



Centro Universitário de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde

## Transformação de mamoeiro - XV anos de sucesso

Lílian Silveira Travassos do Carmo



Centro Universitário de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Bacharelado em Ciências Biológicas

## **Transformação de mamoeiro - XV anos de sucesso**

Lílian Silveira Travassos do Carmo

Monografia apresentada como requisito para a  
conclusão do curso de Biologia do Centro  
Universitário de Brasília

Orientação: Manoel Teixeira Souza Júnior (Embrapa)  
Marcelo X. A. Bizerril (FACS-UniCEUB)

Brasília -1º/ 2003

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha família pelo apoio dado ao longo desses anos, ao meu orientador, Manoel Teixeira Souza Júnior, que contribuiu muito para minha formação acadêmica e realização dessa monografia, às minhas amigas, Marly Catarina Felipe Coelho e Daniele Scandiucci, a atenção demonstrada para que fosse possível a finalização desse trabalho.

## Resumo

A publicação do primeiro artigo científico reportando sucesso em transformação genética de mamoeiro (*Carica papaya* L.), ocorrida em 1988, abriu as portas para a utilização em larga escala desta tecnologia no melhoramento genético desta fruteira tropical. Nestes quinze anos que se seguiram, diversos grupos pelo mundo realizaram trabalhos visando à otimização do sistema de transformação, o que culminou com a liberação comercial das primeiras variedades de mamoeiro transgênicos, em 1998, no Haváí. Esta monografia, objetiva fazer uma revisão dos trabalhos de pesquisa e desenvolvimento realizados desde 1988, com especial atenção a vários aspectos técnicos dos sistemas de transformação genética de mamoeiros. Entre os aspectos abordados estão: explantes e variedades utilizadas, características introduzidas, sistemas de transformação utilizados, genes marcadores e repórteres empregados. Diversos países, entre eles o Brasil, já dominam a transformação genética de mamoeiro, tendo perseguido, nestes últimos 15 anos, principalmente a produção de mamoeiros transgênicos resistentes ao *Papaya ringspot virus* (PRSV), agente causal do principal problema fitossanitário desta cultura no mundo.

**Palavras-chaves:** Mamão, *Carica papaya*, transformação, *Agrobacterium*, biobalística.

## Sumário

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| <b>1. Introdução</b>                 | 06 |
| <b>2. Desenvolvimento do Tema:</b>   |    |
| 2.1 Variedades utilizadas            | 07 |
| 2.2 Explantes utilizados             | 09 |
| 2.3 Gene Marcador                    | 10 |
| 2.4 Gene Repórter                    | 12 |
| 2.5 Gene de Interesse                | 12 |
| 2.6 Sistemas de Transformação        | 15 |
| 2.7 Eficiência de Transformação      | 16 |
| <b>3. Conclusão</b>                  | 23 |
| <b>4. Referências Bibliográficas</b> | 24 |

## 1. Introdução

O mamão (*Carica papaya* L.) é uma fruta tropical de grande importância econômica, sendo o Brasil o principal produtor mundial. O cultivo do mamoeiro no Brasil apresentou um crescimento acentuado na última década, tendo contabilizado um aumento de 151% na área colhida (de 16.012 ha em 1990 para 40.202 ha em 2000), e um acréscimo de 164% na quantidade produzida (de 642.581 em 1990 para 1.693.779 mil frutos em 2000). O valor da produção nacional de mamão em 2000 foi de aproximadamente duzentos e cinquenta e nove milhões de reais (IBGE, 2002). A produção de mamão no Brasil destina-se principalmente para o mercado interno, porém, durante toda a década passada foi observado um crescimento contínuo no volume exportado. Este crescimento se deu principalmente após a abertura do mercado dos EUA a partir de 1998. No ano de 1990 o Brasil exportou 4.071 toneladas, o que rendeu US\$ 2.027.000,00. Já em 2001, foram exportadas 22.804 toneladas, rendendo US\$ 18.502.886,00; um aumento de 560% no volume exportado e 872% no valor arrecadado (SECEX-MDIC, 2002).

Em 2003 completam-se 15 anos desde a publicação do artigo científico intitulado “*Agrobacterium*-mediated Gene Transfer in Papaya” (Transformação genética de mamão mediada por *Agrobacterium*). Aquele artigo, publicado por Pang & Sanford no “*Journal of American Society of Horticultural Science*” em 1988, reportou o primeiro sucesso na transformação genética do mamoeiro. Nestes 15 anos desde então, diversos progressos foram alcançados na transformação genética desta fruteira que tem grande valor sócio-econômico nos diversos países onde é produzida comercialmente. O ápice da pesquisa com mamoeiros transgênicos neste período se deu com a liberação comercial das variedades transgênicas Rainbow e SunUp, ocorrida em 1998 no Havaí. Estas variedades, resistentes ao *Papaya ringspot virus* (PRSV), organismo causador da doença denominada “Mancha Anelar” ou “Mosaico”, salvaram a indústria do mamão naquele estado norte-americano.

Esta monografia que tem como objetivo mostrar o estado da arte desta linha de pesquisa e desenvolvimento, fazendo uma análise sucinta de diversos aspectos técnicos do desenvolvimento de mamoeiros transgênicos realizados em diversos países do mundo desde 1988, entre eles: as variedades utilizadas, as características introduzidas, os sistemas de transformação utilizados, os genes marcadores e repórteres empregados.

## 2. Desenvolvimento do Tema

Para a realização dessa monografia foram selecionados artigos a partir de dois bancos de dados: Agrícola - AGRICultural OnLine Access<sup>1</sup> e CAB Internacional<sup>2</sup>. Os artigos foram analisados quanto a aspectos técnicos utilizados no desenvolvimento de protocolo de transformação genética de mamoeiro, dentre eles: explantes utilizados; variedades transformadas; genes de interesse, marcadores e repórteres empregados; sistemas de transformação genética aplicada; e eficiência de transformação. Para cada um desses aspectos foi realizada uma análise sucinta que é apresentada a seguir:

### 2.1 Variedades utilizadas

O gênero *Carica*, um dos cinco que fazem parte da família Caricaceae, é composto de 21 espécies (Badillo, 1993), mas somente a espécie *Carica papaya* L. tem importância econômica. Embora Bancos Ativos de Germoplasma, contendo centenas de acessos, estejam presentes em diversos programas de melhoramento genético de *C. papaya* no mundo, como por exemplo, no programa de melhoramento de mamoeiro desenvolvido pela Embrapa na unidade de Cruz das Almas, Bahia<sup>3</sup>, o número de variedades comerciais de mamoeiro é bastante reduzido. De uma maneira geral, variedades do grupo Solo, desenvolvidas no, ou a partir, do quase centenário programa de melhoramento genético da Universidade do Havai<sup>4</sup>, dominam os plantios comerciais no mundo. Mesmo outros grupos de variedades, como o grupo Formosa, desenvolvido na Fengshan Tropical Horticultural Experiment Station<sup>5</sup>, derivam de variedades do grupo Solo.

Uma análise da tabela 1, que mostra as principais variedades utilizadas até o momento em trabalhos de transformação genética de mamoeiro, claramente demonstra o domínio de variedades do grupo Solo também na pesquisa visando à produção de mamoeiros transgênicos. Isso é de se esperar, haja vista que a escolha da variedade a ser transformada precisa estar em estreita sintonia com o programa de melhoramento, recaindo, sempre que possível, em variedades ou cultivares elite, isto é, de uso no mercado.

---

1 - <http://www.nal.usda.gov/ag98/>; 2 - <http://www.cabi.org/>; 3 - <http://www.cnpmf.embrapa.br/>; 4 - <http://www.ctahr.hawaii.edu/ctahr2001/>; e 5 - <http://old.tari.gov.tw/indexe.html>.

**Tabela 1.** Variedades e explantes de mamoeiro (*Carica papaya* L.) utilizadas em trabalhos de transformação genética, por artigo científico analisado.

| Variedade                               | Explante   | Artigo Científico           |
|---|--|-----------------------------|
| Sunrise Solo e Kapoho Solo              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Discos foliares</li> <li>Segmentos caulinares</li> <li>Segmentos de pecíolo</li> </ul>  | Pang & Sanford (1988)       |
| Sunset Solo e Kapoho Solo               | <ul style="list-style-type: none"> <li>Embriões somáticos derivados de segmento de hipocótilo e de EZI*</li> </ul>   | Fitch et al. (1990)         |
| Kapoho Solo                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>Segmentos de hipocótilo</li> <li>Calos embriogênicos e embriões somáticos derivados de Segmento de hipocótilo e EZI</li> </ul>                    | Fitch et al. (1993)         |
| Yellow-large hermaphrodite type         | <ul style="list-style-type: none"> <li>Folhas</li> </ul>   | Cabrera-Ponce et al. (1996) |
| Tainung N° 2                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>Embriões somáticos derivados de EZI</li> </ul>  | Cheng et al. (1996)         |
| Sunrise Solo                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>Embriões somáticos derivados de EZI</li> </ul>  | Cai et al. (1999)           |
| Tai-nong-2                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Calos embriogênicos derivados de segmentos radiculares e de pecíolo</li> </ul>  | Chen et al. (2001)          |
| Sunset Solo e Kapoho Solo               | <ul style="list-style-type: none"> <li>Embriões somáticos derivados de EZI</li> <li>Segmentos de hipocótilo</li> <li>Calos embriogênicos derivados de segmento de hipocótilo</li> </ul>  | Fitch et al. (1994)         |
| Maradol                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Embriões zigótico</li> <li>Calos embriogênicos derivados de EZI</li> </ul>  | Cabrera-Ponce et al. (1995) |
| Sunrise Solo                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pecíolo de Multibrotos obtidos a partir de embriões zigótico</li> </ul>   | Yang et al. (1996)          |
| Queensland papaya line (OE)             | <ul style="list-style-type: none"> <li>Embriões somáticos derivados de EZI</li> </ul>  | Mahon et al. (1996)         |
| Não citada                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Folhas</li> <li>Cotilédones</li> <li>Segmentos de hipocótilo e epicótilo</li> </ul>   | Cônsoi et al. (1995)        |
| Sunset Solo e Kapoho Solo               | <ul style="list-style-type: none"> <li>Embriões somáticos derivados de EZI</li> <li>Calos embriogênicos derivados de segmentos de hipocótilo</li> <li>Segmentos de hipocótilo</li> </ul> | Fitch et al. (1992)         |
| Sunrise Solo                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>Embriões somáticos derivados de EZI</li> </ul>  | Gonsalves et al. (1998)     |
| Kamiya Solo                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>Calos embriogênicos derivados de segmentos de hipocótilo</li> <li>Embriões somáticos derivados EZI</li> </ul>                                     | Fitch et al. (1998)         |
| Sunrise Solo, Kapoho Solo e Sunset Solo | <ul style="list-style-type: none"> <li>Embriões somáticos derivados de EZI</li> </ul>  | Neupane et al. (1998)       |
| Não citada                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Não citada</li> </ul>   | de la Fuente et al. (1997)  |
| F65                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Embriões somáticos obtidos de cultura líquida</li> </ul>  | Ying et al. (1999)          |

\* Embrião Zigótico Imaturo (EZI)

Sucessos na transformação genética de diversas variedades do grupo Solo foram relatados, entre elas: Sunrise, Sunset, Kapoho e Kamiya. As duas variedades transgênicas, hoje comercializadas nos EUA, Rainbow e SunUp, derivaram da linha transgênica 55-1 (Gonsalves, 1998), que originou-se da transformação da variedade Sunset.

Os programas de desenvolvimento de mamoeiros transgênicos em curso em países como o Brasil e a Jamaica, também utilizam variedades do grupo Solo (Tennant, 1996; Souza Júnior, 1999). Já países como o México, Austrália e Taiwan, utilizam outras variedades, de consumo mais local, tais como: Maradol e Tainung #2 (Cabrera-Ponce *et al.* 1995; Cheng *et al.* 1996).

## **2.2 Explantes utilizados**

No desenvolvimento de plantas transgênicas se faz necessário usar, como material de transformação, tecido vegetal com capacidade de regenerar outra planta. A este material de transformação dar-se o nome de explante. Explantes são utilizados para iniciar uma cultura *in vitro*, e entre os tipos mais usados estão: as folhas, caule, pecíolo (base da folha), tecido embrionário (embriões zigóticos imaturos, embriões somáticos, calos embriogênicos), segmentos de hipocótilo [parte caulinar do embrião ou plântula localizada entre o ponto de inserção do(s) cotilédono(s) e o início da radícula] e epicótilo (parte aérea de um embrião ou plântula situada acima do ponto de inserção dos cotilédones), cotilédono (folha embrionária) e raízes (Torres *et al.* 2000).

Nos trabalhos desenvolvidos com transformação genética de mamão, verificou-se que a eficiência do sistema de transformação utilizado, mediado por biobalística ou por *Agrobacterium*, é também determinada pelo tipo de explante empregado. A tabela 1 mostra os diversos tipos de explante utilizados até o momento pelos diversos grupos trabalhando na produção de mamoeiros transgênicos. Os principais explantes utilizados são os embriões somáticos ou calos embriogênicos derivados de embriões zigóticos imaturos e de segmentos de hipocótilo de plantas germinadas *in vitro*.

O explante tem que se prestar não somente à transformação genética, mas também ser capaz de permitir a regeneração de plantas inteiras a partir das células transformadas. No caso do mamoeiro, não há relatos de sucesso na regeneração de plantas a partir de

células do tecido foliar ou segmento de hipocótilo, por organogênese. Cabrera-Ponce *et al.* (1996) é até agora o único relato de sucesso na transformação genética de mamoeiro utilizando folha como explante submetido à transformação. Naquele trabalho os autores foram capazes de regenerar plantas transgênicas a partir de calos embrionários obtidos de raízes produzidas de folhas co-cultivadas com *Agrobacterium rhizogenes*.

Além da transformação mediada por biobalística e por *Agrobacterium*, um outro sistema também utilizado para transformação genética de plantas é a eletroporação. Na eletroporação, protoplastos da espécie vegetal são submetidos a uma alta voltagem, desestabilizando a membrana plasmática, e produzindo assim, poros temporários que permitem a passagem de moléculas de DNA que então se integram ao genoma da espécie em questão. Para o uso desta forma de transformação genética de plantas, se faz necessário o domínio da produção de protoplastos e da regeneração de plantas a partir destes. Chen (1994) relata o primeiro e único sucesso, até o momento, da regeneração de mamoeiros a partir de protoplastos, abrindo assim, a possibilidade de uso da técnica de eletroporação para a transformação genética de mamoeiro.

### **2.3 Gene Marcador**

A submissão do tecido ou órgão vegetal à transformação resulta na modificação genética, por inserção de transgene(s), de poucas células deste. Depois de concluída a transformação, se faz necessária a separação entre as células não transformadas das transformadas, para então induzir a regeneração da planta transgênica a partir destas últimas. Esta separação pode ser feita tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e faz uso de um gene marcado de seleção inserido em conjunto com o gene de interesse. O gene marcador de seleção é aquele que irá conferir às células transformadas a capacidade de resistir e se multiplicar na presença de um determinado agente seletor (normalmente antibiótico ou herbicida).

Quando células vegetais são submetidas a certos antibióticos, esses irão interferir na síntese protéica em mitocôndria e cloroplasto, levando a uma inibição do crescimento do tecido vegetal e a clorose. Células transgênicas que produzem *nptII* (neomicina fosfotransferase II) conseguem tolerar dosagens tóxicas dos antibióticos canamicina e

neomicina, ao contrário das não transformadas, no qual esses são letais. Entre os antibióticos, a canamicina é o agente seletor mais usado na seleção de plantas transgênicas (Brasileiro *et al.* 1998).

De acordo com a tabela 2, o gene *nptII* esteve presente em quase todos os trabalhos como gene marcador de seleção de mamoeiros transgênicos. Esse gene marcador é bastante utilizado em transformação genética de plantas, e codifica a enzima neomicina fosfotransferase II. Cabrera-Ponce *et al.* (1995) é o único trabalho que utilizou o gene *bar*, além do *nptII*, como gene marcador na produção de mamoeiros transgênicos. Neste artigo, os autores combinam dois agentes seletores, o antibiótico canamicina (100 mg/L) e o herbicida fosfinotricina (quatro mg/L), para seleção *in vitro* de embriões somáticos transformados. O gene *bar* codifica a enzima fosfinotricina acetil transferase que confere resistência ao herbicida fosfinotricina (Thompson *et al.* 1987).

Em função de questões ligadas a biossegurança e à percepção pública dos organismos geneticamente modificados, principalmente no que se refere ao uso de genes de resistência a antibióticos como genes marcadores de seleção positiva no desenvolvimento de plantas transgênicas, se faz necessária a busca por sistemas alternativos de gene marcador/ agente seletivo para triagem de embriões somáticos transgênicos de mamoeiro. Neste contexto, Souza Júnior *et al.* (2001) buscou avaliar os sistemas gene *manA*/ manose e *bar*/ PPT, como alternativos ao *nptII* canamicina. O primeiro sistema consiste de utilizar o gene *manA*- de *Escherichia coli*, o qual codifica a enzima fosfomanose isomerase, como gene marcador, e a manose como agente seletivo. Espécies vegetais que não metabolizam manose sofrem severa inibição de crescimento quando esta é oferecida como única fonte de carbono em um meio de cultura. Os resultados obtidos por Souza Júnior *et al.* (2001) mostraram que este sistema não é passível de uso no processo de seleção positiva de transformantes em programa de transformação genética do mamoeiro Sunrise, haja vista que embriões somáticos desta variedade foram capazes de se multiplicar na presença de altas dosagens de manose. Já o sistema gene *bar*/ PPT, que utiliza o agente seletivo glufosinato de amônio (PPT), mostrou-se eficiente, para essa cultivar, somente em concentrações superiores a 125 µM de PPT.

## 2.4 Gene Repórter

O gene repórter é aquele gene cujo produto da expressão, normalmente uma enzima, possibilita a fenotipagem da célula transformada, tanto quanto do tecido, órgão ou planta derivado desta. Este tipo de gene é utilizado principalmente quando do desenvolvimento de protocolo de cultura e transformação de uma espécie vegetal, sendo desnecessário o seu uso quando o protocolo está pronto e é aplicado para o desenvolvimento de plantas transgênicas de interesse agropecuário. Os principais genes repórter utilizados estão: luciferase (*luc*) (Lo *et al.* 2002),  $\beta$ -glucuronidase (*Gus*) (Brasileiro *et al.* 1998) e green fluorescent protein (*gfp*) (Sullivan & Kay, 1999).

Quanto ao gene repórter utilizado no desenvolvimento de mamoeiros transgênicos, dois terços dos trabalhos citados na tabela 2 usaram o gene *Gus*. Aliás, este é o único gene repórter utilizado no desenvolvimento de mamoeiros transgênicos até o momento. Esse gene codifica a enzima  $\beta$ -glucuronidase (*Gus*), e a sua expressão pode ser visualizada pelo contato do tecido transformado com o substrato X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronídeo). Esse substrato sofre hidrolização pela ação da enzima, resultando, assim, em produto de coloração azulada, visível a olho nú (Torres *et al.* 2000).

## 2.5 Gene de Interesse

O gene de interesse é aquele utilizado para dar à planta transformada o fenótipo desejado, através de sua expressão. É o gene de interesse que tem o papel de agregar valor à variedade sendo transformada. Neste 15 anos desde Pang & Sanford (1988), diversos genes de interesse foram utilizados na transformação genética de mamoeiro, sendo que estes podem ser classificados em quatro grupos distintos, que são: a) gene que confere tolerância a alumínio; b) gene que confere tolerância a herbicida; c) gene que aumenta a vida de prateleira dos frutos; e d) gene que confere resistência a vírus (Tabela 2).

**Tabela 2.** Genes e mecanismos de transformação utilizada em trabalhos de transformação genética, por artigo científico analisado.

| Artigo                      | Gene Marcador | Gene Repórter | Gene de Interesse                                   | Transformação mediada por              |
|-----------------------------|---------------|---------------|---|--|
| Pang & Sanford (1988)       | NptII         | -             | -   | Agrobacterium tumefaciens              |
| Fitch et al. (1990)         | NptII         | Gus           | gene da capa proteica de PRSV HA 5-1                | Biobalística                           |
| Fitch et al. (1993)         | NptII         | Gus           | gene da capa proteica de PRSV HA 5-1                | Agrobacterium tumefaciens              |
| Cabrera-Ponce et al. (1996) | NptII         | Gus           | -   | Agrobacterium rhizogenes               |
| Cheng et al. (1996)         | NptII         | -             | Nib/CP/3'ncr de PRSV YK                             | Agrobacterium tumefaciens              |
| Cai et al. (1999)           | NptII         | Gus           | gene da capa proteica de PRSV HA 5-1                | Biobalística                           |
| Chen et al. (2001)          | NptII         | Não citado    | Gene da replicase de PRSV AL                        | Agrobacterium tumefaciens              |
| Fitch et al. (1994)         | NptII         | Gus           | gene da capa proteica de PRSV HA 5-1                | Biobalística/Agrobacterium tumefaciens |
| Cabrera-Ponce et al. (1995) | NptII e bar   | Gus           | gene da phophinotricine acetyl transferase (bar)    | Biobalística                           |
| Yang et al. (1996)          | NptII         | Gus           | -   | Agrobacterium tumefaciens              |
| Mahon et al. (1996)         | NptII         | Gus           | -   | Biobalística                           |
| Cônsoli et al. (1995)       | Não citado    | Não citado    | -   | Agrobacterium rhizogenes               |
| Fitch et al. (1992)         | NptII         | Gus           | gene da capa proteica de PRSV HA 5-1                | Biobalística                           |
| Gonsalves et al. (1998)     | NptII         | Gus           | gene da capa proteica de PRSV HA 5-1                | Biobalística                           |
| Fitch et al. (1998)         | NptII         | Gus           | gene da capa proteica e da replicase de PRSV HA 5-1 | Biobalística                           |
| Neupane et al. (1998)       | NptII         | -             | gene da ACC sintase                                 | Biobalística/Agrobacterium tumefaciens |
| De la Fuente et al. (1997)  | Não citado    | Não citado    | gene da citrato sintase de P. aeruginosa            | Biobalística                           |
| Ying et al. (1999)          | NptII         | Gus           | -   | Agrobacterium tumefaciens              |

O alumínio, na sua forma  $Al^{3+}$ , é tóxico para muitas plantas, sendo o principal fator limitante de produtividade em solos ácidos. Algumas plantas mostram resistência natural ao alumínio tóxico, por serem capazes de liberar ácidos orgânicos em grande quantidade, como o ácido cítrico, que é um quelante de  $Al^{3+}$ . Fuente *et al.* (1997), utilizou o gene bacteriano da citrato sintase (CSb) para transformar mamoeiro, por biobalística, com o intuito de desenvolver plantas tolerantes ao alumínio. Os autores obtiveram plantas contendo de duas a três vezes o nível de citrato sintase observado nas plantas não transformadas. Essas plantas foram capazes de desenvolver raízes e crescer normalmente em concentrações de alumínio de até 300  $\mu M$ , enquanto que os mamoeiros não transformados eram incapazes de enraizar em concentrações de iguais ou superiores 50  $\mu M$ .

Cabrera-Ponce *et al.* (1995) desenvolveram mamoeiros transgênicos expressando o gene *bar*. Plantas transgênicas expressando este gene não apresentaram necrose mesmo após dois meses de aplicação localizada de PPT, herbicida fosfinotricina, (na concentração de 3% peso/ volume) às folhas, enquanto que as plantas controle apresentaram necrose nas folhas quando tratadas com concentrações de 0,1% de PPT. Este é o único relato, até o momento, do desenvolvimento de mamoeiros com tolerância a herbicida.

O etileno tem um papel importante no processo de amadurecimento de frutos. O aminoácido metionina (Met) é o precursor do etileno. A sua conversão a S-adenosil metionina (AdoMet), catalisada pela AdoMet sintetase, no ciclo de Yang fornece a matéria-prima para a produção de etileno, em duas reações subseqüentes. Estas reações são catalisadas respectivamente pela ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) sintase e ACC oxidase. No processo de maturação do fruto, o aumento na biossíntese de etileno é associado ao aumento na quantidade de ACC, na atividade das enzimas ACC sintase e oxidase, e também nos níveis de mRNA específicos de ambas enzimas (Taiz & Zeiger, 1998). Na tentativa de reduzir a síntese de etileno durante o processo de amadurecimento de mamões, e com isso aumentar a vida de prateleira dos mesmos, Neupane *et al.* (1998) produziu versões sense e antisense do gene ACC sintase de mamão e utilizou para transformar as variedades Sunrise e Kapoho Solo. Mamoeiros transgênicos contendo a versão antisense deste gene foram obtidos e duas plantas de um mesmo evento de transformação apresentaram níveis significantes de antisense mRNA deste gene.

A principal característica perseguida pela transformação genética de mamoeiro

nestes últimos 15 anos é a resistência ao *Papaya ringspot virus* (PRSV). PRSV é o nome dado ao vírus causador da mancha anelar do mamoeiro, que é a principal doença a limitar o cultivo desta fruteira no mundo. Esse vírus é da família *Potyvirus* e possui duas estirpes: PRSV-p, que infecta mamoeiro e cucurbitáceas, e a estirpe PRSV-w, que infecta somente cucurbitáceas.

Dois genes de PRSV já foram utilizados para transformar mamoeiro com vistas a obter resistência a este vírus, são eles: o gene da replicase (*Nlb*), e o gene da capa protéica (*cp*). O gene da replicase é responsável por codificar a RNA dependente RNA polimerase (RdRp), que participa do processo de replicação do vírus. A resistência mediada pelo gene da replicase é uma das principais estratégias de obtenção de resistência a vírus em plantas transgênicas (Souza Júnior & Gonsalves, 1999). O gene da replicase do PRSV foi utilizado por Fitch *et al.* (1998) e Chen *et al.* (2001) no intuito de obter resistência em mamoeiros a este vírus. Ambos grupos relatam sucesso na obtenção de plantas transgênicas expressando o gene da replicase e resistentes a PRSV.

O gene *cp* produz a proteína capsídica, que participa do empacotamento do RNA viral, além de ter participação no movimento viral dentro da planta e da interação com os insetos vetores do vírus. O gene da capa protéica de PRSV é o gene mais utilizado na produção de mamoeiros transgênicos até o momento.

Diversos grupos já relataram sucesso na obtenção de mamoeiros expressando este gene e resistentes a este vírus (Fitch *et al.* 1992; Tennant, 1996; Cheng *et al.* 1996; Souza Júnior, 1999; Cai *et al.* 1999). Esta estratégia permitiu, em 1998, a liberação comercial das primeiras fruteiras transgênicas resistentes a vírus no mundo, os mamoeiros ‘Rainbow’ e ‘SunUp’ (Gonsalves, 1998).

## **2.6 Sistema de Transformação**

Somente dois sistemas de transformação foram utilizados para a produção de mamoeiros transgênicos até o momento, são eles: a transformação mediada por *Agrobacterium* e por biobalística (Tabela 2).

O sistema de transformação mediada por *Agrobacterium* consiste em submeter tecidos vegetais a uma suspensão de bactérias, permitindo, assim, que estas se alojem no

apoplasto (espaço intercelular), e estabeleçam um canal de ligação com a célula vegetal, por onde se procede a transferência de DNA da bactéria para a planta. A presença de moléculas “sinais” (compostos fenólicos - acetoseringona e derivados), estimula a bactéria a se instalar no interior da planta e posterior integração do seu material genético ao genoma da planta (Brasileiro *et al.* 1998).

Diferentes linhagens de *A. tumefaciens* (GV3111; LBA4404; A136; C58-Z707) e *A. rhizogenes* (LBA9402; A<sub>4</sub>T; 8196) foram utilizadas para transformar explantes de mamoeiro. Dos trabalhos citados na Tabela 2, 55,6% utilizaram-se desse sistema de transformação. Entretanto, a transformação mediada por *A. tumefaciens* foi de 80% quando comparada com a mediada por *A. rhizogenes* (20%).

Embora Pang & Sanford (1988) tenham utilizado esse sistema de transformação genética de mamoeiro, estes não foram capazes de regenerar plantas transgênicas. Trabalhos posteriores, como os de Fitch *et al.* (1993), Cabrera-Ponce *et al.* (1996), Cheng *et al.* (1996), Yang *et al.* (1996), Ying *et al.* (1999) e Chen *et al.* (2001) mostraram-se capazes de regenerar mamoeiros transgênicos.

No desenvolvimento de transformação genética de mamão, a biobalística é outra ferramenta que vem sendo usada ao longo desses 15 anos. A biobalística consiste na introdução direta de DNA no interior da célula, causando lesões mínimas nesta. Partículas de ouro ou tungstênio, cobertas com o DNA a ser introduzido, são aceleradas na direção das células, mediante uso de gás Hélio sob alta pressão. As partículas em altíssima velocidade penetram na célula, e o DNA é então dissociado destas e integrado ao genoma da planta (Brasileiro *et al.* 1998).

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

## **2.7 Eficiência de Transformação**

A transformação genética de mamoeiro é um processo complexo, apresentando diversas etapas, todas muito importante no que compete à eficiência deste. O sistema de

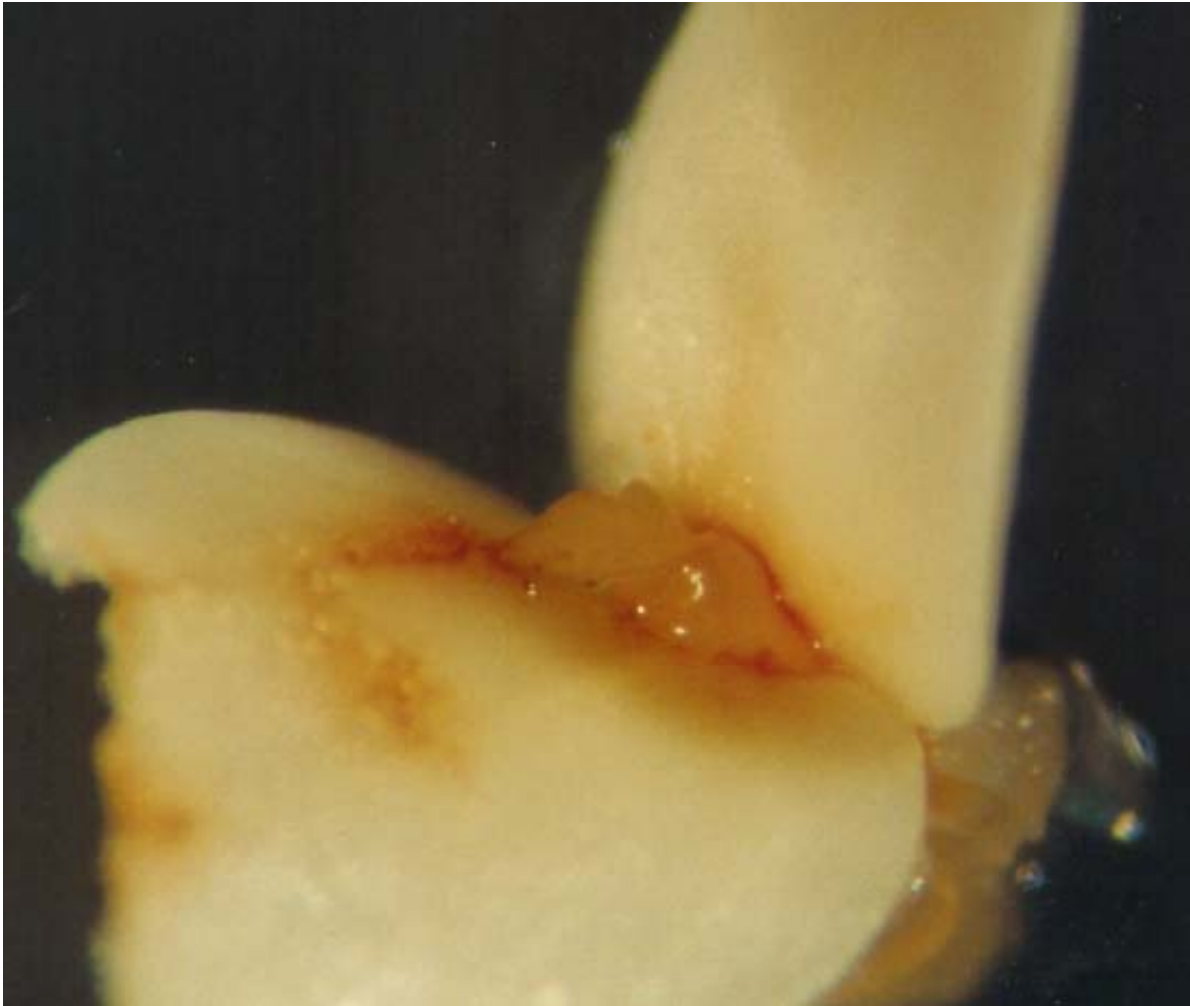
transformação utilizado por Souza Júnior (1999), pode ser dividido em quatro fases principais: a) excisão do embrião zigótico imaturo (Figura 1), b) indução/ produção de embrião somático (Figura 2), c) seleção de embriões somáticos potencialmente transgênicos (“Putative Transgenic Embryo Cluster” - PTECs), e d) regeneração de plantas a partir de PTECs. A eficiência na transição entre uma fase e outra é fundamental na medição da eficácia do processo como um todo. A eficiência na obtenção de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos imaturos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia é de aproximadamente 80%, enquanto que a obtenção de PTECs a partir de embriões somáticos secundários (Figura 3 e 4) submetidos à transformação mediada por biobalística é de quase 20%, e a eficiência de regeneração de plantas (Figura 5) a partir de PTECs é de 58% (dados não publicados). Portanto, o sistema de cultura de tecidos e transformação genética de mamoeiro em uso na Embrapa tem uma eficiência de quase 9%; isto é, para cada 100 embriões zigóticos excisados, nove eventos distintos de transformação são regenerados.

Cai *et al.* (1999) definiram eficiência de transformação de diversas formas, tais como: a) número de eventos distintos de transformação por número de blocos de embriões zigóticos que produziram embriões somáticos; b) número de eventos distintos de transformação por grama de tecido fresco (bloco de embriões somáticos) utilizados na transformação; e c) número de eventos distintos de transformação por placa de petri contendo embriões somáticos submetidos à transformação.

Mahon *et al.* (1996) relata uma taxa de transformação média de 41% das placas de petri bombardeadas, enquanto Cai *et al.* (1999) relata 100%; isto é, número de placas de petri que geraram plantas transgênicas, por número de placas submetidas à transformação. Uma comparação direta da eficiência de transformação entre os diversos trabalhos citados na tabela 1 não é possível devido diferença metodológica observadas (distintas variedades, idade e tipo de explante usado na transformação, sistema de transformação, etc.).



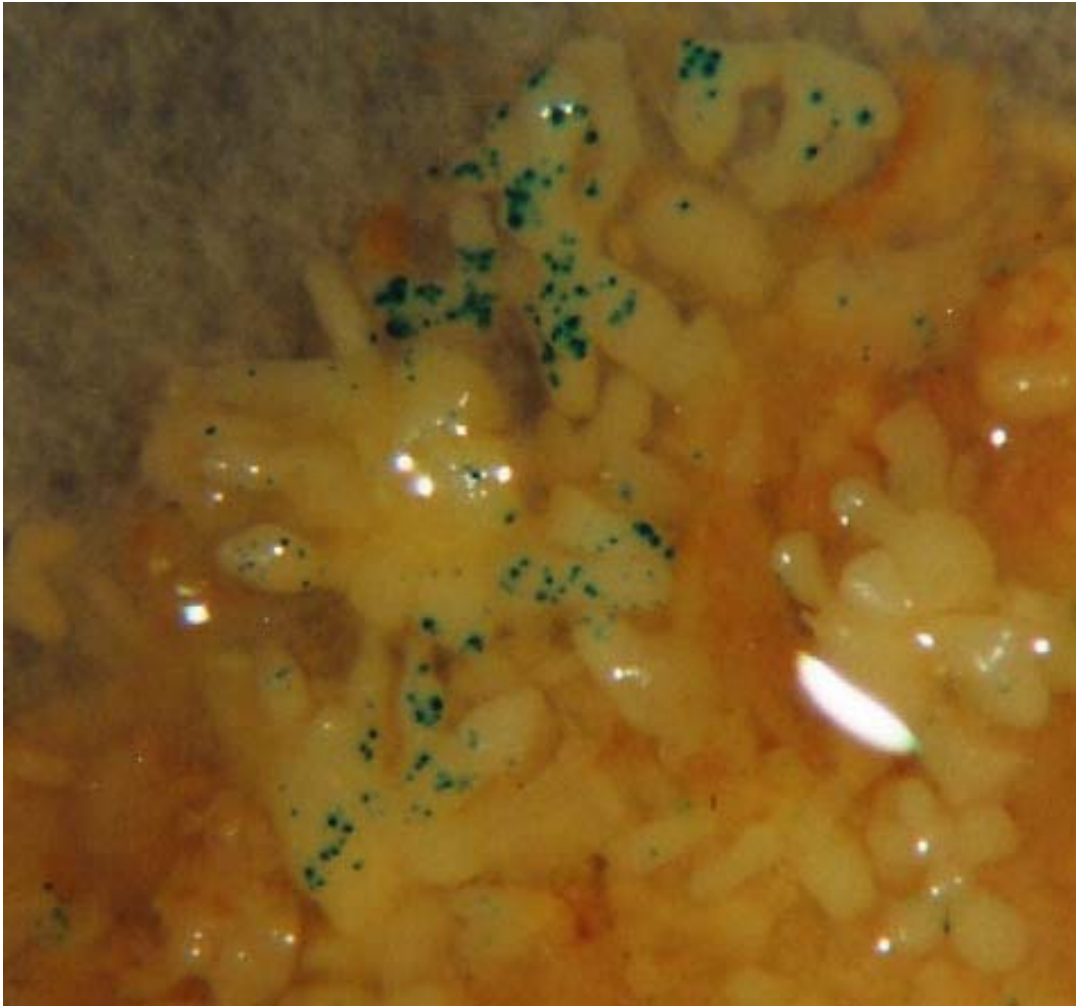
**Figura 1.** Explante de *Carica papaya* L. utilizado na transformação genética. Embrião zigótico imaturo.



**Figura 2.** Explante de *Carica papaya* L. utilizado na transformação genética. Embrião zigótico imaturo apresentando início de desenvolvimento de embriões somáticos.



**Figura 3.** Explante de *Carica papaya* L. utilizado na transformação genética. Embriões somáticos secundários.



**Figura 4.** Expressão transiente do gene repórter *gus* em embriões somáticos secundários de mamoeiro (*Carica papaya* L.).



**Figura 5.** Mamoeiros regenerados *in vitro* a partir de embriões somáticos potencialmente transgênicos (“Putative Transgenic Embryo Cluster” - PTECs).

### 3. Conclusão

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

Esta monografia objetivou fazer uma análise sucinta dos últimos 15 anos de pesquisa em transformação genética de mamoeiro, relatando desde o primeiro sucesso de transformação genética de mamoeiro, publicação por Pang & Sanford (1988), até os trabalhos mais atuais nessa área de pesquisa. Com esses trabalhos, pôde-se verificar que:

- a) Diversas variedades de mamoeiros do grupo Solo, que concentra as principais variedades comercializadas no mundo, já foram transformadas geneticamente, entre elas: Sunrise, Sunset, Kapoho e Kamiya;
- b) Embriões somáticos derivados de hipocótilos e de embriões zigóticos foram até o momento os explantes de transformação mais utilizados;
- c) O gene marcador mais usado no desenvolvimento de mamoeiros transgênicos é o gene *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina, sendo que este está presente na duas variedades transgênicas comercializadas no Havaí desde 1998 (Gonsalves, 1998). Tentativas de uso de outros sistemas gene marcador/ agente seletor não lograram sucesso similar ao do gene *nptII* (Souza Júnior *et al.*, 2001);
- d) A resistência ao *Papaya ringspot virus* foi o fenótipo mais buscado pela transgenia de mamoeiro nestes últimos 15 anos;
- e) Sucesso na transformação genética de mamoeiro foi obtido por diversos grupos no mundo, utilizando tanto a transformação mediada por *Agrobacterium*, quanto transformação mediada por biobalística.

#### 4. Referências Bibliográficas

- BADILLO, V. M. *CARICACEA. Revista de la Facultad de Agronomía.* v.43, p.10- 111. 1993.
- BRASILEIRO, A. C. M., *et al.* Manual de Transformação Genética de Plantas. 1<sup>a</sup> ed. Brasília: Embrapa - SPI/ Embrapa Cenargen, 1998. 309p.
- CABRERA-PONCE, J.L. VEGAS-GARCIA, A., HERRERA-ESTELLA, L. Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Reports*, v. 15, p. 1-7.1995.
- CABRERA-PONCE, J.L., VEGAS-GARCIA, A., HERRERA- ESTELLA, L. Regeneration of Transgenic Papaya Plants via Somatic Embryogenesis induced by *Agrobacterium Rhizogenes*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* v. 32, p. 86-90. 1996.
- CAI, W.; GONSALVES, C.; TENNANT, P.; FERMIN, G.; SOUZA JR., M. T.; SARINDU, N.; JAN, F.; ZHU, H.; GONSALVES, D. A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In vitro Cell Dev. Biol. - Plant*, v.35, p. 61-69.1999.
- CHEN, M. H. Regeneration of Plants from Protoplasts of *Carica* Species (Papaya). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, v.29, p. 52-60.1994.
- CHEN, G., YE, C.M., HUANG, J.C., YU, M., LI, B.J. Cloning of the papaya ringspot virus (PRSV) replicase gene and generation of PRSV-resistant papayas through the introduction of the PRSV replicase gene. *Plant Cell Reports*, n.20, p.272-277.2001.
- CHENG, Ying-Huey, YANG, Jiu-Sherng, YEH, Shyi- Dong. Efficient transformation of papaya by coat protein gene of papaya ringspot virus mediated by *Agrobacterium* following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with caborundum. *Plant Cell Reports*, n.16, p.127-132. 1996.
- CÔNSOLI, L., GAZIOLA, S. A., VIEIRA, M. L. C. Plant transformation mediated by *Agrobacterium rhizogenes*: optimization of the infection process. *Revista Brasileira de Genética*, v.18, n.1, p.115-119. 1995.
- FITCH, Maureen M. M., MANSCHARDT, Richard M., GONSALVES, Dennis, SLIGHTOM J. L., SANFORD, Jonh C. Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports*, n .9, p.189-194. 1990.

- FITCH, M.M.M., MANSARD, R.M., GONSALVES, D, SLIGHTOM, Jerry L. Virus Resistant Papaya Plants Derived from Tissues Bombarded with The Coat Protein Gene of Papaya Ringspot Virus. *Biotechnology*, v. 10, p. 1466-1472.1992.
- FITCH, M. M. M., MANSARDT, Richard M, GONSALVES, Dennis, SLIGHTOM, J.L. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*- mediated transformation of somatic embryos. *Plant Cell Reports*, n.12. p. 245-249. 1993.
- FITCH, M.M.M., PANG, S. Z., SLIGHTOM, J. L., LIUS, S., TENNANT, P., MANSARDT, R. M., GONSALVES, D. Genetic Transformation in *Carica papaya* L. (Papaya). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, v: 29, p.232-256.1994.
- FITCH, M.M.M., MOORE, P., DREW, R.A., LEONG, T. Progress in transgenic papaya (*Carica papaya*) research: Transformation for broader resistance among cultivars and micropropagating selected hybrid transgenic plants. *Acta Horticulturae*, n. 461, p. 315-319. 1998.
- De la FUENTE, J. M., RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, V., CABRERA-PONCE, J. L., HERRERA-ESTRELLA, L. Aluminum Tolerance in Transgenic Plants by Alteration of Citrate Synthesis. *Science*, v. 276, p. 1566-1568.1997.
- GONSALVES, C., CAI, W., TENNANT, P., GONSALVES, D. Effective Development of Papaya Ringspot Virus Resistant Papaya with Untranslatable Coat protein Gene using a modified Microprojective Transformation Method. *Acta Horticulturae*, n. 461, p. 311-314.1998.
- GONSALVES, D. Control of papaya ringspot virus in papaya: A case study. *Annual Review Phytopathology*, v.36, p. 415-437. 1998.
- IBGE-SIDRA (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatístico). Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 2002.
- LO, H.R., CHOUT, C. C., WUS, T.Y., YUEN, J. P.Y., CHAO, Y.C. Novel Baculovirus DNA Elements Strongly Stimulate Activities of Exogenous and Endogenous Promoters. *American Society of Biological Chemistry*, v. 277, n. 7, p. 5256-5264.2002.
- MAHON, R. E., BATESON, M. F., CHAMBERLAIN, D.A., HIGGINS, C. M., DREW, R.A., DALE, J. L. Transformation of an Australian Variety of *Carica papaya* using Microprojectile Bombardment. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.23, p. 679-685.1996.

- NEUPANE, K. R., MUKATIRA, U. T., KATO, C., STILES, J. I. Cloning and characterization of fruit-expressed ACC synthase and ACC oxidase from papaya (*Carica papaya* L.). *Acta Horticulturae*, n.461 p. 329-337.1998.
- PANG, S.Z., SANFORD, J.C., Agrobacterium-mediated Gene Transfer in Papaya. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*, v. 113, p. 287-291.1988.
- SECEX (Secretaria do Comércio Exterior)/ MIDIC. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/Micn001.htm>>. Acesso em 2002.
- SOUZA JR, M. T., VENTUROLI, M. F., COELHO, M. C. F., RECH FILHO, E. L. Análise de Sistemas Gene Marcador/ Agente Seletivo Alternativo para Seleção Positiva de Embriões Somáticos Transgênicos de Mamoeiro. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.13, n.3, p. 366-373.2001.
- SOUZA JR. M. T. & GONSALVES, D. Genetic Engineering Resistance to Plant Virus Diseases, an Effort to Control *Papaya ringspot virus* in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 24, n. 4. p.485-502.1999.
- SOUZA JR., M. T. Analysis of the resistance in genetically engineered papaya against *Papaya ringspot potyvirus*, partial characterization of the PRSV. Brazil. Bahia isolate, and development of transgenic papaya for Brazil. (Ph.D. Dissertation). Ithaca. Cornell University.1999.
- SULLIVAN, K. F., KAY, S. A. *Methods in Cell Biology*. v.58. Academic Press. 1999. 386p.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Plant physiology*. 2<sup>nd</sup>. Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. 1998. 793 p.
- TENNANT, P. F. Evaluation of the resistance of coat protein transgenic papaya against papaya ringspot virus isolates and development of transgenic papaya for Jamaica. (Ph. D. Dissertation). Ithaca. Cornell University.1996.
- THOMPSON, C. J., RAO MOVVA, N., TIZARD, R., CRAMERI, R. , DAVIES, J. , LAUWEREYS, M. , BOTHERMAN, J. Characterization of the herbicide resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal*, v. 6, p. 2519-2523.1987.

- TORRES, A.C., FERREIRA, A.T., SÁ, F. G., BUSO, J. A., CALDAS, L. S., NASCIMENTO, A. S., BRÍGIDO, M. M., ROMANO, E. *Glossário de Biotecnologia Vegetal*. 1ª ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.128p.
- YANG, J. S., YU, T. A., CHENG, Y. H., YEH, S. D. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of petioles of in vitro propagated multishoots. *Plant Cell Reports*. v. 15, p. 459-464.1996.
- YING, Z. T., YU, X., DAVIS, M. J., YING, Z. T., YU, X. New method for obtaining transgenic papaya plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, n.112, p. 201-205. 1999.