

Resistência de mamoeiro transgênico à mancha anelar no Brasil



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
134**

**Resistência de mamoeiro transgênico
à mancha anelar no Brasil**

*Paulo Ernesto Meissner Filho
Alberto Duarte Vilarinhos
Vania Jesus dos Santos de Oliveira
Dreid de Cerqueira Silveira da Silva
Vanderlei da Silva Santos
Jorge Luiz Loyola Dantas*

Embrapa Mandioca e Fruticultura
Cruz das Almas, BA
2022

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Mandioca e Fruticultura
Rua Embrapa, s/nº, Caixa Postal 07
44380-000, Cruz das Almas, Bahia
Fone: 75 3312-8048
Fax: 75 3312-8097
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Mandioca e Fruticultura

Presidente
Francisco Ferraz Laranjeira

Secretário-Executivo
Maria da Conceição Pereira da Silva

Membros
*Ana Lúcia Borges, Áurea Fabiana Apolinário de
Albuquerque Gerum, Cinara Fernanda Garcia
Morales, Harllen Sandro Alves Silva, Herminio
Souza Rocha, Jailson Lopes Cruz, José
Eduardo Borges de Carvalho, Paulo Ernesto
Meissner Filho, Tatiana Góes Junghans*

Supervisão editorial
Francisco Ferraz Laranjeira

Revisão de texto
Alessandra Angelo

Normalização bibliográfica
Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
*Anapaula Rosário Lopes
Carlos Miguel Mascarenhas Carmo*

Fotos da capa
Paulo Ernesto Meissner Filho

1ª edição
Publicação digital: PDF (2022)

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 Mandioca e Fruticultura

Resistência de mamoeiro transgênico à mancha anelar no Brasil. Paulo Ernesto Meissner
Filho.... [et. al.]. – Cruz das Almas, BA : Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2022.

21 p. il. ; 22 cm. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/ Embrapa Mandioca e
Fruticultura, 134).

ISSN 1809-5003.

1. Mamão 2. Melhoramento vegetal I. Meissner Filho, Paulo Ernesto II. Vilarinhos, Alberto
Duarte III. Oliveira, Vania Jesus dos Santos de IV. Silva, Dreid de Cerqueira Silveira da V.
Silva, Vanderlei da Silva VI. Dantas Jorge Luiz Loyola, VII. Título. VIII. Série.

CDD 634.651

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	11
Conclusões.....	19
Agradecimento	19
Referências	19

Resistência de mamoeiro transgênico à mancha anelar no Brasil

Paulo Ernesto Meissner Filho¹

Alberto Duarte Vilarinhos¹

Vania Jesus dos Santos de Oliveira²

Dreid de Cerqueira Silveira da Silva³

Vanderlei da Silva Santos¹

Jorge Luiz Loyola Dantas²

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência de populações de mamoeiro transgênicas (PTP) ao vírus da mancha anelar do mamoeiro (*Papaya ringspot virus*, PRSV-P). Plantas transgênicas da variedade Sunrise Solo foram produzidas com versões traduzíveis e não traduzíveis do gene da proteína PRSV-P e foram inoculadas mecanicamente com o PRSV em casa de vegetação para fazer uma observação preliminar de sua reação ao vírus. A presença do gene CP/PRSV e sua homozigose foi avaliada por reação em cadeia da polimerase e as plantas selecionadas em função desta característica, bem como o controle Sunrise Solo foram transplantados para o campo para avaliações agrônômicas. Na avaliação em casa de vegetação, entre 5,8% e 96,3% de plantas das PTP apresentaram resistência, e não houve variação nos sintomas observados. As PTP 1/6, 1/7, 1/9, 1/10, 1/15, 2/38, 2/41, 2/56, 2/65, 3/27, 3/46, 3/48, 4/9, 4/27, 8/4, 23/8, 33/33, 18/3, 18/4, 18/8, 18/22, 18/27, 28/97, 28/104 e 28/110 não apresentaram sintomas, sendo ELISA negativo, a maioria continha os genes CP e NPT II. As PTP 1/6 e 3/46 tinham o gene CP em homozigose e em dupla inserção. As plantas PTP 1/6/20, 1/6/59, 1/6/64, 1/6/90, 3/46/44, 3/46/52 e 18/27/97 foram selecionadas no campo dentro de cada população em avaliação. Dessas PTP, as plantas 1/6/59 e 3/46/52 apresentam resistência ao PRSV-P, com boas características agrônômicas e com homozigose do gene CP.

Palavras-chave: Organismo geneticamente modificado. *Carica papaya*. PRSV.

¹ Engenheiro-agrônomo, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, Brasil.

² Centro Universitário Maria Milza, Cruz das Almas, BA, Brasil.

³ Bolsista de Iniciação Científica da FAPESB, estudante de Agronomia, Universidade Federal do Recôncavo Baiano, Cruz das Almas, BA, Brasil.

Resistance of transgenic papaya tree against papaya ringspot in Brazil

Abstract –The objective of this work was to evaluate the resistance of transgenic papaya populations (PTP) to *Papaya ringspot virus-P* (PRSV-P). Sunrise Solo cultivar transgenic plants were produced with translate and no translate versions of the PRSV-P protein coat gene and were mechanically inoculated with PRSV-P in greenhouse. The presence of the CP/PRSV gene and homozygosity was evaluated by polymerase chain reaction (PCR). Selected plants and the Sunrise Solo cultivar control were transplanted to the field to agronomic evaluations. In greenhouse evaluation the resistant of plants became between 96.3% to 5.8% and didn't had variation in the symptoms. The PTP 1/6, 1/7, 1/9, 1/10, 1/15, 2/38, 2/41, 2/56, 2/65, 3/27, 3/46, 3/48, 4/9, 4/27, 8/4, 8/23, 8/33, 18/3, 18/4, 18/8, 18/22, 18/27, 28/97, 28/104 and 28/110 didn't showed symptoms, were ELISA negative and most contained the CP and NPT II genes. PTP 1/6 and 3/46 had the CP gene in homozygosity and in double insertion. The PTP 1/6/20, 1/6/59, 1/6/64, 1/6/90, 3/46/44, 3/46/52 and 18/27/97 were selected in field. From these PTP, 1/6/59 and 3/46/52 were selected with resistance to PRSV-P, with good agronomic characteristics and homozygosity of the CP gene.

Keywords: Genetic modified. *Carica papaya*. PRSV.

Introdução

Pesquisas com o mamoeiro (*Carica papaya* L.) são de fundamental importância para o Brasil, que é um dos principais produtores da fruta com uma produção em 2019 de 1.161 mil toneladas. O mamoeiro é cultivado em todo o território brasileiro, sendo os estados do Espírito Santo e Bahia os principais produtores do país (IBGE, 2019).

As viroses são os problemas mais limitantes da cultura. No Brasil o mamoeiro é afetado pelo vírus da mancha anelar (*Papaya ringspot virus-P*, PRSV-P), pelo vírus da meleira (*Papaya meleira virus*, PMeV) e pelo vírus do amarelo letal do mamoeiro Solo (*Papaya lethal yellow virus*, PLYV) (Basso et al., 2016). O PRSV-P tem RNA senso positivo; é uma espécie do gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*. O controle do PRSV-P é difícil porque ele é transmitido por várias espécies de afídeos de forma não circulativa, o que leva a uma transmissão muito rápida do vírus (Azad et al., 2014; King et al., 2012). A infecção pelo PRSV-P reduz a produção e a qualidade dos frutos que podem ficar deformados, apresentar anéis na casca e redução do seu teor de açúcar (Lima et al., 2017).

As principais medidas adotadas nas regiões produtoras de mamoeiro para o controle da mancha anelar são o escape pelo isolamento dos campos e a erradicação precoce das plantas infectadas (Lima et al., 2017). Até o momento não foram encontradas fontes de resistência para o PRSV-P em *C. papaya*; porém, há espécies da família do mamoeiro com tolerância ao vírus, que têm sido utilizadas em programas de melhoramento genético na Tailândia, Taiwan e no Havaí. Na busca de plantas resistentes para o PRSV-P, têm sido realizados cruzamentos entre *C. papaya* e *Vasconcella cauliflora* (Alviar et al., 2012; Dinesh et al., 2013; Jayavalli et al., 2011). O principal fator limitante para esta estratégia de controle do PRSV-P é o longo período necessário para desenvolver estas variedades e ter produção de frutos com alta qualidade (Dinesh et al., 2013). Alguns pesquisadores avaliaram o uso da proteção cruzada, mas ela não apresentou bons resultados para o controle do PRSV (Fitch, 2010; Hamin et al., 2018). Recentemente foi avaliado o uso de RNA de fita dupla (dsRNA) para o controle de PRSV-P (Vadlamudi et al., 2020).

A produção de plantas de mamoeiro transgênicas para resistência ao PRSV-P é uma excelente e durável alternativa para o seu controle. Ela tem sido usada e pesquisada em várias regiões produtoras de mamoeiro, como Austrália, Bangladesh, Brasil, China, Estados Unidos, Filipinas, Índia, Indonésia, Jamaica, Japão, Malásia, México, Tailândia, Vietnam e Venezuela (Baranski

et al., 2019; Fitch, 2010; Hamin et al., 2018; Li et al., 2014; Lima et al., 2017; Meissner Filho et al., 2021; Souza Júnior et al., 2005; Wu et al., 2018).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência de populações de mamoeiro transgênicas (PTP) para o *Papaya ringspot virus-P* (PRSV-P) no Brasil.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos em Cruz das Almas, Bahia, no Laboratório de Virologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, casa de vegetação e campo experimental nas coordenadas 12°40'12"S; 39°06'07"W e a 220 m de altitude, de abril de 2003 a outubro de 2006. O clima na região é do tipo Bwa de acordo com a classificação de Köppen com temperatura média acima de 22 °C, 82% de umidade relativa e 1.136 mm de precipitação anual (D'Angiolella et al., 1998). O solo da área experimental é classificado como Latossolo Amarelo distrófico (Santos et al., 2013), com textura areno-argilosa. A variedade transgênica Sunrise Solo, foi produzida em Cornell em parceria com a Universidade de Cornell. As plantas foram transformadas por biobalística como um cassete contendo o gene da capa proteica de um isolado do PRSV-P coletado na Bahia em diferentes versões traduzíveis e não traduzíveis (Souza Júnior et al., 2005). O experimento foi conduzido com a autorização da Comissão Técnica de Biossegurança (CTNBio): Processo 01200.004426/2000-57 e Processo 01200.01214/2006-11.

Sementes de 13 populações de mamoeiro transgênicas (PTP) nas gerações R-1 e R-2 foram semeadas em casa de vegetação para obter 100 plântulas conforme recomendado para a cultura (Sanches; Dantas, 1999) em fevereiro de 2003. Trinta dias após a semeadura todas as plântulas foram desafiadas por inoculação mecânica com um isolado de PRSV-P coletado na região e reinoculadas após 15 dias, utilizando tampão fostato de sódio a 0,02 M, pH 7 contendo sulfito de sódio a 0,02 M. Como abrasivo foi adicionado Celite no macerado e para a inoculação foi usado o pistilo de um almofariz, sendo o inóculo diluído a 1:10 (p/v) (Souza Júnior et al., 2005; Velame; Meissner Filho, 2001). As plântulas foram avaliadas semanalmente quanto à presença de sintomas do vírus, como clareamento das nervuras, encarquilhamento e mosaico. Plantas da cultivar Sunrise Solo inoculadas e não inoculadas foram utilizadas como controle (Tabela 1). As plantas que não apresentaram sintomas foram transplantadas para o campo em dezembro de 2003, visando à produção de

novas sementes e para observações preliminares (Figura 1). Foi necessária a renovação das sementes disponíveis, uma vez que as sementes originais foram armazenadas em geladeira por 22 meses, enquanto eram aguardadas as licenças necessárias para o experimento de campo (Contini et al., 2005).



Fotos: Paulo Ernesto Meissner Filho

Figura 1. Campo com mamoeiro transgênico em Cruz das Almas (BA) para a renovação das sementes disponíveis e para observações preliminares. Mudanças utilizadas para instalação do campo (A) e vista geral do campo (B).

Quando elas foram semeadas seu poder germinativo variou de 0 a 56% (Tabela 1). O campo foi instalado com PTP R-1 e R-2: PTP 1, PTP 2, PTP 3, PTP 4, PTP 5, PTP 6, PTP 7, PTP 8, PTP 10, PTP 17, PTP 18 e PTP 28 (Souza Júnior et al., 2005). Três mudas foram transplantadas em cada cova, e uma planta hermafrodita foi mantida durante a sexagem. Todas as sementes produzidas neste campo foram originárias de autofecundação, sendo as sementes produzidas em cada planta mantidas separadas e cada planta recebeu um número diferente que foi adicionado ao nome da PTP. As populações foram inicialmente observadas quanto à presença de sintomas de PRSV-P, suas características agrônômicas, como tamanho dos frutos e sua forma, cor da polpa, tipo de columela de frutos produzidos e quanto à presença de defeitos nos frutos (carpeloidia e pentandria) (Dias et al., 2011; Sanches; Dantas, 1999). Amostras obtidas de cada PTP foram avaliadas pela reação de polimerase em cadeia (PCR) quanto à presença do gene CP/PRSV, sendo o DNA extraído conforme o método de Doyle & Doyle (Almeida; Lima, 2001), já a PCR foi realizada conforme as condições descritas por Souza Júnior et al. (2005).

Amostras de folhas foram coletadas de 50 plantas de cada população de mamoeiro transgênico (gerações R-2 e R-3), consideradas mais promissoras nas observações preliminares durante sua multiplicação no campo (PTP 1/6, PTP 1/10, PTP 2/38, PTP 18/4, PTP 18/27 e PTP 28/104) foram avaliadas por PCR quanto à presença dos genes da capa proteica (CP) do PRSV-P e do gene para seleção das plantas transformadas em laboratório, o gene da neomycin phosphotransferase II (NPT II), que confere resistência às plantas a canamicina (Souza Júnior et al, 2001). A extração do DNA foi feita conforme o método proposto por Doyle & Doyle (Almeida; Lima, 2001) e a PCR realizada conforme descrito por Souza Júnior et al. (2005). A análise da segregação do gene da CP foi realizada por PCR e os resultados avaliados pelo teste de qui-quadrado (Ramalho et al., 2012).

Mudas das seguintes PTP R-2 e R-3: PTP 1/6, PTP 1/10, PTP 2/38, PTP 3/46, PTP 17/92, PTP 18/4, PTP 18/22, PTP 18/27, PTP 28/75, que tiveram suas sementes renovadas no primeiro campo e a testemunha cultivar Sunrise Solo (Souza Júnior et al., 2005) foram produzidas em casa de vegetação conforme recomendado por Sanches e Dantas (1999). Cem plantas de cada população foram desafiadas por inoculação mecânica com PRSV-P, como foi descrito anteriormente. As mudas que não apresentaram sintomas foram transplantadas para o campo experimental em abril de 2005, utilizando um delineamento experimental completamente casualizado com três repetições

por tratamento e cada parcela contendo seis plantas. As plantas foram monitoradas semanalmente quanto à presença de sintomas de PRSV-P (clareamento das nervuras, estrias oleosas, encarquilhamento foliar, mosaico e anéis nos frutos). Também foram testadas por ELISA indireto para PRSV no final do experimento utilizando um antissoro para o PRSV cedido por André Dusi (Embrapa Hortaliças) e o antissoro conjugado foi o Goat-antirabbit conjugado com fosfatase alcalina (Almeida; Lima, 2001). Foram considerados resultados positivos as amostras que apresentaram na leitora de microplacas com o filtro de 405 nm, 60 minutos após a adição do substrato para a enzima, o paranitrofenil fostato de sódio, leituras duas vezes superiores ao valor da leitura média obtida para amostras de plantas saudias. Cada amostra tinha duas a três repetições na placa.

Os eventos elite foram selecionados de plantas sem sintomas do PRSV-P, após exposição natural no campo ao vírus, com frutos piriformes pesando aproximadamente 500 gramas, com polpa alaranjada, columela de frutos bem formada, apresentando menos de 10% de carpeloidia e sem defeitos nos frutos, conforme critérios adotados na seleção de mamoeiro (Dias et al., 2011; Sanches; Dantas, 1999). A partir das sementes obtidas das plantas PTP 1/6/20, 1/6/59, 1/6/64, 1/6/90, 3/46/44, 3/46/52 e 18/27/97 selecionadas no campo, foram obtidas sementes para a produção de mudas em casa de vegetação e realização da análise da segregação do gene da CP por PCR como descrito anteriormente.

Resultados e Discussão

Na primeira avaliação em casa de vegetação da resistência para PRSV-P de PTP das gerações R-1/R-2 das PTP, a porcentagem de plantas resistentes variou de 5,8 a 96,3%, dependendo da população em análise (Tabela 1). Não foi observada variação nos sintomas apresentados, que foram clareamento das nervuras, encarquilhamento foliar das folhas do topo e mosaico (Figura 2). De forma semelhante, Kung et al. (2010) observaram uma diferente porcentagem de plantas de Tainung nº 2 transgênico resistentes para o PRSV-P, essas plantas continham uma versão não traduzível do gene CP do PRSV/CP, e verificaram variação no tempo para expressão dos sintomas. Na China algumas plantas de mamoeiro transgênico foram infectadas com alguns isolados de PRSV-P, mas estes isolados eram recombinantes (Wu et al., 2018).

Tabela 1. Percentagem de germinação das populações de mamoeiro transgênicas (PTP) nas gerações R-1/R-2 e sua resistência após desafio por inoculação mecânica com *Papaya ringspot virus-P* (PRSV-P) em casa de vegetação. Cruz das Almas, BA.

População ⁽¹⁾	Germinação (%)	Plantas saudias (%)
PTP 1 (R-1)	13,5	96,3
PTP 2 (R-1)	52	58,2
PTP 3 (R-1)	26	78,8
PTP 4 (R-1)	15	16,7
PTP 5 (R-1)	3	80,0
PTP 6 (R-1)	4,5	22,2
PTP 7 (R-1)	29	13,8
PTP 8 (R-1)	24	23,4
PTP 9 (R-1)	0	0
PTP 10 (R-1)	34	5,8
PTP17 (R-1)	50	7
PTP 18 (R-2)	22	77,8
PTP 28 (R-1)	56	12,6

⁽¹⁾ 200 sementes semeadas por população

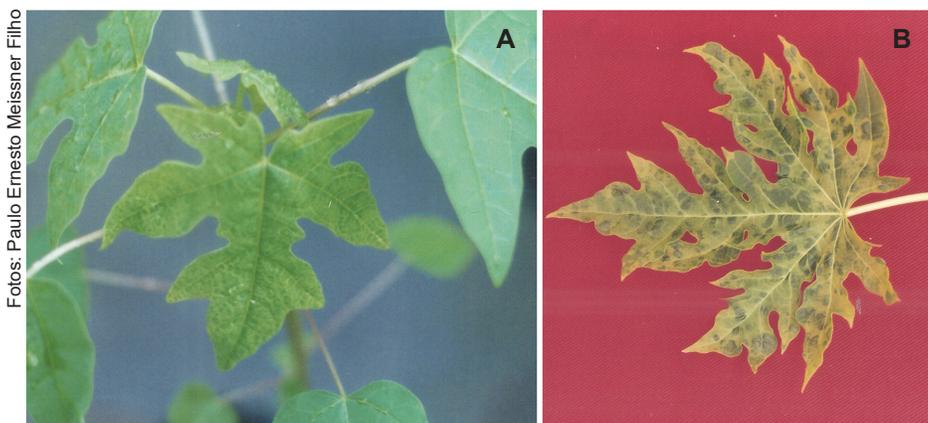


Figura 2. Sintomas apresentados por algumas plantas de mamoeiro transgênicas desafiadas por inoculação mecânica com *Papaya ringspot virus* (PRSV-P) e mantidas em casa de vegetação. Encarquilhamento das folhas e clareamento das nervuras (A) e mosaico (B).

As plantas PTP 2/80, 4/30, 5/2, 6/2, 6/3, 7/21, 7/24, 7/44, 10/21, 10/25, 10/33, 17/28, 17/74, 17/92 e 28/75 após serem transplantadas para o campo, apresentaram sintomas do PRSV-P (Tabela 2). As plantas PTP 1/6, 1/7, 1/9, 1/10, 1/15, 2/38, 2/41, 2/56, 2/65, 3/27, 3/46, 3/48, 4/9, 4/27, 8/4, 8/23, 8/33, 18/3, 18/4, 18/8, 18/22, 18/27, 28/97, 28/104 e 28/110 não apresentaram sintomas e também testaram negativo no ELISA (Tabela 2 e 3). Na PCR dentre as 22 plantas sem sintomas, 20 continham os genes CP e NPT II (Figura 3), sendo que em 90,9% dos casos houve correlação entre a presença do gene CP e a resistência para o PRSV-P. Kung et al. (2010) também associaram a resistência de mamoeiros transgênicos com a presença de duas ou mais cópias do transgene.

Tabela 2. Desafio de mamoeiros transgênicos geração R-2/R-3 com *Papaya ringspot virus*-P (PRSV-P) em casa de vegetação e exposição natural no campo.

População	Plantas sadias na CV ^{*(1)} %	Plantas sadias no campo ^{***(2)} %
PTP 1/6 (R-2)	100	100
PTP 1/10 (R-2)	85	88
PTP 2/38 (R-2)	60	0
PTP 2/80 (R-2)	49	NT
PTP 3/46 (R-2)	98	82
PTP 7/44 (R-2)	20	NT
PTP 8/23 (R-2)	15	NT
PTP 17/92 (R-2)	58	17
PTP 18/4 (R-3)	86	94
PTP 18/22 (R-3)	87	83
PTP 18/27 (R-3)	84	89
PTP 28/75 (R-2)	88	11
PTP 28/104 (R-2)	41	NT
Sunrise Solo	34	0

⁽¹⁾ Inoculação de 100 plantas de cada população. NT, não testado. ⁽²⁾ 18 plantas avaliadas.

Tabela 3. Avaliação por ELISA de gerações de mamoeiros transgênicos selecionados em cada população no campo como resistentes ao *Papaya ringspot virus-P* (PRSV-P).

População	Absorbância			Absorbância média
PTP 1/6	0.078	0.030	-	0.054 (-)
PTP 1/7	0.067	0.071	-	0.069 (-)
PTP 1/9	0.000	0.000	-	0.000 (-)
PTP 1/10	0.008	0.000	-	0.004 (-)
PTP 1/15	0.067	0.071	-	0.069 (-)
PTP 2/38	NT	NT	NT	NT
PTP 2/41	0.004	0.000	-	0.002 (-)
PTP 2/56	0.044	0.000	-	0.022 (-)
PTP 2/65	NT	NT	NT	NT
PTP 3/27	NT	NT	NT	NT
PTP 3/46	0.081	0.041	-	0.061 (-)
PTP 3/48	NT	NT	NT	NT
PTP 4/9	0.078	0.005	-	0.042 (-)
PTP 4/27	0.040	0.022	-	0.031 (-)
PTP 8/4	0.043	0.030	-	0.037 (-)
PTP 8/23	0.024	0.000	-	0.012 (-)
PTP 8/33	NT	NT	NT	NT
PTP 18/3	0.010	0.015	-	0.012 (-)
PTP 18/4	0.038	0.009	-	0.024 (-)
PTP 18/8	0.023	0.000	-	0.012 (-)
PTP 18/22	0.000	0.031	-	0.016 (-)
PTP 18/27	0.000	0.045	-	0.022 (-)
PTP 28/97	0.038	0.028	-	0.033 (-)
PTP 28/104	NT	NT	NT	NT
PTP 28/110	0.042	0.011	-	0.026 (-)
PTP 1/6/20	0.121	0.102	0.083	0.102 (-)
PTP 1/6/59	0.046	0.045	0.037	0.050 (-)
PTP 1/6/64	0.170	0.169	0.187	0.175 (+) ⁽¹⁾
PTP 1/6/90	NT	NT	NT	NT
PTP 3/46/44	0.025	0.032	0.035	0.031 (-)
PTP 3/46/52	0.064	0.067	0.069	0.067 (-)
PTP 18/27/97	0.097	0.073	0.073	0.081 (-)

Tabela 3. Continuação.

População	Absorbância			Absorbância média
PTP 18/27/200	0.067	0.057	0.058	0.061 (-)
Sunrise Solo sadio	0.056	0.056	0.052	0.054 (-)
Sunrise Solo sadio (2 x)				0.108 (-)
Sunrise infectado	0.371	0.369	0.381	0.374 (+)

⁽¹⁾Plantas com absorbância no ELISA com o dobro do valor da media obtida para as plantas saudias

NT, não testado. -, sadia. +, infectada.

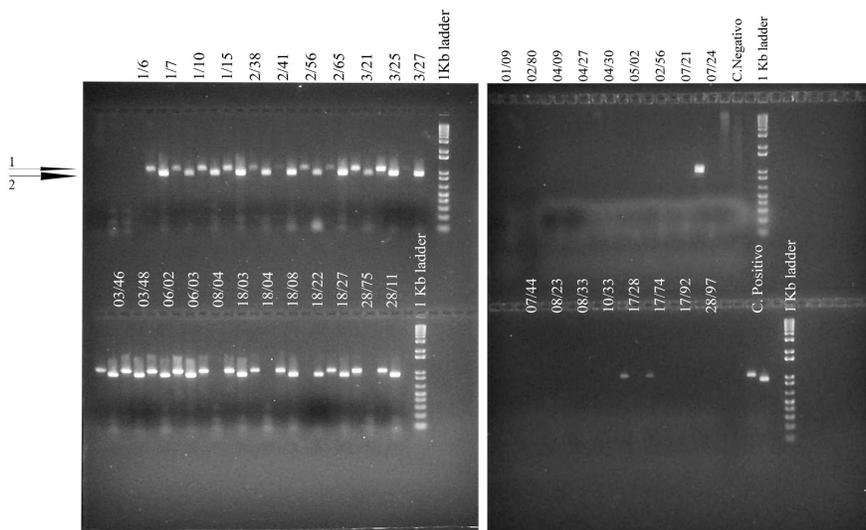


Foto: Vania Jesus dos Santos de Oliveira

Figura 3. Gel do produto do PCR de mamoeiros transgênicos e não transgênicos utilizando primers para os genes Npt II (banda 1) e CP/PRSV (banda 2).

Nas análises da homozigose das populações transgênicas selecionadas no campo, PTP 1/6 tinha o transgene em todos os indivíduos, indicando condição de homozigose do genitor e todas as plantas foram resistentes (Figura 4). Dentre 17 plantas da população PTP 3/46, 15 tinham o gene da CP e não apresentaram sintomas do PRSV-P no campo, porém duas apresentaram sintomas

e não tinham o gene. Não foi observada diferença significativa na segregação do gene CP na população PTP 3/46 (15 plantas resistentes: 2 plantas suscetíveis), o que é esperado quando ocorre dupla inserção do gene em hemizigose (Tabela 4) (Ramalho et al., 2012). Todos os indivíduos da PTP 17/92 apresentaram sintomas do PRSV-P, bem como a maioria das plantas da PTP 28/75 e não continham o gene CP, então elas não foram avaliadas quanto à sua homozigose. O gene CP foi encontrado na segregação de 15:1 na PTP 1/10 e 15:3 em PTP 18/22. Após a análise pelo teste do qui-quadrado, não foi observada diferença significativa na sua segregação, o que é um indicativo da existência de dupla inserção do gene em hemizigose (Figura 4, Tabela 4). PTP 2/38 e PTP 28/104 não foram avaliadas com relação à sua homozigose. O gene da CP dos isolados brasileiros do PRSV-P tem alta similaridade, então a produção de plantas de mamoeiro transgênicas para estes isolados deve proporcionar uma resistência ampla para este vírus no Brasil (Souza Júnior et al., 2005). Alguns fatores podem influenciar a resistência apresentada por mamoeiros transgênicos para o PRSV-P, como a homologia entre a sequência do gene CP contida no transgene e a CP do isolado de PRSV-P, o aparecimento de novas estirpes, o silenciamento pós-transcrição, o estágio da planta, o número de cópias do transgene na planta e o meio ambiente (Hamin et al., 2018; Kung et al., 2010; Wu et al., 2018). Na China, Kung et al. (2015) observaram quebra de resistência em plantas de mamoeiro transgênicas, independente de homologia de sequências por um gene silenciador presente em estirpes mais virulentas.

Tabela 4. Análise do qui-quadrado da presença do gene da CP do PRSV-P em populações transgênicas de mamoeiro.

População	GL	Banda observada	Banda ausente	Presença da banda esperada	Ausência da banda esperada	X ²
PTP 1/10	1	45	5	46.875	3.125	1.20 ^{ns}
PTP 3/46	1	15	2	15.9375	1.0625	0.88 ^{ns}
PTP 18/22	1	15	3	16.875	1.125	3.3 ^{ns}

ns, não significativo pelo teste do qui-quadrado com 5% de probabilidade.

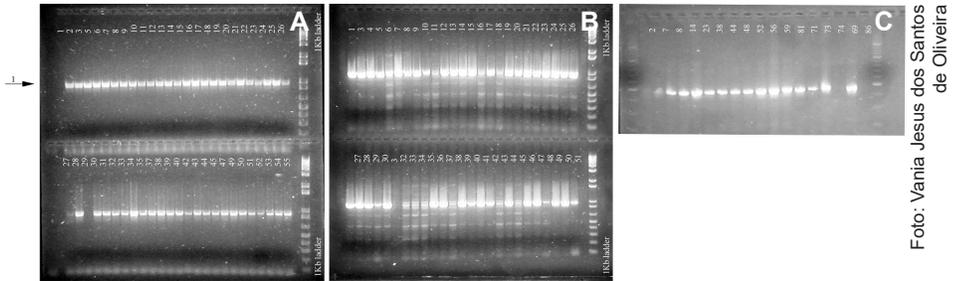


Foto: Vania Jesus dos Santos de Oliveira

Figura 4. Gel do produto do PCR para a CP/PRSV de plantas de mamoeiros transgênicos de diferentes populações. População PTP 1/6 (A); população PTP 1/10 (B) e população PTP 3/46 (C). Marcador de peso molecular DNA Ladder 1 kb.

Os eventos selecionados no campo PTP 1/6/20, 1/6/59, 1/6/64, 1/6/90, 3/46/44, 3/46/52 e 18/27/97 tinham frutos piriformes com peso de aproximadamente 500 gramas, com polpa alaranjada, columela de frutos bem formada, com carpeloidia inferior a 10% e sem defeitos conforme recomendado por Dias et al. (2011) e Sanches e Dantas (1999) (Figura 6). As plantas não apresentavam sintomas do PRSV (Tabela 2), tiveram resultados negativos para presença do PRSV-P no ELISA indireto (Tabela 3). As plantas 1/6/59 e 3/46/52 continham o gene CP em homozigose (Tabela 4, Figura 7). Conforme observado no Havaí por Tennant et al. (2001), a cultivar de mamoeiro SunUp homozigota apresentou resistência para vários isolados do PRSV-P, enquanto a cultivar Rainbow, que é hemizigota, não.



Foto: Paulo Ernesto Meissner Filho

Figura 5. Vista geral do campo instalado com as PTP em avaliação para a seleção de eventos elite.



Figura 6. Vista da columela de frutos de mamoeiros transgênicos selecionados no campo. 1/6/20 (A), 1/6/59 (B), 1/6/64 (C), 1/6/90 (D), 3/46/44 (E), 3/46/52 (F), 18/27/97 (G) e Sunrise Solo convencional (H).

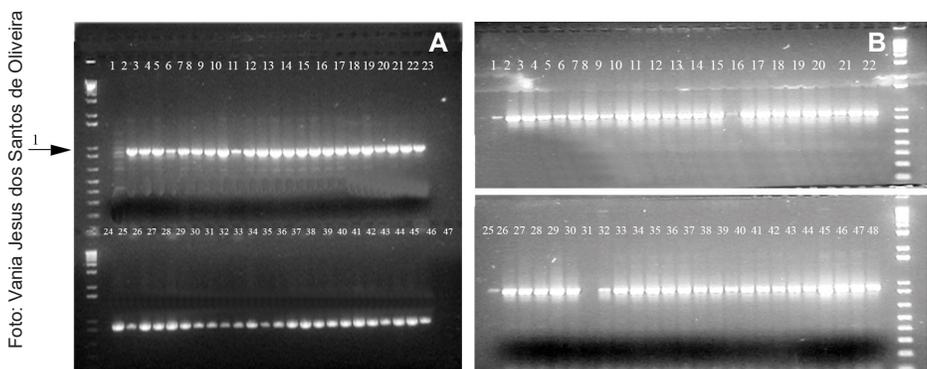


Figura 7. Análise da homozigose do gene CP de mamoeiros transgênicos na geração R-3 por PCR. PTP 1/6/59 (A) e PTP 3/46/52 (B). Marcador de peso molecular DNA Ladder 1 kb.

Atualmente, novas variedades de mamoeiro transgênicas que estão em desenvolvimento no Brasil precisam ter resistência para o PRSV-P e PMeV, as mais importantes viroses da cultura no país. A resistência genética de plantas para viroses é a forma mais econômica e eficiente para o seu controle, sendo uma tecnologia disponível para qualquer produtor. Para a produção de plantas transgênicas, além dos trabalhos de pesquisa em laboratório e casa de vegetação, são também necessários experimentos a campo de forma a obter todos os resultados solicitados pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para fazer a análise e aprovação destas plantas.

Conclusões

1. PTP 1/6/59 e 3/46/52 são eventos de mamoeiro transgênicos com resistência para o PRSV-P.
2. PTP 1/6/59 e 3/46/52 têm boas características agrônômicas e o gene CP em homozigose.

Agradecimentos

A Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Estadual de Apoio a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro e pelas bolsas concedidas que propiciaram a realização desta pesquisa, bem como a todos os bolsistas e empregados da Embrapa Mandioca e Fruticultura que cooperaram para sua realização.

Referências

ALVIAR, A. N.; STA CRUZ, F.; HAUTEA, D. M. Assessing the responses of tolerant papaya (*Carica papaya* L.) varieties to *Papaya ringspot virus* (PRSV). Infection and Establishment of Symptom Severity Rating Scale for Resistance Screening. **Philippine Journal of Crop Science**, v. 37, p. 20-28, 2012.

ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Ed. Álvaro M. R. Almeida; J. Albérico de A. Lima. Londrina: Embrapa Soja, Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2001. 186 p.

AZAD, M. A. K.; AMIN, L.; SIDIK, N. M. Gene technology for Papaya ringspot virus disease management. **The Scientific World Journal**, 2014, article ID 768038. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/768038>. Acesso em: 27 out. 2020

BARANSKI, R.; KLIMEK-CHODACKA, M.; LUKASIEWICZ, A. Approved genetically modified (GM) horticultural plants: a 25-year perspective. **Folia Horticulturae**, v. 31, n. 1, p. 3-49, 2019. DOI: 10.2478/fhort-2019-0001. Acesso em: 27 out. 2020

BASSO, M. F.; LIMA, J. A. A.; DEGUCHI, M.; GALDEANO, D. M.; AMARAL, L. S.; FERNANDES, P. M. B. Papaya viral diseases: recent advances and perspectives. **Advances in Genetics Research**, v. 16, p. 135-150, 2016.

CONTINI, E.; SAMPAIO, M. J. A.; AVILA, A. F. D. The lack of clear GMO regulation: its impact on researchers and farmers in Brazil. **International Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 1, 2, 3, p. 29-45, 2005.

D'ANGIOLELLA, G. L. B., CASTRO NETO, M. T., COELHO, E. F. Tendências climáticas para os tabuleiros costeiros da região de Cruz das Almas, BA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 27, 1998, v. 1, p. 43-45. Poços de Caldas, MG. **Anais...** Lavras, MG: Sociedade Brasileira de Engenharia Agrícola, 1998.

DIAS, N. L. P.; OLIVEIRA, E. J.; DANTAS, J. L. L. Avaliação de genótipos de mamoeiro com uso de descritores agrônômicos e estimação de parâmetros genéticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 11, p. 1471-1479, 2011.

DINESH, M. R., VEENA, G. L., VASUGI, C., REDDY, M. K., RAVISHANKAR, K. V. Intergeneric hybridization in papaya for 'PRSV' tolerance. **Scientia Horticulturae**, v. 161, p. 357-360, 2013.

FITCH, M. M. M. *Papaya ringspot virus* (PRSV) coat protein gene virus resistance in papaya: Update on progress worldwide. **Transgenic Plant Journal**, v. 4, n. special 1, p. 16-28, 2010.

HAMIN, I.; BORTH, W. B.; MARQUEZ, J.; GREEN, J. C.; MELZER, M. J.; HU, J. S. Transgene-mediated resistance to *Papaya ringspot virus*: challenges and solutions. **Phytoparasitica**, v. 46, p. 1-18, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12600-017-0636-4>. Acesso em: 27 out. 2020

IBGE. Produção Agrícola Municipal, 2019. Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/mamao/b1_mamao.pdf. Acesso em: 27 out. 2020.

JAYAVALLI, R.; BALAMOHAN, T. N.; MANIVANNAN, N.; GOVINDARAJ, M. Breaking the intergeneric hybridization barrier in *Carica papaya* and *Vasconcellea cauliflora*. **Scientia Horticulturae**, v. 130, p. 787-794, 2011.

KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. **Virus Taxonomy. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London, UK: Elsevier Academic Press. San Diego, 2012. 1327 p.

KUNG, Y.; YU, T.; HUANG, C.; WANG, H.; WANG, S.; YEH, S. Generation of hermaphrodite transgenic papaya lines with virus resistance via transformation of somatic embryos derived from adventitious roots of in vitro shoots. **Transgenic Research**, v. 19, p. 621-635, 2010.

KUNG, Y.; YOU, B.; RAJA, J. A. J.; CHEN, K.; HUANG, C.; BAU, H.; YANG, C.; HUANG, C.; CHANG, C.; YEH, S. Nucleotide sequence-homology-independent breakdown of transgenic resistance by more virulent virus strains and a potential solution. **Scientific reports**, v. 20, p. 1-10, 2015. DOI: 10.1038/srep09804.

LI, Y.; PENG, Y.; HALLERMAN, E. M.; WU, K. Biosafety management and commercial use of genetically modified crops in China. **Plant Cell Reporter**, v. 33, p. 565-573, 2014. DOI 10.1007/s00299-014-1567-x.

- LIMA, J. A. A.; NASCIMENTO, A. K. Q.; MAIA, L. M.; LIMA, R. C. A. Plantas transgênicas no controle da mancha anelar do mamoeiro. **Anais da Academia Cearense de Ciências**, v. 1, n. 1, p. 23-38, 2017.
- MEISSNER FILHO, P. E.; VILARINHOS, A. D.; OLIVEIRA, V. J. dos S. de; SILVA, D. de C. S. da; SANTOS, V. da S.; DANTAS, J. L. L. Resistance of transgenic papaya trees to papaya ringspot in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 56, e01954, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2021.v56.01954>.
- RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P., SOUZA, E. A., GONÇALVES, F. M. A., SOUZA, J. C. **Genética na agropecuária**. 5ª ed. rev., 565 p. Lavras: UFLA, 2012.
- SANCHES, N. F.; DANTAS, J. L. L. Coords. **O cultivo do mamão**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1999. 105 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular Técnica, 34).
- SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. rev. e ampl. Brasília: Embrapa, 2013. 353 p.
- SOUZA JÚNIOR, M. T.; NICKEL, O.; GONSALVES, D. Development of virus resistant transgenic papayas expressing the coat protein gene from a brazilian isolate of *Papaya ringspot virus*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 657-365, 2005.
- SOUZA JÚNIOR, M. T.; VENTUROLI, M. F.; COELHO, M. C. F., RECH FILHO, E. L. Análise de sistemas gene marcador/agente seletivo alternativos para seleção positiva de embriões somáticos transgênicos de mamoeiro. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 365-372, 2001.
- TENNANT, P.; FERMIN, G.; FITCH, M. M.; MANSARDT, R. M.; SLIGHTOM, J. L.; GONSALVES, D. Papaya ringspot virus resistance of transgenic Rainbow and SunUp is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 645-653, 2001.
- VADLAMUDI, T.; PATIL, B. L.; KALDIS, A.; GOPAL, D. V. R. S.; MISHRA, R.; BERBATI, M.; VOLOUDAKIS, A. DsRNA-mediated protection against two isolates of *Papaya ringspot virus* through topical application of dsRNA in papaya. **Journal of Virological Methods**, v. 275, p. 1-7, 2020.
- VELAME, K. V. C.; MEISSNER FILHO, P. E. Purificação e produção de anti-soro para o vírus do mosaico comum da mandioca. **Magistra**, v. 13, n. 2, p. 63-66, 2001.
- WU, Z.; MO, C.; ZHANG, S.; LI, H. Characterization of papaya ringspot virus isolates infecting transgenic papaya 'Huanong N° 1' in South china. **Scientific reports**, v. 8, n. 8206, 2018. DOI: [10.1038/s41598-018-26596-x](https://doi.org/10.1038/s41598-018-26596-x)



Mandioca e Fruticultura

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

CGPE 017472