

Regeneração e Transformação Genética  
via embriogênese somática de Mamoeiro  
(*Carica papaya*) para Resistência a Vírus



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
353**

**Regeneração e Transformação Genética  
via embriogênese somática de Mamoeiro  
(*Carica papaya*) para Resistência a Vírus**

*Emanuel Felipe Medeiros Abreu  
Camila Chabi de Jesus  
Eduardo Chumbinho de Andrade  
Gláucia Barbosa Cabral  
Francisco José Lima Aragão*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Parque Estação Biológica  
PqEB, Av. W5 Norte (final)  
70970-717, Brasília, DF  
Fone: +55 (61) 3448-4700  
Fax: +55 (61) 3340-3624  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações  
da Unidade Responsável

Presidente  
*Marília Lobo Burle*

Secretária-Executiva  
*Ana Flávia do N. Dias Côrtes*

Membros  
*Antonieta Nassif Salomão; Bianca Damiani Marques; Diva Maria Alencar Dusi; Francisco Guilherme V. Schmidt; João Batista Tavares da Silva; João Batista Teixeira; Maria Cléria Valadares-Ingles; Rosameres Rocha Galvão; Tânia da Silveira Agostini Costa*

Supervisão editorial  
*Ana Flávia do N. Dias Côrtes*

Revisão de texto  
*João Batista Teixeira*

Normalização bibliográfica  
*Ana Flávia do N. Dias Côrtes*

Tratamento das ilustrações  
*Adilson Werneck*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Adilson Werneck*

Foto da capa  
*Léa Cunha - Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*

**1ª edição**  
1ª impressão (ano): tiragem

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Regeneração e Transformação Genética via embriogênese somática de Mamoeiro (Carica papaya) para Resistência a Vírus I / Emanuel Felipe Medeiros Abreu et al ... – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019. 25 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 353).

ISSN: 0102-0110  
Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader (PDF)  
Modo de Acesso: World Wide Web

1. Marcador de seleção. 2. Biobalística. 3. Embrião zigótico. I. Abreu, Emanuel Felipe Medeiros. II. Jesus, Camila Chabi de. III. Andrade, Eduardo Chumbinho de. IV. Cabral, Gláucia Barbosa. V. Aragão, Francisco José Lima. VI. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. IX. Série.

## Sumário

---

Resumo .....	5
Abstract .....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos .....	10
Resultados e Discussão .....	13
Conclusões.....	18
Agradecimento .....	18
Literatura Recomendada .....	18



# Regeneração e Transformação Genética via embriogênese somática de Mamoeiro (*Carica papaya*) para Resistência a Vírus.

Emanuel Felipe Medeiros Abreu<sup>1</sup>

Camila Chabi de Jesus<sup>2</sup>

Eduardo Chumbinho de Andrade<sup>3</sup>

Glaucia Barbosa Cabral<sup>4</sup>

Francisco José Lima Aragão<sup>5</sup>

**Resumo** – O mamão (*Carica papaya* L.) é uma das frutas com maior destaque no mercado consumidor em todo o mundo. O Brasil é o segundo produtor mundial de mamão, com uma produção de 1.603.351 t/ano. Neste contexto, o desenvolvimento de novas tecnologias, que busquem agregar valor à cadeia produtiva do mamoeiro, assim como reduzir a vulnerabilidade dos produtores aos efeitos danosos de fatores bióticos e abióticos, faz-se necessário. Entre as tecnologias que podem contribuir para a sustentabilidade da cultura do mamão no campo, destaca-se o desenvolvimento de plantas transgênicas com diferentes aplicações agrônômicas. Desse modo, há algumas décadas muitos centros de pesquisa em todo o mundo têm buscado desenvolver protocolos e estratégias de transformação genética do mamoeiro para as mais variadas finalidades. O presente trabalho teve por objetivo estabelecer um sistema de transformação genética composto por três pilares principais: a regeneração por embriogênese somática, o bombardeamento de partículas e a curva de seleção com glifosinato de amônio (GA). Para a regeneração por embriogênese somática, utilizaram-se embriões zigóticos imaturos com 90 a 120 dias após a antese, os quais foram induzidos com 10 mg/L de 2,4-D. Após cinco semanas de indução da embriogênese, os embriões somáticos primários foram macerados e submetidos ao bombardeamento, usando um vetor contendo o gene *bar* dirigido pelo promotor 35SCaMV. Embriões somáticos secundários regeneraram sob pressão de seleção de GA a 2,5

---

<sup>1</sup> Biólogo, doutor em Biologia Molecular, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>2</sup> Bióloga, mestre em Microbiologia Agrícola, Esalq/USP, Piracicaba, SP

<sup>3</sup> Agrônomo, doutorado em Agronomia, pesquisador da Embrapa mandioca e Fruticultura

<sup>4</sup> Engenheira Agrônoma, doutora em Energia Nuclear na Agricultura, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>5</sup> Engenheiro Agrônomo, doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

mg/L. Os embriões que atingiram o estágio cotiledonar foram testados para a presença da proteína fosfinotricina acetiltransferase (PAT) que confere resistência ao GA, confirmando sua transgenia.

**Termos para indexação:** mamão, regeneração, marcador de seleção, glifosinato de amônio, biobalística, embrião zigótico, gene *bar* .

### **Regeneration and Genetic Transformation via Somatic Embryogenesis of Papaya (*Carica papaya*) for Virus Resistance.**

**Abstract** – The papaya is one of the fruits that has gained greater prominence in the consumer market all over the world. Brazil is the second largest producer of papaya, with a production of 1,603,351 t/year. In this context, the development of new technologies that seek to add value to the production chain of papaya, as well as reduce the vulnerability of producers due to the harmful effects of biotic and abiotic factors is necessary. Among the technologies that can contribute to the sustainability of papaya culture in the field, the development of transgenic plants with different agronomic applications stands out. Thus, a few decades ago, many research centers around the world have sought to develop protocols and strategies for the genetic transformation of papaya for a variety of purposes. The present work aimed to establish a genetic transformation system composed of three main pillars: particle bombardment, regeneration by somatic embryogenesis and selective agent/selection marker (ammonium glyphosate/BAR). For regeneration by somatic embryogenesis immature zygotic embryos were used 90 to 120 days after the anthesis in which they were induced with 10 mg/L of 2,4-D. The bombardment was performed after five weeks of induction of embryogenesis from the zygotic embryos by means of a vector containing a cassette with 35S CaMV promoter, the BAR gene and 35S CaMV terminator. The regenerated embryos from the bombardment were cultured on 2.5 mg / L medium of the ammonium glyphosate (GA), as selective agent. Embryos that reached the cotyledonary stage were tested for the presence of the phosphinothricin acetyltransferase protein (PAT) conferring resistance to GA, expressed by the *bar* gene, confirming the effectiveness of the transformation system.

**Index terms:** Papaya, selection marker, ammonium glyphosate, biolistic, zygotic embryo, *bar* gene

## Introdução

---

A cultura do mamoeiro no Brasil, há décadas, vem enfrentando crescentes dificuldades associadas à incidência de doenças e pragas nas regiões de maior produção, a exemplo dos Estados do Espírito Santo e Bahia (IBGE, 2018). Entre os fitopatógenos, as viroses constituem o principal grupo de doenças que se manifestam no mamoeiro, ocasionando grandes perdas na produção, podendo chegar à destruição total das plantações atacadas. Os principais vírus que infectam o mamoeiro no Brasil são o vírus da mancha anelar - *papaya ringspot virus* - PRSV-P (Costa et al., 1969, Lima; Gomes, 1975; Purcifull et al., 1984), o vírus do amarelo letal - *papaya lethal yellowing virus* - PLYV (Loreto et al., 1983; Silva, et al., 2000) e os vírus da meleira - *papaya meleira virus 1* - PMeV1 (Marciel-Zambolim et al., 2000, 2003, Abreu et al., 2015) e *papaya meleira virus 2* – PMeV2 (Sá Antunes et al., 2016). Diante desse cenário, o programa de melhoramento genético da Embrapa tem concentrado esforços no desenvolvimento de variedades e/ou híbridos resistentes a essas viroses, agregando características agrônomicas desejáveis, como ausência de flores hermafroditas estéreis, frutificação precoce e vigorosa, altura da frutificação inicial inferior a 90 cm, entre outras.

Por muitos anos, o melhoramento clássico foi o único método disponível para a introdução de genes e características genéticas de interesse agrônomico no desenvolvimento de novas variedades (Costa et al., 2003). Entretanto, dependendo da característica, esse processo pode ser lento, especialmente, tratando-se de espécies semiperenes como é o caso do mamoeiro. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante no início da década de 70, a biotecnologia de plantas tornou-se uma valiosa ferramenta para os programas de melhoramento genético, proporcionando o aumento do repertório de estratégias para transpor as barreiras de incompatibilidade sexual entre as espécies. Apesar dos avanços da biotecnologia no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (GM), os sistemas de transformação genética mais adotados continuam restritos ao uso de *Agrobacterium tumefaciens* e biobalística. No caso do sistema via *A. tumefaciens*, faz-se uso do mecanismo natural de transformação genética de plantas que, a partir do desenvolvimento da engenharia genética, foi possível utilizar esse sistema para introgradir características alvos (transgenes) em plantas para as mais diferentes finalidades. Essa técnica também se destaca em relação à

biobalística por apresentar, em geral, maior eficiência na geração de plantas GM), contendo menor número de cópias do transgene (Cho et al. 2014; Que et al. 2014). O baixo número de cópias de um transgene é um fator desejável, não só para evitar variações funcionais do genoma original, evitar silenciamento, como para facilitar os cruzamentos entre linhagens na etapa do melhoramento genético.

Outro fator primordial no processo de transformação de plantas consiste no uso de marcadores de seleção que visam facilitar a identificação e seleção de indivíduos transformados. Para plantas superiores - dicotiledôneas e monocotiledôneas - há poucos sistemas de seleção bem caracterizados, e esses são geralmente limitados às estratégias para a resistência a antibióticos ou herbicidas (Brasileiro; Dusi, 1999), e pode não funcionar eficientemente em todas as espécies de interesse (Aragão; Brasileiro, 2002). O uso de marcadores de seleção é parte fundamental no processo de transformação genética. Até o momento, o gene marcador de seleção mais utilizado para a produção de mamoeiros GM é o da neomicina fosfotransferase (*nptII*), que confere resistência à canamicina, neomicina, geneticina, paramomicina e similares. Esse marcador de seleção vem sendo utilizado por vários grupos de pesquisa para o desenvolvimento de linhagens de mamão resistente ao PRSV (Fitch et al., 1992; Cabrera-Ponce et al., 1995; Cai et al., 1999; Souza Jr., 1999), ao herbicida fosfotricina (PPT) (Cabrera-Ponce et al., 1995), ao alumínio (De La Fuente et al., 1997), tolerante ao ácaro rajado (McCafferty et al. 2006) e a *Phytophthora palmivora* (Zhu et al., 2007). Contudo, do ponto de vista da percepção pública e mercado consumidor, o uso de genes marcadores de seleção, contendo proteínas que inibem a ação de antibióticos, como o *nptII*, não são bem aceitos. Por esta razão, sistemas de transformação genética e seleção alternativos têm surgido como recombinação sítio-específica (Aragão; Brasileiro, 2002; Malnoy et al., 2010) e uso do gene *manA* (que codifica a enzima PMI - phosphomannose isomerase) de *Escherichia coli* (Zhu et al., 2005).

O mamoeiro foi a primeira fruteira a ser modificada por engenharia genética e comercializada no mundo (Fitch et al., 1992; Gonsalves et al., 1998). Esse primeiro evento transgênico foi desenvolvido por duas instituições americanas - Universidade do Havaí, em parceria com a Universidade de Cornell - e tiveram como objetivo principal o desenvolvimento de mamoeiros GM resistentes ao *papaya ringspot virus* (PRSV), a mais importante praga

dessa cultura. O PRSV é da família *Potyviridae* e transmitido por algumas espécies de afídeos, que possuem alta capacidade de replicação e dispersão em pomares de mamão, resultando em sérios danos na produção dos frutos.

No contexto brasileiro, linhagens transgênicas de mamoeiro foram desenvolvidas para resistência aos isolados locais de PRSV (Souza Jr. et al., 1999), utilizando a mesma estratégia das plantas geradas no Havaí, RNA antisense do gene *cp* (capa proteica). As linhagens obtidas chegaram a ser testadas em condições de campo, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF e na Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas - BA. Os resultados dos experimentos de campo revelaram que as linhagens testadas tinham grande potencial para apresentar amplo espectro de resistência aos isolados brasileiros de PRSV (Souza Jr. et al., 1999). Entretanto, devido às restrições das normas brasileiras de biossegurança à época, não era permitida a presença do gene repórter (*uidA*; *gus*) e do gene de resistência a antibiótico para seleção na bactéria, inserido no plasmídeo utilizado na transformação do mamoeiro, e esse projeto foi descontinuado pela Embrapa. Não obstante, desde 2012, a Embrapa iniciou uma nova estratégia de desenvolvimento de linhagens de mamoeiro GM resistentes a dois vírus, o PRSV e PMeV, utilizando a estratégia de silenciamento por RNAi e seleção com o gene *bar*. No caso do PMeV, apesar de esse vírus ser considerado a principal virose do mamão no Brasil, o conhecimento da sua etiologia, hospedeiros alternativos, formas de transmissão, sequências e organização genômica do vírus ainda é pouco estudada. Um estudo mais recente, realizado no Brasil, revelou a presença de um vírus adicional em plantas sintomáticas infectadas com o PMeV. O vírus, denominado papaya meleira vírus-2 (PMeV-2), exibiu homologia de 70% de identidade de nucleotídeo (nt) para o RdRp, sem um gene CP putativo, similarmente aos umbravírus (Antunes et al., 2016). Mais importante, o estudo mostrou que o PMeV-2 foi encapsidado pelo CP do PMeV e os sintomas da doença foram observados apenas em plantas infectadas por misturas (Antunes et al., 2016). Entretanto, análises e caracterização das sequências nucleotídicas disponíveis no GenBank indicam semelhanças do PMeV com vírus de dsRNA da família Totiviridae (Araujo et al., 2007). Estudos recentes, utilizando análise comparativa e de diversidade de 31 isolados de PMeV, coletados nos principais Estados produtores de mamão do Brasil, indicaram um nível de identidade maior que 88% entre os isolados (Daltro et al., 2014). Essa relação de variabilidade genéti-

ca foi reforçada pela presença de motivos conservados dentro das regiões RdRp (gene da replicase) do PMeV. A partir das informações de variabilidade, foi selecionado um fragmento de 400 pb da região da RdRp para construção do vetor de RNAi para transformação por biobalística.

## Material e Métodos

---

### Preparo do Material Vegetal

Sementes de frutos imaturos de mamão papaia, cv. Sunrise solo, foram coletadas no período de 90 a 120 dias após a antese e desinfestadas em etanol 70% por 1 minuto, seguido de enxague com água destilada autoclavada. Consecutivamente, foram deixadas em solução de hipoclorito de sódio 2% por 10 minutos, seguido de enxague com água destilada autoclavada por 3 ou 4 vezes. Após a desinfestação, embriões zigóticos imaturos (EZI) foram extraídos das sementes e usados como explantes para indução de embriogênese somática, de acordo com o protocolo descrito por Fitch; Manshardt (1990).

### Indução de Embriogênese Somática

EZI isolados das sementes foram inoculados em meio de indução (MI) de embriogênese somática (Fitch et al., 1990), contendo metade da concentração de sais MS (Murashige; Skoog, 1962), 400 mg/L de glutamina, 50 mg/L de mio-inositol, 0,4 mg/L de tiamina-HC1, 2,0 mg/L de glicina, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 0,5 mg/L de piridoxina-HC1, 6,0 % de sacarose, 10 mg/L de 2,4-D, 0,8 % de Ágar e pH 5.8. Os explantes foram cultivados no escuro por cinco semanas a  $26 \pm 2$  °C. Após esse período, observou-se a formação de embriões somáticos primários na região do meristema apical. Os embriões somáticos primários foram coletados e esmagados com o auxílio de uma espátula de metal. A massa obtida foi espalhada sobre uma membrana de nitrocelulose hidrofílica, diâmetro de 47 mm (Millipore®), e subcultivada em novo MI por aproximadamente cinco semanas, até a formação de embriões somáticos secundários. Após quatro semanas, os embriões somáticos secundários regenerados foram utilizados nos experimentos de

estabelecimento da curva de seleção com glifosinato de amônio (GA) e biobalística.

### **Curva de seleção com Glifosinato de Amônio**

Para os experimentos de determinação da curva de seleção com GA, os embriões somáticos secundários induzidos em MI foram esmagados com o auxílio de uma espátula para liberação de células embriogênicas. A massa de células expostas foi transferida para membranas de nitrocelulose hidrofílica, como 47 mm de diâmetro (Millipore®) e mantidas por cinco semanas em MI, suplementado com diferentes concentrações do agente seletivo. Para a determinação da concentração mínima de GA capaz de inibir o crescimento de calos embriogênicos e regeneração de embriões somáticos, realizaram-se dois experimentos independentes em blocos inteiramente casualizados. Nos dois experimentos, foi utilizado o MI, suplementado com diferentes concentrações de GA (0; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 15,0 mg/L). Para cada concentração, foram utilizadas placas em triplicatas, sendo uma membrana/placa. As placas foram mantidas no escuro com temperatura de  $26 \pm 2$  °C por seis semanas. A cada 15 dias, os calos embriogênicos mantidos em membrana de nitrocelulose foram subcultivados para um novo meio de cultura nas mesmas condições do início do experimento. O experimento foi finalizado após seis semanas e avaliado quanto ao crescimento de calos embriogênicos e produção de embriões somáticos nas diferentes concentrações de GA. A avaliação ocorreu utilizando critérios qualitativos, como crescimento e coloração dos calos e regeneração de embriões somáticos em estádios mais avançados (torpedo e cotiledonar). Os dados coletados serviram para determinar a concentração adequada para ser usada na fase de transformação genética por biobalística.

### **Construção do vetor para a transformação do mamoeiro**

Para a construção do vetor de RNAi, visando o silenciamento do PRSV e PMeV, inicialmente, sequências genômicas depositadas no GenBank, de ambos os vírus, foram alinhadas no software Clustal W (Larkin et al., 2007). Esse alinhamento resultou na seleção de uma região mais conservada para escolha dos fragmentos contendo cerca de 400 pb. Para o PRSV, foi selecionada uma região do gene da capa proteica e PMeV, o gene da replicase (RpRd). O vetor contendo o cassete de interferência foi sintetizado na empresa Epoch Biotech. O cassete de interferência (PRSV-PMeV) foi clonado no vetor pBluescript® SK (pBSK), já contendo os sítios das enzimas

de restrição Not I e Sac I. Este cassete foi retirado do vetor pBSK e transferido para o vetor pBSKP5CS, entre as sequências do promotor 35SdCAMV e o terminador da nopalina sintase (Nos term), utilizando os sítios Not I e Sac I. Para a transformação das plantas por biobalística, o cassete resultante, contendo o referido promotor e o terminador, foi subclonado utilizando a enzima de restrição Not I no vetor pAT para adição do gene *bar*, que codifica a proteína fosfinotricina acetiltransferase (PAT), que, por sua vez, inativa o herbicida fosfinotricina (PPT) ou o análogo glifosinato de amônio, conferindo resistência ao herbicida GA. A referida subclonagem resultou na versão final do vetor pAPRNAi2 (Figura 1).

### **Transformação genética do mamoeiro**

Embriões somáticos secundários, induzidos em MI, foram esmagados com o auxílio de uma espátula, duas horas antes do bombardeamento. A massa de células liberadas foi transferida para membranas de nitrocelulose hidrofílica com 47 mm de diâmetro (Millipore®) e, posteriormente, disposta em placa de petri (60 mm x 15 mm), contendo meio de cultura MS suplementado com 3% de sacarose, 8 g/L de Phytigel® e pH 5.7. O bombardeamento com o vetor pAPRNAi2 (Figura 1) seguiu o protocolo descrito por Aragão et al. (1996). Sete dias após o bombardeamento, os discos de nitrocelulose, contendo as células embriogênicas, mantidos no escuro à temperatura de  $26 \pm 2$  °C, foram transferidos para um novo MI, suplementado com GA na concentração de 1,0 mg/L. Após o período de quatro semanas, os embriões somáticos regenerados foram transferidos para o meio de maturação (MM), de composição semelhante ao MI, sem 2,4-D e com 2,5 mg/L de GA. Os embriões foram mantidos a  $27 \pm 2$  °C sob fotoperíodo de 16 h e permanecendo no meio por mais quatro semanas.

Embriões somáticos, regenerados no estágio cotiledonar, foram transferidos para o meio de germinação (MG), composto por sais  $\frac{1}{2}$  MS, 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 a  $27$  °C  $\pm$  2 °C, com fotoperíodo de 16 h. Alguns embriões foram submetidos ao teste de imunodeteção da proteína PAT de modo aleatório. Após, aproximadamente, 30 dias em meio MG, embriões, que apresentaram as primeiras folhas verdadeiras, foram subcultivados em novo meio MG e mantidos em frascos de vidro, 74 x 109 mm (L x A). As plantas alongadas foram mantidas por 70 dias em meio MG e transferidas para meio de enraizamento (ME), composto por

sais ½ 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, a 27 °C ± 2 °C, com fotoperíodo de 16h.



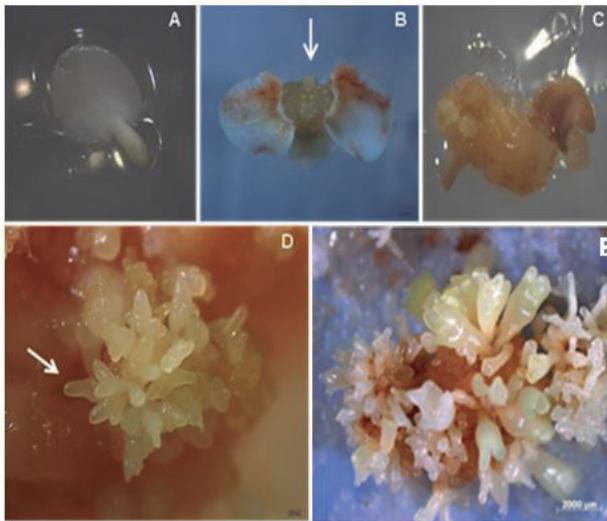
**Figura 1** - Representação esquemática do vetor pAPRNAi2, que contém as construções de RNAi complementar a sequências específicas dos vírus PRSV (verde escuro) e PMeV (laranja), referentes a fragmentos de ~400 pb, que apresentam as mesmas sequências de forma invertida e separadas pelo pdk intron, para formar a estrutura de grampo. O cassete de RNAi está sob o controle do promotor CaMV35S dobrado (azul). O gene *bar* (verde claro) confere resistência ao herbicida glifosinato de amônio e codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT).

## Resultados e Discussão

### Indução de Embriões Somáticos Primários

O cultivo de EZI com 90 a 120 dias de *C. papaya* cv. Sunrise solo em meio MI resultou na proliferação de embriões somáticos primários na região meristemática do domo apical do EZI. Os calos tinham uma aparência friável, com coloração amarelada e embriões somáticos primários com cor amarelo-palha. O início da formação de calos foi observado entre sete a dez dias de cultivo do embrião zigótico em MI (Figura 2A), após a abertura dos cotilédones e um discreto alongamento do hipocótilo (Figura 2B). Contudo, a produção dos embriões somáticos primários só pode ser observada após três a quatro semanas em meio MI (Figura 2C). Primeiramente, foram produzidas estruturas globulares, de coloração amarelo-pálida, que se diferenciaram em embriões nos estádios cordiforme, torpedo e cotiledonar (Figura 2D). Embora a diferenciação dos estádios de desenvolvimento dos embriões não tenha ocorrido de modo sincronizado nas primeiras quatro semanas no MI, após seis semanas, a maioria dos embriões somáticos produzidos encontrava-se no estádio cotiledonar (Figura 2E). Resultados similares foram relatados por Fitch et al. (1990), Cai et al. (1999), Koehler (2004) e Clarindo et al. (2008). Muitos protocolos de embriogênese somática, utilizando diferentes fontes

de explantes vêm sendo estabelecidos desde a década de 70, quando os primeiros estudos foram iniciados (De Bruijne et al., 1974; Yie; Liaw, 1977; Arora; Singh, 1978). Contudo, a maioria dos trabalhos, utilizando a técnica de embriogênese somática, faz uso de EZI, uma vez que este explante apresenta alto potencial embriogênico e baixo índice de contaminação por microrganismos, diferentemente dos tecidos adultos (Ascencio-Cabral et al., 2008; Clarindo et al., 2008; Ananda et al., 2012; Pérez et al., 2015).

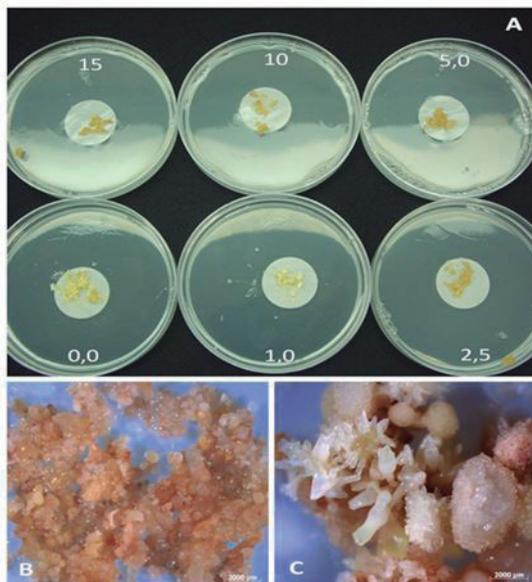


**Figura 2** - Embriogênese somática de *Carica papaya* cv. Sunrise solo : (A) Embrião zigótico imaturo em meio de indução; (B) Embrião zigótico após dez dias de indução, apresentando resposta embriogênica na região do meristema apical (seta); (C) Embrião zigótico cultivado por 30 dias, apresentando calogênese; (D) Embriões somáticos primários em estádios de desenvolvimento, principalmente globular e cordiforme; (E) Proliferação de massa embriogênica, com diferenciação de embriões somáticos nos estádios de torpedo e cotiledonares (esverdeados).

### Curva de Seleção com Glifosinato de Amônio

No estabelecimento da curva de seleção, observou-se, em todas as concentrações usadas de GA (1; 2,5; 5; 10; 15 mg/L), um atraso no crescimento dos calos e conseqüente inibição da multiplicação das células, quando comparado ao controle (MI sem herbicida). Contudo, após quatro

semanas, observou-se formação de clusters de embriões somáticos secundários em 100% dos calos que se encontravam em meio com 1,0 mg/L de GA. Nas concentrações de 2,5; 5; 10 e 15 mg/L, houve inibição do crescimento e desenvolvimento dos embriões somáticos (Figura 3A). 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 3B). Provavelmente, essa oxidação foi devida à alta concentração do herbicida. Os resultados encontrados indicam que a concentração adequada para a seleção das linhagens transgênicas geradas é de 2,5 mg/L. Em concentrações acima de 5,0 mg/L de glifosinato de amônio, observou-se uma paralisação total no desenvolvimento dos embriões somáticos primários e secundários. Um dos primeiros relatos de uso do sistema *Bar*/PPT, para a seleção de embriões transgênicos de mamoeiro, foi de Cabrera-Ponce et al. (1995). Contudo, este sistema foi utilizado em conjunto com o sistema npt II/canamicina, resultando em uma eficiência de transformação igual a 1,42% para a variedade Maradol.



**Figura 3.** Curva de seleção de massa embriogênica de mamão em meio de indução (MI) com glifosinato de amônio (GA). (A) Meio MI com diferentes concentrações de GA de 0, 1, 2,5, 5, 10 e 15 mg/L; (B) Detalhe de massa embriogênica oxidada em meio MI com 5 mg/L de GA; (C) Detalhe de massa embriogênica em diferenciação de embriões somáticos em meio MI sem GA.

## **Transformação Genética e Regeneração de Plantas**

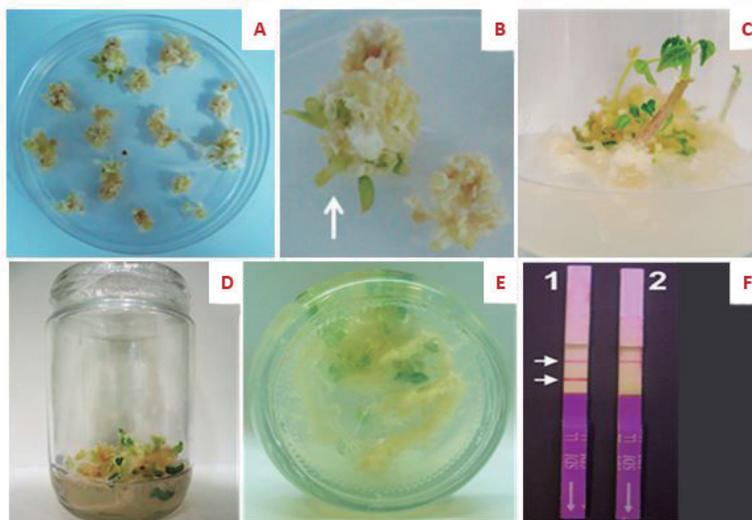
Quarenta e cinco dias após o bombardeamento das massas celulares embriogênicas, embriões somáticos secundários se diferenciaram na presença do herbicida GA. A diferenciação dos embriões somáticos ocorreu na superfície da massa de células embriogênicas, que apresentaram coloração amarelo-pálida. Num mesmo grupo de células embriogênicas, puderam-se observar embriões em estádios distintos de desenvolvimento (Figura 4A e B), resultado semelhante ao observado por Fitch et al. (1990), Cai et al. (1999), Clarindo et al. (2008), Azad et al. (2012). Os embriões encontravam-se, inicialmente, no estágio globular, passando, em seguida, para as formas cordiforme, torpedo e cotiledonar (Figura 4B). Dessa forma, 95% dos agregados celulares produzidos apresentavam embriões no estágio cotiledonar, numa frequência de, mais ou menos, 26 embriões por agregado (Figura 4B).

A transferência dos embriões somáticos secundários, para meio nutritivo na ausência de 2,4-D (MM) e na presença de luz, possibilitou a maturação desses embriões, favorecendo sua germinação. No meio MG, foi possível observar o crescimento e desenvolvimento de folhas cotiledonares e primárias em 30% dos calos, contendo embriões somáticos nos estádios torpedo e cotiledonar com aproximadamente quatro meses após o bombardeamento (Figura 4B e C). Entretanto, várias estruturas foram observadas no estágio inicial de germinação (Figura 4A, B e C). Em um tipo, folhas verdadeiras se desenvolveram a partir de aglomerados de estruturas foliares, seguido por alongamento do caule e desenvolvimento da raiz. Em um segundo tipo, ocorreu primeiro o alongamento do hipocótilo e havia, na porção apical das plântulas, folhas brancas, que mais tarde se desenvolveram em folhas verdadeiras. Em um terceiro tipo, estruturas com um grande número de folhas verdes ou brancas regeneraram a partir de calos e mais tarde deram origem a folhas verdadeiras e desenvolvimento de plântulas.

Neste trabalho, foi utilizada a embriogênese cíclica, em que foram realizados dois ciclos de embriogênese somática, para transformação e regeneração de plantas de mamão. Entretanto, na fase de estabelecimento do protocolo de regeneração por embriogênese somática, observou-se que os melhores resultados foram obtidos na indução dos embriões primários e secundários, devido ao fato que, acima de dois ciclos de regeneração, há um aumento na frequência de oxidação dos calos, interferindo na eficiência de indução da embriogênese somática. Segundo Koehler (2004), a produção de substâncias do metabolismo secundário das células é responsável pela

oxidação e coloração escura dos calos. Já em outro estudo, Abreu et al. (2014) utilizaram agregados celulares em meio líquido, suplementado com Ácido Abscísico, e obteve resultados de elevada eficiência na maturação e germinação de embriões somáticos e redução na frequência de oxidação dos calos embriogênicos.

A identificação da integração do gene *bar* deu-se pela análise das plântulas regeneradas dos clusters de embriões somáticos secundários (Figura 4D), 120 dias após o bombardeamento. Foi utilizado o kit de teste para Milho - Trait LL (Romer Labs®) - que, a partir de anticorpos específicos, detecta a presença da proteína PAT no extrato vegetal. A presença da proteína PAT foi confirmada com o aparecimento da linha inferior na tira, que é específica para o referido alvo (Figura 4F).



**Figura 4** – Obtenção de Embriões Somáticos secundários em seleção com glifosinato de amônio, após o bombardeamento de massa embriogênica com o vetor pAPRNAi2. **(A)** Maturação e germinação de embriões somáticos; **(B)** Detalhe da maturação e germinação; **(C)** Embrião somático secundário germinado, no detalhe, com presença de meristema apical e raízes, após 60 dias em meio de germinação; **(D)** Embrião somático secundário germinando, após 60 dias em meio de germinação; **(E)** Detalhe de proliferação de raízes a partir de embrião somático em enraizamento; **(F)** Teste para detecção da proteína PAT, em 1, embriões somáticos regenerados 80 dias após o bombardeamento. A linha inferior demonstra a presença da proteína PAT. Em 2, controle negativo realizado com embriões somáticos regenerados sem o bombardeamento.

## Conclusão

---

1) Todas as etapas do protocolo de regeneração por embriogênese somática, estabelecido nesse trabalho, foram consideradas reprodutíveis e com eficiência de regeneração de novo de cerca de 30%, após quatro meses do início do experimento.

2) O sistema gene *bar*/glifosinato de amônio (GA), para a seleção de embriões transgênicos de mamoeiro, deve ser realizado em concentração de 2,5 mg/L de GA.

3) O teste imunológico de detecção da proteína PAT confirmou que o protocolo de transformação, utilizando o vetor pAPRNAi2, foi capaz de regenerar plantas GMs de mamoeiro cv. Sunrise solo.

## Agradecimentos

---

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro e concessão de bolsas. E a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fabesb), pelo apoio financeiro com a concessão de bolsa de IC.

## Literatura Recomendada

---

ABREU, I. S.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. Massal induction of *Carica papaya* L. 'Golden' somatic embryos and somaclone screening by flow cytometry and cytogenetic analysis. **Cytologia**, v. 79, n. 4, p. 475–484, 2014.

ABREU, E. F. M.; DALTRO, C. B.; NOGUEIRA, E. O. P. L.; ANDRADE, E. C.; ARAGÃO, F. J. L. Sequence and genome organization of papaya meleira virus infecting papaya in Brazil. **Archives of Virology**, v. 160, p. 3143-3147, 2015.

ANANDAN, R.; SUDHAKARA, D.; BALASUBRAMANIANA, O.; GUTIÉRREZ-MORAB, A. In vitro somatic embryogenesis from suspension cultures of *Carica papaya* L. **Scientia Horticulturae**, v. 136, p. 43-49, 2012.

ARAGÃO, F. J. L.; BRASILEIRO, A. C. M. Estratégias de seleção positiva, negativa e livre de marcadores para obtenção de plantas transgênicas. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.14, n. 1, p. 01-10, 2002.

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 genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, n. 1-2, p.142-150, 1996.

ARAÚJO, M. M. M.; DE TAVARES, É.T.; DA SILVA, F.R.; DE MARINHO, V.L.A.; JÚNIOR, M.T.S. Molecular detection of Papaya meleira virus in the latex of *Carica papaya* by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 146, p. 305-310, 2007.

ARORA, I. K.; SINGH, R.N. Growth hormones and in vitro callus formation of papaya. **Scientia Horticulturae**, v. 8, p.3 57-361, 1978.

ASCENCIO-CABRAL, A.; PULIDO, H. G.; GARAY, B. R.; MORA, A. G. 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.

AZAD, M. A. K.; RABBANI, M. G.; AMIN, L. Plant regeneration and somatic embryogenesis from immature embryos derived through interspecific hybridization among different *Carica* species. **International Journal of Molecular Science**, v. 13, p. 17065–17076, 2012.

BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C. CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1999. Parte IV, v. 2, p.679-735.

CABRERA-PONCE, J. L.; VEGAS-GARCIA, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 15-17, 1995.

CAI, W.; GONSALVES, C.; TENNANT, P.; FERMIN, G.; SOUZA JUNIOR, M.T.; SARINDU, N.; JAN, F. J.; ZHU, H. Y.; GONSALVES, D. A protocol for eficiente transformation and regeneration of *Carica papaya* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 35, p. 61-69, 1999.

CHO, M.-J.; WU, E.; KWAN, J.; YU, M.; BANH, J.; LINN, W.; ANAND, A.; LI, Z.; TERONDE, S.; REGISTER, J. III.; JONES, T.; ZHAO, Z. Y. Agrobacterium-mediated high-frequency transformation of an elite commercial maize (*Zea mays* L.) inbred line. **Plant Cell Reports**, v. 33, n. 10, p. 1767–1777, 2014.

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

COSTA, A. F. S.; PACOVA, B. E. V. Caracterização de cultivares, estratégias e perspectivas do melhoramento genético do mamoeiro. In: Martins, D. S.; Costa, A. F. S. (Ed.) **A Cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória: INCAPER, 2003. p. 57-102.

COSTA, A. S.; CARVALHO, A. M.; KAMADA, S. Constatado o mosaico do mamoeiro em São Paulo. **O Agrônômico**, v. 21, p. 38-43, 1969.

DALTRO, C. B.; ABREU, E. F. M.; ARAGÃO, F. J. L.; ANDRADE, E. C. Genetic diversity studies of Papaya meleira virus. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, p. 104-108, 2014.

DE BRUIJNE, E.; LANGHE, E. DE.; VAN RIJCK, R. Actions of hormones and embryoid formation in callus cultures of *Carica papaya*. Intl. Symp. Fytofarmacia. **Fytiatrie**, v. 26, p.637-645, 1974.

DE LA FUENTE, J. M.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, V. J. L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. **Science**, v. 276, n. 5318, 1566-1568. DOI: 10.1126/science.276.5318.1566, 1997.

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

FITCH, M. M.; MANSHARDT, R. M.; GONSALVES, D.; SLIGHTOM, J. L.; SANFORD, J. C. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. **Nature Biotechnology**, v. 10, p. 1466-1472, 1992.

GONSALVES, D. Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 415-437, 1998.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>>. Acesso em: 23 mai. 2018.

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**. 2004. 85 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa, MG.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LIMA, J. A. A; GOMES, M. N. S. Identificação de papaya ringspot virus no Ceará. **Fitossanidade**, v. 1, p. 56-59, 1975.

LORETO, T. J. G.; VITAL, A. F.; REZENDE, J. A. M. Ocorrência de um amarelo letal do mamoeiro solo no estado de Pernambuco. **O Biológico**, v. 49, p. 275-279, 1983.

MACIEL-ZAMBOLIM, E.; KUNIEDA-ALONSO, S.; MATSUOKA, K.; CARVALHO, M. G.; ZERBINI, F. M. Purification and some properties of Papaya meleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. **Plant Pathology**, v. 52, p. 389-394, 2003.

MACIEL-ZAMBOLIM, E. Identification and partial characterization of papaya meleira virus. **Virus Review & Research**, v. 11, p. 198, 2000.

MALNOY, M.; BORESJA-WYSOCKA, E. E.; NORELLI, J. L.; FLAISHMAN, M. A.; GIDONI, D.; ALDWINCKLE, H. S. Genetic transformation of apple (Mallus x domestica) without use of a selectable marker gene. **Tree Genetics and Genomics**, Heidelberg, v. 6, p. 423-433, 2010.

McCAFFERTY, H.; MOORE, P.; ZHU, J. Improved Carica papaya tolerance to carmine spider mite by the expression of Manduca sexta chitinase transgene. **Transgenic Research**, v. 15, p. 337-347, 2006.

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

NCBI. **GenBank**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Acesso em: jan. 2019.

PÉREZ, L. P.; MONTESINOS, Y. P.; OLMEDO, J. G.; ROMELIO RODRÍGUEZ SÁNCHEZ, R. R.; MONTENEGRO, O. N.; RODRIGUEZ, R. B.; RIBALTA, O. H.; ESCRIBA, R. C. R.; DANIELS, D.; GÓMEZ-KOSKY, R. Effects of different culture conditions (photoautotrophic, photomixotrophic) and the auxin indolebutyric acid on the in vitro acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Red Maradol) plants using zeolite as support. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n.35, p. 2622-2635, 2015.

PURCIFULL, D. E.; GONSALVES, D. **Papaya ringspot virus**. Descriptions of Plant Viruses. Kew Surrey: CMI/AAB, n. 292, 1984.

QUE, Q.; ELUMALAI, S.; LI, X.; ZHONG, H.; NALAPALLI, S.; SCHWEINER, M.; FEI, X.; NUCCIO, M.; KELLIHER, T.; GU, W.; CHEN, Z.; CHILTON, M-DM. Maize transformation technology development for commercial event generation. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 379, 2014.

SÁ ANTUNES, T. F.; AMARAL, R. J. V.; VENTURA, J. A.; GODINHO, M. T.; AMARAL, J. G.; SOUZA, F. O. The dsRNA Virus Papaya Meleira Virus and an ssRNA Virus Are Associated with Papaya Sticky Disease. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, 2016.

SILVA, A. M. R.; KITAJIMA, E. W.; RESENDE, R. O Nucleotide and amino acid Analysis of the polymerase and the coat protein genes of the papaya lethal yellowing virus. **Virus Review and Research**, v. 11, p.196, 2000.

SOUZAJUNIOR, 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**. 1999. Tese (Doutorado). Ithaca - Cornell University.

VIERA, R. F.; SIMON, J. E. Chemical Characterization of Basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. **Economic Botany**, v. 54, p. 207-216, 2000.

YIE, S.T.; LIAW, S. I. Plant regeneration from shoot tips and callus of papaya. **Plant - In vitro**, v.13, n. 9, p.564-568, 1977.

ZHU, Y. J.; AGBAYANI, R.; McCAFFERTY, H.; ALBERT, H. H.; MOORE, P. H. Effective selection of transgenic papaya plants with the PMI/Man selection system. **Plant Cell Reports**, v.24, p. 426-432, 2005.

ZHU, Y. J.; AGBAYANI, R.; MOORE, P.H. Ectopic expression of *Dahlia merckii* defensin DmAMP1 improves papaya resistance to *Phytophthora palmivora* by reducing pathogen vigor. **Planta**, v. 226, n. 1, p. 87-97, 2007.



---

*Recursos Genéticos e  
Biotecnologia*



CGPE: 15456