

LEONARDO BOLZANI TORRES

AVALIAÇÃO DE RISCO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE MARACUJÁ-AMARELO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) RESISTENTES AO CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*): FLUXO GÊNICO EM *Passiflora* sp.

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2003**

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a minha mãe Ivone, ao meu pai Eduardo e ao meu filho Eduardo pela força, motivação, conselhos e apoio sem os quais não teria sido capaz de executar este trabalho.

Agradeço ao meu orientador Murilo Zerbini, por acreditar e apoiar este trabalho e acima de tudo pelos ensinamentos passados.

Agradeço aos amigos Marcos Oranje “Laranja”, Eduardo Chumbinho “Tutu”, Danielle Ribeiro de Barros e Ricardo Brainer, pelo carinho e paciência nas horas difíceis.

Aos colegas do Trio Maracujá, Enilton e Antônio Sérgio.

Aos colegas de Mestrado, que caminharam juntos comigo nesta jornada.

Aos companheiros de laboratório, Poli, Ana Verônica, Ana Raquel, Edimar, Fabrício, Glória, Renata, Alison, Silvana e Adriana, pela companhia e pelos momentos divertidos, além da ajuda prestada em várias ocasiões.

Aos funcionários do DFP que sempre foram atenciosos comigo, principalmente Fizinho e Joaquim e a turma do Viveiro de Café.

A Fernanda que na reta final me deu apoio e motivação para concluir o trabalho.

Aos colegas do Pólo e ao Seu Juca que sofreram nos dias de estresse e que faziam da hora do almoço um momento de relaxamento e diversão.

E por fim a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram mas que não foram mencionados aqui e sem os quais esta jornada teria sido muito mais difícil.

Gostaria de também agradecer ao Departamento de Fitopatologia da UFV pela oportunidade de mostrar meu trabalho, e a FAPEMIG pelo suporte financeiro do projeto.

Obrigado a todos.

BIOGRAFIA

Leonardo Bolzani Torres é natural do Rio de Janeiro, RJ, nascido a 29 de outubro de 1975, filho de Eduardo Enrique Torres Vasconez e Ivone Bolzani de Torres. Concluiu o primeiro grau no Colégio Andrews em 1990, e o segundo grau no Centro Educacional Anísio Teixeira (CEAT) em 1995, ambos em seu município natal.

Em 1996 ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, onde se graduou como Engenheiro Agrônomo em março de 2001.

Em abril do mesmo ano ingressou no curso de mestrado do programa de Pós-Graduação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

Em agosto de 2002 ingressou no curso de especialização MBE Gestão Ambiental, na COPPE/UFRJ.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
LITERATURA CITADA.....	10
CAPÍTULO 1: Avaliação de risco de plantas transgênicas de maracujá-amarelo (<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deg.) resistentes ao CABMV (<i>Cowpea aphid- borne mosaic virus</i>): Fluxo gênico em <i>Passiflora</i> sp.	15
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
INTRODUÇÃO.....	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
MATERIAL VEGETAL.....	19
Localização experimental.....	19
Dispersão de pólen pelo vento.....	20
Dispersão de pólen mediada por insetos polinizadores.....	20
Análise estatística	20
RESULTADOS	21
Dispersão de pólen pelo vento.....	21
Dispersão de pólen mediada por insetos polinizadores.....	21
DISCUSSÃO	21
LITERATURA CITADA	23
APÊNDICE	32

RESUMO

TORRES, Leonardo Bolzani, M.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2003.
Avaliação de risco de plantas transgênicas de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) resistentes ao CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*): Fluxo gênico em *Passiflora* sp. Orientador: Francisco Murilo Zerbini Junior. Conselheiros: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Cláudio Horst Bruckner.

O endurecimento dos frutos do maracujazeiro, causado pelo CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*), é uma das principais doenças da cultura. O controle é difícil, e estratégias baseadas no controle do inseto vetor, em proteção cruzada e na resistência natural tem se mostrado ineficientes. Na busca de uma estratégia alternativa de controle foram produzidas plantas transgênicas de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressando um RNA não traduzível correspondente aos genes *nib* e *cp* de um isolado do CABMV de Minas Gerais (MG1). Uma linhagem transgênica (TE5-10) se mostrou resistente ao isolado MG1 por meio de silenciamento gênico pós-transcricional, sendo porém suscetível a um isolado de Pernambuco (PE1). Este trabalho teve como objetivos estimar o potencial de fluxo gênico em maracujá-amarelo e estudar a herança da resistência na linhagem transgênica TE5-10. Para o estudo de fluxo gênico foi implantado um cultivo experimental de maracujazeiros com 2.640m², consistindo em quatro linhas de 210 m espaçadas de três metros, com 23 plantas de maracujá-amarelo em cada linha. Na cabeceira das linhas foram plantados três genótipos distintos, e o restante das linhas foi constituído de clones de uma mesma planta de um quarto genótipo. Foram realizadas avaliações da porcentagem de

fecundação natural (via inseto polinizador) ao longo das linhas e estudos de dispersão do pólen por meio do vento a partir de uma única planta. Os resultados indicam que o fluxo gênico via dispersão de pólen pelo vento não ocorre a distâncias superiores a 3 m. Já o fluxo gênico via inseto polinizador poderia ocorrer à distância máxima de 210 m avaliada no experimento, uma vez que frutos foram produzidos nas plantas localizadas a essa distância. Foi observada uma queda na porcentagem de fecundação natural ao longo das linhas, entretanto essa queda não foi significativa, nem foi possível ajustar um modelo (paramétrico ou não-paramétrico) aos dados. A grande desuniformidade no desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, na densidade floral ao longo das linhas, pode ter sido um fator complicador. Para o estudo da herança da resistência foram realizados cruzamentos entre a linhagem transgênica resistente TE5-10, uma linhagem transgênica suscetível (T2-5) e uma planta não-transformada. Além disso, foram realizadas autofecundações da linhagem TE5-10 com o objetivo de obter plantas com o transgene em homozigose. Foram obtidos frutos de todos os cruzamentos, e suas sementes foram extraídas. A análise da resistência nas plantas provenientes dessas sementes encontra-se em andamento.

ABSTRACT

TORRES, Leonardo Bolzani, M.S., Universidade Federal de Viçosa, april 2003. **Risk assessment of transgenic yellow passionfruit plants (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) resistant to CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*): Gene flow in *Passiflora* sp.** Advisor: Francisco Murilo Zerbini Junior. Committee Members: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Cláudio Horst Bruckner.

Passionfruit woodiness, caused by *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), is one of the most important diseases of the crop. Management is difficult, and strategies based on vector control, cross-protection and natural resistant have not been successful in keeping the disease under control. As an alternative control strategy, transgenic yellow passionflower plants (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) expressing a non-translatable RNA corresponding to the *nib* and *cp* genes of a CABMV from Minas Gerais state (MG1) were produced. One transgenic line (TE5-10) was resistant to the MG1 isolate by posttranscriptional gene silencing. However, this transgenic line was susceptible to an isolate from Pernambuco state (PE1). The objectives of this work were to estimate the potential of gene flow in yellow passionflower, and to study the inheritance of resistance to CABMV in the transgenic line TE5-10. For the gene flow study, an experimental plot with 2.640 m² was established, consisting of four rows of plants with 210 m each, 3 m apart. Each row consisted of 23 yellow passionflower plants, 10 m apart. At one end of each line, three distinct genotypes were planted, and the remaining of each line was planted with clones from the same plant of a fourth genotype. The percentage of natural insect-mediated pollination was measured along

each line. A study of pollen dispersal from a single plant by wind was also carried out. Results indicate that gene flow mediated by wind dispersal of pollen does not take place at distances greater than 3 m. On the other hand, gene flow mediated by pollen dispersal by the pollinator insect could take place at the maximum measured distance of 210 m, since viable fruit were produced in the plants located at that distance. A decrease in the percentage of pollination along the lines was observed, however this trend was not statistically significant using either parametric or non-parametric models. The large variation observed in the development of each plant and, consequently, of flower density along the lines, might be an explanation for the variation observed in the data. To study resistance inheritance in the transgenic line TE5-10, crosses were carried out between this transgenic line, a susceptible transgenic line (T2-5) and a non-transformed plant. Also, a TE5-10 plant was self-pollinated in order to obtain transgene-homozygous F₂ plants. Viable fruit were obtained for all crosses, and their seed was extracted. Analysis of resistance in the F₂ plants is in progress.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Passiflora*, no qual está classificado o maracujazeiro, é constituído por mais de 500 espécies, sendo mais de 150 destas encontradas no Brasil (Hoehne, 1946; Salomão & Andrade, 1987). O maracujazeiro é originário da América do Sul, sendo as regiões Central e Norte-Nordeste o seu centro de distribuição geográfica (Hoehne, 1946; Salomão & Andrade, 1987). Muitas espécies de *Passiflora* são cultivadas por seus frutos serem comestíveis. As espécies mundialmente mais cultivadas para esse fim são *P. edulis* f. *edulis* Sims., *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg., *P. ligularis* Juss., *P. molissima* Bailey, *P. quadrangularis* L. e *P. alata* Dryand (Martin & Nakasone, 1970; Oliveira, 1987). Outras espécies são cultivadas com diversas finalidades tais como produção de doces e compotas, propriedades medicinais e ornamentação (Freitas, 1987; Oliveira, 1987).

O maracujá-amarelo, *P. edulis* f. *flavicarpa*, é a espécie comercialmente mais cultivada no Brasil. Acredita-se que o maracujá-amarelo tenha sido resultado do cruzamento entre *P. edulis* e uma espécie próxima, possivelmente *P. ligularis*, ou uma mutação em *P. edulis*, ou ainda seria uma forma mutante originária da Austrália (Oliveira & Ferreira, 1991).

A partir do final da década de 60 ocorreu grande expansão da cultura do maracujazeiro no Brasil, inicialmente nas regiões Norte e Nordeste, e em seguida na região Sudeste. Em 1975, Bahia e Minas Gerais eram responsáveis por 55% da produção nacional. Em 1993, os principais estados produtores incluíam Pará, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Rio de Janeiro e Sergipe, representando cerca de 97% da

produção nacional (Bliska *et al.*, 1994; Rey-Bellet, 1991; Suzuki & Lins, 1987). O Brasil é o primeiro produtor mundial de maracujá-amarelo, posição que ocupa há mais de 15 anos (Agrianual, 2003). As regiões Norte e Nordeste são as principais regiões produtoras com 150.569 e 122.012 toneladas, respectivamente (Agrianual, 2003).

O endurecimento dos frutos do maracujazeiro é a virose mais importante da cultura em todo mundo. Foi descrito pela primeira vez na Austrália em 1901 por Allen, citado por Cobb (1901) e Noble (1928). Até pouco tempo acreditava-se que era causado somente pelo *Passionfruit woodiness virus* (PWV), porém com o desenvolvimento de técnicas de clonagem e seqüenciamento descobriu-se que a estirpe da África do Sul do PWV constituía na verdade outra espécie do gênero *Potyvirus*, inicialmente denominada *South African passiflora virus* (SAPV) (McKern *et al.*, 1994). Análises posteriores determinaram que o SAPV consistia na verdade em uma estirpe do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (Sithole Niang *et al.*, 1996). Estudos recentes demonstraram que o CABMV é a principal espécie associada ao endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Brasil (Nascimento, 2001; Santana *et al.*, 1999; Braz, 1999).

Plantas de maracujazeiro infectadas pelo PWV ou CABMV apresentam mosaico e deformação foliar, e produzem frutos pequenos, deformados e com endurecimento do pericarpo. A produtividade e o ciclo da cultura são reduzidos. Tanto o PWV como o CABMV são transmitidos de maneira não-circulativa por várias espécies de afídeos, além de serem facilmente transmitidos via extrato foliar tamponado e por enxertia (Chagas *et al.*, 1981; Costa *et al.*, 1995; McKern *et al.*, 1994; Taylor & Greber, 1973). Esses vírus infectam naturalmente espécies de *Passiflora* e de leguminosas, além de infectarem artificialmente alguns membros das famílias *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Solanaceae* e *Cucurbitaceae* (McKern *et al.*, 1994; Teakle & Widermuth, 1967).

No Brasil, o controle dessa doença tem sido insatisfatório, principalmente devido à natureza não-circulativa da transmissão do vírus pelos afídeos, o que torna ineficiente o controle químico do inseto vetor como método de controle da doença. Além disso, o CABMV infecta diversas espécies silvestres de *Passiflora* e de

leguminosas, que são fontes potenciais de inóculo. Dessa forma a erradicação do vírus torna-se dessa forma inviável (Costa, 1996).

Segundo Costa (1996), a proteção cruzada poderia ser um método viável para o controle desta doença no Brasil. Entretanto, a proteção cruzada exige um tempo considerável para obtenção, seleção e testes de proteção e estabilidade dos isolados fracos. Além disso, podem ocorrer problemas como uma possível mutação que induziria a reversão do isolado fraco para um isolado forte, a quebra da resistência induzida pelo isolado fraco, e principalmente a possibilidade de efeito sinérgico do isolado fraco com outras espécies de vírus na cultura, o que poderia resultar numa doença ainda mais grave, conforme relatado por Pares *et al.* (1985), que descreve um sintoma de necrose do ponteiro causado pela infecção mista do PWV com o *Cucumber mosaic virus* (CMV). Taylor & Kimble (1964) também obtiveram sintomas semelhantes inoculando artificialmente esses dois vírus em plantas de maracujá .

Uma alternativa mais interessante para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro é o uso de cultivares resistentes. Entretanto, variedades resistentes a esta doença não estão disponíveis. Estudos genéticos de espécies de *Passiflora* são escassos, embora *P. suberosa* tenha se mostrado resistente ao endurecimento dos frutos do maracujazeiro em estudos preliminares (Costa, 1996).

O desenvolvimento de variedades comerciais de maracujazeiro resistentes ao endurecimento dos frutos é difícil, pois existem poucas fontes de resistência a essa doença, e essas se encontram em espécies não-comerciais de *Passiflora*, o que acarreta em tempo demasiado longo para o desenvolvimento de variedades resistentes com características agronômicas adequadas. Plantas de maracujazeiro possuem auto-incompatibilidade e também problemas de incompatibilidade inter-específica, o que dificulta o sucesso da autofecundação e do retrocruzamento (Costa, 1996). A maioria das espécies horticulturalmente mais importantes, como *P. edulis*, possui número de cromossomos $2n=18$, porém há casos de variações intra-específicas no número de cromossomos ($2n=12$, $2n=20$, $2n=22$, $2n=24$, $2n=36$ e $2n=84$) relatados em *P. suberosa*, *P. foetida* e *P. pulchella* (Lopes, 1994; Martin & Nakasone, 1970).

Com base nessas considerações, uma alternativa atraente para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro seria a obtenção de plantas transgênicas de

maracujá expressando porções do genoma viral, a chamada resistência derivada do patógeno (RDP). A transformação de plantas com porções do genoma viral freqüentemente dá origem a linhagens de plantas que exibem resistência ao vírus do qual a seqüência foi derivada (Fuchs *et al.*, 1997). O primeiro caso de RDP foi relatado em 1986, com a produção de plantas de fumo que expressavam a proteína capsidial (CP) do vírus do mosaico do fumo (*Tobacco mosaic virus*, TMV) e eram resistentes a esse vírus (Powell-Abel *et al.*, 1986). Nesse trabalho, linhagens transgênicas expressando a proteína capsidial apresentaram um atraso no desenvolvimento dos sintomas após inoculação com o TMV. A resistência foi considerada de amplo espectro, pois era efetiva contra diversas estirpes do vírus. Atualmente, a maioria dos trabalhos visando a produção de plantas transgênicas resistentes a vírus explora o mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (*posttranscriptional gene silencing*, PTGS) (Fuchs *et al.*, 1997). Nesses casos as plantas são transformadas com fragmentos não-traduzíveis do genoma viral, e as linhagens transgênicas expressando mRNA, porém sem expressão de proteína, freqüentemente se mostram imunes à infecção viral. Entretanto essa resistência é altamente específica, sendo eficiente apenas contra isolados virais que possuem altíssima identidade de seqüência (acima de 96%) com o isolado a partir do qual obteve-se a seqüência utilizada para a transformação.

Em 1994, Manders *et al.* (1994) relataram a transformação de *Passiflora edulis* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, permitindo deste modo a introdução de genes de interesse naquela espécie. Braz (1999) transformou plantas de maracujá-amarelo com um fragmento não-traduzível do genoma de um isolado de CABMV de Minas Gerais (CABMV-MG1), correspondente a 2/3 da replicase viral e 1/3 da proteína capsidial. Alfnas (2002) caracterizou estas plantas e constatou que uma das linhagens transgênicas F₁ (TE5-10) era resistente ao isolado CABMV-MG1, porém mostrava-se suscetível a um isolado de Pernambuco (CABMV-PE1). Também foi determinado que o mecanismo de resistência consistia em silenciamento gênico pós-transcricional, e que este mecanismo já se encontrava ativado nas plantas antes da inoculação com o vírus. A especificidade observada na resistência é explicada pela especificidade do mecanismo de PTGS em relação à seqüência utilizada para a

transformação, uma vez que a homologia de sequência entre os isolados MG1 e PE1 é de 93%.

As plantas transgênicas analisadas por Alfenas (2002) encontravam-se em hemizigose, ou seja, possuíam apenas uma cópia do transgene. Trabalhos realizados com plantas transgênicas de mamoeiro expressando uma construção não-traduzível correspondente à proteína capsidial do *Papaya ringspot virus* (PRSV) determinaram o mesmo tipo de especificidade da resistência nas plantas F₁ (hemizigotas) (Lius *et al.*, 1997; Tennant *et al.*, 1994). Após autofecundação e obtenção de linhagens F₂ em homozigose, a resistência foi efetiva contra várias estirpes do vírus. Dessa forma, o estudo da herança da resistência das plantas transgênicas de maracujá-amarelo e a avaliação de linhagens F₂ em homozigose pode revelar alterações no espectro da resistência.

Com base nos trabalhos já desenvolvidos e visando o uso de plantas transgênicas de maracujá-amarelo resistentes ao CABMV em escala comercial, devem ser realizados estudos com o objetivo de avaliar o possível impacto ambiental decorrente do plantio desse material no campo. Segundo Hails (2000), os riscos ecológicos podem ser divididos em três grupos: (i) aqueles que dizem respeito à organização genômica da planta, (ii) o impacto em organismos não-alvo do ecossistema, e (iii) o escape dos transgenes para parentes silvestres (fluxo gênico). Segundo esse mesmo autor, o fluxo gênico é um processo em duas etapas que envolvem a hibridação e o estabelecimento. Considerando a primeira etapa do processo, as culturas podem ser agrupadas em três grupos: (i) aquelas para as quais não existem parentes silvestres, (ii) aquelas em que existe uma limitada possibilidade de hibridação, e (iii) aquelas com várias espécies relacionadas. O maracujá-amarelo, espécie nativa do Brasil e com grande número de espécies silvestres classificadas taxonomicamente no mesmo gênero, pertenceria ao terceiro grupo.

Mesmo em situações nas quais o processo natural de fluxo gênico via polinização ocorra, um número de condicionantes devem ser observadas simultaneamente para que o fluxo gênico cause algum impacto na população selvagem (Doebley, 1990). Em primeiro lugar, deve existir compatibilidade sexual entre as plantas em questão. Também devem ser consideradas as características de polinização

das plantas envolvidas. Plantas alógamas (p.ex., o milho) podem trocar genes de forma relativamente freqüente com outras plantas da mesma espécie ou com plantas de espécies silvestres relacionadas sob condições apropriadas. O fluxo gênico em plantas autógamas (p.ex., o trigo ou a soja) ocorre em menor freqüência. Ademais, a cultura deve ser cultivada em área onde o parente silvestre ocorra naturalmente. Em segundo lugar, deve haver um benefício associado ao gene transferido para que ele persista na população. Normalmente as plantas cultivadas são altamente domesticadas e dificilmente são capazes de sobreviver no ambiente sem intervenção humana. Se uma característica como a resistência a um herbicida é transferida para uma espécie selvagem mas não ocorre pressão de seleção, ou seja, se o herbicida não é utilizado nessa população, a característica não irá conferir maior adaptabilidade e o gene não será estabilizado na população (Council for Biotechnology Information, 2001). No caso do maracujá-amarelo, uma espécie na qual o nível de domesticação é baixo se comparado ao de grandes culturas, a probabilidade de um transgene conferir uma maior adaptabilidade e, conseqüentemente, de se estabelecer no ambiente silvestre é considerável. Além disso, normalmente genes que conferem resistência a patógenos também conferem uma vantagem adaptativa às plantas transgênicas em habitats naturais. Espécies silvestres que possam receber estes genes provavelmente irão aumentar em população, em detrimento de outras (Hails, 2000).

Segundo Skogsmyr (1994), um dos riscos mais discutidos em relação ao cultivo de plantas transgênicas é a possibilidade da perda do controle sobre os genes utilizados. Um grande interesse tem sido demonstrado em relação à dispersão desses genes por meio do pólen, já que grãos de pólen são pequenos e produzidos em grandes quantidades, o que torna difícil o controle de sua dispersão. A disponibilidade de agentes polinizadores pode variar conforme o ano e a época de plantio, sendo influenciada por fatores abióticos como temperatura e umidade e fatores bióticos como a densidade populacional de insetos e a distribuição florística da área. Outro fator importante é o tamanho da área plantada com plantas transgênicas. A hibridação entre plantas transgênicas de rabanete (*Raphanus sativus*) e plantas não transformadas ocorreu em distâncias de até 1000 m (Skogsmyr, 1994).

Colbach *et al.* (1999) demonstraram que o fluxo gênico por meio de troca de sementes e pólen entre plantas transgênicas de canola (*Brassica napus*) tolerantes a herbicida e espécies silvestres relacionadas foi influenciada pelo tamanho da área cultivada, distância entre as áreas e, no caso específico de fluxo gênico via pólen, pela época de florescimento das plantas. Campos maiores atraem um maior número de polinizadores e levam a preferência dos insetos polinizadores pelas plantas transgênicas, pois os insetos coletam pólen e néctar de forma mais eficiente quando podem voar distâncias mais curtas. Essa preferência pode levar a uma especialização dos insetos, ou seja, eles se especializam em coletar pólen e néctar de uma determinada espécie de planta e passam a preferir essa espécie em detrimento de outras. No caso de as plantas transgênicas e as plantas receptoras do pólen serem da mesma espécie ou de espécies relacionadas, essa especialização acarretará em uma maior eficiência na dispersão do gene.

Outra via potencial de escape gênico é particularmente pertinente a plantas transgênicas resistentes a vírus. Em condições de melhoramento tradicional utilizando genes de resistência encontrados em espécies selvagens, a coevolução do vírus com o hospedeiro rapidamente gera novas estirpes virais capazes de infectar plantas contendo o gene de resistência. Grande parte dos trabalhos envolvendo resistência derivada do patógeno para o caso de viroses se baseia no uso do gene da proteína capsidial. Essa estratégia proporciona uma resistência mais duradoura do que aquela obtida em programas de melhoramento tradicional, ou mesmo do que a RDP proporcionada por outros genes virais, uma vez que, para a maioria dos vírus, a proteína capsidial está sujeita a uma pressão de seleção negativa, ou seja, a proteína é altamente conservada e mutações que modificam sua seqüência de aminoácidos são em sua maioria letais ou altamente deletérias para o vírus (Callaway *et al.*, 2001; Ohshima *et al.*, 2002). Contudo, o aumento da freqüência do gene da proteína capsidial em populações de plantas poderia acelerar a taxa de evolução natural de populações de vírus por meio de recombinação. A recombinação é um dos mecanismos mais importantes na evolução dos vírus, e grande parte dos vírus são na verdade um mosaico de diferentes rearranjos de blocos gênicos (Cooper, 1997; Robinson, 1996; Tepfer, 1993). Em condições naturais a recombinação ocorre entre duas moléculas de ácido nucléico virais.

Entretanto, em plantas transgênicas expressando um gene viral, a recombinação pode ocorrer entre o mRNA proveniente do transgene e o RNA viral (Greene & Allison, 1994).

Atualmente, algumas ferramentas e técnicas podem ser empregadas com o objetivo de impedir ou minimizar o escape de genes a partir de cultivos transgênicos. Dentre estas técnicas pode-se citar o controle molecular do escape utilizando “blocos recuperáveis de função”, que consistem em seqüências bloqueadoras ligadas ao gene de interesse e uma seqüência recuperadora, todas em uma única construção. A seqüência bloqueadora interrompe uma determinada função fisiológica ou molecular na planta. A ação da seqüência bloqueadora leva à morte da planta ou a uma alteração do seu fenótipo que acarreta na inabilidade de se reproduzir sexualmente na natureza. A construção recuperadora recupera a função bloqueada, e é regulada externamente por um tratamento específico, químico ou físico, estando inativa sob condições naturais. Kushinov *et al.* (2001) desenvolveram plantas de fumo transformadas com construções expressando os genes *barnase* (construção bloqueadora) e *barstar* (construção recuperadora) sob a ação dos promotores SH-EP (sulfidril endopeptidase, um promotor constitutivo) e um promotor de choque térmico, respectivamente. Em condições normais, as plantas transgênicas expressam barnase e são estéreis. Caso as plantas sejam submetidas a um choque térmico (40°C por 2 horas), o gene *barstar* recupera a fertilidade das plantas, que passam a se reproduzir normalmente.

Outro método que pode ser utilizado é o plantio de culturas-armadilha para o pólen do cultivo transgênico. No caso de espécies que possuem insetos como agentes polinizadores deve-se ter o cuidado de escolher espécies armadilhas que floresçam na mesma época do cultivo de interesse, e que tenham seu pólen coletado pela mesmas espécies de insetos polinizadores do cultivo transgênico. É possível também usar como armadilha a própria cultura, desde que estejam disponíveis genótipos com esterilidade masculina.

Um grande problema enfrentado pelas análises de risco envolvendo fluxo gênico reside no fato que a maioria dos trabalhos é limitada espacial e temporalmente. Para tentar minimizar este problema, Lavigne *et al.* (2002) desenvolveram uma metodologia de estimativa de fluxo gênico baseada na mensuração do fluxo gênico

inverso, ou seja, medindo o fluxo dos genes de plantas silvestres para o cultivo de interesse por meio de marcadores RAPD. O fluxo gênico resulta da observação de impurezas nas sementes da cultura de interesse. O nível normal de impurezas é usualmente conhecido pelos produtores de sementes, e sua estimativa é mais fácil do que rastrear o fluxo em plantas silvestres, devido a maior quantidade de sementes produzidas pela cultura e ao fato de seu perfil genético ser conhecido.

Este projeto tem como objetivos: (i) estimar o potencial de fluxo gênico em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) via dispersão de pólen pelo vento e pelo inseto polinizador, e (ii) estudar a herança da resistência ao CABMV nas plantas transgênicas de maracujá-amarelo produzidas por Braz (1999).

LITERATURA CITADA

- AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo, SP: FNP Consultoria e Agroinformativos. pp.399-405. 2003.
- ALFENAS, P.F. Resistência de maracujazeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) transformados com uma construção derivada do genoma do PWV (*Passionfruit woodiness virus*) a dois isolados do patógeno. Tese M.S., Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 56 p. 2002.
- BLISKA, F.M.; LEITE, R.S.S.F.; GARCIA, A.E.B. Produção do maracujá no Brasil e sua comercialização nas principais centrais de abastecimento. pp. 206-222 In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.) Maracujá, produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB. 1994.
- BRAZ, A.S.K. Clonagem e seqüenciamento dos genes da proteína capsidial e da replicase de um *Potyvirus* causador de endurecimento dos frutos do maracujazeiro, e transformação de maracujá-amarelo com construção derivada desses genes. Tese M.S., Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 101 p. 1999.
- CALLAWAY, A.; GIESMAN-COOKMEYER, D.; GILLOCK, E.T.; SIT, T.L.; LOMMEL, S.A. The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annual Review of Phytopathology*, v. 39, p. 419-460, 2001.
- CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T. Grave moléstia em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flaviparca*) no Estado da Bahia causada por um isolado do

- vírus do “woodiness” do maracujá. *Fitopatologia Brasileira*, v. 6, p. 259-268, 1981.
- COBB, N.A. Woodiness of passionfruit. *Agricultural Gazette of New South Wales*, v. 12, p. 407-418, 1901.
- COLBACH, N.; MEYNARD, J.M.; CLERMONT-DAUPHIN, C.; MESSEAN, A. GENESYS: A model of the effects of cropping system on gene flow from transgenic rapeseed. In: *Gene Flow and Agriculture: BCPC Symposium Proceedings No. 72*, 1999.
- COOPER, J.I. Might transgenes conferring virus resistance harm the environment? pp.115-124 In: McLEAN, G.D.; WATERHOUSE, P.M.; EVANS, G.A. AND GIBBS, M. J. (Ed.) *Commercialization of Transgenic Crops: Risk Benefit and Trade Considerations*. Camberra. 408 pp. CRC for Plant Science and Bureau of Resource Sciences. 1997.
- COSTA, A.F. Comportamento de *Passiflora* spp. diante do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro e a relação entre a nutrição mineral e a interação vírus-*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Tese D.S., Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 129 p. 1996.
- COSTA, A.F.; BRAZ, A.S.K.; CARVALHO, M.G. Transmissão do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro por afídeos (Hemiptera-Aphididae). *Fitopatologia Brasileira*, v. 20, p. 376, 1995.
- Council for Biotechnology Information. Gene flow to wild plant relatives. www.whybiotech.com/html/pdf/Gene_flow_to_wild_plant.pdf. Acessado em 08/05/2001.
- DOEBLEY, J. Molecular evidence for gene flow among *Zea* species. *BioScience*, v. 40, p. 443-448, 1990.
- FREITAS, P.C.D. Possibilidades farmacológicas. pp. 210-217 In: RUGGIERO, C. (Ed.) *Maracujá*. Ribeirão Preto: Legis Summa. 1987.
- FUCHS, M.; FERREIRA, S.; GONSALVES, D. Management of virus diseases by classical and engineered protection. *Molecular Plant Pathology* online 1997. <http://www.bspp.org.uk/mppol/1997/0116fuchs/>

- GREENE, A.E.; ALLISON, R.F. Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. *Science*, v. 263, p. 1423-1425, 1994.
- HAILS, R.S. Genetically modified plants - the debate continues. *Tree*, v. 15, p. 14-18, 2000.
- HOEHNE, F.C. Frutas Indígenas. São Paulo: Instituto de Botânica. 63 p. 1946.
- KUSHINOV, V.; KIMMO, K.; KANERVA, A.; PEHU, E. Molecular control of transgene escape from genetically modified plants. *Plant Science*, v. 160, p. 517-522, 2001.
- LAVIGNE, C.; KLEIN, E.K.; COUVERT, D. Using seed purity data to estimate an average of pollen mediate gene flow from crops to wild relatives. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 104, p. 139-145, 2002.
- LIUS, S.; MANSCHARDT, R.M.; FITCH, M.M.M.; SLIGHTOM, J.L.; SANFORD, J.C.; GONSALVES, D. Pathogen-derived resistance provides papaya with effective protection against *Papaya ringspot virus*. *Molecular Breeding*, v. 3, p. 161-168, 1997.
- LOPES, S.C. Citogenética do maracujazeiro - *Passiflora* spp. pp. 19-23 In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.) Maracujá, produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB. 1994.
- MANDERS, G.; OTONI, W.C.; VAZ, F.B.D.U.; BLACKHALL, N.W.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, v. 13, p. 697-702, 1994.
- MARTIN, F.W.; NAKASONE, H.Y. The edible species of *Passiflora*. *Economical Botany*, v. 24, p. 333-343, 1970.
- MCKERN, N.M.; STRIKE, P.M.; BARNETT, O.W.; DIJKSTRA, J.; SHUKLA, D.D.; WARD, C.W. Cowpea aphid borne mosaic virus-Morocco and South African *Passiflora* virus are strains of the same potyvirus. *Archives of Virology*, v. 136, p. 207-217, 1994.
- NASCIMENTO, A.V.S. Análise filogenética de potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. Tese M.S., Departamento de

- Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE. 55 p. 2001.
- NOBLE, J.R. Some observations on the woodiness or bullet disease of passionfruit. Preceedings of the Royal Society of New South Wales, v. 62, p. 79-98, 1928.
- OHSHIMA, K.; YAMAGUCHI, Y.; HIROTA, R.; HAMAMOTO, T.; TOMIMURA, K.; TAN, Z.; SANO, T.; AZUHATA, F.; WALSH, J.A.; FLETCHER, J.; CHEN, J.; GERA, A.; GIBBS, A. Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: Evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. Journal of General Virology, v. 83, p. 1511-1521., 2002.
- OLIVEIRA, J.C. Melhoramento genético. pp. 218-246 In: RUGGIERO, C. (Ed.) Maracujá. Ribeirão Preto: Legis Summa. 1987.
- OLIVEIRA, J.C.; FERREIRA, F.R. Melhoramento genético do maracujazeiro. pp. 211-239 In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. (Eds.) A cultura de maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEP. 1991.
- PARES, R.D.; MARTIN, A.B.; FITZELL, R.D. Virus-induced tip necrosis of passionfruit (*Passiflora edulis* Sims.). Australian Plant Pathology, v. 14, p. 76-78, 1985.
- POWELL-ABEL, P.; NELSON, R.S.; DE, B.; HOFFMANN, N.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T.; BEACHY, R.N. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science, v. 232, p. 738-743, 1986.
- REY-BELLET, P.A. Aspectos empresariais da industrialização de derivados de maracujá: experiências e perspectivas. pp. 19-21 In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. (Eds.) A cultura de maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEP. 1991.
- ROBINSON, D.J. Environmental risk assessment of release of transgenic plants containing virus-derived inserts. Transgenic Research, v. 5, p. 359-362, 1996.
- SALOMÃO, T.A.; ANDRADE, V.M.M. Botânica. pp. 20-39 In: RUGGIERO, C. (Ed.) Maracujá. Ribeirão Preto: Legis Summa. 1987.

- SANTANA, E.N.; BRAZ, A.S.K.; TORRES, L.B.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZERBINI, F.M. Molecular characterization of *Potyvirus* isolates causing passionfruit woodiness in Brazil. *Virus Reviews and Research*, v. 4, p. 153, 1999.
- SITHOLE NIANG, I.; NYATHI, T.; MAXWELL, D.P.; CANDRESSE, T. Sequence of the 3'-terminal region of a Zimbabwe isolate of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). *Archives of Virology*, v. 141, p. 935-943, 1996.
- SKOGSMYR, I. The effects of sexually traits on gene dispersal. *Field Crops Research*, v. 45, p. 163-170, 1994.
- SUZUKI, O.Y.; LINS, W.B.A. Considerações econômicas brasileiras. pp. 8-19 In: RUGGIERO, C. (Ed.) *Maracujá*. Ribeirão Preto: Legis Summa. 1987.
- TAYLOR, R.H.; GREBER, R.S. Passionfruit woodiness virus. *Descriptions of plant viruses* no. 122. Kew, England: CMI/AAB. 1973.
- TAYLOR, R.H.; KIMBLE, K.A. Two unrelated viruses which cause woodiness of passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 24, p. 173-186, 1964.
- TEAKLE, D.S.; WIDERMUTH, G.B. Host range and particle length of passionfruit woodiness virus. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences*, v. 24, p. 173-186, 1967.
- TENNANT, P.F.; GONSALVES, C.; LING, K.S.; FITCH, M.; MANSCHARDT, R.; SLIGHTOM, J.L.; GONSALVES, D. Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. *Phytopathology*, v. 84, p. 1359-1366, 1994.
- TEPFER, M. Viral genes and transgenic plants. *BioTechnology*, v. 11, p. 1125-1132, 1993.

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DE RISCO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE MARACUJÁ-AMARELO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) RESISTENTES AO CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*): FLUXO GÊNICO EM *Passiflora* sp.

Torres, L.B., Lopes, E.F., Bruckner, C. H., Mizubuti, E.S.G. & Zerbini, F.M. Avaliação de risco de plantas transgênicas de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) Resistentes ao CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*): Fluxo gênico em *Passiflora* sp.

**AVALIAÇÃO DE RISCO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE
MARACUJÁ-AMARELO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)
RESISTENTES AO CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*): FLUXO
GÊNICO EM *Passiflora* sp.***

**Leonardo B. Torres¹, Edimar F. Lopes¹, Claudio H. Bruckner²,
Eduardo S.G. Mizubuti¹ e F. Murilo Zerbini¹**

¹Departamento de Fitopatologia, ²Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG, 36570-000. E-mail: zerbini@ufv.br

(Aceito para publicação em / /)

Autor para correspondência: F. Murilo Zerbini

Torres, L.B., Lopes, E.F., Bruckner, C. H., Mizubuti, E.S.G. & Zerbini, F.M. Avaliação de risco de plantas transgênicas de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) Resistentes ao CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*): Fluxo gênico em *Passiflora* sp.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo realizar uma análise preliminar do potencial de fluxo gênico em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) via dispersão de pólen pelo vento e pelo inseto polinizador. Foi implantado um cultivo experimental de maracujá-amarelo com 2.640 m², consistindo em quatro linhas de 210 m de comprimento espaçadas de três metros, com 23 plantas em cada linha. Nas extremidades das linhas foram plantados três genótipos distintos, e o restante das linhas foi constituído de clones de uma mesma planta de um quarto genótipo. Realizaram-se avaliações da taxa de fecundação natural (via inseto polinizador) ao longo das linhas e estudos de dispersão do pólen pelo vento a partir de uma única planta. Os resultados obtidos indicam que o fluxo gênico via dispersão de pólen pelo vento não ocorre a distâncias superiores a 3 m. Já o fluxo gênico via inseto polinizador poderia ocorrer à distância máxima de 210 m avaliada no experimento, uma vez que frutos foram produzidos nas plantas localizadas a essa distância. Foi observada uma tendência de queda na taxa de fecundação natural ao longo da linha, entretanto essa tendência não foi estatisticamente significativa, nem foi possível ajustar um modelo (paramétrico ou não-paramétrico) aos dados. A grande desuniformidade no desenvolvimento das plantas e,

* Parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal de Viçosa

conseqüentemente, na densidade floral ao longo das duas linhas, pode ter sido um fator complicador.

ABSTRACT

The objective of this work was to estimate the potential of gene flow in yellow passionflower (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). An experimental plot with 2.640 m² was established, consisting of four 210 m lines of plants, 3 m apart. Each line consisted of 23 yellow passionfruit plants, 10 m apart. At one end of each line, three distinct genotypes were planted, and the remaining of each line was planted with clones from the same plant of a fourth genotype. The percentage of natural insect pollination was measured along each line. A study of pollen dispersal from a single plant by wind was also carried out. Results indicate that gene flow mediated by wind dispersal of pollen does not take place at distances over 3 m. On the other hand, gene flow mediated by pollen dispersal by the pollinator insect could take place at the maximum measured distance of 210 m, since viable fruit were produced in the plants located at that distance. A decrease in the percentage of pollination along the lines was observed, however this trend was not statistically significant using either parametric or non-parametric models. The large variation observed in the development of each plant and, consequently, of flower density along the lines, might be an explanation for the variation observed in the data.

INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora*, ao qual pertence o maracujazeiro, é constituído por mais de 500 espécies, sendo mais de 150 destas encontradas no Brasil (Hoehne, 1946; Salomão & Andrade, 1987). O endurecimento dos frutos do maracujazeiro é a virose mais importante da cultura em todo mundo. Até pouco tempo acreditava-se que era causado somente pelo *Passionfruit woodiness virus* (PWV), porém com o emprego de técnicas moleculares demonstrou-se que diversos isolados de vírus causadores da doença pertencem na verdade à espécie *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (McKern *et al.*, 1994; Santana *et al.*, 1999; Sithole Niang *et al.*, 1996). Tanto o PWV como o CABMV são transmitidos de maneira não-circulativa por várias espécies de afídeos (Chagas *et al.*, 1981; Costa *et al.*, 1995; McKern *et al.*, 1994; Taylor & Greber, 1973).

No Brasil, o controle dessa doença tem sido insatisfatório, principalmente devido à natureza não-circulativa da transmissão do vírus pelos afídeos, o que torna ineficiente o controle químico do vetor como método de controle da doença. Não há cultivares resistentes ou tolerantes à doença, e tentativas de controle por meio de proteção cruzada não obtiveram sucesso até o presente (Costa, 1996; Novaes & Rezende, 2001).

Uma alternativa para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro seria a resistência derivada do patógeno (RDP) (Fuchs *et al.*, 1997). Com esse objetivo, Braz (1999) transformou plantas de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) com um fragmento não-traduzível do genoma de um isolado de CABMV de Minas Gerais (CABMV-MG1), correspondente a 2/3 da replicase viral e 1/3 proteína capsidial. Alfenas (2002) caracterizou estas plantas e constatou que uma das linhagens transgênicas obtidas era resistente ao isolado CABMV-MG1, porém suscetível ao isolado CABMV-PE1 (de Pernambuco), o que era esperado uma vez que o mecanismo de resistência é baseado em silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS).

A utilização das tecnologias de transgenia no melhoramento de plantas cultivadas é uma realidade. Contudo, a utilização destes materiais em escala comercial deve ser antecedida de estudos para avaliação dos riscos potenciais e reais para o ser humano e o meio ambiente.

Segundo Hails (2000), os riscos ecológicos de plantas transgênicas podem ser divididos em três grupos: (i) aqueles que dizem respeito à organização genômica da planta, (ii) o impacto em organismos não-alvo do ecossistema, e (iii) o escape dos transgenes para parentes silvestres (fluxo gênico). Segundo esse mesmo autor, o fluxo gênico é um processo em duas etapas que envolve a hibridação (transferência do gene) e o estabelecimento (sua fixação na população). Considerando a primeira etapa do processo, as culturas podem ser agrupadas em três grupos: (i) aquelas para as quais não existem parentes silvestres, (ii) aquelas em que existe uma limitada possibilidade de hibridação, e (iii) aquelas com várias espécies relacionadas. O maracujá-amarelo é uma espécie nativa com um grande número de espécies silvestres classificadas taxonomicamente no mesmo gênero e tendo como principal agente polinizador as abelha do gênero *Xilocopa*. Dessa forma, pertenceria ao terceiro grupo.

Este trabalho teve como objetivo estimar o potencial de fluxo gênico em maracujá-amarelo via dispersão de pólen pelo vento e pelo inseto polinizador.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Mudas de maracujá-amarelo foram produzidas a partir de estacas de quatro genótipos da coleção de germoplasma de *Passiflora* da UFV (genótipos 04, 11, 13 e 28), conforme descrito por Salomão *et al.* (2002). As estacas permaneceram em vasos com areia estéril por 30 dias e uma vez enraizadas foram transferidas para sacos plásticos contendo uma mistura de solo e esterco, onde permaneceram até atingir um comprimento de aproximadamente 30 cm de altura.

Localização experimental

As mudas obtidas foram plantadas em área experimental localizada no campus da Universidade Federal de Viçosa, município de Viçosa, MG. A área possui uma topografia com declive moderado, voltada para oeste. Quatro linhas de espaldeiras de 210 m espaçadas 3 m entre linhas e 10 m entre plantas foram preparadas. As linhas encontravam-se em sentido perpendicular à declividade do terreno. As mudas foram plantadas em covas de 30 cm³. As espaldeiras foram construídas com mourões de eucalipto de 15 cm de diâmetro com um arame esticado a uma altura de 1,80 m. Nas extremidades de cada linha foram plantadas três mudas de três genótipos distintos (4, 11, 13), na mesma cova, e o restante das linhas foi constituído de plantas-clone do genótipo 28. Uma vez que plantas de maracujá-amarelo são auto-incompatíveis (Rêgo *et al.*, 2000), qualquer fruto observado nas plantas do genótipo 28 (ao longo das linhas) são necessariamente provenientes de flores fecundadas com grãos de pólen originados das plantas dos genótipos 4, 11 ou 13 (localizadas nas extremidades das linhas).

Dispersão de pólen pelo vento

Com a finalidade de construir um gradiente de dispersão do pólen pelo vento foram distribuídas armadilhas de deposição, perpendicularmente e diretamente abaixo de uma planta localizada na primeira linha. Cada armadilha consistia em uma placa de Petri com 9 cm de diâmetro com o fundo recoberto por uma fina camada de vaselina. As placas foram espaçadas em 0,5 m até 5 m de distância da linha (na direção externa à área experimental) ou 3 m de distância (na direção interna à área), conforme diagramado na Figura 1. As armadilhas foram distribuídas na parte da manhã, antes da antese, e recolhidas ao final do dia. A contagem de grãos de pólen nas armadilhas foi realizada com o auxílio de binocular estereoscópica. Também foi determinada a densidade floral (flores em antese/metro linear de espaldeira) nos dias de avaliação. Foram realizadas quatro avaliações, durante os meses de fevereiro e março de 2003.

Dispersão de pólen mediada por insetos polinizadores

Com o objetivo de avaliar o potencial de dispersão do pólen pelo inseto polinizador, abelhas do gênero *Xylocopa* (Hymenoptera: Anthophoridae), foram realizados estudos de eficiência de polinização utilizando-se a mesma área experimental descrita anteriormente. Foram realizadas avaliações periódicas a fim de determinar se a porcentagem de fecundação das flores ao longo da linha é constante, ou se existe um gradiente decrescente a partir das plantas doadoras de pólen na cabeceira até o final da linha. Pela manhã, antes da antese, as flores que iriam sofrer antese naquele dia, tanto nas plantas doadoras quanto nas plantas-clone ao longo das linhas, foram marcadas com fitas da mesma cor. Após sete dias determinou-se o número de flores fecundadas. Foram realizadas 27 avaliações, entre novembro de 2002 e março de 2003.

Análise estatística

O padrão de distribuição dos dados de número de flores e da porcentagem de flores fecundadas em função da distância foi analisado por meio de técnicas de análise exploratória de dados. Foram construídos gráficos de dispersão para exame da linearidade da relação. Realizou-se análise de correlação de Pearson entre número de flores em antese e porcentagem de flores fecundadas em relação à distância as plantas doadoras. A seguir, realizaram-se análises de regressão paramétrica linear entre as variáveis medidas e a distância. Esta relação foi também analisada por ajuste não-paramétrico por meio da técnica LOESS (“Locally Weighted Scatter Plot Smoothing”) (Härdle, 1992). As análises estatísticas foram realizadas com o programa “The SAS System, ver 8.0” (SAS Institute, Cary, North Carolina, EUA).

RESULTADOS

Dispersão de pólen pelo vento

A maioria dos grãos de pólen foi coletada até 2,5 m da planta doadora, frequentemente na forma de grumos contendo dezenas de grãos (Figura 2). Foi observada uma distribuição mais homogênea dos grãos na entrelinha em relação à área externa, o que pode ser explicado pela contribuição da planta localizada na linha 2 (Figura 3). Nas distâncias superiores a 2,5 m observou-se uma queda brusca na quantidade de grãos de pólen coletados, e a maior parte dos grãos encontrava-se isolados.

Dispersão de pólen mediada por insetos polinizadores

Os dados de porcentagem de fecundação, coletados ao longo de 27 dias, foram selecionados com base na densidade floral observada em cada dia de avaliação (Quadro 1).

Foram escolhidos os cinco dias nos quais as plantas apresentaram valores próximos ou dentro da faixa de 0,8 a 1,2 flores/m linear de espaldeira, valor relatado como o ideal para a fecundação natural (Silva *et al.*, 1999). Além disso, foram avaliadas apenas as linhas 1 e 2, por apresentarem maior uniformidade no crescimento das plantas e maior número de flores que sofreram antese.

O gráfico de porcentagem de fecundação em relação à distância da planta doadora de pólen indica uma tendência de queda na porcentagem de fecundação ao longo da linha (Figura 4). Entretanto, não foi possível ajustar nenhum tipo de modelo (paramétrico ou não-paramétrico) aos dados, pois os coeficientes obtidos das equações não foram estatisticamente significativos. Mesmo assim, um dado de grande relevância foi a observação de flores fecundadas nas plantas localizadas a 210 m da planta doadora (Figura 4).

DISCUSSÃO

A possibilidade de fluxo gênico entre plantas transgênicas e silvestres, com a transferência do transgene para essas últimas, é um dos maiores riscos potenciais associados ao plantio em larga escala de plantas geneticamente modificadas. Diversos estudos já foram realizados em condições de campo visando quantificar a frequência de fluxo gênico (Eastham & Sweet, 2002; Jorgensen *et al.*, 1998; Luby & McNicol, 1995; Oard *et al.*, 2000; Snow *et al.*, 2002). Os resultados demonstram que o fluxo gênico é altamente dependente de fatores bióticos e abióticos, não sendo possível extrapolar dados obtidos de uma espécie de planta para outra. A completa inexistência de dados de fluxo gênico em espécies de *Passiflora* motivou o presente estudo, com o objetivo de fornecer informações, mesmo que preliminares, que possam subsidiar um futuro plantio em campo de plantas transgênicas de maracujá-amarelo resistentes ao CABMV.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem, em primeiro lugar, que o fluxo gênico a partir de plantas de maracujá-amarelo devido à dispersão de pólen pelo vento não ocorre em situações de campo. Os resultados apresentados nas Figuras 1 e 2 estão de acordo com os resultados relatados por Akamine & Girolani (1959), que afirmam que em condições de campo a fecundação do maracujá-amarelo pelo vento é praticamente nula. A grande maioria dos grãos é depositada em distâncias de até 2,5 m, distância inferior ao espaçamento entre plantas em plantios comerciais (3 m). Os grãos de pólen de maracujá-amarelo são considerados de grande tamanho, além disso, frequentemente se apresentam agrupados em grumos contendo dezenas ou mesmo centenas de grãos. Os grãos observados em distâncias

superiores a 2,5 m encontravam-se em sua maioria isolados ou em pequenos grumos. Apenas cinco grãos de pólen foram observados a 5 m, em uma mesma placa em um único dia de avaliação. De acordo com Akamine & Girolani (1959), o número mínimo de grãos de pólen necessário para que ocorra a fertilização é de aproximadamente 190.

Entretanto, é significativa a possibilidade de fluxo gênico devido à dispersão de pólen mediado pelo principal inseto polinizador, as abelhas do gênero *Xylocopa* (conhecidas popularmente como mamangavas), pelo menos até a distância de 210 m a partir das plantas doadoras de grãos de pólen. A taxa média de fecundação natural observada nas plantas localizadas a 210 m das doadoras foi de 11,46%, comparado com 38,34% para as plantas localizadas a 10 m. Conclui-se que, caso plantas transgênicas de maracujá-amarelo venham a ser plantas no campo, a bordadura de plantas de maracujá não-transgênicas com o objetivo de diluir o pólen transgênico deverá possuir uma largura superior a 210 m. Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho não permitem determinar a largura precisa dessa bordadura, uma vez que não foi possível ajustar nenhum modelo de regressão aos dados. Regressões paramétricas e não-paramétricas buscando uma equação que descrevesse a tendência decrescente da porcentagem de fecundação em função da distância forneceram coeficientes estatisticamente não-significativos, ou seja, não foi possível estabelecer uma relação de causa e efeito entre a queda na porcentagem de fecundação observada e a distância da planta doadora.

Algumas distorções observadas no experimento podem explicar a impossibilidade de se ajustar um modelo estatístico aos dados. Em primeiro lugar, verificou-se um aumento considerável na porcentagem de fecundação nas distâncias em torno de 100 m. Nessa posição, apenas uma flor sofreu antese na linha 1 durante os cinco dias selecionados para avaliação, e essa flor foi fecundada (ou seja, a porcentagem de fecundação nessa posição foi de 100%). Portanto, ao se calcular a porcentagem de fecundação média nas duas linhas naquela distância obteve-se um valor artificialmente elevado. Da mesma forma, nas distâncias de 120 a 140 m observou-se um número reduzido de flores que sofreram antese nos cinco dias selecionados para avaliação (Figura 5), elevando artificialmente a porcentagem de fecundação também nessa região. Além disso, não é possível descartar a possibilidade de entrada de pólen exógeno ao experimento. Como não foi possível obter um isolamento total do experimento em relação a plantas voluntárias de maracujá, a visita de abelhas carregando grãos de pólen de tais plantas pode ter influenciado nas porcentagens de fecundação observadas. Novas avaliações deverão ser realizadas durante a próxima temporada de florescimento, de outubro de 2003 a março de 2004, quando as plantas deverão apresentar um grau de desenvolvimento

uniforme e a densidade floral ao longo da linha deverá ser constante e dentro da faixa ótima para fecundação natural. Em tais condições, mesmo que se observe fecundação a 210 m das plantas doadoras, o ajuste de um modelo estatístico de regressão deverá permitir a determinação da distância necessária para que não se obtenha fecundação a partir dessas plantas.

LITERATURA CITADA

- AKAMINE, E.K.; GIROLANI, G. Pollination and fruit set in yellow passionfruit. Technical bulletin 39. Honolulu: University of Hawaii, Agric. Exp. Sta. 44 p. 1959.
- ALFENAS, P.F. Resistência de maracujazeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) transformados com uma construção derivada do genoma do PWV (*Passionfruit woodiness virus*) a dois isolados do patógeno. Tese M.S., Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 56 p. 2002.
- BRAZ, A.S.K. Clonagem e seqüenciamento dos genes da proteína capsidial e da replicase de um *Potyvirus* causador de endurecimento dos frutos do maracujazeiro, e transformação de maracujá-amarelo com construção derivada desses genes. Tese M.S., Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 101 p. 1999.
- CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T. Grave moléstia em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flaviparca*) no Estado da Bahia causada por um isolado do vírus do “woodiness” do maracujá. *Fitopatologia Brasileira*, v. 6, p. 259-268, 1981.
- COSTA, A.F. Comportamento de *Passiflora* spp. diante do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro e a relação entre a nutrição mineral e a interação vírus-*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Tese de Doutorado, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 129 p. 1996.
- COSTA, A.F.; BRAZ, A.S.K.; CARVALHO, M.G. Transmissão do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro por afídeos (Hemiptera-Aphididae). *Fitopatologia Brasileira*, v. 20, p. 376, 1995.
- EASTHAM, K.; SWEET, J. Genetically modified organisms (GMOs): The significance of gene flow through pollen transfer. Environmental issue report 28. Copenhagen, Dinamarca: European Environment Agency. 75 p. 2002.
- FUCHS, M.; FERREIRA, S.; GONSALVES, D. Management of virus diseases by classical and engineered protection. *Molecular Plant Pathology* online 1997. <http://www.bspp.org.uk/mppol/1997/0116fuchs/>.

- HAILS, R.S. Genetically modified plants - the debate continues. *Tree*, v. 15, p. 14-18, 2000.
- HÄRDLE, W. Applied nonparametric regression. New York: Cambridge University Press. 1992.
- HOEHNE, F.C. Frutas Indígenas. São Paulo: Instituto de Botânica. 63 p. 1946.
- JORGENSEN, R.B.; ANDERSEN, B.; P., T. Introgression of crop genes from oilseed rape (*Brassica napus*) to related wild species - An avenue for the escape of engineered genes. In: International Symposium on Brassicas, Anais. p. 211-217, 1998.
- LUBY, J.J.; MCNICOL, R.J. Gene flow from cultivated to wild raspberries in Scotland: Developing a basis for risk assessment for testing and deployment of transgenic cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 90, p. 1133-1137, 1995.
- MCKERN, N.M.; STRIKE, P.M.; BARNETT, O.W.; DIJKSTRA, J.; SHUKLA, D.D.; WARD, C.W. Cowpea aphid borne mosaic virus-Morocco and South African Passiflora virus are strains of the same potyvirus. *Archives of Virology*, v. 136, p. 207-217, 1994.
- NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M. Problemas no controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro utilizando estirpes fracas do *Passionfruit woodiness virus* (PWV). *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, p. 519, 2001.
- OARD, J.; COHN, M.A.; LINScombe, S.; GEALY, D.; GRAVOIS, K. Field evaluation of seed production, shattering, and dormancy in hybrid populations of transgenic rice (*Oryza sativa*) and the weed, red rice (*Oryza sativa*). *Plant Science*, v. 157, p. 13-22, 2000.
- RÊGO, M.M.; RÊGO, E.R.; BRUCKNER, C.H.; SILVA, E.A.M.D.; FINGER, F.L.; PEREIRA, K.J.C. Pollen tube behavior in yellow passionfruit following compatible and incompatible crosses. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 101, p. 685-689, 2000.
- SALOMÃO, L.C.C.; PEREIRA, W.E.; DUARTE, R.C.C.; SIQUEIRA, D.L.D. Propagação por estaquia dos maracujazeiros doce (*Passiflora alata* Dryand.) e amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* Deg.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 24, p. 163-167, 2002.
- SALOMÃO, T.A.; ANDRADE, V.M.M. Botânica. pp. 20-39 In: RUGGIERO, C. (Ed.) Maracujá. Ribeirão Preto: Legis Summa. 1987.
- SANTANA, E.N.; BRAZ, A.S.K.; TORRES, L.B.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZERBINI, F.M. Molecular characterization of *Potyvirus* isolates causing passionfruit woodiness in Brazil. *Virus Reviews and Research*, v. 4, p. 153, 1999.
- SILVA, M.M.D.; BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.; MOLINA-RUGAMA., A.J. Número floral, clima, densidad, poblacional de *Xylocopa* spp. (Hymenoptera: Anthophoridae) y polinización del maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Revista de Biología Tropical*, v. 47, p. 711-718, 1999.

- SITHOLE NIANG, I.; NYATHI, T.; MAXWELL, D.P.; CANDRESSE, T. Sequence of the 3'-terminal region of a Zimbabwe isolate of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). *Archives of Virology*, v. 141, p. 935-943, 1996.
- SNOW, A.; MALLORY-SMITH, C.; ELLSTRAND, N.; HOLT, J. (Eds.) Ecological and agronomic consequences of gene flow from transgenic crops to wild relatives. Columbus, Ohio, EUA: The Ohio State University. 187 p. 2002.
- TAYLOR, R.H.; GREBER, R.S. Passionfruit woodiness virus. *Descriptions of plant viruses*, no. 122. Kew, England: CMI/AAB. 1973.

Quadro 1. Densidade de flores em antese observada nas plantas de maracujá-amarelo localizadas nas linhas 1 e 2, durante os 27 dias de avaliação. Os cinco dias nos quais foram observadas as melhores densidades florais estão destacados em itálico.

DIA	DENSIDADE FLORAL (flores/metro linear)	
	Linha 1	Linha 2
19/11/2002	0,009524	0,02381
20/11/2002	0,004762	0,009524
21/11/2002	0,004762	0,028571
22/11/2002	0	0,019048
25/11/2002	0,009524	0,009524
26/11/2002	0,038095	0,057143
27/11/2002	0,019048	0,042857
28/11/2002	0,028571	0,071429
29/11/2002	0,038095	0,038095
30/11/2002	0,014286	0,019048
01/12/2002	0,038095	0,061905
02/12/2002	0,014286	0,038095
03/12/2002	0,004762	0,061095
04/12/2002	0	0,028571
05/12/2002	0,014286	0,038095
06/12/2002	0,02381	0,066667
11/12/2002	0,128571	0,2
17/12/2002	0,228571	0,257143
18/12/2002	0,185714	0,104762
19/12/2002	0,152381	0,090476
20/12/2002	0,071429	0,080952
<i>08/01/2003</i>	<i>0,557143</i>	<i>0,604762</i>
10/01/2003	0,157143	0,114286
<i>22/01/2003</i>	<i>0,871429</i>	<i>1,014286</i>
<i>27/01/2003</i>	<i>1,057143</i>	<i>1,195238</i>
<i>07/03/2003</i>	<i>0,757143</i>	<i>0,795238</i>
<i>11/03/2003</i>	<i>0,642857</i>	<i>0,733333</i>

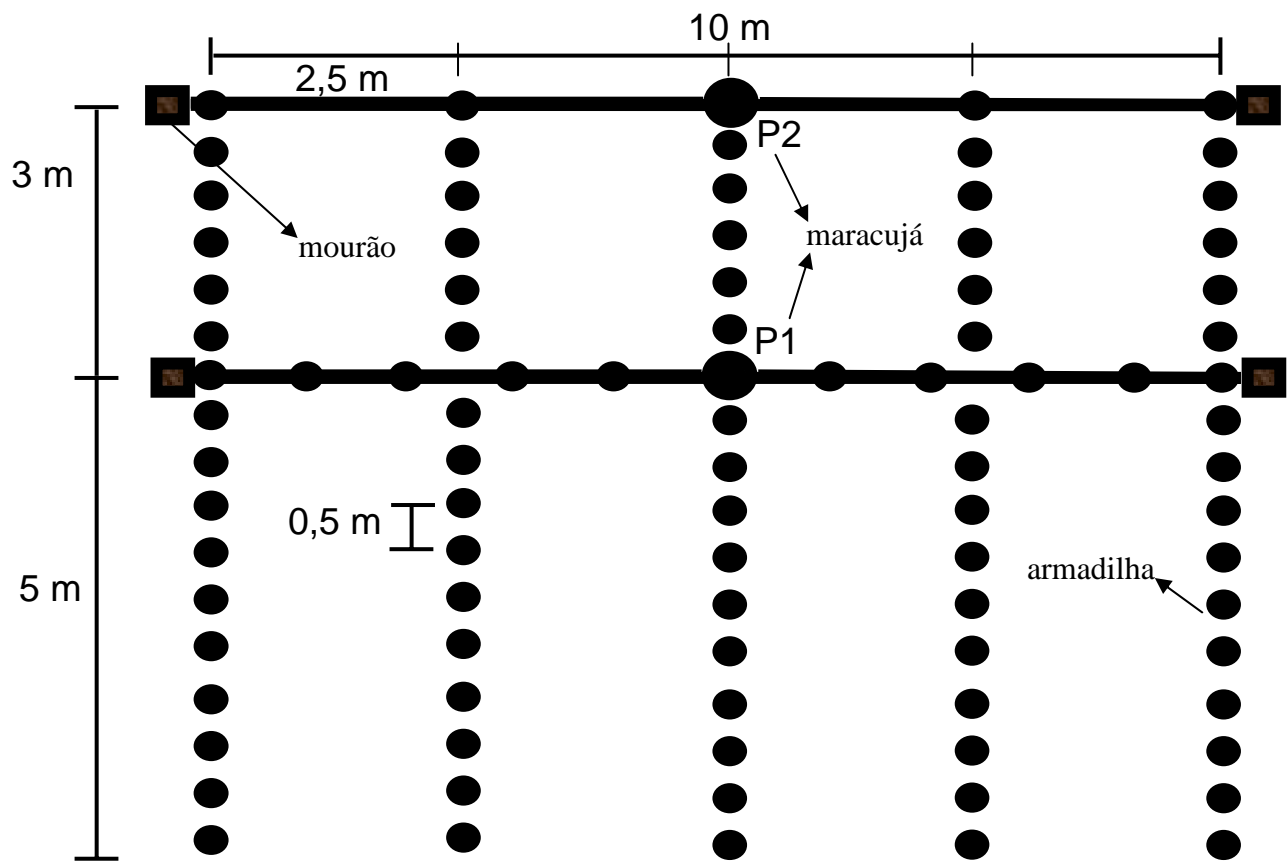


Figura 1. Distribuição das armadilhas de deposição para construção do gradiente de dispersão de pólen pelo vento a partir de uma planta doadora de pólen (P1, localizada na linha 1 da área experimental). P2, planta localizada na linha 2 da área experimental.

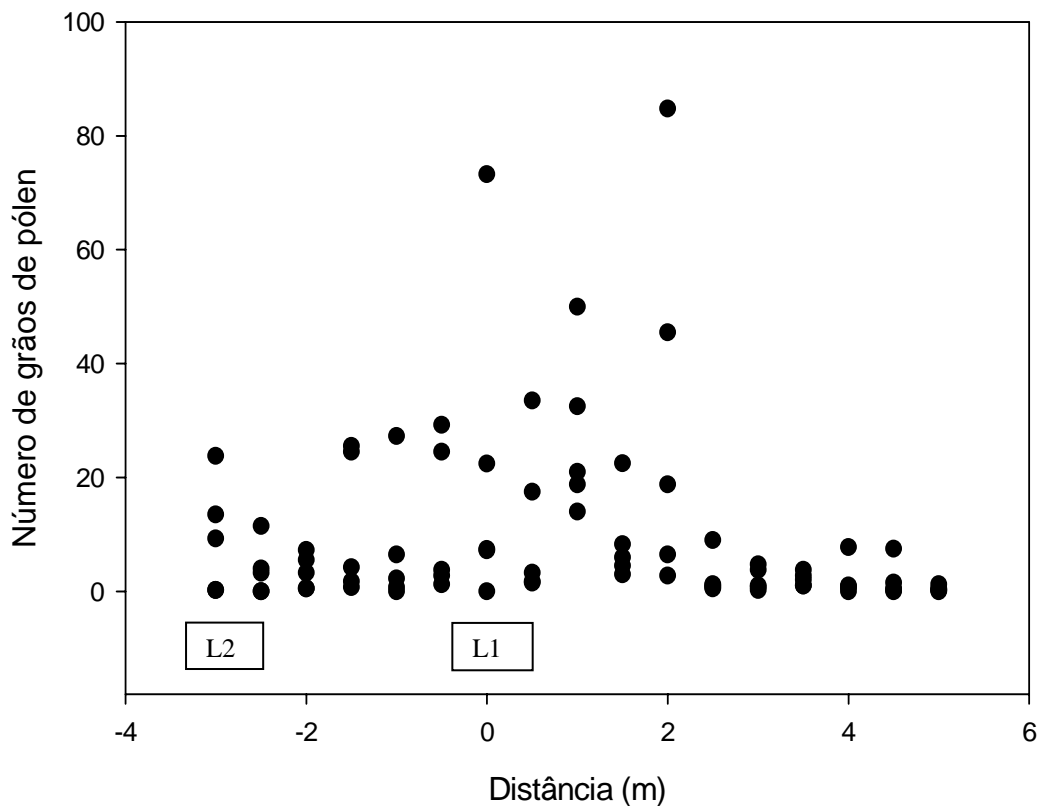


Figura 2. Número de grãos de pólen coletados nas armadilhas de deposição, distribuídas a partir de uma planta de maracujá-amarelo localizada na linha 1 (L1) da área experimental (distância 0). Cada ponto constitui a média do número de grãos coletados naquela distância, nas quatro avaliações realizadas. Valores de distância positiva referem-se às armadilhas distribuídas na parte externa ao experimento, e valores negativos referem-se às armadilhas distribuídas na entrelinha. Na distância -3 está localizada a linha 2 (L2).

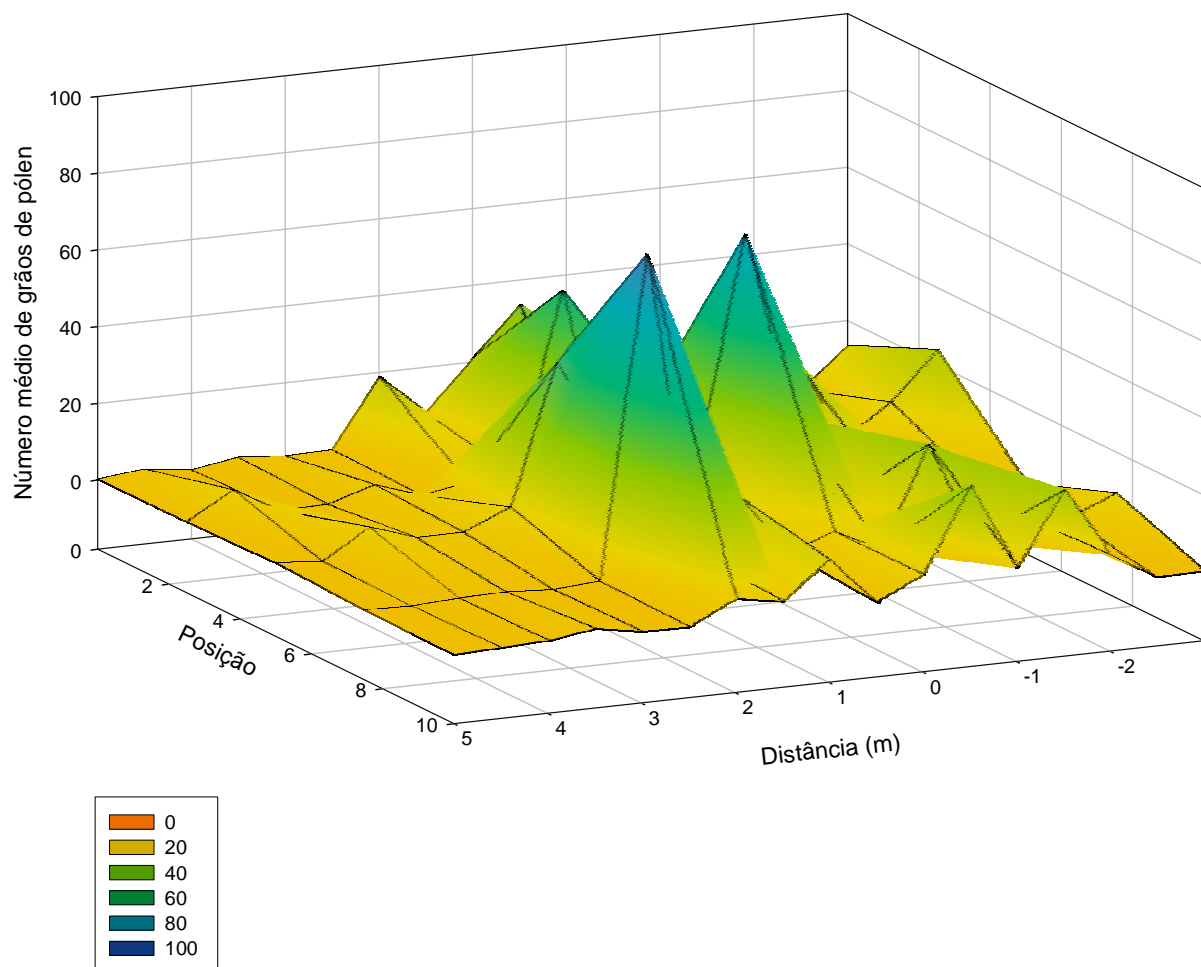


Figura 3. Número de grãos de pólen coletados nas armadilhas de deposição, distribuídas a partir de uma planta de maracujá-amarelo localizada na linha 1 da área experimental (distância 0). Valores de distância positiva referem-se às armadilhas distribuídas na direção externa ao experimento, e valores negativos referem-se às armadilhas distribuídas na direção interna ao experimento. Na distância -3 está localizada a linha 2. Os valores apresentados constituem a média das quatro avaliações para cada armadilha.

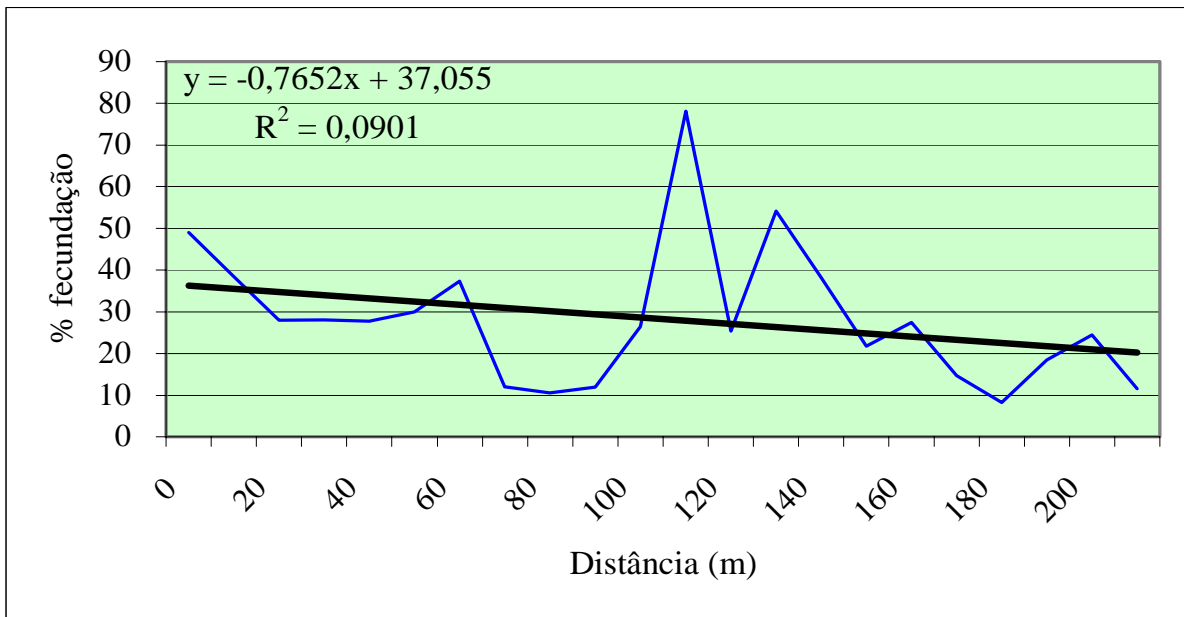


Figura 4. Porcentagem média de fecundação de plantas de maracujá-amarelo em função da distância em relação às plantas doadoras de grãos de pólen. Os valores apresentados contituem as médias para as plantas localizadas na mesma distância nas linhas 1 e 2 para os cinco dias de avaliação. A linha obtida por meio de regressão linear paramétrica e sua equação também são apresentadas.

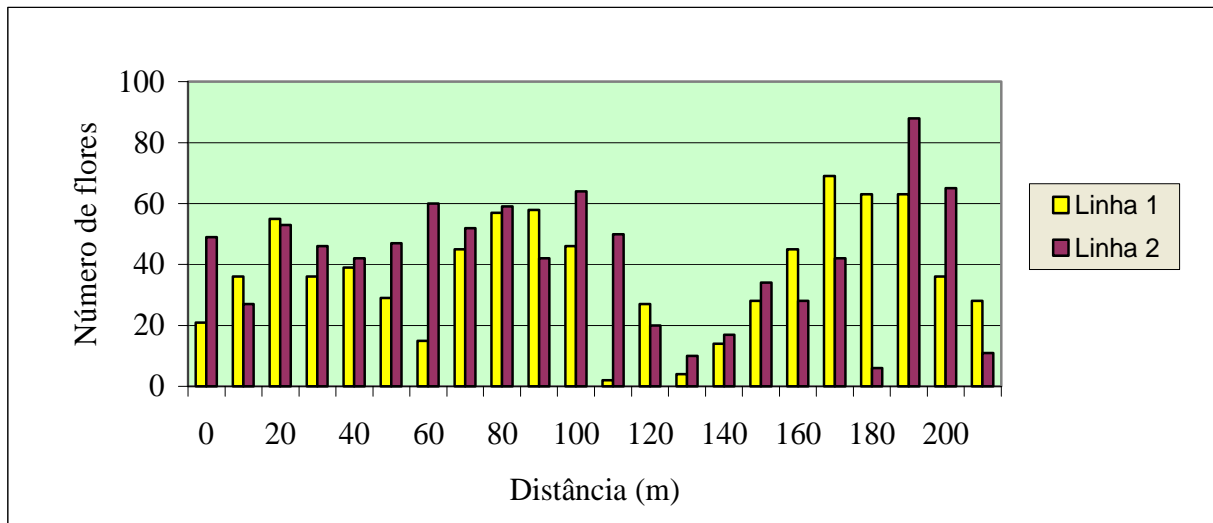


Figura 5. Número total de flores em antese ao longo das linhas 1 e 2, nos cinco dias de avaliação.

APÊNDICE

HERANÇA DA RESISTÊNCIA EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE MARACUJÁ-AMARELO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) RESISTENTES AO CABMV

A fim de determinar o comportamento da herança da resistência em plantas transgênicas expressando um RNA de origem viral, foram realizados todos os cruzamentos possíveis entre a planta transgênica resistente (linhagem TE5-10), uma planta transgênica suscetível (linhagem T2-5), e uma planta não-transformada (NT) (Quadro A1). As flores que iriam sofrer antese em determinado dia foram ensacadas utilizando-se sacos de papel, e após a antese foram realizados os cruzamentos utilizando-se um cotonete para tocar na antera da flor paterna, coletando o pólen, e em seguida tocar no estigma da flor materna, efetuando a polinização. Após os cruzamentos as flores foram novamente ensacadas para evitar contaminação, e envoltas em uma rede para evitar a queda dos frutos por ocasião do amadurecimento e abscisão. Os cruzamentos foram realizados nos dois sentidos, ou seja, cada planta foi ao mesmo tempo doadora e receptora de pólen. Após a abscisão dos frutos foram coletadas as sementes. O arilo das sementes foi retirado com auxílio de areia autoclavada e cal virgem.

Quadro A1. Frutos obtidos dos cruzamentos realizados entre plantas transgênicas resistente e suscetível, e planta não-transformada de maracujá-amarelo.

PROGENITOR MATERNO	PROGENITOR PATERNO	NÚMERO DO FRUTO	DATA DA FECUNDAÇÃO
TE5-10 (Transgênica, resistente)	TE5-10 (autofecundação)	07	03/01/03
	TE5-10 (autofecundação)	12	31/01/03
	TE5-10 (autofecundação)	15	06/02/03
	T2-5	14	05/02/03
	T2-5	05	06/01/03
	NT	06	04/01/03
T2-5 (Transgênica, suscetível)	NT	08	29/11/02
	TE5-10	13	24/01/03
	TE5-10	16	05/02/03
NT (Não-transformada)	TE5-10	1	02/01/03
	TE5-10	2	02/01/03
	TE5-10	3	30/12/02
	T2-5	4	05/11/02

Para determinar se a resistência se comporta da mesma forma em estado de homozigose foram realizadas autofecundações na planta transgênica resistente (Quadro 1). Para tanto, as flores que sofreram antese no dia foram cobertas com sacos de papel e nelas foram efetuadas duas polinizações, uma às 13:00 horas e outra por volta das 17:00 horas. Os frutos originados dessas autofecundações foram coletados e as sementes extraídas conforme descrito anteriormente.

As plantas provenientes de cada cruzamento serão inoculadas com os isolados MG1 e PE1 do CABMV, a fim de verificar se a resistência é transmitida de forma estável para a F₂, e se a presença do transgene em homozigose aumenta o espectro da resistência. Esses trabalhos encontram-se em andamento.