprimido (MORIKAWA et al., 1989), a descarga de hélio a alta pressão (SANFORD et al., 1991), ou com baixa voltagem a alta capacitância (RECH et al., 1991). No entanto, os sistemas que utilizam gás hélio sob alta pressão e descarga elétrica possuem um amplo espectro de utilização e são mais eficientes para a obtenção de altas frequências de transformação em diferentes espécies vegetais. O sistema que utiliza gás hélio sob alta pressão tem sido responsável pela totalidade das plantas transgênicas obtidas pelo processo de biobalística (RECH e ARAGÃO, 1998).

Pang e Sanford em 1988 relataram o primeiro sucesso na transformação genética em mamoeiro mediada por *Agrobacterium*, mas não foram capazes de regenerar plantas transgênicas. Trabalhos posteriores, como Fitch et al. (1993), Cabrera-Ponce et al. (1996), Cheng et al. (1996), e Chen et al. (2001) mostraram-se capazes de regenerar mamoeiros transgênicos.

Fitch et. al. (1990), Cabrera-Ponce et. al. (1995), Mahon et. al. (1996), Tennant (1996), De la Fuente et. al. (1997), Gonsalves et al. (1998), Neupane et al. (1998), Cai et al. (1999) e Souza Jr (1999) utilizaram a biobalística e com esta técnica obtiveram sucesso no desenvolvimento de mamoeiros transgênicos.

Sucessos na transformação genética de diversas variedades do grupo Solo foram relatados, entre elas: Sunrise e Kapoho (PANG e SANFORD 1988), Sunset (FITCH et al., 1994) e Kamiya (FITCH et al., 1998). Outras variedades também são relatadas: Maradol (CABRERA-PONCE et al., 1995) e Tainung (CHENG et al., 1996).

A transformação genética de mamoeiro é hoje uma realidade, sendo que mamoeiros transgênicos já se encontram no mercado americano desde 1998 (MALDANER, 2009). Outros mamoeiros transgênicos se encontram em avançada fase de avaliação em casa-de-vegetação e campo, em diversos países, entre os quais cabe destacar: Brasil, Jamaica, México, Taiwan e Tailândia.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Objetivou-se neste trabalho a regenerar embriões somáticos por embriogênese somática do mamoeiro, estabelecer um sistema de seleção positiva com o herbicida glufosinato de amônia e transformar células embriogênicas da variedade Sunrise Solo, pelo método de biobalística.

4.2 Objetivos específicos:

CAPITULO I:

- Estabelecer um protocolo de regeneração por embriogênese somática utilizando embriões zigóticos imaturos do mamoeiro, como explante;
- Desenvolver um sistema de desinfestação dos embriões zigóticos imaturos que impeça o surgimento de contaminações endógenas futuras;
- Encontrar uma dosagem do herbicida glufosinato de amônia (GA) que iniba o crescimento e desenvolvimento das células embriogênicas visando à seleção positiva após transformação genética.

CAPITULO II

- Clonar, extrair e purificar o vetor pBI426;
- Confirmar a presença do DNA exógeno nas células embriogênicas por meio de ensaio histoquímico utilizando o reagente X-Gluc.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I. S. **Monitoramento da embriogênese somática de *Carica papaya* L. por técnicas citogenéticas de citometria de fluxo**. Dissertação Mestrado. UFV, 2010
- ALMEIDA, E. P. Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. **Scientia Agricola**, v.58, n.1, p.51-54, jan./mar. 2001.
- ALMEIDA, E. P., OLIVEIRA, R. P., DANTAS, J. L. L. Protocolo para a embriogênese somática do mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.10, p.2017-2024, 2000.
- ANDRADE, S. R. M. **Transformação de plantas**. Planaltina: Embrapa Cerrados. p.28, 2003.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul: Ed. Gazeta Santa Cruz, p.129, 2012.
- ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, L.; BRASILEIRO, A. C. M.; RIBEIRO, S. G.; SMITH, F. D.; SANFORD, J. C.; FARIA, J. C.; RECH, E. L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris*) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.142-150, 1996.
- ASCENCIO-CABRAL, A.; GUTIÉRREZ-PULIDO, H; RODRÍGUEZ-GARAY, B.; GUTIÉRREZ-MORA, A. Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. **Scientia Horticulturae**, v.118, p.155-160, 2008.
- AWADA, M. Effects of moisture on yield and sex expression of the papaya plants (*Carica papaya* L.). **Hawaii: Hawaii Agricultural Experiment Station**, 4p. (Progress Notes, 97), 1953.
- BAJPAI, A.; SINGH, A, K. Meiotic behavior of *Carica papaya* L.: spontaneous chromosome instability and elimination in important cvs. in North indian conditions. **Cytologia**, 71: 131-136, 2006.
- BATISTA, R.; NUNES, D.; CARMO, M.; CARDOSO, C.; SÃO JOSÉ, H.; ALMEIDA, A.B.; MANIQUE, A.; BENTO, L.; RICARDO, C.P.; OLIVEIRA, M.M. Lack of detectable allergenicity of transgenic maize and soybean samples. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 116:403-410, 2005

BORÉM, A. MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 5 ed. Viçosa: Editora UFV. p.420-431, 1998.

BRASILEIRO, A.C.M. e DUSI, D.M.A. Transformação Genética de Plantas. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S. e BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, 1999.

CABRERA-PONCE, J. L.; VEGAS-GARCIA, A.; HERRERA-ESTRELA, L. Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, p. 1-7, 1995.

CABRERA-PONCE, J. L.; VEGAS-GARCIA, A.; HERRERA-ESTRELA, L. Regeneration of Transgenic Papaya Plants via Somatic Embryogenesis induced by *Agrobacterium rhizogenes*. **In vitro Cellular e Desenvolpmental Biology – Plant**, Largo, MD, v. 32, p. 86-90, 1996.

CADERNAS, M. **Manual de plantas econômicas de Bolívia. La Paz**: Ed. Los Amigos Del Libro, 333p, 1989.

CAI, W.; GONSALVES, C.; TENNANT, P.; FERMIN, G.; SOUZA JR., M. T.; SARINDU, N.; JAN, F.; ZHU, H.; GONSALVES, D. A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In vitro Cell Dev. Biol. - Plant*, v.35, p. 61-69.1999.

CARMO, L. S. T. **Transformação de mamoeiro - XV anos de sucesso**. Centro Universitário de Brasília, Brasília-DF. Monografia, 2003.

CARMO, L. S. T.; JÚNIOR, M. T. S. **Transformação genética de mamoeiros – 15 anos de sucesso**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/ Documentos 100, 23 p., 2003.

CASTILLO, B.; SMITH, M. A. L.; YADAVA, U. L. Liquid system scale up of *Carica papaya* L. somatic embryogenesis. **Journal of Horticultural Science e Biotechnology**, 73: 307-311, 1998.

CHEN, G.; YE, C. M.; HUANG, J. C.; YU, M.; LI, B. J. Clonning of the papaya ringspot virus (PRSV) replicase gene and generation of PRSV-resistant papayas through the introduction of the PRSV replicase gene. **Plant Cell reports**, Berlin, n. 20, p.272-277, 2001.

CHEN, M. H. Regeneration of plants from protoplasts of *Carica* species (*papaya*). In: **Biotechnology in Agriculture and Forestry 29** / Plant Protoplasts and Genetic Engineering V, YPS Bajaj (ed.), Ed. Springer-Verlag, pp. 52-60, 1994.

CHEN, M. H., CHEN, C. C. Plant regeneration from *Carica* protoplasts. **Plant Cell Reports**, v.11, p. 404-407, 1992.

CHEN, M. H.; WANG, P. J.; MAEDA, E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. **Plant Cell Report**, v.6, p.348- 351, 1987.

CHEN, M. H.; WANG, P. J.; MAEDA, E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. **Plant Cell Reports**, 6: 348-351, 1987.

CHENG, Y. H.; YANG, J. S.; YEH, S. D. Efficient transformation of papaya by *Agrobacterium* following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with caborundum. **Plant Cell reports**, Berlin, n. 16, p.127-132, 1996.

CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R.; ARAÚJO, F.S.; ABREU, I. S.; OTONI, W. C. Recovering polyploid papaya in vitro regenerants as screened by flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 92: 207-214, 2008.

DANTAS, J. L. L.; OLIVEIRA, E. J. O melhoramento genético do mamoeiro: avanços, desafios e perspectivas. In: **I Simpósio Nordestino de Genética e Melhoramento de Plantas**, 2009, Fortaleza -CE. O melhoramento genético no contexto atual. Fortaleza - CE : Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. v. 1. p. 151-180.

DANTAS, J. L. L.; SOUZA, J. S.; PINTO, R. M. S.; LIMA, J. F. Variabilidade genética e melhoramento do mamoeiro. In: **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**, 2012.

DONG, J. Z.; DUNSTAN, D. I. Molecular biology of somatic embryogenesis in conifers. In: JAIN, S.M.; MINOCHA, S.C. (Eds), Molecular biology of woody plants. Dordrecht : **Kluwer Academic**, p. 51–87, 2000.

DREW, R. A. **Micropropagation of *Carica papaya* and related species**. In: Micropropagation of Woody Trees and Fruits, SM Jain & K Ishii (eds.), Ed. Kluwer Academic Publishers, pp. 543-564, 2003.

DREW, R. A. The effects of medium composition and cultural conditions on *in vitro* root initiation and growth of papaya (*Carica papaya* L.). **Journal of Horticultural Science**, v.62, n.4, p.551-556, 1987.

DREW, R. A.; MILLER, R. M. Nutritional and cultural factors affecting rooting of papaya (*Carica papaya* L.) *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, 64: 767-773, 1989.

FERNANDO, J. A.; MELO, M.; SOARES, M. K. M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Anatomy of somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 44: 247-255, 2001.

FISK, H. J.; DANDEKAR, A. M. The introduction and expression of transgenes in plants. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, 55: 5-36, 1993.

FITCH, M. M. M. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** 32:205-212; 1993.

FITCH, M. M. M. **Somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya* L.)**. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. New York, Springer-Verlag, v. 30, p.261-279, 1995.

FITCH, M. M. M.; MANSCHARDT, R. M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Cell Reports**, 9: 320-324, 1990.

FITCH, M. M. M.; MANSCHARDT, R. M.; GONSALVES, D., SLIGHTOM J. L., SANFORD, J. C. Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. **Plant Cell Reports**, n .9, p.189-194. 1990.

FITCH, M. M. M.; MOORE, P.; DREW, R. A.; LEONG, T. Progress in transgenic papaya (*Carica papaya*) research: Transformation for broader resistance among cultivars and micropropagated in selected hybrid transgenic plants. **Acta Horticulturae**, n. 461, p. 315-319. 1998.

FITCH, M. M. M.; PANG, S. Z.; SLIGHTOM, J. L.; LIUS, S., TENNANT, P.; MANSCHARDT, R. M.; GONSALVES, D. Genetic Transformation in *Carica papaya* L. (Papaya). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v: 29, p.232-256.1994.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – **FAO**. Faostat. Disponível em <www.fao.org>. Acesso em 10/04/2013.

FUENTE, J. M. de la.; RAMÍREZ-RODRIGUEZ, V.; CABRERA-PONCE, J. L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Aluminium tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthase. **Science**, Washington, v. 276, p. 1566-1568, 1997.

GONSALVES, D. Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. **Annu. Rev. Phytopathol.** 36:415-437; 1998.

HINCHEE, M. A. W.; CONNOR-WARD, D. V.; NEWELL, C. A.; McDONNELL, R. E.; SATO, S. J.; GASSER, C. S.; FISCHHOFF, D. A.; RE, D. B.; FRALEY, R. T.; HORSCH, R. B. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Nature Biotechnology**, 6:915-922, 1988.

HOFMEYER, J. D. J. Genetical studies of *Carica papaya* L. African Dept. Agric. For. **Science**, Bull., v.187, p1-64, 1938.

HOHN, B. Exploration of *Agrobacterium tumefaciens*. In: RUSSO, V.E.A. et al. **Development: the molecular genetic approach**. Berlin: Springer-Verlag, 1992.

HOMHUAN, S.; KIJWIJANA, B.; WANGSOMNUKA, P.; BODHIPADMAB, K.; LEUNG, D. Variation of plants derived from indirect somatic embryogenesis in cotyledon explants of papaya. **Science Asia**, 34: 347- 352, 2008.

HOROVITZ, S. Determinacion del sexo en *Carica papaya* L. Estructura hipotetica de los cromosomas sexuales. **Agronomia Tropical**, v.3, p.229-249, 1954.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/cgi-bin/prtabl>>. Acesso em: 10/04/2013.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13 n.2 p.196-223, 2001.

JORDAN, M.; VELOSO, J. Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspensions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 189-194, 1996.

JORDAN, M.; VELOSO, J. In vitro propagation of highland papayas (*Carica pubescens* and *C. pentagona*). **Acta Horticulturae**, v. 447, p. 103-106, 1997.

KHATOOM, K.; SULTANA, R. Plant regeneration from *Carica papaya* cv. Malir grown in tissue culture. **Pakistan Journal of Botany**, v.26, p.191-195, 1994.

KOEHLER, A. D. **Embriogênese somática em mamoeiro (*Carica papaya* L.): anatomia, histoquímica e influência de ACC, AVG e STS e de pulsos de 2,4-D.** (Dissertação Mestrado). UFV, 2004.

KUMAR, L. S. S.; ABRAHAM, A. Chromosome number in *Carica*. **Current Science**, 11: 58, 1942.

LIMA, A. S.; RAMOS, A. L. D.; MARCELLINI, O. S.; BATISTA, R. A.; FARAONI, A. S. Adição de agentes antiescurecimento, antimicrobiano e utilização de diferentes filmes plásticos, em mamão minimamente processado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 27: 149-152, 2005.

LIMA, S. A. A. C. Formação de calos a partir de hipocótilos de mamoeiro submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D e sacarose. **Congresso Brasileiro de Fruticultura**. Belém. 2003.

LIN, C. M.; YANG, J. S. Papaya somatic embryo from fruit-bearing field plants: effects of root supporting material and position of root explants. **Acta Horticulturae**, v.560, p. 489-492, 2001.

LITZ, R. E. Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica* suspensions cultures. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 111, p. 969-972, 1986.

LITZ, R. E.; CNOVER, R. A. Somatic embryogenesis in cell cultures of *Carica stipulate*. **HortScience**, v.15, p.733-735, 1978.

MAHON, R. E.; BATESON, M. F.; CHAMBERLAIN, D. A.; HIGGINS, C. M.; DREW, R. A.; DALE, J. L. Transformation of an Australian Variety of *Carica papaya* using Microprojectile Bombardment. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.23, p. 679-685.1996.

MALDANER, F. J. **Transformação genética de plantas: uma importante ferramenta para o melhoramento genético**. Faculdades Da Terra De Brasília (Monografia). 2009.

MARANCA, G. 1992. **Cultura do mamão**. São Paulo: Nobel, 105p.

McCABE, D.E.; SWAIN, W.F.; MARTINELLI, B.J.; CHRISTOU, P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. **Biotechnology**, 6:23-926, 1988.

MEDHI, A. A.; HOGAN, L. Tissue culture of *Carica papaya*. **HortScience**, 11: 311, 1976.

MING R, YU Q, MOORE PH. Sex determination in papaya. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 18: 401-408, 2007.

MONDAL, M.; GUPTA, S.; MUKHERJEE, B.B. Callus culture and plantlet production in *Carica papaya* (var. HoneyDew). **Plant Cell Reports**, v.13, p.390-393, 1994.

MONMARSON, S.; MICHAUX-FERRIERE, N.; TEISSON, C. Production of high-frequency embryogenic calli from integuments of immature seeds of *Carica papaya* L. **Journal of Horticultural Science**, v.70, n. 1, p. 57-64, 1995.

MORAIS, L. S.; MATSUMOTO, K.; ARAGÃO, F. J. L. e RECH, E. L. Transformação em células em suspensão de bananeira, utilizando como agente seletivo o herbicida imazapyr, via biobalística. **45º Congresso Brasileiro de Genética**. Gramado – RS. Anais do Congresso Brasileiro de Genética. Gramado, RS: SBG, Setor 17-086, 1999.

MORIKAWA, H.; IIDA, A.; YAMADA, Y. Transient expression of foreign genes in plant cells and tissues obtained by simple biolistic device (particle-gun). **Applied Microbiology and Biotechnology**, 31:320-322, 1989.

NEUPANE, K. R.; MUKATIRA, U. T.; KATO, C.; STILES, J. I. Cloning and characterization of fruit-expressed ACC synthase and ACC oxidase from papaya (*Carica papaya* L.). **Acta Horticulturae**, n.461 p. 329-337.1998.

OLIVEIRA, R. P.; DANTAS, J. L. L.; ALMEIDA, E. P.; NICKEL, O.; VILARINHOS, A. D.; MORALES, C. F. G. Uso da biotecnologia no melhoramento genético e

propagação do mamoeiro. In: MENDES, L.G.; DANTAS, J.L.L.; MORALES, C.F.G. (Ed.). **Mamão no Brasil**. Cruz das Almas : UFBA/Embrapa-CNPMF, 179p, 1996.

PANG, S. Z.; SANFORD, J. C. Agrobacterium-mediated gene transfer in papaya. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, VA, v. 113, p. 287-291, 1988.

PARASNIS, A. S.; RAMAKRISHNA, W.; CHOWDARI, K. V.; GUPT, V. S.; RANJEKAR, P. K. Microsatellite (GATA)_n reveals sex-specific differences in Papaya. **Theoretical and Applied Genetics**, 99: 1047-1052, 1999.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações**. Lavras: Ed. Brasil, 1997.

PERL, A.; LOTAN, O.; ABU-ABIED, M. & HOLLAND, D. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): the role of antioxidants during grape *Agrobacterium* interactions. **Nature Biotechnology**, 14:624-628, 1996.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., cap.27, 1999.

RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L. Biobalística. In: BRASILEIRO, A.C.M. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI/Embrapa Cenargen, p. 51-64, 1998.

RECH, E. L.; VAINSTEIN, M. H.; DAVEY, M. R. An electrical particle acceleration gun for gene transfer into cells. **Technique**, 3:143-149, 1991.

RENUKDAS, N.; MOHAN, M. L.; KHUSPE, S. S.; RAWAL, S. K. Influence of boron on somatic embryogenesis in papaya. **Biologia Plantarum**, 47: 129-132, 2003.

RIMBERIA, F. K.; ADANIYA, S.; ETOH, T.; ISHIMINE, Y. Sex and ploidy of anther culture derived papaya (*Carica papaya* L.) plants. **Euphytica**, 149: 53-59, 2006.

RIMBERIA, F. K.; SUNAGAWA; URASAKI, N.; ISHIMINE, Y.; ADANIYA, S. Embryo induction via anther culture in papaya and sex analysis of the derived plantlets. **Scientia Horticulturae**, 103: 199-208, 2005.

SAKER, M. M.; BEKHEET, S. A.; TAHA, H. S.; REDA, A. A. In vitro propagation of papaya (*Carica papaya* L.). **Arab Journal of Biotechnology**, 2: 235-244, 1999.

SANFORD, J. C. The biolistic process. A new concept in gene transfer and biological delivery. **TIBTech**, v.6, p. 299-302, 1988.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science Technology**, 5:27-37, 1987.

SANFORD, J. C.; VIT, M. J.; RUSSELL, J. A.; SMITH, F. D.; HARPENDING, M. K.; ROY, M.K.; JOHNSTON, S.A. An improved helium-driven biolistic device. **Technique**, 3:3-16, 1991.

SANTARÉM, E. R.; FERREIRA, A. G. **Transformação de soja via bombardeamento de partículas**. ABCTP Notícias, Brasília, v.9: p.2-9, 1997.

SANTARÉM, R. E. Métodos eficientes para a transformação genética de plantas. universidade de Cruz Alta. **Revista De Ciência e Tecnologia**. 15 – p. 81-90, 2000.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T.; SCHMILDT, O. Sucrose on *in vitro* rooting phase of papaya tree 'Tainung 01'. **Scientia Agraria**, 8: 25-31, 2007.

SOUZA JR., M. T. **Analysis of the resistance in genetically engineered papaya against papaya ringspot potyvirus, partial characterization of the PRSV**.Brazil. Bahia isolate, and development of transgenic papaya for Brazil. Ithaca, Cornell University, 277p, 1999.

SOUZA, S. M. A. MAMÃO NO BRASIL: distribuição regional da produção e comportamento dos preços no período 1996-2005. **Informações Econômicas**, SP, v.37, n.9, set. 2007.

STOREY, W. B. The primary flowers types of papaya and the primary fruit types that develop from them. Proceedings of the American Society for Horticultural **Science**, v.35, p.83-85, 1938.

TENNANT, P. F. **Evaluation of the resistance of coat protein transgenic papaya against papaya ringspot virus isolates and development of transgenia papaya for Jamaica**. Ph.D. thesis. Ithaca: Cornell University; 317. 1996.

TISSERAT, B.; ESAN, E. B.; MURASSHIJGE, T. Somatic embryogenesis in angiosperms. **Horticultural Reviews**, v.1, p.1-78, 1979.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa-CNPq, p.128, 2000.

VEGA DE ROJAS, R.; KITTO S. L. Regeneration of babaco (*Carica pentagona*). **Journal of the American Society for Horticultural Science from ovular allus**, v. 116. p. 747-752, 1991.

VIANNA, G. R. **Micropropagação do mamoeiro (*Carica papaya* L.) utilizando ápices caulinares de plantas adultas**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitotecnia, 66 p., (Dissertação M. Sc.), 1996.

YANG, J. S.; YE, C. A. Plant regeneration from petioles of *in vitro* regenerated (*Carica papaya* L.) shoots. **Botanical Bulletin** of Academia Sinica, v.33, p.375-381, 1992.

YANG, J.; YU, T.; CHENG, Y.; YEH, S. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of petioles of *in vitro* propagated multishoots. **Plant Cell Reports**, 15: 459-464, 1996.

ZAMBRYSKI, P. Basic Processes Underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. **Annual Review of Genetics**, Cambridge, 22: 1-30, 1988.

CAPÍTULO I

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ESTABELECIMENTO DA CURVA DE SELEÇÃO COM O HERBICIDA GLUFOSINATO DE AMÔNIA PARA O MAMOEIRO

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos regenerar embriões somáticos do mamoeiro e estabelecer um sistema de seleção positiva de células embriogênicas com o herbicida glufosinato de amônia (GA). Para tanto, embriões zigóticos imaturos foram utilizados na indução da embriogênese somática (ES). Também, realizou-se um experimento com duas desinfestações, uma com a semente e a outra com o embrião zigótico imaturo, utilizando diferentes concentrações e tempo de exposição ao NaClO. Simultaneamente, células embriogênicas foram inoculadas em meio de indução com diferentes concentrações de GA: 0; 1; 2, 5; 10 e 15mg/L. Plântulas de mamoeiro foram obtidas em estágio de enraizamento. O sistema de duas desinfestações com as sementes e embriões zigóticos imaturos, reduziram em 81% as fontes de contaminações. A curva de seleção demonstrou que concentrações acima de 5mg/L de GA inibe o crescimento das células embriogênicas. Por meio destes dados pode-se inferir que o protocolo de regeneração por ES foi eficiente e que concentrações acima de 5mg/L de GA inibem o crescimento das células embriogênicas do mamoeiro.

ABSTRACT

The present study aimed to regeneration of somatic embryos of papaya, and a system of positive selection of embryogenic cells with the herbicide glufosinate ammonia (GA). Therefore, immature zygotic embryos were used for induction of somatic embryogenesis (ES). Also, there was an experiment with two pest control, seeds and one with another with the immature zygotic embryo, using different concentrations and time of exposure to NaClO. Simultaneously, embryogenic cells were inoculated into induction medium with different concentrations of GA: 0, 1, 2, 5, 10 and 15mg/L. Papaya plantlets were obtained in the stadium rooting. The system of two disinfestation with seeds and immature zygotic embryos, reduced by 81% sources of contamination. The curve selection showed that concentrations above 5mg/L the GA inhibits the growth of embryogenic cells. Using these data it can be inferred that the regeneration protocol for ES was efficient and concentrations above 5 mg / L GA inhibit cell growth embryogenic of papaya tree.

1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das fruteiras mais cultivadas e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (CHEN et al., 1991), possuindo frutos aromáticos, ricos em vitamina C, utilizados amplamente em dietas alimentares pelo seu valor nutritivo e digestivo. As cultivares de mamoeiro mais utilizadas no país são Sunrise Solo, Improved Sunrise Solo line 72/12 e o híbrido Tainung nº. 1 (ALMEIDA et al., 2001) e Golden.

O desenvolvimento da cultura do mamoeiro tem sido limitado por fatores relacionados à natureza dióica, heterozigose e à suscetibilidade a doenças. Nas últimas duas décadas, diversas técnicas de biotecnologia têm sido empregadas em apoio a programas de melhoramento do mamoeiro, tais como o resgate de embriões, cultura de anteras, isolamento e cultivo de protoplastos, produção de sementes artificiais, micropropagação, marcadores moleculares e transformação genética (OLIVEIRA et al., 1996).

A propagação do mamoeiro pode ser feita através de sementes, estacas, enxertia ou ainda utilizando as técnicas de cultura *in vitro*. Neste último caso, plantas são regeneradas via organogênese ou embriogênese somática, podendo-se obter milhares de mudas com alto padrão de qualidade e condições fitossanitárias aceitáveis (LIMA, 2003).

A embriogênese somática é, portanto, o meio pelo qual células somáticas se desenvolvem em estruturas que se assemelham aos embriões zigóticos (isto é, bipolar e sem conexão vascular ao tecido parental) com uma série de estádios embriológicos característicos, sem fusão de gametas (JIMÉNEZ, 2001)

A ES, quando eficientemente estabelecida apresenta vantagens em relação aos demais sistemas de cultivo *in vitro*, permitindo a multiplicação, em larga escala, de embriões capazes de se desenvolverem em plantas completas (KOEHLER, 2004).

Segundo Jiménez (2001), a embriogênese somática apresenta como principal vantagem a multiplicação em larga escala de embriões geneticamente idênticos, via ciclos repetitivos de divisão celular. Essa característica tem sido explorada, atualmente, com a finalidade da transformação genética.

O processo de desenvolvimento de organismos geneticamente modificados (OGM), também conhecidos como “transgênicos”, depende do uso de sistema *gene marcador/ agente seletivo* que permita a seleção positiva de células transformadas (SOUZA JR et al., 2001).

Dentre os sistemas mais usados está o sistema tipo gene de resistência a herbicida/ herbicida. O gene *bar* codifica a enzima PAT (fosfinotricina acetil transferase) isolado de *Streptomyces hygroscopicus* (MURAKANI et al., 1986), tendo o glufosinato de amônia como agente seletivo (LINDSEY, 1992). A enzima PAT inativa herbicidas que apresentam o glufosinato de amônia como composto ativo mediante sua detoxificação (SOUZA JR et al., 2001). A detoxificação, que é resultante da acetilação do grupamento amino livre presente no glufosinato de amônia, torna este incapaz de competir de forma inibitória com a glutamina sintetase (GS), possibilitando assim a remoção da amônia tóxica da célula vegetal pela conversão de glutamato em glutamina, reação esta catalizada pela GS (LINDSEY, 1992).

O gene *nptII* esteve presente em quase todos os trabalhos como gene marcador de seleção de mamoeiros transgênicos. Esse gene marcador é bastante utilizado em transformação genética de plantas, e codifica a enzima neomicina fosfotransferase II. Cabrera-Ponce et al. (1995) e Souza Jr et al. (2001) são os únicos trabalho que utilizou o gene *bar*, além do *nptII*, como gene marcador na produção de mamoeiros transgênicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo regenerar embriões somáticos do mamoeiro *Carica papaya* da variedade Sunrise Solo e estabelecer um sistema de seleção positiva de células embriogênicas com o herbicida glufosinato de amônia.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo de regeneração por embriogênese somática utilizando como explantes embriões zigóticos imaturos do mamoeiro;
- Desenvolver um sistema de desinfestação dos embriões zigóticos que impeça o surgimento de contaminações endógenas futuras;
- Encontrar uma dosagem do herbicida glufosinato de amônia (GA) que iniba o crescimento e desenvolvimento das células embriogênicas visando à seleção positiva após transformação genética.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Cultura de Tecidos e no de Virologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas-BA. Para tanto, embriões zigóticos imaturos do mamoeiro da variedade Sunrise Solo foram regenerados por embriogênese somática. Para eliminar contaminações com fungos e bactérias endofíticas, foi realizado um experimento com diferentes desinfestações utilizando os embriões zigóticos imaturos. Foi realizada uma curva de seleção com herbicida GA para verificação da dosagem que impossibilite o desenvolvimento das células embriogênicas não transformadas com o vetor pBSPAPVirBAR (que contém o gene de resistência a herbicida GA).

3.1 Estabelecimento do protocolo de regeneração por embriogênese somática de mamoeiro

3.1.1 Coleta dos Frutos e Desinfestação

Os frutos imaturos da variedade “Sunrise Solo” foram coletados com 90 a 120 dias após a antese no BAG (Banco Ativo de Germoplasma) de mamão situado na Embrapa Mandioca e Fruticultura. Esses foram levados para o laboratório de Cultura de Tecidos, lavados com água corrente e hipoclorito de sódio (NaClO) 2% e

posteriormente encaminhados para câmara de fluxo laminar, onde realizou-se o processo de desinfestação, utilizando material esterilizado. A desinfestação foi feita inicialmente em solução de álcool 70% durante três minutos, depois em solução comercial de hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos, sendo em seguida lavados com água destilada por três vezes.

Após desinfestação, foram retirados os embriões zigóticos das sementes, com auxílio do microscópio estereoscópico, os quais foram utilizados como explantes para indução de embriogênese somática, baseando-se no protocolo de Fitch e Manshardt (1990).

3.1.1.1 Experimento com diferentes desinfestações utilizando embriões zigóticos imaturos

Também, foi realizado um experimento, em que utilizou-se duas desinfestações: a primeira com as sementes e a segunda com os embriões zigóticos imaturos. As sementes foram desinfestadas da mesma forma como descrito no item 3. 1.1. Para os embriões zigóticos excisados, foram realizados 4 tratamentos diferentes, de acordo com a Tabela1 abaixo:

Tabela 1: Testes para desinfestação dos embriões zigóticos imaturs excisados

Componentes	Tratamento 1 (após 4 dias)		Tratamento 2		Tratamento 3		Tratamento 4	
	Min	Conc.	Min	Conc.	Min	Conc.	Min	Conc.
Álcool	1	70%	1	70%	1	70%	1	70%
Hipoclorito de sódio	5	1%	5	2%	5	1%	10	1%

Min: minutos; Conc: concentração.

Após a desinfestação com o hipoclorito de sódio comercial, os embriões zigóticos de todos os tratamentos foram lavados com água esterilizada por três vezes, secos em papel filtro e inoculados em meio de indução. Para o Tratamento 1, a desinfestação dos embriões foi realizada após 4 dias da extração e inoculados em novo meio de indução.

Foram realizadas quadriplicatas para cada tratamento, totalizado 16 placas neste experimento, para cada placa foram inoculados 20 embriões zigóticos imaturos. Após 60 dias o material foi avaliado quanto a resposta embriogênica, a paralização dos embriões zigóticos imaturos e a presença de contaminações.

3.1.2 Desenvolvimento de embriões somáticos primários

Os embriões zigóticos imaturos foram introduzidos em placas de Petri contendo 15 mL de meio de cultura. O meio de cultura foi composto por 1/2MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 10mg/L de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), 60g/L de sacarose, 10mg/L de vitamina de mamão (400mg/L de glutamina, 50mg/L de mio-inositol, 0,4mg/L de tiamina, 2mg/L de glicina, 0,5 mg/L de ácido nicotínico e piridoxina), 8g/L de ágar com pH 5,8. Todo material foi mantido no escuro a 27°C \pm 2 °C de temperatura.

3.1.3 Desenvolvimento de embriões somáticos secundários

Após cinco semanas da inoculação dos embriões zigóticos em meio de indução, o calos que apresentaram formação de embriões somáticos primários foram macerados com espátula de metal e inoculados novamente em meio de indução sob uma membrana de celulose® (Fmaia) para a formação de embriões somáticos secundários. O meio nutritivo e as condições de luminosidade e temperatura foram os mesmos utilizados no procedimento anterior.

3.1.4 Maturação dos embriões somáticos

Quando os calos sob membrana de celulose apresentaram formação de embriões somáticos, estes foram transferidos para o meio de maturação. O meio de maturação foi idêntico ao meio de indução já descrito, exceto o 2,4-D, que não foi incluído. A partir deste estágio o material foi transferido para sala de crescimento a 27°C \pm 2°C de temperatura, com fotoperíodo de 24 horas.

3.1.5 Germinação dos embriões somáticos

Os embriões somáticos maduros foram transferidos para um novo meio de germinação. Esse meio consiste em sais 1/2MS, 3% de sacarose, 100 mg/L de mio-inositol, 0,4 mg/L de tiamina, 0,8% de ágar e pH 5,8. Todo material permaneceu em sala de crescimento. Com aproximadamente 30 dias, os embriões que germinaram e que apresentavam alto grau de crescimento foram transferidos para novo meio de germinação em frascos, proporcionando maior espaço para o desenvolvimento e crescimento.

3.1.6 Indução de enraizamento dos embriões somáticos

Com aproximadamente 70 dias em meio de germinação, as plântulas de mamoeiro que apresentavam-se alongadas e com cotilédones bem desenvolvidos foram transferidas para meio de enraizamento. O meio de enraizamento foi composto de suplemento com sais 1/2 MS, 50 mg/L de mio-inositol, 0,2 mg/L de tiamina, 1,5 % de sacarose 0,8% de ágar e pH 5,8.

3.2 Estabelecimento da curva de seleção com o herbicida glufosinato de amônia utilizando embriões somáticos

Para o desenvolvimento de um protocolo de transformação genética é necessário inicialmente estabelecer um sistema de seleção positiva das células, após a transformação. Neste caso, são utilizados sistemas do tipo *agente marcador/ agente seletivo* que permite a seleção das células que adquiriram o gene marcador pelo método de transformação. Nesse trabalho foi utilizado o sistema do tipo *gene de resistência a herbicida/ herbicida*, o gene *bar*, que codifica a proteína PAT, confere resistência ao herbicida glufosinato de amônia. Dessa forma, os cassetes que serão utilizados para transformação genética irão conter o gene *bar* e as células não transformadas não irão se desenvolver na presença do glufosinato de amônia.

A curva de seleção foi baseada no protocolo de Cabrera-Ponce et al. (1995). Para o estabelecimento da curva de seleção com calos embriogênicos de mamão utilizou-se como agente seletivo o glufosinato de amônia e selecionaram-se os calos com aproximadamente 60 dias que continham embriões somáticos secundários em

estágios mais avançado (a partir do estágio de torpedo). Esses embriões foram macerados em membrana de celulose com auxílio de uma espátula e transferidos para as placas de Petri com diferentes concentrações de glufosinato de amônia, e, para cada tratamento foram realizadas triplicatas.

O meio nutritivo foi o MS, com metade da concentração (1/2 X MS), suplementado com 6 % de sacarose, 0,8% de ágar, 10mg/L de 2,4-D, e vitaminas de mamão (mio-inositol, L- glutamina, glicina, ácido nicotínico, piridoxina e tiamina) e com concentrações: 0; 1; 2,5; 5; 10; e 15mg/L de glufosinato de amônia e pH 5,8. As placas contendo os embriões foram mantidas no escuro a 27°C +/-2 °C de temperatura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estabelecimento do protocolo de regeneração por embriogênese somática de mamoeiro

O cultivo dos embriões zigóticos imaturos (Figura 1A) de *C. papaya* em meio de cultura suplementado com 10mg/L de 2,4-D resultou na indução de células embriogênicas (Figura 1B), sendo que em alguns explantes foi também possível observar a formação de calo (Figura 1C). A indução ocorreu na região do meristema apical (Figura 1B). Resultados similares foram relatos por Koehler (2004), Clarindo et al. (2008) e Abreu (2010), onde também observaram a indução de embriogênese somática na região do meristema apical de embriões zigóticos imaturos do mamoeiro.

Fitch e Manshardt (1990) foram os primeiros a relatarem a utilização de embriões zigóticos imaturos para indução de embriogênese somática em mamoeiros nas cultivares comerciais Kapoho, Sunrise Solo, Sunset e Waimanalo, utilizando-se de diferentes níveis de 2,4-D. Segundo Abreu (2010), o regulador de crescimento 2,4-D é considerado o propulsor da competência embriogênica. Em resposta à presença exógena de 2,4-D, as células vegetais são estimuladas a acumular quantidades substanciais da auxina endógena ácido indol-3-acético (AIA) (MICHALCZUK et al., 1992). Pasternak et al. (2002) sugerem que o aumento dos níveis endógenos desse regulador natural pode ser responsável pela aceleração no processo de desdiferenciação. Segundo Pasqual et al. (1997) esse processo de desdiferenciação é

determinante para que ocorra o processo de embriogênese somática. As células diferenciadas devem, antes de tudo, ser desdiferenciadas depois da divisão celular, para serem determinadas como células embriogênicas e posteriormente serem rediferenciadas.

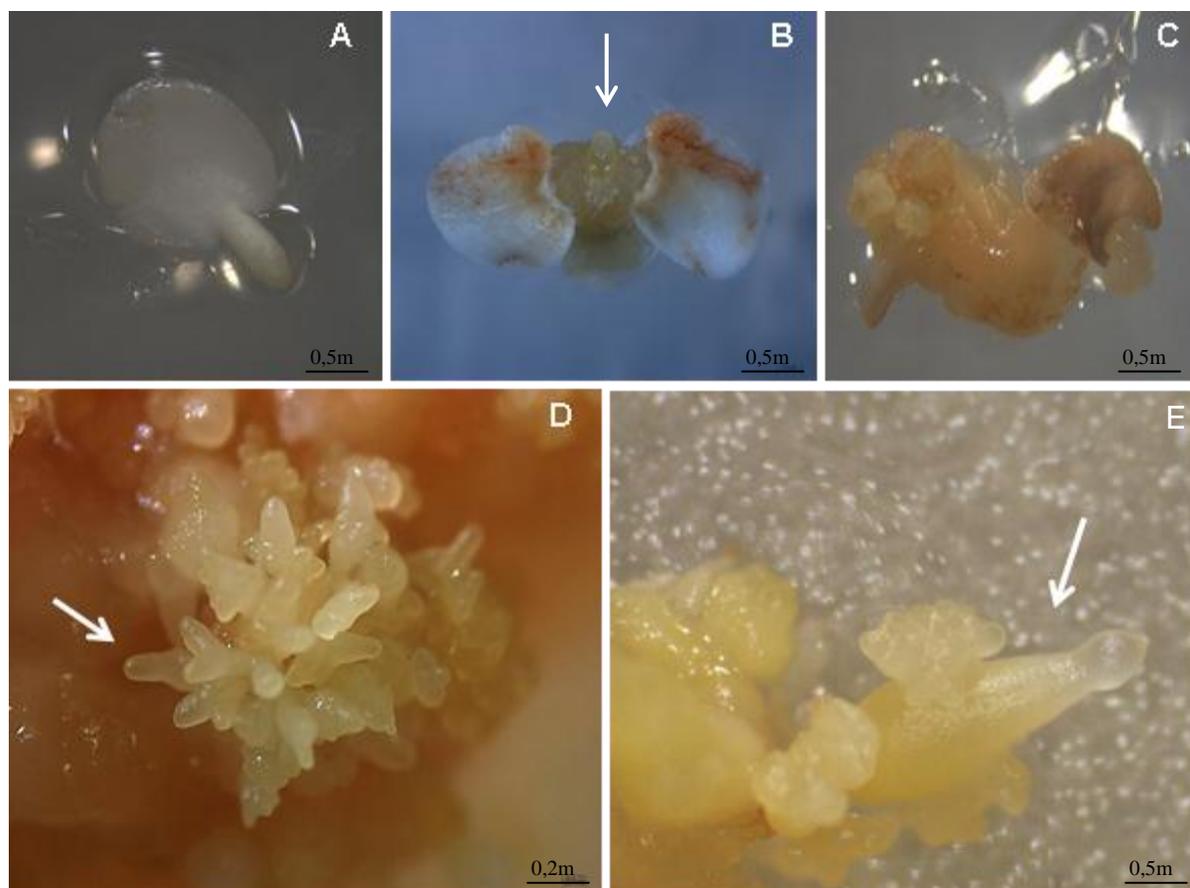


Figura 1- Embriogênese somática do mamoeiro da variedade Sunrise Solo: A. Embrião zigótico imaturo em meio de indução; **B.** Embrião zigótico após 10 dias de inoculação apresentado resposta à indução embriogênica na região do meristema apical; **C.** Embrião com aproximadamente 30 dias em meio nutritivo, apresentando resposta calogênica; **D.** Embriões somáticos primários em diferentes estádios de desenvolvimento em um mesmo calo embriogênico, com ênfase no embrião em estágio codiforme; **E.** Calo embriogênico com embrião somático em estágio de torpedo.

Os embriões zigóticos do mamoeiro apresentaram uma rápida resposta à indução para a embriogênese somática. Em menos de duas semanas foram observadas as primeiras respostas embriogênicas. Resultado similar foi obtido por

Abreu (2010). Por outro lado, a indução da embriogênese somática a partir de secções de hipocótilo, segundo Fitch (1993) levou em média 14 semanas e 11 semanas para explantes como folhas cotiledonares, epicótilo e hipocótilo com folhas cotiledonares (ALMEIDA et al., 2000).

Após 45 dias os embriões somáticos que foram esmagados em membrana de celulose se proliferaram em embriões somáticos secundários. A diferenciação dos embriões somáticos ocorreu na superfície dos calos. Os calos embriogênicos apresentaram coloração amarelo-pálida. Num mesmo calo embriogênico pôde-se observar embriões em estádios distintos (Figura 1D), resultado também observado por Almeida et al. (2000). Os embriões eram inicialmente globulares, passando, em seguida, para as formas cordiforme, torpedo (Figura 1E) e cotiledonar.

Neste trabalho foi utilizada a embriogênese cíclica, realizando-se dois ciclos de embriogênese somática. Os melhores resultados foram observados na indução dos embriões primários e secundários, devido ao fato de que acima de dois ciclos observou-se grande índice de oxidação, que prejudicou a indução de embriogênese somática. Segundo Koehler (2004) a produção de substâncias do metabolismo secundário das células é responsável pela oxidação e coloração marrom dos calos.

A transferência dos embriões para meio nutritivo na ausência de 2,4-D e na presença de luz possibilitou a maturação de embriões somáticos secundários. Foi possível observar o crescimento e desenvolvimento de estruturas cotiledonares (Figura 2A). Resultados semelhantes foram encontrados por Koehler (2004) que utilizou meio de maturação suplementando com ácido abicísico (ABA), onde observou o acúmulo de substâncias de reserva, detectado por testes histoquímicos. Abreu (2010) utilizou agregados celulares em meio líquido, também suplementado com ABA e obteve bons resultados. Entretanto, longos períodos de exposição ao ABA podem ter um efeito negativo no crescimento da planta (BOZHKOV et al., 1998).

Segundo Torres et al. (1999) a fase de maturação é o momento que compreende o estímulo à progressão das fases iniciais para as fases tardias da embriogênese somática. O aumento da osmolaridade parece estar relacionado com a transição do ciclo divisão/diferenciação, e este aumento pode ser obtido pela adição de mio-inositol, vitamina esta, utilizada no meio de maturação.

Após a fase de maturação os embriões que se destacaram e se encontram em estágio cotiledonar foram transferidos para meio de germinação. O meio de germinação suplementado com as vitaminas mio-inositol e tiamina proporcionaram o desenvolvimento cotiledonar e surgimento de tecido clorofilado (Figura 2C e D). Neste estágio observou-se o alongamento do caule das plântulas, as quais foram transferidas para o meio de enraizamento (Figura 3A e B). Segundo Almeida (2000) a fase de germinação é uma das etapas mais importantes na regeneração por embriogênese somática, pois as plântulas bem alongadas são mais promissoras ao enraizamento.

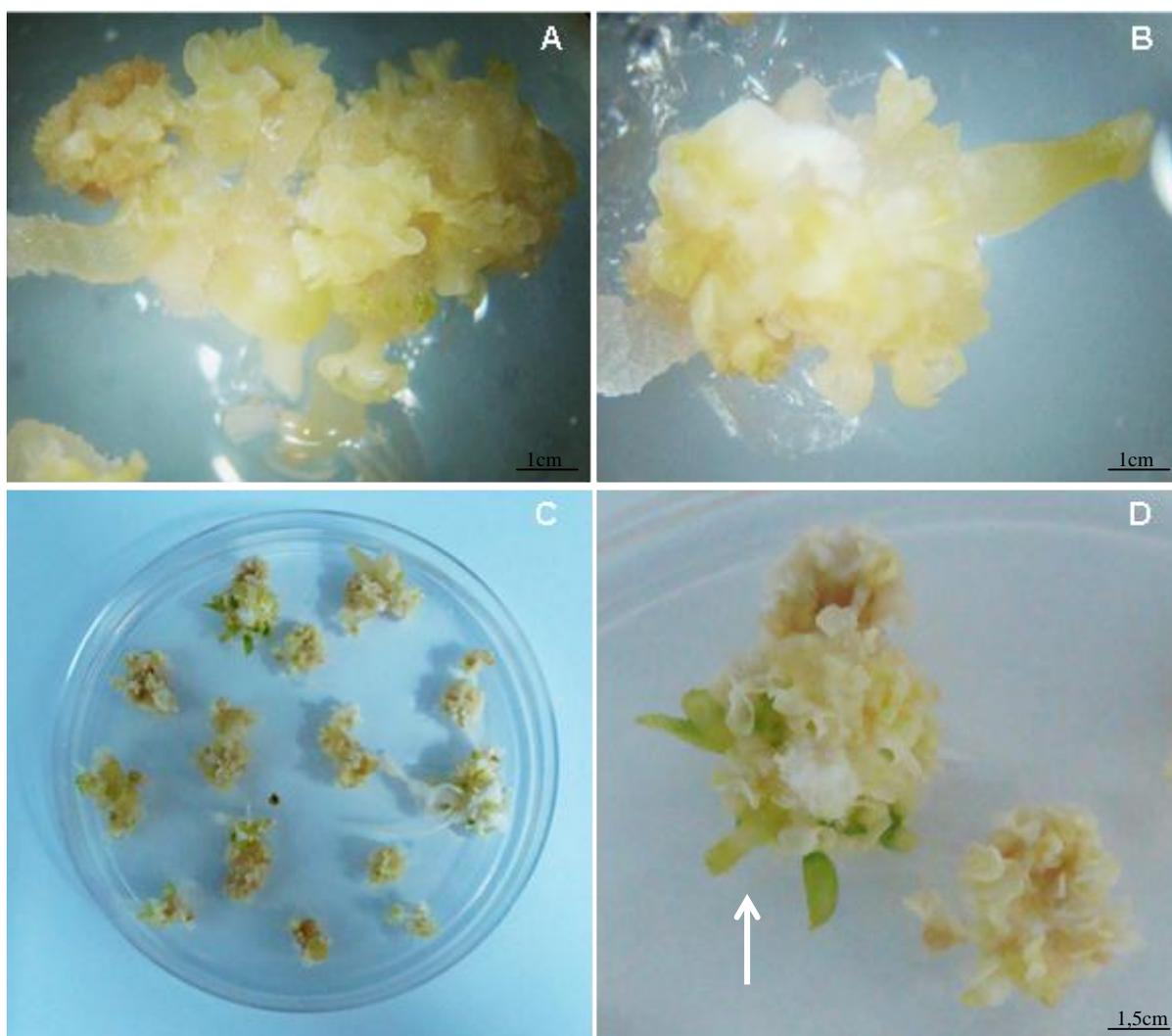


Figura 2- Indução da maturação e germinação de embriões somáticos: A e B. Embriões somáticos secundários em estágio de maturação; **C.** Placa de Petri contendo calos embriogênicos e embriões somáticos em estágio de germinação; **D.** Calo embriogênico contendo embrião somático em estágio de germinação, apresentando tecido clorofilado.

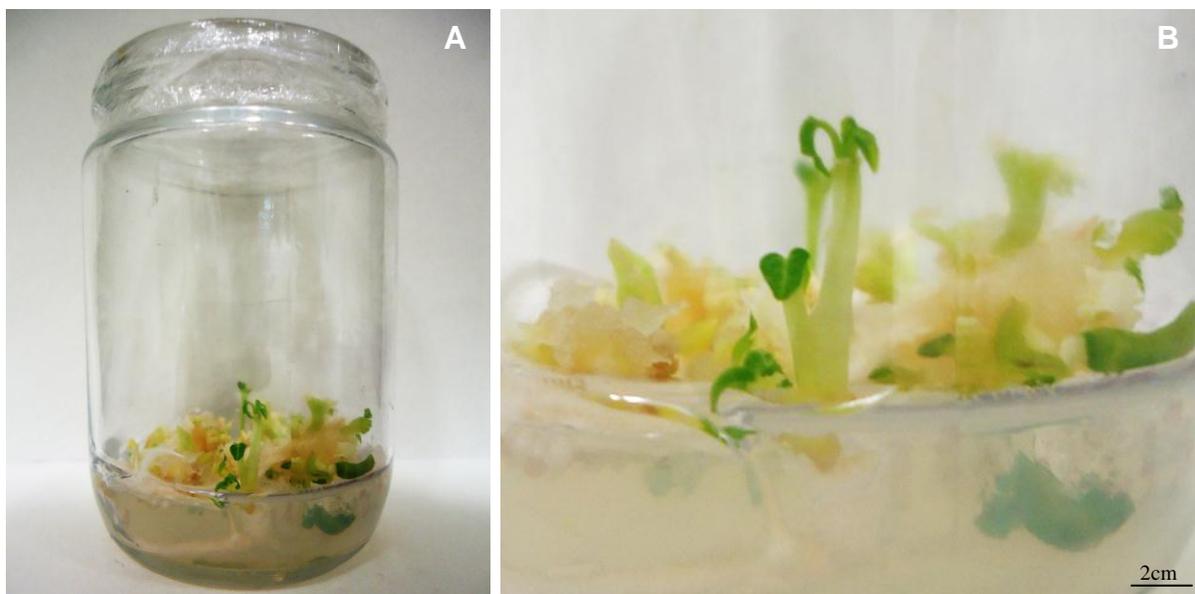


Figura 3- Plântulas de mamoeiro em estágio de alongamento: A. Plântulas de mamoeiro após 60 dias em meio de germinação; **B.** Plântula em processo de alongamento transferido para meio de enraizamento.

A redução dos níveis de mio-inositol e tiamina proporcionaram o desenvolvimento das folhas (Figura 4A) e da raiz das plântulas em meio de enraizamento (Figura 4B). Todo este material encontra-se em regeneração no estágio de enraizamento, para posteriormente serem aclimatizados em casa de vegetação.

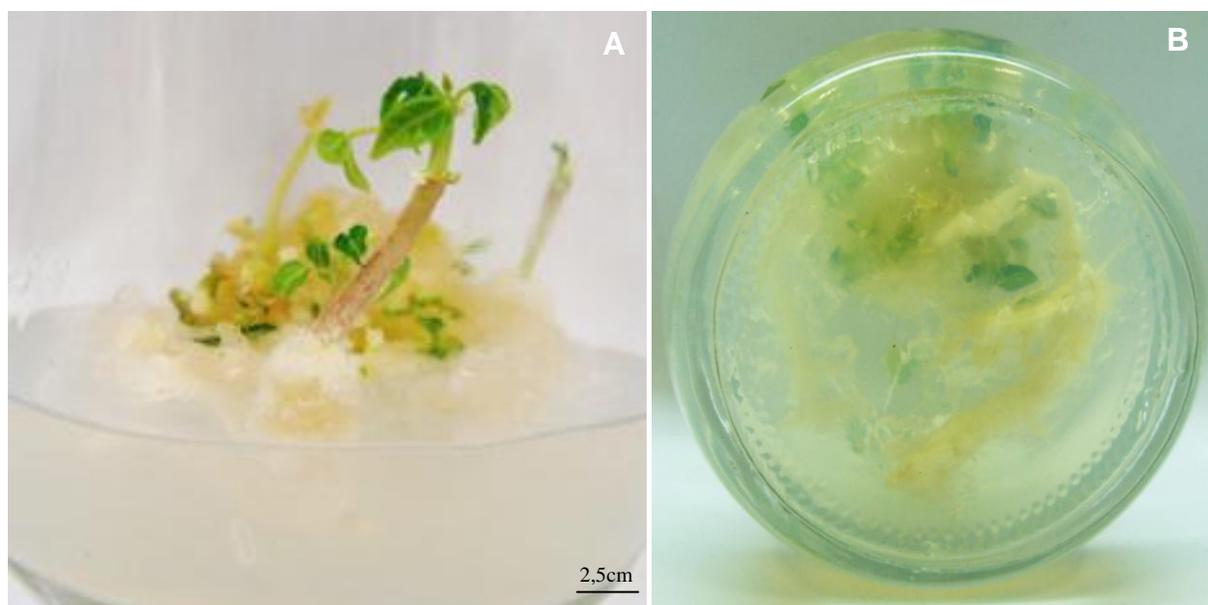


Figura 4- Plântulas de mamoeiro após 15 dias em meio de enraizamento: A. Plântula em estágio de enraizamento, apresentando desenvolvimento das folhas e caule; **B.** Raízes das plântulas em desenvolvimento.

4.2 Experimento com diferentes desinfestações utilizando embriões zigóticos imaturos

Segundo Pereira et al. (2003) o meio de cultura fornece condições favoráveis ao desenvolvimento de bactérias e fungos, estes passam a competir com os explantes por nutrientes, comprometendo a multiplicação e desenvolvimento desses explantes, podendo, inclusive, levá-los à morte.

As contaminações por microrganismos em cultura de tecidos podem ser originadas pela ineficiência dos procedimentos de asséptica, ou por bactérias e fungos fitopatogênicos e/ou endofíticos. Neste trabalho não se verificou morte de explantes com sinais de crescimento bacteriano e/ou fungos, sugerindo que os contaminantes podem ser endógenos e não fitopatogênicos. Rajeevan e Pandey (1986) afirmam que a contaminação endofítica em tecidos de mamoeiro é bastante comum.

Na literatura há relatos de que os embriões zigóticos imaturos de mamoeiro apresentam a vantagem de ter baixo índice de contaminação, pois nestes embriões o processo de desinfestação alcança a contaminação endógena. Entretanto, neste trabalho foi observado um alto índice de contaminação por microrganismos.

Koelher (2004) e Abreu (2010) também utilizaram embriões zigóticos imaturos do mamoeiro e relataram em seus trabalhos um baixo índice de contaminações. O alto índice de contaminação dos embriões zigóticos imaturos e somáticos encontrado neste trabalho pode ter ocorrido devida à utilização de plantas e frutos contendo microrganismos. Sendo que o processo de desinfestação apenas com a semente, (procedimento que era realizado anterior ao experimento) não foi o suficiente para eliminação das fontes de contaminação, permitindo o surgimento destas, mesmo após os procedimentos de assepsia, dificultando a indução da embriogênese somática.

Foi observada uma redução de 81% de contaminação dos embriões zigóticos imaturos para os tratamentos avaliados, sendo que o percentual de 19% de contaminações foram devido a contaminações presentes nos Tratamentos 2 e 4 (Figura 5). A partir da Figura 5, pode-se observar que a desinfestação diretamente com os embriões zigóticos imaturos reduziu muito o potencial embriogênico do explante. Também, foi observado que após 22 dias da inoculação ocorreu uma paralisação dos embriões zigóticos imaturos submetidos ao tratamento 2 (Figura6A), 3 e 4. Tal resultado

pode ter sido influenciado pela ação do hipoclorito de sódio. O Tratamento 1 foi o único em que os cotilédones dos embriões se abriram, observando-se a indução de embriões somáticos na região do meristema apical (Figura 6B).

Torna-se necessário a avaliação por mais tempo destes tratamentos, onde será possível observado se este sistema de desinfestação se mostrará eficiente, não permitindo o surgimento de contaminações possibilitando a indução da embriogênese somática. Deve-se também avaliar qual ou quais as origens das contaminações, se são de origem fitopatogênica, endofítica ou devido à ineficiência da desinfestação.

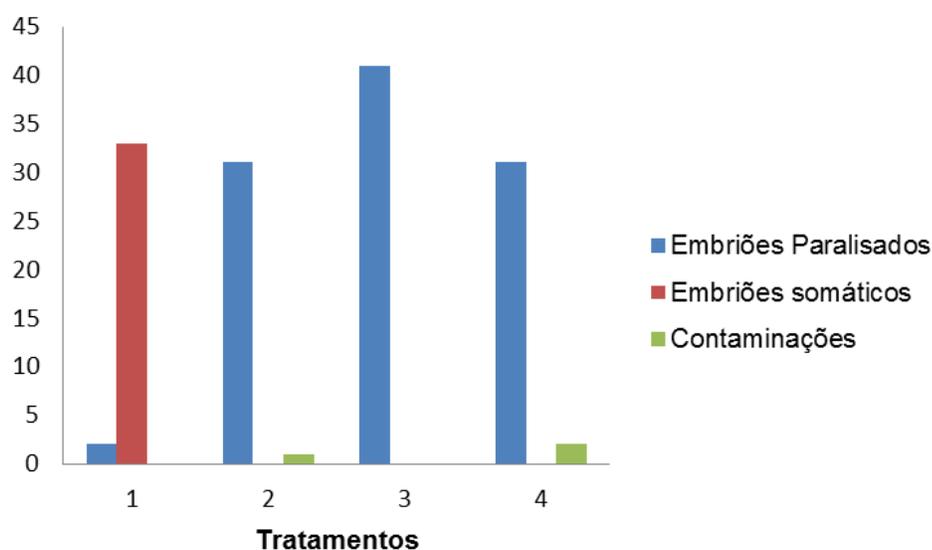


Figura 5- Avaliação dos tratamentos após 60 dias: presença de embriões somáticos no Tratamento 1; embriões paralisados nos Tratamentos 2,3 e 4; e presença de contaminação nos Tratamentos 2 e 3.

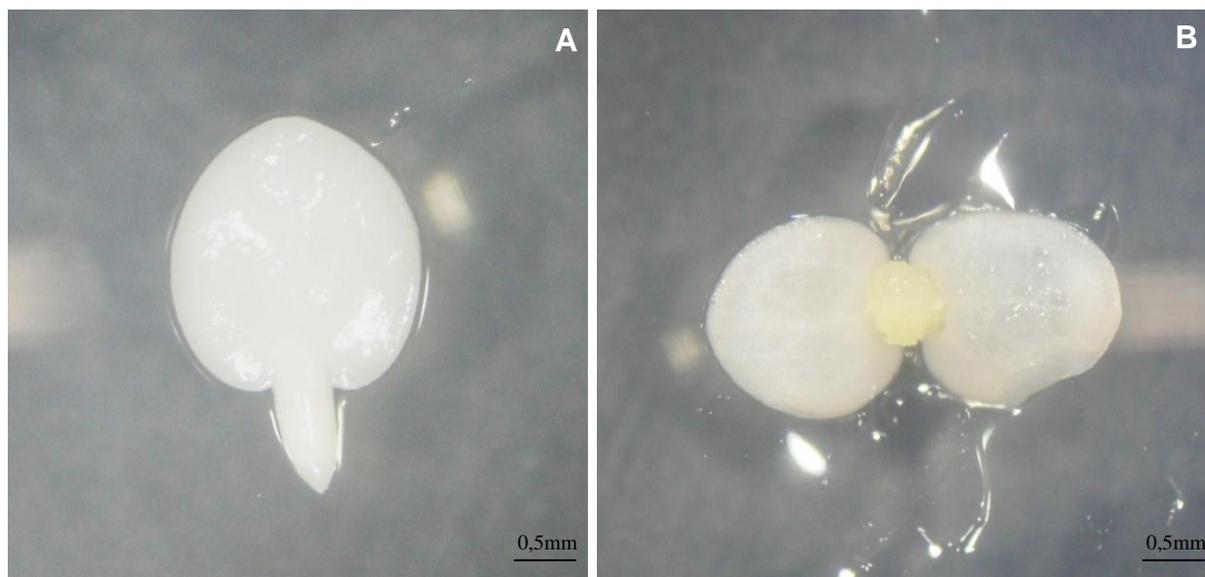


Figura 6- Experimento com diferentes métodos de desinfestação: A. Embrião zigótico após 22 dias de inoculação no Tratamento 2; **B.** Embrião apresentando resposta embriogênica no Tratamento 1.

4.3 Estabelecimento da curva de seleção com o herbicida glufosinato de amônia utilizando embriões somáticos

Para o desenvolvimento de um protocolo de transformação genética eficiente é necessário encontrar um sistema adequado para seleção positiva das células. Na maioria dos trabalhos o sistema de seleção se refere ao uso de genes de resistência a antibióticos como genes marcadores de seleção positiva, entretanto, em função de questões ligadas à biossegurança dos organismos geneticamente modificados, se fez necessária a busca por sistemas alternativos de gene marcador/ agente seletivo para triagem de embriões somáticos transgênicos de mamoeiro. Para isto foi utilizado neste trabalho o sistema gene *bar*/GA visando à geração de plantas geneticamente modificadas.

O experimento da curva de seleção com GA teve como objetivo principal encontrar uma dosagem adequada para inibir o crescimento das células embriogênicas, com consequente inibição do desenvolvimento de embriões somáticos.

As avaliações foram realizadas visualmente, quanto a presença ou ausência de formação de embriões somáticos. Foi observado que as concentrações de 5, 10 e 15

mg/L (Figura 7A) inibiram o crescimento e desenvolvimento dos embriões somáticos. Contudo, nas concentrações de 10 e 15 mg/L, os calos não só deixaram de se desenvolver como apresentaram um alto grau de oxidação (Figura 7B). Provavelmente, essa oxidação foi devida à alta concentração do herbicida.

Resultados semelhantes foram encontrados por Souza Jr et al. (2001). Estes autores observaram uma paralisação total no desenvolvimento dos embriões somáticos primários e secundários em concentrações acima de 5 mg/L de glufosinato de amônia. Cabrera-Ponce et al. (1995) usou do sistema *bar*/GA para a seleção de embriões transgênicos de mamoeiro, porém este sistema foi utilizado em conjunto com o sistema *npt III*/canamicina, resultando em uma eficiência de transformação igual a 1,42% para a variedade Maradol.

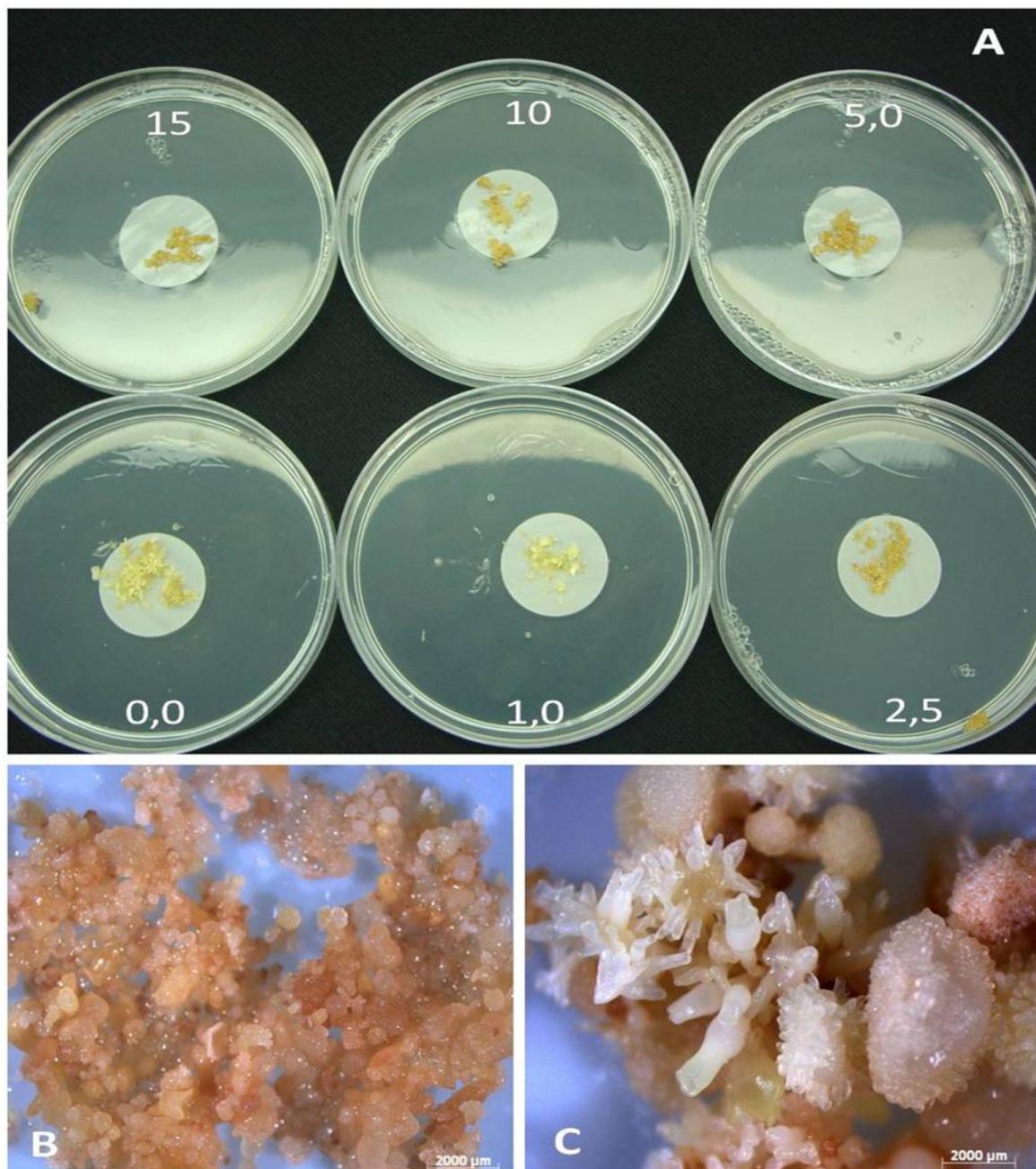


Figura 7- Curva de seleção de calos embriogênicos de mamoeiro presentes em meio suplementado com diferentes concentrações de glutosinato de amônia: A. Meio de indução suplementado com diferentes concentrações de GA (0; 1,0; 2,5; 5,0; 10 e 15 mg / L). **B.** Calo oxidado em meio de indução com 5 mg/L de GA. **C.** Calos embriogênicos em meio de indução sem GA

5. CONCLUSÕES

- Tendo em vista o potencial da aplicabilidade da ES na produção de plântulas do mamoeiro, os protocolos de indução, maturação, germinação e enraizamento *in vitro* estabelecidos neste trabalho foram considerados reprodutíveis e eficientes.
- A realização de duas desinfestações dos embriões zigóticos imaturos reduziram em torno de 90% os índices de contaminação, sendo que o Tratamento 1 proporcionou menos agressão aos embriões zigóticos imaturos;
- O sistema *bar*/glufosinato de amônia (GA) para a seleção de embriões transgênicos de mamoeiro, deve ser realizado em concentrações entre 5 a 10mg/L de GA.

REFÊRENCIAS

ABREU, I. S. **Monitoramento da embriogênese somática de *Carica papaya* L. por técnicas citogenéticas de citometria de fluxo.** Dissertação Mestrado. UFV, 2010.

ALMEIDA, E. P. Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. **Scientia Agricola**, v.58, n.1, p.51-54, jan./mar. 2001.

ALMEIDA, E. P.; OLIVEIRA, R. P.; DANTAS, J. L. L. Protocolo para a embriogênese somática do mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.10, p.2017-2024, 2000.

BOZHKOVA, P.; FILONOVA, L.; VON ARNOLD, S. Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. **Physiology Plant**, v. 104, p.211-224, 1998.

CABRERA-PONCE, J. L.; VEGAS-GARCIA, A.; HERRERA-ESTRELA, L. Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, p. 1-7, 1995.

CHEN, G.; YE, C. M.; HUANG, J. C.; YU, M.; LI, B. J. Cloning of the papaya ringspot virus (PRSV) replicase gene and generation of PRSV-resistant papayas

through the introduction of the PRSV replicase gene. **Plant Cell reports**, Berlin, n. 20, p.272-277, 2001.

CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R.; ARAÚJO, F.S.; ABREU, I. S.; OTONI, W. C. Recovering polyploid papaya in vitro regenerants as screened by flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 92: 207-214, 2008.

FITCH, M. M. M. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** 32:205-212; 1993.

FITCH, M. M. M.; MANSHARDT, R. M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Cell Report**, v.9, p.320-324, 1990.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**,v.13 n.2 p.196-223, 2001.

KOEHLER, A. D. **Embriogênese somática em mamoeiro (*Carica papaya* L.): anatomia, histoquímica e influência de ACC, AVG e STS e de pulsos de 2,4-D.** (Dissertação Mestrado). UFV, 2004.

LIMA, S. A. A. C. Formação de calos a partir de hipocótilos de mamoeiro Submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D e sacarose. **Congresso Brasileiro de Fruticultura**. Belém. 2003.

LINDSEY, K. Genetic manipulation of crop plants. **Journal of Biotechnology**, 26: 1-28, 1992.

MICHALCZUK, L.; COOKE, T. J.; COHEN, J. D. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. **Phytochemistry**, 31: 1097-1103, 1992.

MURAKAMI, T.; ANZAI, H.; IMAI, S.; SATOH, A.; NAGAOKA, K. AND THOMPSON, C. J. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of the gene cluster. **Molecular and General Genetics**. 205: 42-50, 1986.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.437-497, 1962.

OLIVEIRA, R. P.; DANTAS, J. L. L.; ALMEIDA, E. P.; NICKEL, O.; VILARINHOS, A. D.; MORALES, C. F. G. Uso da biotecnologia no melhoramento genético e propagação do mamoeiro. In: MENDES, L.G.; DANTAS, J.L.L.; MORALES, C.F.G. (Ed.). **Mamão no Brasil**. Cruz das Almas : UFBA/Embrapa-CNPMF, 179p,1996.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações**. Lavras: Ed. Brasil, 1997.

PASTERNAK, T. P.; PRINSEN, E.; AYAYDIN, F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS, G.; ASARD, H.; van ONCKELEN, H.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast derived cells of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant Physiology**,129: 1807-1819, 2002.

PEREIRA, J. E. S., M. L. T. Mattos, G. R. Fortes e G. R. de. L. Fortes. **Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 38 (7): 827-834, 2003.

RAJEEVAN, M. S.; PANDEY, R. M. Economics of mass propagation of papaya through tissue culture. In: WITHERS, L. A.; ANDERSON, P. G. (Ed.). **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London : Butterworths, p.211-215, 1986.

SOUZA JR, M. T.; VENTUROLI, M. F.; COELHO, M. C. F.; RECH FILHO, E. L. Análise de sistemas gene marcador/ agentes seletivos alternativos para seleção positiva de embriões somáticos transgênicos de mamoeiro. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 13 (3): 365-372, 2001.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos transformação genética de plantas**- Brasília. Embrapa-SP/Embrapa-CNPH, 1999.

CAPÍTULO II

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM MAMOEIRO PELO MÉTODO DE BIOBALÍSTICA

RESUMO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das fruteiras mais comuns em quase todos os países da América Tropical, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial de mamão. Este trabalho teve como objetivo transformar células embriogênicas do mamoeiro da variedade Sunrise Solo pelo método de biobalística e avaliar sua eficiência. Para tanto, embriões somáticos secundários foram esmagados em membrana de celulose e utilizados na transformação por biobalística; posteriormente, o material foi utilizado para o ensaio histoquímico com o reagente X-Gluc. O vetor utilizado na transformação foi o pBI426, que foi inserido em células competentes de *E. coli*, clonados e isolados. Os resultados deste trabalho demonstram uma alta expressão do gene *bar* pelo ensaio histoquímico pelas células com potencial embriogênico. O protocolo de transformação por biobalística utilizado neste trabalho mostrou-se muito eficiente quanto são utilizadas células com potencial embriogênico.

ABSTRACT

The papaya (*Carica papaya* L.) is one of the most common fruit in almost all countries of tropical America, Brazil is the second largest producer of papaya. This study aimed to transform embryogenic cells of papaya Sunrise Solo variety of biolistic method and evaluate its efficiency. Therefore, secondary somatic embryos were crushed into cellulose membrane and used in biolistic transformation, subsequently, the material was used for the histochemical assay with the reagent X-Gluc. The vector used in the transformation was pBI426, which was inserted into competent cells of *E. coli*, cloned and isolated. The results of this study demonstrate a high expression of the *bar* gene by histochemical assay with cells embryogenic potential. The protocol for biolistic transformation used in this work was very efficient as cells are used with embryogenic potential.

1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das fruteiras mais comuns em quase todos os países da América Tropical, sendo o Brasil o responsável por 45% da produção mundial (KOEHLER, 2004). No território nacional, a zona de cultivo mais relevante localiza-se no sul da Bahia e no norte do Espírito Santo (SOUZA, 2007).

A propagação do mamoeiro pode ser feita mediante sementes, estacas, enxertia ou ainda utilizando as técnicas de cultura *in vitro*. Neste último caso, plantas são regeneradas via organogênese ou embriogênese somática, podendo-se obter milhares de mudas com alto padrão de qualidade e condições fitossanitárias aceitáveis (LIMA, 2003).

A embriogênese somática é uma importante estratégia para estudos de transformação genética. A transformação genética é o processo de introdução controlada de ácidos nucléicos exógenos em um genoma receptor, sem comprometer a viabilidade das células (SANTARÉM, 2000). Os métodos da biotecnologia permitem não somente reduzir o tempo da obtenção de variedades com novas características, mas também transmitir propriedades de espécies que, normalmente, são sexualmente incompatíveis.

Os métodos de transformação genética de plantas mais utilizados são agrupados de acordo com o seu modo de transferência, que podem ser indiretos ou diretos (MALDANER, 2009). O método de transferência indireta de genes é mediado pela *Agrobacterium*, uma bactéria de solo Gram negativa. A técnica consiste na capacidade dessas bactérias transferirem parte do seu genoma plasmidial para o genoma do tecido em contato (CARMO, 2003).

As técnicas de transferência direta de genes utilizam processos físicos ou químicos, causando modificações nas paredes e membranas celulares, facilitando a introdução de DNA exógeno. Entre eles, os métodos que resultaram em maior número de espécies transformadas foram a eletroporação de protoplastos e a aceleração de partículas (SANTARÉM, 2000).

O método de bombardeamento foi desenvolvido por Sanford et al. (1987) e colaboradores na Universidade de Cornell, e foi designado biobalística (biólogo +

balística = biobalística) em razão da alta velocidade imprimida aos microscópicos projéteis revestidos com DNA.

O método consiste na aceleração de micropartículas que atravessam a parede celular e a membrana plasmática, de forma não letal, carregando substâncias adsorvidas, como DNA, RNA ou proteínas, para o interior da célula (SANFORD et al. 1987) rompendo a barreira da parede celular e da membrana plasmática, sem o uso de vetores biológicos. Para isso, microprojéteis de ouro ou tungstênio, cobertos com moléculas de DNA, são acelerados a alta velocidade pelo acelerador de micropartículas que produz uma força propulsora, usando pólvora, gás hélio ou eletricidade, o que possibilita sua penetração em células intactas (MALDANER, 2009).

Após o bombardeamento, uma proporção de células atingidas permanece viável; o DNA é integrado no genoma vegetal e incorporado aos processos celulares de transcrição e tradução, resultando na expressão estável do gene introduzido (SANTARÉM e FERREIRA, 1997).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi transformar células embriogênicas de mamoeiro da variedade Sunrise Solo pelo método de biobalística.

2.2 Objetivos específicos

- Clonar, extrair e purificar o vetor pBI426;
- Confirmar a presença do DNA exógeno nas células embriogênicas por meio de ensaio histoquímico utilizando o reagente X-Gluc.

3. MATERIAL E METÓDOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Transferência de Genes da Embrapa Recursos Genéticos, em Brasília-DF. O vetor utilizado na transformação genética foi o vetor plasmídial pBI426. Células competentes de *E. coli* foram transformadas, clonadas e o plasmídeo isolado na concentração de 1ng/L. Os embriões somáticos do mamoeiro recém-esmagados em membrana de celulose foram utilizados no processo de bombardeamento. Sendo que o material bombardeado foi utilizado no ensaio histoquímico com o reagente X-Gluc (5-bromo- 4-cloro-3-indolil glucuronida).

3.1 Transformação de colônias de *E. coli* por eletroporação e isolamento do vetor plasmídial pBI426

O vetor utilizado neste trabalho foi o vetor plasmídial pBI426 (Figura 1), que possui o gene *gus*, que codifica a enzima β -glucuronidase. Para tanto, células competentes de *E. coli* foram transformadas por eletroporação utilizando-se o vetor pBI426. Após replicação plasmídial, esses vetores foram isolados e usados no bombardeamento do mamoeiro.

O protocolo de transformação bacteriana foi baseado em Zhang et al. (1988). Para eletroporação, foram adicionados de 1 a 2 μ L de DNA (60ng/L) a 40 μ L do estoque de células competentes de *E. coli* e a mistura incubada no gelo por 1 minuto. A amostra foi colocada numa caneleta de eletroporação previamente resfriada, as células presente na amostra, foram eletroporadas. Posteriormente, foram adicionados 600 μ L de meio LB e a solução transferida para um tubo de eppendorf e incubado a 37°C. Após 1 hora foram adicionados 20 μ L de canamicina em placas contendo meio LB e um total de 642 μ L das células transformadas foram plaqueadas e incubadas a 37°C por 12 a 16 horas.

Para isolamento do plasmídeo foi utilizada uma colônia de *E. coli* transformada, que foi colocada em 30mL de meio LB contendo canamicina e incubada a 37°C sob agitação até atingir a fase exponencial de crescimento. Após crescimento foram transferidos 1,5 mL de bactéria para novos eppendorfs. As amostras foram centrifugadas por 3 minutos e o sobrenadante recuperado. Posteriormente, foram

adicionados 200 μ L de solução I. A mistura homogeneizada e mais 200 μ L da solução II foram adicionados. As soluções I e II tem a função de lise das células. 200 μ L da solução III foram adicionados à mistura. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos. Aproximadamente 600 μ L da mistura foram recuperados e adicionados 420 μ L de isopropanol para precipitação do DNA. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos e descartado o sobrenadante, deixando secar em câmara de fluxo por 30 minutos. O DNA foi ressuspendido com 30 μ L de água esterilizada e posteriormente diluído na concentração de 1ng/L.

A composição da solução I foi de 50mM/L de Glicose, 25mM/L de Tris-HCL, 10mM/L de EDTA e pH 8,0; a solução II foi de 8g/L de NaOH, 10ml/L de SDS 10% e pH 8,0; e a solução III foi de 11,5ml/L de C₂H₄O₂, 60ml de C₂H₃KO₂ e pH 4,8.

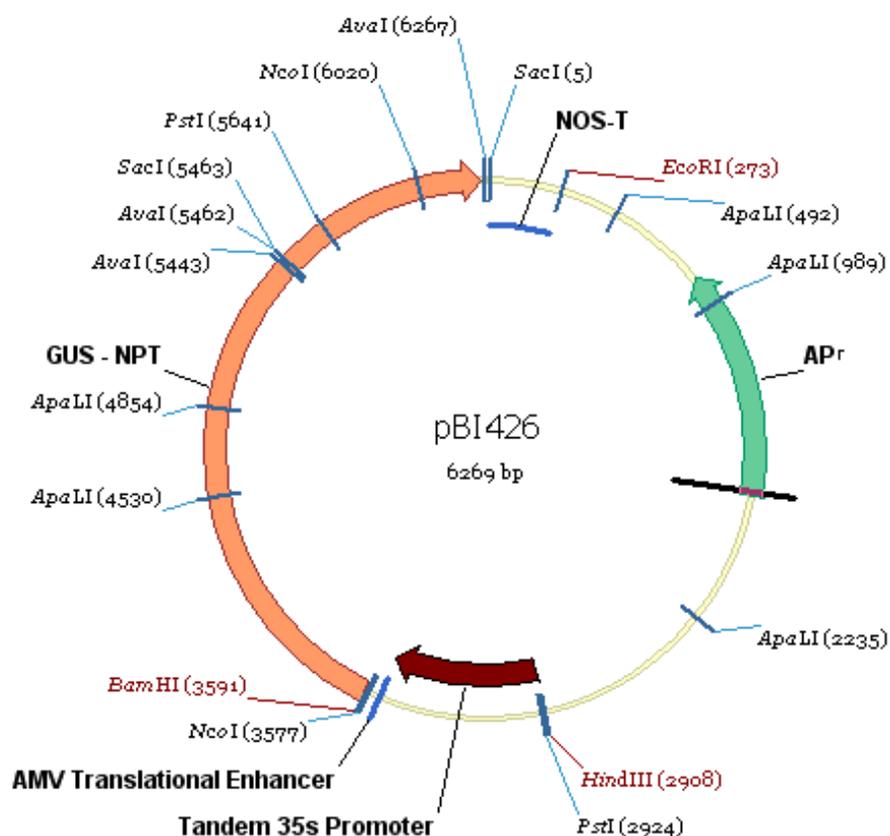


Figura 1- Mapa do vetor pBI426 utilizado na transformação por biobalística: contendo os genes *gus*.

3.2 Transformação genética do mamoeiro pelo método de biobalística

O processo de biobalística foi baseado no protocolo desenvolvido por Aragão *et al.* (1996), onde o vetor pBI426 foi incorporado pelas células embriogênicas, por meio de aceleração de micropartículas de tungstênio. Para o bombardeamento foram utilizados como explantes embriões somáticos recém-esmagados em membrana de celulose no meio de indução. Todo procedimento de transformação foi realizado no Laboratório de Transferência de Genes da Embrapa Cenargen em Brasília-DF.

Para transformação foram utilizados embriões somáticos induzidos a partir de embriões zigóticos imaturos da variedade Sunrise Solo. Embriões somáticos primários e secundários foram esmagados em membrana de celulose esterilizada e transferidos para meio de indução. Após 4 dias as células embriogênicas recém-esmagadas foram utilizadas no bombardeamento. O meio de indução foi composto por ½ dos sais MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 10mg/L de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), 60g/L de sacarose, 10ml/L de vitamina de mamão (400mg/L de glutamina, 50mg/L de myo-inositol, 0,4mg/L de tiamina, 2mg/L de glicina, 0,5 mg/L de ácido nicotínico e piridoxina), 8g/L de ágar com pH 5,8.

No processo de transformação das células embriogênicas primeiramente foram pesados 60mg de micropartículas de tungstênio e esterilizadas com etanol 70% em eppendorfs no vortex durante alguns segundos. Em seguida, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante descartado, lavada três vezes com água estéril no vortex, centrifugando e sempre descartado o sobrenadante. Após última lavagem as micropartículas foram ressuspendidas em 1ml de glicerol 50%, transferindo-se uma alíquota de 50 µL da suspensão para um novo eppendorf, adicionando 5 a 8 µL de DNA, 50 µL cloreto de cálcio (2,5 M), 20 µL de espermidina, sempre homogeneizando. A mistura foi incubada sob agitação à temperatura ambiente e depois centrifugado por 10 segundos, descartando-se o sobrenadante. As partículas revestidas foram lavadas com etanol absoluto e posteriormente centrifugadas, o sobrenadante foi removido e adicionado 24 µL etanol absoluto na mistura. Os tubos foram agitados e a suspensão utilizada para carregar os discos que foram utilizados no bombardeio.

Antes da transformação as membranas contendo as células embriogênicas foram transferidas para meio de bombardeamento, sendo que para cada placa foram

dados 2 tiros. Posteriormente as membranas foram transferidas novamente para o meio de indução. O meio de bombardeamento foi suplementado com água e 8g/L de Phytigel® (Sigma).

3.2.1 Ensaio histoquímico com células embriogênicas recém-transformadas utilizando o reagente X-Gluc

O gene *gus* presente no vetor utilizado na transformação codifica a enzima β -glucuronidase, e a sua expressão pode ser visualizada pelo contato do tecido transformado com o reagente X-gluc. Esse substrato sofre hidrólise pela ação da enzima, resultando, assim, em produto de coloração azulada, visível a olho nu.

Após 4 dias do bombardeamento as células embriogênicas foram utilizadas para ensaio histoquímico, objetivando conhecer a eficiência da transformação. Para preparo da solução de X-GLUC foi pesado 0,744 g de EDTA; 0,76 g de NaH_2PO_4 (fosfato de sódio); 0,042 g de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (cianeto férrico de potássio) ; 0,2 mg de triton; 2 ml de DMSO e 100mg de X-GLUC e dissolvido em 198 ml de água estéril. Posteriormente a solução foi filtro-esterilizada e mantida a -18°C no escuro.

Foram adicionados 10ml da solução X-Gluc em placas de Petri, para onde foram transferidas as células embriogênicas recém-bombardeadas. As placas foram mantidas a 37°C por 24 horas. Sequencialmente o material foi avaliado e fotografado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo ensaio histoquímico com o substrato X-Gluc a transformação por biobalística mostrou-se eficiente em diferentes padrões de expressão, que variaram de pontos a manchas azuis (Figura 3A). Quando se realiza a transformação de plantas com o gene *gus*, há possíveis padrões de expressão diferentes, expressos pela coloração (FAVRETO, 2012). Ambas as formas de expressão confirmam a eficiência do método em teste.

No entanto, os pontos azuis são essencialmente limitados à região das células com potencial embriogênico (Figura 3B e C), demonstrando que as células

indiferenciadas não foram capazes de incorporar o DNA exógeno (Figura 3D). Esses resultados indicam uma maior chance de obter plantas transgênicas de mamoeiro a partir de células com capacidade de regeneração pelo método de biobalística.

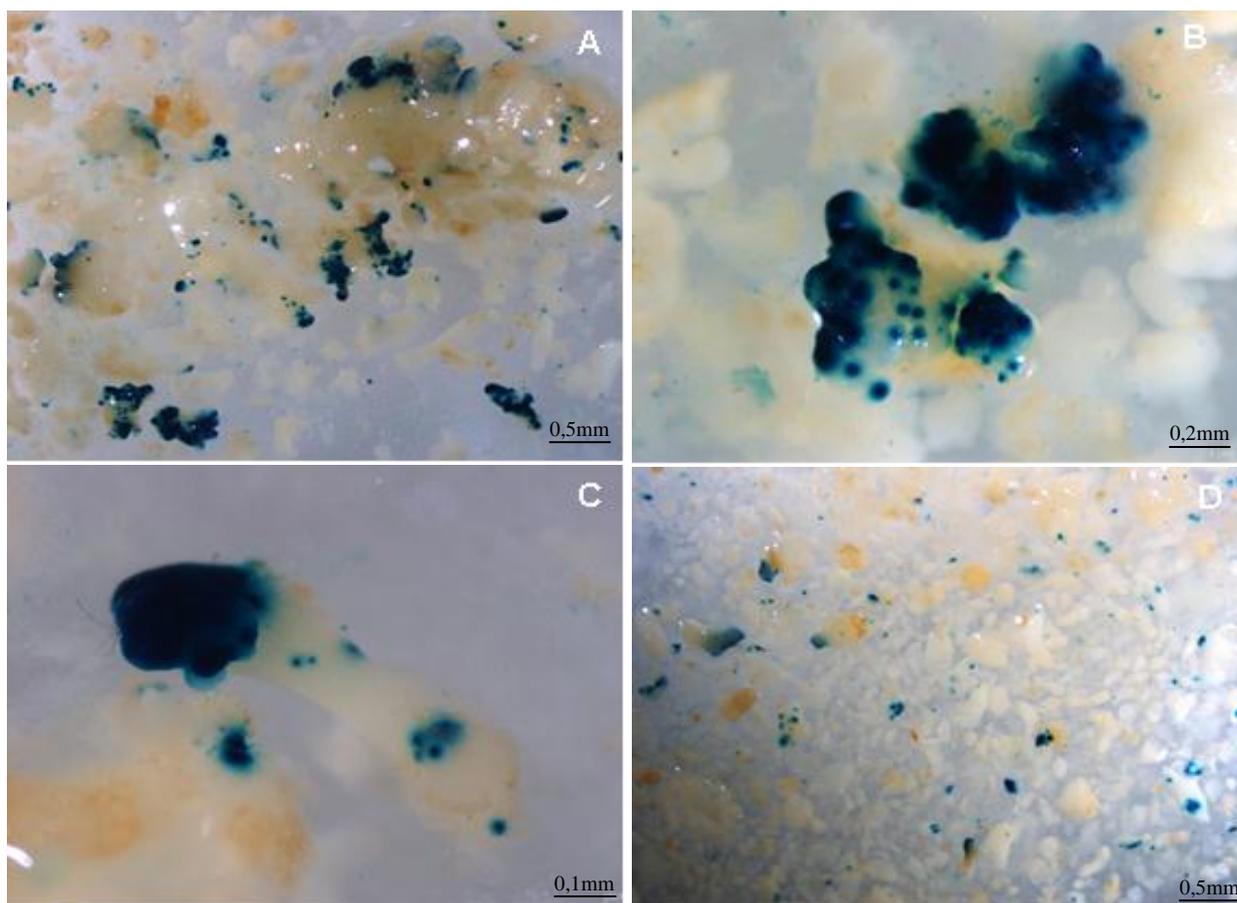


Figura 2– Ensaio histoquímico com o reagente X-Gluc: Células embriogênicas recém-transformadas pelo método de biobalística expressando o gene *gus*.

O vetor utilizado na transformação foi o pBI426, que contém o gene *gus* (codifica a enzima glucuronidase) e que funciona como gene repórter. Segundo Carmo (2003) todos os trabalhos de desenvolvimento de mamoeiros transgênicos utilizaram esse gene como repórter, como Ying et al. (1999) e Cabrera-Ponce et al. (1996).

Além do gene repórter presente em um vetor de transformação, existe o gene marcador. O gene marcador de seleção é aquele que irá conferir às células transformadas a capacidade de resistir e se multiplicar na presença de um determinado agente seletor, normalmente antibiótico ou herbicida (CARMO, 2003). O gene *nptII*,

confere resistência ao antibiótico canamicina e está presente em quase todos os trabalhos como gene marcador de seleção de mamoeiros transgênicos. Segundo Maldenar (2009) em função de questões ligadas a biossegurança e à percepção pública dos transgênicos, principalmente no que se refere ao uso de genes de resistência a antibióticos como genes marcadores de seleção no desenvolvimento de plantas transgênicas, se faz necessária à busca por sistemas alternativos de gene marcador/ agente seletivo para triagem de embriões somáticos transgênicos de mamoeiro.

Neste contexto, Cabrera-Ponce et al. (1995) foram os únicos que utilizaram o gene *bar* além do *nptII*, como gene marcador na produção de mamoeiros transgênicos. Este gene confere resistência ao herbicida glufosinato de amônia. Souza Jr. et al. (2001) buscaram avaliar os sistemas gene *manA*/ manose e *bar*/GA, como alternativos ao *nptII* canamicina, sendo que apenas o sistema *bar*/GA mostrou-se eficiente. Partindo destes resultados, pode-se inferir que é possível obter mamoeiro transgênico utilizando o sistema de seleção *bar*/ GA.

Sendo assim, existe construído um sistema de seleção com o herbicida glufosinato de amônia, que futuramente será utilizado para seleção dos embriões somáticos transformados com o vetor pBSPapBarVir (Figura 3), que contém o gene *bar*, como gene marcador. Entretanto, o vetor utilizado neste trabalho não possui o gene *bar* como gene marcador, pois os resultados foram utilizados para avaliar a eficiência do método de transformação.

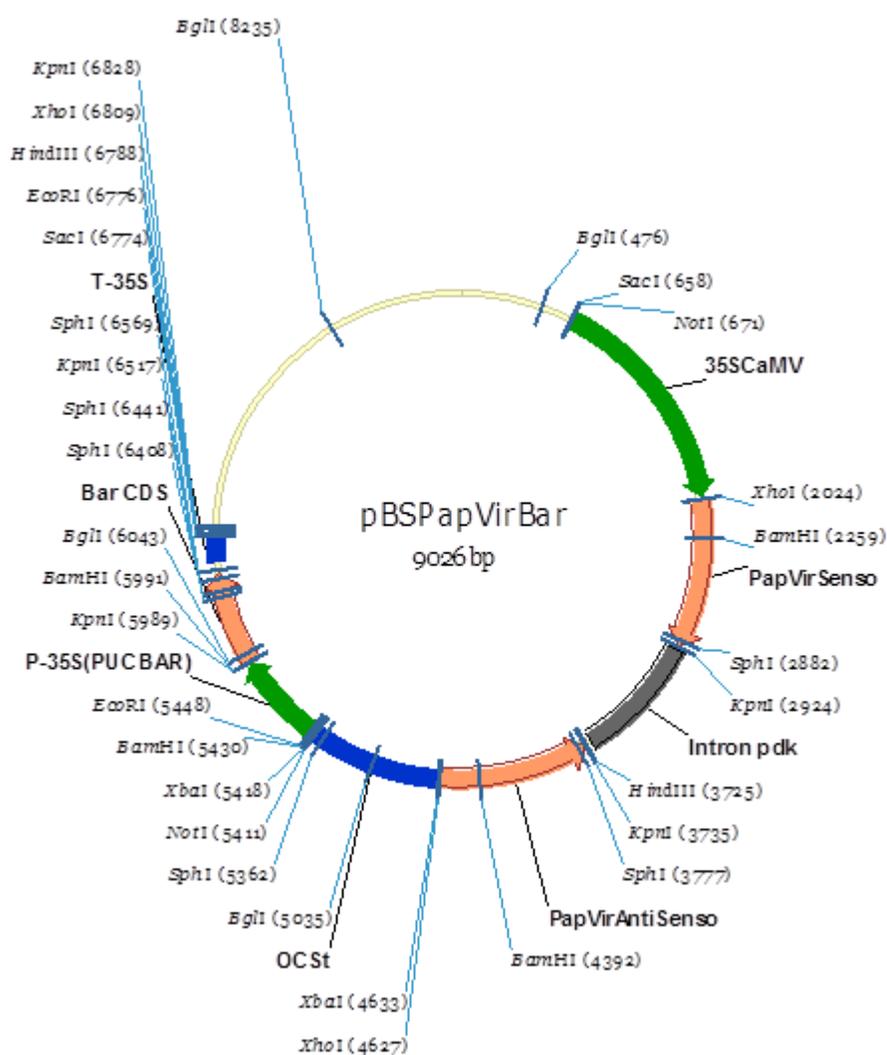


Figura 3- Mapa do vetor pBSPAPVirBAR: com o cassete de interferência e o cassete contendo o gene *bar*.

5. CONCLUSÃO

O método de transformação genética por biobalística mostrou-se eficiente pelo ensaio histoquímico, através da reação enzimática da proteína exógena com o substrato X-Gluc.

REFERÊNCIAS

ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, L. M. G.; BRASILEIRO, A. C. M.; RIBEIRO, S. G.; SMITH, F. D.; SANFORD, J. C.; FARIA, J. C. RECH, E. L. Inheritance of foreign gene in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, n.1-2, p.142-150, 1996.

CABRERA-PONCE, J. L., VEGAS-GARCIA, A., HERRERA-ESTRELA, L. Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, p. 1-7, 1995.

CABRERA-PONCE, J. L., VEGAS-GARCIA, A., HERRERA-ESTRELA, L. Regeneration of transgenic papaya plants via somatic embryogenesis induced by *Agrobacterium rhizogenes*. **In vitro Cellular e Desenvolpmental Biology – Plant**, Largo, MD, v. 32, p. 86-90. 1996.

CARMO, L. S. T. **Transformação de mamoeiro - XV anos de sucesso**. Centro Universitário de Brasília, Brasília-DF. (Monografia), 2003.

FAVRETO, C. B. **Transformação genética de soja usando biobalística, *Agrobacterium* e método integrado, em meio com ácido lipóico**. (Dissertação de Mestrado) Universidade de Maringá. Paraná, 2012.

KOEHLER, A. D. **Embriogênese somática em mamoeiro (*Carica papaya* L.): anatomia, histoquímica e influência de ACC, AVG e STS e de pulsos de 2,4-D**. (Dissertação Mestrado).UFV, 2004.

LIMA, S. A. A. C. Formação de calos a partir de hipocótilos de mamoeiro submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D e sacarose. **Congresso Brasileiro de Fruticultura**. Belém. 2003.

MALDANER, F. J. **Transformação genética de plantas: uma importante ferramenta para o melhoramento genético**. Faculdades Da Terra De Brasília (Dissertação). 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.437-497, 1962.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science Technology**, v.5, p.27-37, 1987.

SANTARÉM, E. R. e FERREIRA, A. G. **Transformação de soja via bombardeamento de partículas**. ABCTP Notícias, Brasília, v.9: p.2-9, 1997.

SANTARÉM, R. E. **Métodos eficientes para a transformação genética de plantas**. Universidade de Cruz Alta. Revista De Ciência & Tecnologia. 15 – p. 81-90, 2000.

SOUZA JR, M. T.; VENTUROLI, M. F.; COELHO, M. C. F.; RECH FILHO, E. L. Análise de sistemas gene marcador/ agentes seletivos alternativos para seleção positiva de embriões somáticos transgênicos de mamoeiro. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 13 (3): 365-372, 2001.

SOUZA, S. M. A. MAMÃO NO BRASIL: distribuição regional da produção e comportamento dos preços no período 1996-2005. **Informações Econômicas**, SP, v.37, n.9, set. 2007.

YING, Z. T.; YU, X.; DAVIS, M. J.; YING, Z. T.; YU, X. New method for obtaining transgenic papaya plants by Agrobacterium-mediated transformation of somatic embryos. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, n.112, p. 201-205. 1999.

ZHANG, H. M.; YANG, H.; RECH, E. L.; GOLDS, T. J.; DAVIS, A. S.; MULLIGAN, B. J.; COCKING, E. C.; DAVEY, M. R. Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 379-384, 1988.