

Transformação Genética do Meloeiro e da Macieira

José Antônio Peters
UFPEL, Instituto de Biologia, Depto. de Botânica peters@ufpel.tche.br

César Rombaldi
UFPEL, FAEM, Depto. de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
cesaruvf@ufpel.tche.br

Jorge Adolfo Silva
UFPEL, FAEM, Depto. de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
ctajorge@ufpel.tche.br

Márcia Wulff Schuch
UFPEL, FAEM, Depto. de Fitotecnia
marciaus@ufpel.tche.br

Aumento do tempo de armazenamento e qualidade dos frutos

Fotos cedidas pelos autores

A Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) vem desenvolvendo pesquisas em biotecnologia vegetal desde 1984, quando começaram os trabalhos em cultura de anteras de arroz. Em 1994, foram iniciadas pesquisas que envolviam também estudos em nível molecular, principalmente na área de transformação genética de plantas. Nas atividades desenvolvidas com as culturas de meloeiro e macieira, participam os Laboratórios de Biotecnologia de Frutas e Hortaliças do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA) e de Cultura de Células e Tecidos de Plantas do Instituto de Biologia (IB), bem como o Centro de Biotecnologia (CENBiot) da UFPEL e o "Laboratoire Éthylène et Maturation de Fruits" do ENSAT - Toulouse, França.

Meloeiro

O melão é plantado em todas as regiões do Rio Grande do Sul - RS, com uma área cultivada de 1.686 ha e um rendimento médio de 3.135 frutos/ha. A região nordeste do RS é a principal produtora dessa fruta. Atualmente, com a utilização de cultivos protegidos, obteve-se um aumento de produtividade, que pode atingir 40 ton, e de qualidade dos frutos (GAYET, 1994; FARIAS, 1988).

De maneira geral, os melões são enquadrados como frutos altamente perecíveis, com uma vida de prateleira de 4 a 10 dias, dependendo da cultivar, das condições de cultivo e ponto de colheita. As principais causas dessa alta perecibilidade são a elevada percentagem de água, a baixa acidez, a estrutura celular com grandes vacúolos e espaços intercelulares e o acelerado metabolismo. A colheita antecipada prolonga o período de conservação, mas compromete a qualidade organoléptica dos frutos. Já a colheita tardia resulta em frutos de alta qualidade

de , mas para consumo imediato. Além disso, a cultivar "Gaúcho", uma das mais plantadas no RS, não tolera armazenamento em refrigerador, mesmo por curto período de tempo, pois perde suas qualidades organolépticas, que ocasionam perdas pós-colheita acima de 60%.

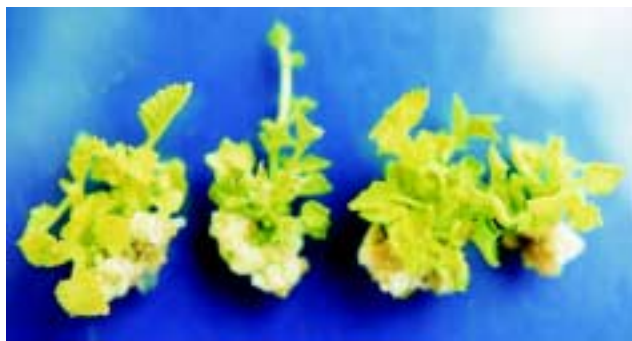


Figura 1 – Regeneração de brotos de melão, cv. Gaúcho, a partir de cotilédones infectados com *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, contendo o plasmídeo pGA 643 e o gene PAP4

A maioria dos eventos fisiológicos relacionados com a maturação de melões do tipo climatérico é coordenada pelo etileno. Este hidrocarboneto é um hormônio associado a, praticamente, todas as etapas fenológicas do desenvolvimento e desempenha papel fundamental na indução da maturação/senesência de frutos climatéricos. A síntese do etileno é fortemente estimulada por fatores exógenos como infecções fúngicas, bacterianas e/ou virais, injúrias físicas e mecânicas, estresses térmicos e hídricos, além da resposta autocatalítica. Esse envolvimento generalizado nos eventos fisiológicos do crescimento e desenvolvimento dos vegetais faz com que esse hidrocarboneto seja, em alguns casos, a causa (p. ex.: maturação) e, em outros, a consequência do processo (p. ex.: resposta a estresses) (KENDE, 1993;

LATCHÉ *et al.*, 1995; PECH *et al.*, 1995; ZAREMBINSKI & THEOLOGIS, 1994)

A via de biossíntese do etileno compreende a conversão da S-adenosil metionina em ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), sob a ação da ACC sintetase, e a conversão do ACC em etileno, pela ação da enzima formadora do etileno (EFE) ou ACC oxidase. No que concerne à ACC oxidase, somente em 1991 é que VERVERIDIS & JOHN conseguiram isolar essa enzima num sistema acelular e dosar sua atividade *in vitro*. A descoberta da natureza e das propriedades dessa enzima resultou em importantes avanços no esclarecimento dos mecanismos fisiológicos e moleculares da maturação de frutos climatéricos. Assim, foram isolados clones de DNA e genes da ACC oxidase em tomate (HAMILTON *et al.*, 1991) e melão (LASSERE *et al.*, 1996).

Visando à produção de plantas transgênicas, o laboratório de Biotecnologia de Frutas e Hortaliças do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA) utilizou a estratégia de obtenção de um clone da ACC oxidase de maçã e os respectivos anticorpos policlonais. Inicialmente, isto possibilitou agregar às técnicas disponíveis para a medida da produção de etileno e da atividade ACC oxidase, o monitoramento da síntese dessa enzima em frutos climatéricos. Além disso, a disponibilidade do clone da ACC oxidase de maçã permitiu o preparo de vetores de expressão com vistas à transformação genética de plantas de interesse econômico que tenham homologia de sequência com esse clone. Entre essas, podemos incluir algumas cultivares de melão (ex.: Gaúcho, Imperial, Cantaloup), macieira (Gala, Jonagold, Royal Gala), tomateiro (kada, Floradade), kiwi (Bruno e Hayward) e pessegueiro (Chimarrita e Chiripá).

O clone de ACC oxidase foi amplificado e clonado a partir de um cDNA de 1200 pares de base (pb) obtido de mRNA extraídos de frutos de maçã, cultivares Jonagold e Gala, armazenados durante 3 meses em câmaras

com atmosfera controlada com 1,5% de O₂, 1,8% de CO₂, temperatura de 0,5°C e umidade relativa de 95%. A seleção dos clones contendo o DNA da ACC oxidase em orientação *antisense* foi realizada por **PCR** e por sequenciamento. Em seguida, os clones selecionados foram replicados em *Escherichia coli* DH5 α e o DNA plasmidial foi purificado por ultracentrifugação em cloreto de cério (SAMBROOK *et al.*, 1989). Essa preparação foi utilizada para transformar células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404.

O plasmídeo utilizado (**pGA 643**), de 11,4 kb contém o gene da **neomicina fosfotransferase II (NPT II)** do transposon Tn5 sob controle do promotor do gene da **nopalina sintase** do plasmídeo Ti (NOS). O sítio de multiclonagem está inserido entre o promotor do vírus do mosaico da couve-flor, **CaMV (35S)**, e o do terminador T7-5. O cDNA **pAP4** de 1,2 kb, que codifica para a ACC oxidase em maçã, foi inserido em orientação *antisense* no sítio de reconhecimento da *Bgl*III, entre o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor – **CaMV** - e o do terminador T7-5 do plasmídeo binário **pGA 643**.

Esse vetor foi utilizado para a transformação das cvs. de meloeiro, Gaúcho e Cantaloup, e da maceira, cv. Gala. O trabalho de transformação foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da UFPel, sendo utilizados como explantes iniciais, cotilédones de sementes germinadas, por três dias, *in vitro*, em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962). Os cotilédones foram seccionados e imersos em meio de cultura contendo células de *Agrobacterium tumefaciens*, por dez minutos, e depois transferidos para meio MS, por 48 horas. Após esse período, os explantes foram lavados em água esterilizada contendo carbenicilina (250 mg/L), secos em papel de filtro estéril e transferidos para meio de regeneração com 200 mg/L de carbenicilina e 50 mg/L de canamicina, como agentes seletivos. Explantes controles foram transferidos diretamente para meio de regeneração. Todo o processo de indução de brotos foi realizado em câmara de crescimento, com temperatura de 24 \pm 1°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de 30 W.m².

Dois meses após o processo de infecção, os brotos regenerados em meios seletivos (Figura 1) foram transferidos, individualmente, para meios de multiplicação e,

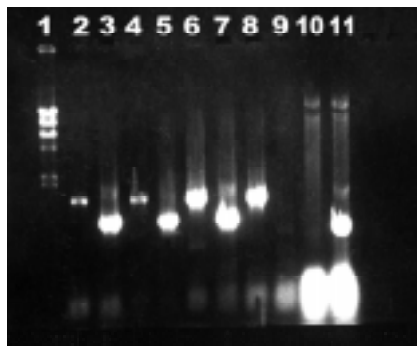


Figura 2 – Gel de agarose com amplificação do gene PAP4 em orientação *antisense* em melões da cv. Cantaloup. Pistas: 1 – DNA fago λ /HindIII; 2, 4 e 6 – DNAs dos clones AS1, AS2 e AS3 com *primers* para gene ACC oxidase endógeno; 3, 5 e 7 – DNAs dos clones AS1, AS2 e AS3 com *primers* para PAP4; 8 – DNA de planta não transformada com *primers* para gene ACC oxidase endógeno; 9 – DNA de planta não transformada com *primers* para PAP4; 10 – DNA do plasmídeo pGA-PAP4 com *primers* para o gene da ACC oxidase endógeno; 11 – DNA do plasmídeo pGA-PAP4 com *primers* para gene PAP4

posteriormente, de enraizamento, contendo sempre canamicina como agente de seleção. Os brotos que apresentaram bom enraizamento foram aclimatizados em casa de vegetação, para o desenvolvimento das plantas e obtenção dos frutos. Foram transferidas plantas de 21 clones da cultivar gaúcho e 10 da cultivar Cantaloup.

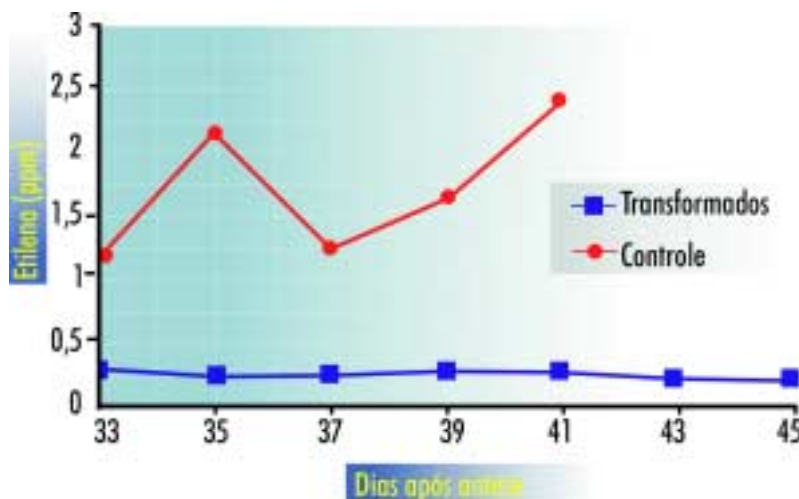


Figura 3 – Produção média de etileno em melões Cantaloup “controle” e transformados, antes da colheita

Para avaliar de maneira rápida a presença do gene *antisense* da ACC oxidase nas folhas das plantas em desenvolvimento, foi utilizada a técnica de **PCR** empregando um termociclador Progene. Para a detecção do clone *antisense*, foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos:

5' - GGATGATTTCTCTTAAATTAAT - 3',
situado na 3' do PAP 4

5' - TAGCTAGCTTAGCTCACGCA - 3',
situado no T-DNA do pGA643.

Para controle positivo da reação, utilizou-se oligonucleotídeos obtidos da sequência do gene endógeno (LASSERE *et al.*, 1998). Das plantas analisadas, três clones da cv. Cantaloup apresentaram resposta positiva, com amplificação de um fragmento de 850pb, correspondente ao gene *antisense* inserido (Figura 2). Para a cultivar Gaúcho, não se obteve transformados **PCR** positivos. Paralelamente aos estudos moleculares, foi medida a atividade da ACC oxidase *in vivo* em discos de folhas de plantas transformadas e controles. Os resultados foram altamente significativos, ocorrendo uma redução acima de 80% na atividade dessa enzima nas plantas transformadas, mesmo em órgãos não clamatéricos, como as folhas.

Nos frutos, a concentração de etileno foi avaliada antes e após a colheita dos mesmos. Para essa avaliação, estudaram-se frutos de plantas “controle” e oriundos do clone AS 1 transformado. Conforme pode ser observado na Figura 3, os frutos de plantas “controle” apresentaram variação crescente na concentração de etileno no pé, enquanto que nos frutos de plantas transformadas não houve variações significativas ao longo do período de avaliação, detectando-se baixas concentrações de etileno (<0,25 ppm). Além disso, o período de colheita dos frutos das plantas transformadas foi retardado, em média, por quatro dias.

Após a colheita, os frutos de plantas “controle” foram acompanhados por até 5 dias no laboratório, quando já apresentavam senescência avançada. Durante o período de avaliação, a produção de etileno mostrou um acréscimo superior a 340%. Nos frutos de plantas transformadas, a produção de etileno manteve-se estável até mesmo próximo à fase de deterioração (figura 4). Os frutos conservaram-se por um período de até 11 dias pós-colheita (Figura 5), mantendo a polpa firme e íntegra, diferentemente dos oriundos de plantas “controle” (Figura 6).

Embora esses resultados sejam preli-

minares e oriundos de poucas plantas, sendo necessários novos ensaios em maior escala e outras avaliações bioquímicas, verificou-se que o peso médio dos frutos de plantas transformadas eram superiores aos das plantas “controle” (1.100 e 700 gr., respectivamente). Considerando que a produtividade média dessa cultivar, no Rio Grande do Sul, está em torno de 40 ton.ha⁻¹, esse incremento de peso poderia representar um ganho médio superior a 20 ton.ha⁻¹. Além disso, a redução da produção de etileno nas plantas transformadas permitiu prolongar o ciclo de maturação em 5 dias e o período de conservação em 7 dias.

Quanto a cv. Gaúcho, a não obtenção de plantas transgênicas pode estar associada: a) à insuficiente pressão de seleção no meio de cultivo; b) a uma menor eficiência de transformação dessa cultivar; e c) à necessidade de utilização de outro gene marcador de seleção. Novos estudos estão sendo realizados, com vistas a transformar essa cultivar, que apresenta as maiores perdas pós-colheita entre as plantadas, no Rio Grande do Sul.

Macieira

Entre as frutíferas de clima temperado, a cultura da macieira ocupa, atualmente, lugar de destaque na fruticultura brasileira, sendo cultivados, aproximadamente, 27.500 ha, com uma produção de 590.000 ton, atendendo a cerca de 80% do consumo interno. Os principais Estados produtores localizam-se na região Sul, onde temperaturas abaixo ou igual a 7°C estão em torno de 700-800 horas/anos. As cultivares mais plantadas são Gala e Fuji (78% da área cultivada), que têm alta aceitação no mercado consumidor interno e externo (KLUGE *et al.*, 1997).

A maçã, como o melão, apresenta frutos climatéricos, com aumento apreciável de produção de etileno precedendo a maturação. A concentração endógena de etileno nos diversos frutos de clima temperado é variável conforme a espécie e a cultivar (KLUGE *et al.*, 1997). A produção de etileno, entre outros fatores, é responsável pelo grau de perecibilidade e capacidade de armazenamento de frutas climatéricas como a maçã, pêra e pêssego, o que causa, muitas vezes, um elevado índice de perdas pós-colheita. Estudos de fisiologia pós-colheita demonstraram que a redução da ação e/ou da produção de etileno prolonga o período de conservação das maçãs. Esses estudos utili-

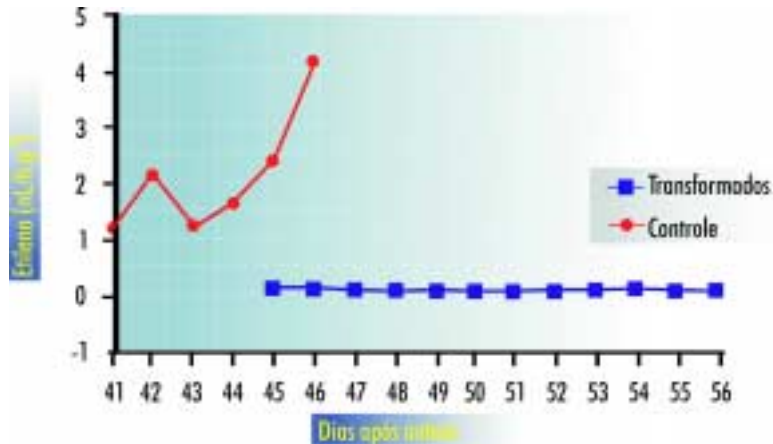


Figura 4 – Produção média de etileno em melões Cantaloup “controle” e transformados, após a colheita

zaram atmosfera controlada, inibidores de produção (AVE) e/ou da ação do etileno (MCP) (ZIMER *et al.*, 1998)

A maioria das plantas transformadas geneticamente, até o momento, são herbá-



Figura 5 – Aspectos dos frutos, cv. Cantaloup, de plantas “controle” e transformada, 5 e 11 dias após a colheita, respectivamente



Figura 6 – Aspectos da polpa dos frutos, cv. Cantaloup, de plantas “controle” e transformada, 5 e 11 dias após a colheita, respectivamente

ceas (BRASILEIRO & DUSI, 1999), uma vez que, em plantas lenhosas, o processo de transformação é menos utilizado por causa da dificuldade de manipulação *in vitro* de seus tecidos. A maior dificuldade para a obtenção de plantas transgênicas é o estabelecimento prévio de um sistema de regeneração eficiente. Cada espécie vegetal, ou mesmo diferentes genótipos dentro de uma mesma espécie,

tem diferentes exigências nutricionais e hormonais para sua regeneração, a partir de explantes de tecidos organizados ou a partir de protoplastos. O agente e a metodologia de seleção a serem utilizados também dependem do tipo de explante e do genótipo estudados. Mesmo para espécies cujos protocolos de regeneração e transformação já estejam estabelecidos, sua reprodução em outras condições de laboratório nem sempre é possível. Assim, o domínio da regeneração é um problema geral, qualquer que seja a espécie vegetal considerada, existindo ou não uma metodologia qualquer de transformação previamente descrita (BRASILEIRO & DUSI, 1999).

Dessa forma, o estabelecimento de uma estratégia eficiente para a transferência de genes é fundamental para o sucesso da técnica (MACHADO *et al.*, 1997).

Considerando o exposto acima, foi iniciado, mais recentemente, um trabalho similar ao descrito para o melão, visando a diminuir a perecibilidade dos frutos de macieira, principalmente da cultivar Gala, que é a mais plantada e que apresenta maiores problemas de conservação pós-colheita. Para tal fim, foi utilizado o mesmo plasmídeo (pGA 643) empregado para a transformação da cv. Cantaloup de melão, contendo o gene da ACC oxidase (pAP4) em orientação *antisense*.

Inicialmente, foi determinado qual o melhor tipo de explante e de meio de cultura para a regeneração de brotos, tentando estabelecer um protocolo adequado de regeneração para a cv. Gala. Foram testados internós e folhas de brotos multiplicados *in vitro* a partir de meristemas e desenvolvidos em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, densidade de fluxo luminoso de 30 W.m⁻² e temperatura de 25±1°C durante o período claro e 23±1°C durante o período de escuro, e 16 meios de cultura, constituídos pelos sais e vitaminas de MS e reguladores de crescimento [benzilamino-

purina (BAP), thidiazuron (TDZ) e ácido α -naftalenoacético (ANA), em diferentes concentrações e combinações.

Explantos de folhas foram os mais responsivos, com 100% de regeneração e número médio de três (3) brotações por explante (Figura 7), demonstrando que a metodologia utilizada estava apropriada para o desenvolvimento de brotações adventícias. Esse protocolo foi então utilizado, inicialmente, para verificar a eficiência de transformação através da expressão transiente dos tecidos infectados com a bactéria LBA4404 contendo o plasmídeo pMOG 402 *GUS*. A expressão desse gene ocorreu em 30% dos tecidos logo após a infecção e 20 dias após os mesmos serem colocados em meio de regeneração de brotos, contendo 20 mg/L de canamicina como agente seletivo. (Figura 8). Cinquenta a setenta dias após a infecção dos explantes e transferência para o meio regenerativo contendo canamicina, foram obtidas brotações potencialmente transgênicas (Figura 9), as quais foram transferidas para meios de multiplicação contendo o mesmo antibiótico de seleção. As que sobreviveram estão sendo enraizadas e suas folhas utilizadas para estudos moleculares, por meio da técnica de PCR com os mesmos *primers* empregados com o melão, no intuito de verificar a presença do gene da ACC oxidase nas plantas que passaram pelo processo de transformação. Nos primeiros ensaios moleculares foram detectadas 2 plantas PCR positivas para o gene *antisense*.

As expectativas para a obtenção de plantas transgênicas de macieira são enormes, pois possibilitará a extensão dessas pesquisas a outras espécies de frutíferas lenhosas de clima temperado, como pereira, pessegueiro, ameixeira etc, utilizando esses ou outros genes de interesse (p. ex.: resistência a doenças, alteração do grau de acidez dos frutos, etc).

Referências Bibliográficas

BRASILEIRO, A. C. M., DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In : TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília : Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1999. p. 679-735.

FARIAS, J.R.B. Comportamento da cultura do melão em estufa plástica, sob diferentes níveis de espaçamento, raleio e cobertura do solo. **Dissertação de Mestrado**. UFPEL, Pelotas, 1988. 80p.

GAYET, J.P. Melão para exportação:



Figura 7 – Regeneração de brotos a partir de explantes foliares de macieira, cv. Gala, em meio MS contendo 4 mg/l de BAP e 0,2 mg/l de ANA

procedimentos de colheita e pós-colheita. **Frupep**. Brasília, 1994. 36p.

HAMILTON, A.J.; BOUZAYEN, M. & GRIERSON, D. Identification of a tomato gene for the ethylene forming enzyme by expression in yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 88:7434-7437, 1991.

KENDE, H. Ethylene Biosynthesis. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 4:283-307, 1993.

KLUGE, R. A.; NACHTIGAL, J. C., FA-CHINELLO, J. C., BILHALVA, A. B. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado**. Pelotas: Editora da UFPEL, 1997. 163 p.

LASSERE, E.; BOUQUIN, T.; HERNANDEZ, J.A.; BULL, J.; PECH, J.-C. & BALAGUÉ, C. Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.) **Mol. Gen. Genet.** 251:81-90. 1996.

LASSERE, E.; HERNANDEZ, L.; BOUQUIN, T.; BULL, J.; PECH, J.C.; BALAGUE, C. Characterisation of three genes encoding ACC oxidase from melon. **Plant Cell**. 10: (in press).

LATCHÉ, A.; AYUB, R.; MARTINEZ, G.; GUIZ, M.; BEN AMOUR, M.; ROMBALDI, C.; PECH, J.-C. & BOUZAYEN, M. Biosynthese et mode d'action de l'hormone végétale éthylène. **Fruits**, 50(5):379-396, 1995.

MACHADO, L.º; ANDRADE, G.M.; CID, L.P.B.; PENDEL, R.M.; BRASILEIRO, A.C.M. *Agrobacterium* strain specificity and shoot tumor formation in eucalypt (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*). **Plant Cell Reports**, 16: 299-303. 1997.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. plant.**, 15:473-497.1962.

PECH, J.-C.; LASSE-RE, E.; AYUB, R.; GUIZ, M.; BIDONDE, S.; HERNANDEZ, J.A.; RAMAS-SAMY, S.; ROMBALDI, C.; BOUZAYEN, M.; BALAGUÉ, C. & LATCHÉ, A. Involvement of ethylene in fruit ripening: expression and control of ACC oxidase gene. In: AUSTRALASIAN POSTHARVEST

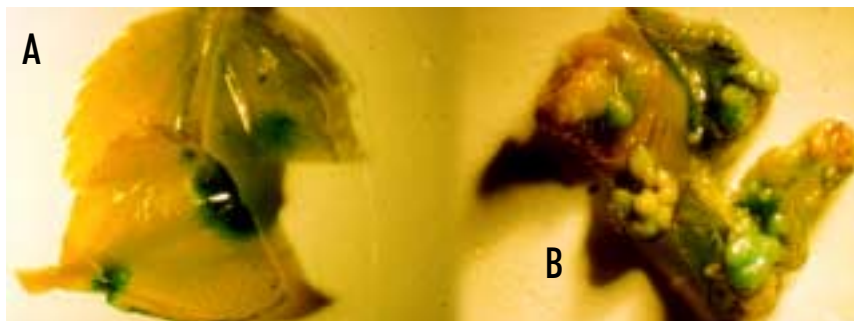


Figura 8 – Expressão transiente em explantes foliares de macieira, cv. Gala, logo após a infecção (A) e 20 dias em cultura (B)

HORTICULTURE CONFERENCE, Melbourne, 1995. Proceedings... Melbourne, Department of Natural Resources and Environment Institute for Horticultural Development. 1995. p.47-53.

SAMBROOK J., FRITSCH E. F., MANIATIS T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual (2^{ed.}). New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press

VERVERIDIS, P. & JOHN, P. Complete recovery *in vitro* of ethylene-forming enzyme activity. **Phytochemistry**, 30:725-727, 1991.

ZAREMBINSKI, T.I. & THEOLOGIS, A. Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. **Plant Mol. Biol.**, 26:1579-1597, 1994.

ZIMER, P.D.; BIERHALS, J.D.; SILVA, J.A.; ROMBALDI, C.V. – inibição da síntese da ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano) oxidase em maçãs frigoconservadas em atmosfera controlada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** da SBCTA (aceito para publicação).



Figura 9 – Regeneração de brotos a partir de explantes foliares de macieira, cv. Gala, potencialmente transformados