



MAMÃO TRANSGÊNICO

Manoel Teixeira Souza Júnior
Eng. Agr., M.Sc., Ph.D. - Embrapa Mandioca e
Fruticultura - A disposição da Embrapa
Recursos Genéticos e Biotecnologia.
msouza@cenargen.embrapa.br

Uso da engenharia genética para obter resistência ao vírus da mancha anelar

1) O mamoeiro (*Carica papaya* L.) e o vírus da mancha anelar (PRSV):

O Brasil é o maior produtor de mamão (*Carica papaya* L.), responsável por aproximadamente 40% da produção mundial. Os últimos dados estatísticos indicam que o Brasil plantou 39.323 hecta-

res desta fruteira em 1997, produzindo 1.531.022.000 frutos, com um valor de produção de aproximadamente cento e oitenta milhões de reais (IBGE.SIDRA, 2000). Porém, somente em torno de 1% de todo o mamão produzido no Brasil é exportado, tendo rendido próximo a dez milhões de dólares americanos em 1998 (SECEX/MDIC, 2000).

O mamão é um fruto com alto valor nutritivo. Um estudo comparativo do valor nutritivo de diversas frutas de regiões tropicais, subtropicais e temperadas, apontou o mamão como a primeira colocada do "ranking" (Burke, 1992). Segundo este estudo, meio mamão (~200 g) apresenta 61% da vitamina A recomendada para a dieta humana, além de 157% da vitamina C, 11% de potássio, 11% das fibras, 3% da niacina, 3% da tiamina, 3% da riboflavina, 1% do ferro, e 4% do cálcio, sendo superior em termos nutritivos a uma laranja, a uma banana ou a uma maçã. Além disso, o mamoeiro também destaca-se por ser uma fruteira capaz de produzir frutos o ano todo, sob irrigação. De fato, poucas plantas em fundo de quintal são suficientes para garantir uma fonte contínua de alimento suplementar de alto valor nutritivo para uma família de tamanho médio.

As principais cultivares de mamoeiro atualmente exploradas no Brasil são: 'Sunrise Solo', 'Improved Sunrise Solo cv. 72/12', 'Golden' e 'Tainung #1'. Os frutos das três primeiras são piriformes, variando de

350 a 600 gramas, e são corriqueiramente chamados de mamão "papaya" ou "havaí" (Figura 1). Enquanto que os frutos do híbrido Tainung #1 são alongados, variando de 800 a 1500 gramas, e conhecidos como mamão "formosa".

Dentre os fatores que limitam esta cultura no Brasil, destaca-se a "mancha anelar do mamoeiro" ou "mosaico" (Figura 2). Esta doença é o principal problema fitossanitário desta cultura no mundo, sendo causada por um vírus, o vírus da mancha anelar do mamoeiro ou papaya ringspot virus (PRSV). Mamoeiros atacados por essa doença apresentam clorose e mosaico nas folhas jovens, as quais perdem considerável área foliar à medida que maturam, resultando em diminuição na taxa de crescimento da planta e, conseqüentemente, na produtividade. Além dos citados sintomas nas folhas, as plantas doentes também apresentam estrias oleosas na parte superior do caule, e mancha anelares nos frutos. As manchas anelares cobrindo a superfície dos frutos reduzem substancialmente a aceitação desses no mercado. Um campo pode apresentar 100% das plantas infectadas em um período de 4 a 7 meses após o plantio, se nenhuma forma de controle for utilizada (Ishii, 1972; Barbosa & Paguio, 1982).

Diversas estratégias já foram aplicadas visando o controle da mancha anelar. Dentre elas cabe citar: a) os programas fitossanitários baseados na eliminação das plantas sintomáticas, b) o uso de plantas toleran-



Figura 1: Planta hermafrodita de mamoeiro do grupo 'Solo', conhecido como mamão "havaí"

tes desenvolvidas em programas de melhoramento genético convencional, e c) o uso de proteção cruzada, onde uma estirpe atenuada do vírus é utilizada como “vacina”, protegendo a planta do ataque de estirpes severas (Isherwood, 1992; Rezende & Costa, 1993; Yeh & Gonsalves, 1994). Nenhuma dessas estratégias garante um controle amplo e duradouro. Atualmente, o Estado do Espírito Santo, segundo maior produtor Brasileiro, apresenta áreas onde a doença esta sob controle devido aplicação de um programa fitossanitário bastante severo. Porém, o sucesso deste programa a longo prazo é questionado, haja vista que existem exemplos de sucessos anteriores que acabaram sendo inviabilizados com o tempo (Gonsalves, 1998).

2) Obtenção de mamoeiros expressando o gene da capa protéica do isolado Brasileiro de PRSV:

O primeiro mamoeiro transgênico resistente ao PRSV foi obtido no início da década de 90, resultado de uma colaboração entre a Universidade de Cornell, a Universidade do Havaí e a empresa UpJohn, todas nos EUA (Fitch et al., 1992). A planta resultante deste trabalho, denominada linha 55-1, expressava o gene da capa protéica (*cp*) de um isolado havaiano de PRSV, e mostrou-se resistente a este e a outros isolados havaianos. Porém, quando desafiada por isolados de outras regiões geográficas, inclusive o Brasil, esta planta se mostrou susceptível (Tennant et al., 1994).

Em decorrência deste fato, a Embrapa, através do Centro de Mandioca e Fruticultura na Bahia, estabeleceu um acordo de parceria com a Universidade de Cornell para desenvolver mamoeiro transgênico resistente aos isolados Brasileiros de PRSV. Para tanto, foi coletado um isolado de PRSV na principal região produtora de mamão do Brasil, a região do extremo sul da Bahia, o qual foi utilizado como doador do gene de

capa protéica empregado em novos trabalhos de transformação de mamoeiro. Alguns deste novos mamoeiros, expressando o gene *cp* do isolado Brasileiro, mostraram-se resistentes não somente ao isolado doador, como também a isolados do Havaí e da Tailândia (Souza Jr., 1999).

Embriões zigóticos imaturos da cultivar Sunrise foram excisados de sementes de frutos colhidos 100-120 dias após a abertura das flores, e utilizados como explante para indu-



Figura 2: Planta feminina de mamoeiro do grupo ‘Solo’ infectada pelo vírus da mancha anelar (PRSV)

ção de embriogênese somática direta (Figura 3), em meio de cultura suplementado com 2,4-D (Fitch, 1993; Cai et al., 1999). Embriões somáticos secundários foram transformados via biobalística (Sanford et al., 1993) utilizando versões traduzíveis e não-traduzíveis do gene *cp*. O gene *npt II* (neomycin phosphotransferase II), que confere resistência ao antibiótico kanamicina, foi utilizado como gene

marcador; sendo que a seleção positiva de embriões transgênicos se deu em meio suplementado com 150 mg/l deste antibiótico (Souza Jr., 1999).

Uma eficiência de transformação de 2.4% foi observada, o que demonstra a capacidade de obtenção de uma linha transgênica a cada 40 embriões zigóticos excisados. Dentre as plantas transgênicas obtidas, encontram-se plantas expressando a forma traduzível do gene e plantas expressando a forma não-traduzível. As plantas transgênicas obtidas foram desafiadas com três isolados de PRSV, o isolado Brasil.Bahia (doador do gene *cp*), o isolado severo do Havaí (Gonsalves & Ishii, 1980) e um isolado Tailandês (Tennant et al., 1994). Foram observadas plantas transgênicas susceptíveis a todos os três isolados, plantas resistentes ao isolado doador e susceptíveis aos demais, plantas resistentes ao isolado doador e ao isolado Havaiano, mas susceptíveis ao Tailandês, e plantas resistentes aos três isolados. Resistência, na forma de imunidade, foi observada tanto em plantas expressando a versão traduzível quanto a versão não-traduzível do gene. Para ser considerada resistente, a planta desafiada tem que permanecer sem sintomas três semanas após a segunda inoculação mecânica do vírus, feita três semanas após a primeira inoculação (Souza Jr., 1999).

A análise molecular por PCR de uma população R1, obtida por autofecundação de uma planta Ro resistente aos três isolados, demonstrou não somente a passagem do (trans)gene *cp* de uma geração para outra, como também demonstrou uma segregação mendeliana de 3:1 para este gene. Esta população R1, quando desafiada separadamente pelos três isolados descritos anteriormente, mostrou a manutenção do amplo espectro de resistência observado na planta Ro (Souza Jr., 1999).

3) O mecanismo de resistência e os fatores que o influenciam:

O desenvolvimento de plantas transgênicas de mamoeiro, expressando a versão não-traduzível do gene *cp* do PRSV, e resistente a este vírus, demonstrou que a proteção neste caso é mediada pelo RNA, e não pela proteína (Cai et al., 1999; Souza Jr., 1999). Estudos utilizando técnicas de ELISA, Northern-blot e Run On Assay sugerem que a resistência na linha 55-1 é mediada pelo RNA através do mecanismo de silenciamento do gene após a transcrição (Post-Transcriptional Gene Silencing – PTGS) (Tennant et al., 1997; Souza Jr., 1999).

Um gene encontra-se num estado de PTGS quando a taxa de transcrição

resistência ao PRSV observada em mamoeiros transgênicos expressando o gene *cp*. Este modelo postula que a quantidade de transcritos de um determinado gene seria a responsável pela ativação do sistema de degradação, o que se daria após esta quantidade ultrapassar um patamar específico. Uma vez acima daquele patamar, a célula induziria a síntese de moléculas de RNA complementares (cRNA) ao transcrito do gene em questão pela RdRp (RNA polimerase dependente de RNA) (Fraenkel-Conrat, 1986). Estes cRNAs iriam operar em cis e trans, promovendo a degradação, por certas RNases, do transcrito e do RNA do vírus que viesse a infectar a célula, desde que o genoma do vírus apresentasse regiões com alto grau de homologia ao gene

o (trans)gene *cp* e o gene *cp* do isolado de PRSV usado no desafio (Souza Jr., 1999).

Um mamoeiro transgênico contendo o (trans)gene *cp* em um único loco, e hemizigoto para este loco, mostrou-se resistente ao isolado de PRSV doador do gene e susceptível a outros dois isolados de diferentes regiões (aqui denominadas A e B). Já as plantas homozigotas para o citado loco mostraram-se resistentes ao isolado doador e ao isolado da região A, mas susceptíveis ao da B; demonstrando que o aumento do número de cópias transcritas do gene (e consequentemente da dosagem gênica) resultou numa ampliação do espectro de resistência em um específico evento elite de transformação (Tennant et al., 1997). Esse aumento do



Figura 3: Embriões somáticos primários obtidos a partir de embriões zigóticos (A), embriões somáticos secundários em processo de maturação (B), e plantas de mamoeiro resultante da germinação *in vitro* de embriões somáticos secundários (C)

daquele gene é alta, mas a abundância relativa (“steady state”) do RNA transcrito na célula é baixa (para revisão sobre silenciamento de genes ver: Depicker & Montagu, 1997; Kumapatla et al., 1998; Wassenegger & Péliissier, 1998). Este fenômeno de silenciamento parece ocorrer no citoplasma (de Carvalho et al., 1995), e seria resultado de um mecanismo de degradação de seqüência(s) específica(s) de RNA (Dougherty & Parks, 1995).

Diversos modelos teóricos têm sido propostos para explicar a ativação do estado de PTGS na célula (Lindbo et al., 1993; Baulcombe & English, 1996; Metzloff et al., 1997; Wassenegger & Péliissier, 1998). Em face às evidências coletadas até o momento, o modelo denominado “threshold model” (Lindbo et al., 1993) parece ser o que melhor explica a

silenciado (Figura 4).

De uma maneira geral, a resistência devido a PTGS sofre influência do estágio de desenvolvimento da planta (Pang et al., 1993 & 1996; Tennant et al., 1997), é dependente de homologia entre o gene silenciado e o genoma do patógeno (English et al., 1996), além de ser positivamente correlacionada com a dosagem gênica (Pang et al., 1996; Goodwin et al., 1996).

Estudos com o objetivo de melhor conhecer a resistência ao PRSV nas plantas transgênicas de mamoeiro que expressam o gene *cp* mostraram que esta depende não somente do estágio de desenvolvimento da planta, mas também da concentração de inóculo (Figura 5). Porém, a influência destes dois fatores é pequena frente aos efeitos devido à dosagem gênica e ao grau de homologia entre

espectro de resistência também foi observado em mamoeiros descendentes de um outro evento elite, a linha 63-1 (Souza Jr., 1999).

4) Biossegurança e perspectivas:

A discussão quanto aos possíveis riscos associados ao uso de organismos geneticamente modificados (OGMs) intensificou-se nos últimos dois anos. Infelizmente, essa discussão muitas vezes não é guiada prioritariamente pelo aspecto técnico-científico. Porém, um ponto importante que emerge desta discussão é que a análise da segurança alimentar e ambiental na liberação de um OGM deve ser feita caso a caso, haja vista que um determinado OGM é resultado único da interação entre a espécie modificada e o(s) (trans)gene(s) utilizado(s) para produzir aquele evento de transformação. No que se

refere ao mamoeiro transgênico resistente ao(s) isolado(s) Brasileiro(s) de PRSV, os genes utilizados foram o gene *cp* do próprio vírus causador da doença e o gene marcador *npt II*; portanto, a análise dos riscos deve prioritariamente considerar a interação *C. papaya* x *cp* x *npt II*.

Considerando a questão de segurança ambiental, os principais riscos levantados no que se refere a plantas transgênicas expressando o gene *cpe* resistentes a vírus são: a) ocorrência de heteroencapsidação, e b) ocorrência de fluxo gênico. Heteroencapsidação é a encapsidação do genoma (DNA ou RNA) de um vírus pela proteína capsídica de um outro vírus, conferindo a este segundo, interinamente, a capacidade de realizar atividades dependentes daquela proteína (ex.: transmissão por um vetor originalmente incapaz de transmitir o segundo vírus) (Jacquet et al., 1998). A idéia é que uma planta transgênica expressando o gene da proteína capsídica do primeiro vírus forneceria proteína em quantidade para encapsidar o genoma do segundo vírus, que, “adquirindo” a capacidade de transmissão por esse novo vetor, aumentaria o seu potencial de disseminação. Não existem estudos mostrando que os demais vírus presentes em mamoeiros no Brasil, como o causador do “amarelo letal” e o provável causador da “meleira” (Rezende & Costa, 1993), sejam passíveis de encapsidação pela proteína capsídica do PRSV. Além do mais, mamoeiros transgênicos expressando o gene da capa protéica na versão não-traduzível não produzem a proteína e, portanto, não possibilitam a ocorrência de heteroencapsidação.

No que se refere a fluxo gênico, ou transferência vertical do (trans)gene para espécies do mesmo gênero ou de diferentes gêneros da mesma família, é necessário levar em consideração os seguintes pontos: a) qual a possibilidade da transferência ocorrer, e b) qual a consequência desta transferência. A produção de híbridos interespecíficos naturais dentro do gênero *Carica*, tendo *C. papaya* como um dos progenitores, é muito pouco provável. Esta afirmação se baseia no relato de inúmeras

tentativas frustradas de se transferir a resistência ao PRSV, encontrada em diversas espécies silvestres de *Carica*, para o mamoeiro comum (Horowitz & Jimenez, 1967; Mekako & Nakasone, 1975; Manshardt, 1992). Mesmo quando o híbrido era obtido, o que ocorreu somente mediante emprego de técnica de resgate de embrião *in vitro*, problemas de baixa taxa de fertilidade do pólen inviabilizaram programas de melhoramento baseados em retrocruzamento (Manshardt & Wenslaff 1989a, 1989b; Chen et al., 1991). O fato é que se essa via fosse possível, nós já teríamos resolvido a questão da resistência ao PRSV no mamoeiro a muitos anos.

Embora com remota possibilida-

híbrido surgisse, estaríamos presenciando uma ampliação espetacular no conjunto de genes disponíveis aos melhoristas convencionais de mamoeiro, aumentando de forma considerável o universo de possibilidades dos programas de melhoramento genético desta frutífera.

O uso de genes de resistência a antibióticos como genes marcadores para seleção positiva de transformantes tem prioritariamente que considerar a importância do específico antibiótico no tratamento de doenças humanas. Se o antibiótico for a única ou uma das únicas armas contra uma doença que confere alto risco de vida, este tem que ser sumariamente proibido de uso

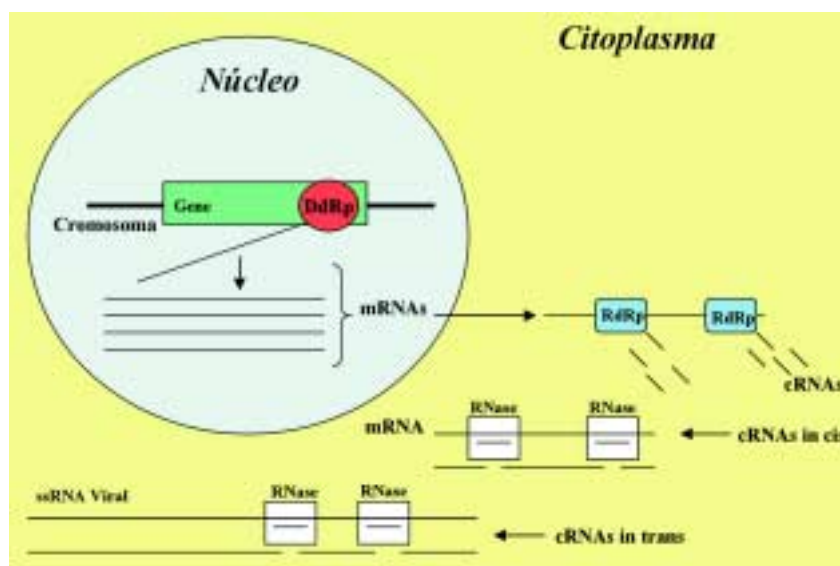


Figura 4: Desenho esquemático mostrando o mecanismo de PTGS (Silenciamento gênico após transcrição) (Baseado em Dougherty & Parks, 1995)

de de ocorrência, fica a pergunta: o que aconteceria se, por acaso, um híbrido fértil fosse produzido naturalmente entre um mamoeiro transgênico e uma espécie silvestre de *Carica*? Cabe lembrar que o mamoeiro não-transgênico e os indivíduos das espécies silvestres já convivem a bastante tempo sem gerar nenhum híbrido natural conhecido. Pergunta-se ainda se o efeito deste (trans)gene *per se* seria maior que o efeito causado pelo junção de dois genomas bastante distintos. Com ou sem (trans)gene, o fato é que, se esse

no desenvolvimento de plantas transgênicas.

O (trans)gene *npt II*, também presente no mamão transgênico, é o gene marcador mais utilizado na engenharia genética de plantas. Este gene produz a enzima neomycin phosphotransferase II, a qual inativa antibióticos como neomicina, kanamicina e puromicina por meio de fosforilação. Estes dois últimos não são geralmente utilizados para o controle de doenças em humanos e animais, enquanto a neomicina tem uso prin-

cipalmente tóxico.

Considerando a questão de segurança ambiental e alimentar, os principais perigos levantados no que se refere a plantas transgênicas expressando genes de resistência a antibiótico são: a) que o gene seja tóxico, b) que o produto do gene (polipeptídeo) seja tóxico ou cause alergia, c) que o gene seja transferido (transferência horizontal) para microorganismos no aparelho digestivo dos animais (incluindo o homem) ou no ambiente, e d) que o gene ou seu produto cause danos ao ambiente (Harding, 1995; FDA, 1998).

O item c é tido como o mais polêmico destes riscos. Embora já tenha sido demonstrado que pedaços de DNA iguais ou maiores que um gene podem resistir degradação no aparelho digestivo (Shubbert et

riente, teria que passar por um processo de recombinação gênica que o colocasse precisamente após um promotor de procarionte, para que pudesse se expresso na bactéria. Mesmo que essa sucessão de eventos ocorra e venha a produzir bactéria(s) expressando o gene *npt II*, é importante lembrar que esta(s) bactéria(s) teria que estar em um ambiente em que existisse uma pressão de seleção em favor da(s) mesma(s). Caso isso não ocorresse, esta seria menos competitiva que a sua contraparte sem o citado gene, o que acarretaria na perda do mesmo com o tempo.

A Embrapa tem como objetivo produzir um mamoeiro transgênico com amplo espectro de resistência aos isolados Brasileiros de PRSV. Para alcançar este objetivo, foi mon-

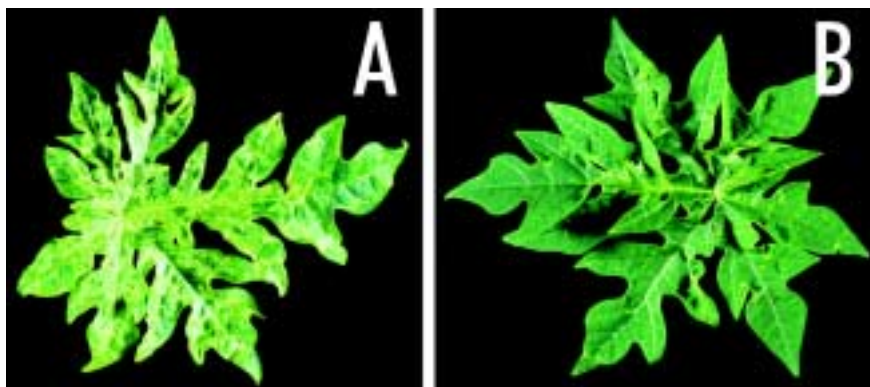


Figura 5: Folha de mamoeiro hemizigoto (A) e homozigoto (B) para um único loco com o gene *cp*, após inoculação com isolado de PRSV em alta concentração. As folhas são de plantas inoculadas quando já haviam emitido 20 ou mais folhas. Quando inoculadas quando haviam emitido somente 6-10 folhas não houve diferença na intensidade dos sintomas, ambas apresentaram sintomas semelhantes aos mostrados em A. Planta homozigota para gene *cp* não apresenta nenhum sintoma quando inoculada com PRSV, em concentração normal, após emitir 20 ou mais folhas

al., 1994), e que a transferência de genes de resistência a antibióticos de plantas para bactérias ocorrem em frequências de 10^{-13} , sob condições ótimas, que não são as que ocorrem na natureza (Nielsen et al., 1997), existem diversos outros fatores que precisam ser considerados quando discutindo este risco. Além de resistir a degradação no aparelho digestivo e ser objeto de transferência horizontal para bactérias presentes neste aparelho, o gene *npt II*, que está sob regulação de um promotor de euca-

tado um banco de isolados representativo do território nacional, o qual está sendo objeto de estudo da variabilidade do gene *cp*. Paralelamente, as plantas resistentes ao isolado doador do (trans)gene de interesse estão tendo seu espectro de resistência testado contra os diversos isolados constituintes desse banco. A perspectiva é que até o final de 2001 possamos ter selecionar pelo menos um material em condições de ser transferido para o produtor.

5) Referências Bibliográficas:

BARBOSA, F. R. & PAGUIO, O. R. Vírus da mancha anelar do mamoeiro: Incidência e efeito na produção do mamoeiro (*Carica papaya* L.). *Fitopatologia Brasileira* 7(1): 365-373. 1982.

BAULCOMBE, D. C. & ENGLISH, J. J. Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 173-180. 1996.

BURKE, B. Papaya captures gold in nutritional 'Olympics'. *Honolulu Star-Bulletin*, July 8, 1992.

CAI, W., GONSALVES, C., TENNANT, P., FERMIN, G., SOUZA JR., M. T., SARINDU, N., JAN, F. J., ZHU, H. Y. & GONSALVES, D. A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In Vitro Cellular & Development Biology - Plant* 35(1): 61-69. 1999.

CHEN, M., CHEN, C., WANG, D. & CHEN, F. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Carica papaya* x *Carica cauliflora* cultured in vitro. *Can J Bot* 69: 1913-1918. 1991.

DE CARVALHO, F., FRENDON, P., VAN MONTAGU, M. & CORNELISSEN, M. Post-transcriptional cosuppression of β -1,3-glucanase genes does not affect accumulation of transgene nuclear mRNA. *Plant Cell* 7:347-358. 1995.

DEPICKER, A. & VAN MONTAGU, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. *Current Opinion in Cell Biology* 9(3), 373-382. 1997.

DOUGHERTY, W. G. & PARKS, T. D. Transgenes and gene suppression: telling us something new? *Current Opinion in Cell Biology* 7: 399-405. 1995.

ENGLISH, J. J., MUELLER, E. & BAULCOMBE, D. C. Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* 8(2): 179-188. 1996.

FDA (U.S. Food and Drug Administration) – Center for Food Safety and Applied Nutrition - Office of Premarket Approval. Guidance for Industry: Use of Antibiotic Resistance Marker Genes in Transgenic Plants. 1998. <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/opa-armg.html>

- FITCH, M. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 32: 205-212. 1993.
- FITCH, M., MANSCHARDT, R., GONSALVES, D., SLIGHTOM, J. & SANFORD, J. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Bio/Technology* 10: 1466-1472. 1992.
- FRAENKEL-CONRAD, H. RNA directed RNA polymerases of plants. *Critical Review in Plant Science USA.* 4: 213-226. 1986.
- GONSALVES, D. Control of papaya ringspot virus in papaya: A case study. *Annual Review Phytopathology.* 36: 415-437. 1998.
- GONSALVES, D. & ISHII, I. Purification and serology of papaya ringspot virus. *Phytopathology* 70: 1028-32. 1980.
- GOODWIN, J., CHAPMAN, K., SWANEY, S., PARKS, T. D., WERNSMAN, E. A. & DOUGHERTY, W. G. Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance. *Plant Cell* 8(1): 95-105. 1996.
- HARDING, K. Biosafety of Selectable Marker Genes. 1995. <http://binas.unido.org/binas/Library/cabi/harding.shtml>
- HOROVITZ, S. & JIMENEZ, H. Cruzamientos interespecíficos e intergenéricos em Caricaceas y sus implicaciones fitotécnicas. *Agronomía Tropical (Maracay)* 17: 323-343. 1967.
- IBGE - SIDRA (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). <http://www.ibge.gov.br>
- ISHERWOOD, M. O. J. Papaya ringspot virus in Puna: chronology of events and eradication program update. *Proc. Annu. Hawaii Papaya Ind. Assoc. Conf.*, 28th, Honolulu, pp. 7-9, Sept. 25-26. 1992.
- ISHII, M. Observations of the spread of papaya ringspot virus in Hawaii. *Plant Disease Reporter* 56(4): 331-333. 1972.
- JACQUET, C., DELECOLLE, B., RACCAH, B., LECOQ, H., DUNEZ, J. & RAVELONANDRO, M. Use of modified plums pox virus coat protein genes developed to limit heterocapsidation-associated risks in transgenic plants. *Journal of General Virology* 79(6): 1509-1517. 1998.
- KUMPATLA, S. P., CHANDRA-SEKHARAN, M. B., IYER, L. M., LI, G. & HALL, T. C. Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing. *Trends in Plant Science* 3(3): 97-104. 1998.
- LINDBO, J. A., SILVA, R. L., PROEBSTING, W. M. & DOUGHERTY, W. G. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5(12): 1749-1759. 1993.
- MANSCHARDT, R. M. Papaya. In "Biotechnology of Perennial Fruit Crops." (Hammerschlag, F. A. & Litz, R. E., eds.), pp. 489-511. CAB International, Wallingford, England, UK. 1992.
- MANSCHARDT, R. & WENSLAFF, T. Zygotic polyembryony in interspecific hybrids of *Carica papaya* and *C. cauliflora*. *Journal American Society Horticulture Science* 114: 684-689. 1989a.
- MANSCHARDT, R. & WENSLAFF, T. Interspecific hybridization of papaya with other *Carica* species. *Journal American Society Horticulture Science* 114: 689-694. 1989b.
- MEKAKO, H. U. & NAKASONE, H. Y. Interspecific hybridization among 6 *Carica* species. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 100: 237-242. 1975.
- METZAFF, M., O'DELL, M., CLUSTER, P. D. & FLAVELL, R. B. RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in petunia. *Cell* 88: 845-854. 1997.
- NIELSEN, K. M., GEBHARD, F., SMALLA, K., BONES, A. M. & VAN ELSAS, J. D. Evaluation of possible horizontal gene transfer from transgenic plants to the soil bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* BD413. *Theoretical and Applied Genetics* 95 (5-6): 815-821. 1997.
- PANG, S. Z., JAN, F. J., CARNEY, K., STOUT, J., TRICOLI, D. M., QUEMADA, H. D. & GONSALVES, D. Post-transcriptional transgene silencing and consequent tospovirus resistance in transgenic lettuce are affected by transgene dosage and plant development. *Plant Journal* 9: 899-909. 1996.
- PANG, S. Z., SLIGHTOM, J. L. & GONSALVES, D. Different mechanisms protect transgenic tobacco against tomato spotted wilt and impatiens necrotic spot tospoviruses. *Bio/Technology* 11: 819-924. 1993.
- REZENDE, J. A. M. & COSTA, A. S. Doenças de vírus e micoplasma de mamoeiro. *Summa Phytopathologica* 19: 73-79. 1993.
- SANFORD, J. C., SMITH, F. D., & RUSSELL, J. A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. In "Methods in Enzymology; Recombinant DNA, Part H." (Wu, R., ed.), pp. 483-509. Academic Press, Inc. 1993.
- SECEX (Secretaria do Comércio Exterior)/MDIC. <http://www.mdic.gov.br/Micn001.htm>.
- SHUBBERT, R., LETTMANN, C. & DOERFLER, W. Ingested foreign (phase M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Molecular & General Genetics* 242: 495-504.
- 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.
- TENNANT, P. F., FITCH, M. M. M., MANSCHARDT, R., SLIGHTOM, J. & GONSALVES, D. Resistant against papaya ringspot virus isolates in coat protein transgenic papaya is affected by transgene dosage and plant development. *Phytopathology* 87(6): S96. 1997 (Abstract).
- TENNANT, P. F., GONSALVES, C., LING, K. S., FITCH, M. M. 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* 84(11): 1359-1366. 1994.
- WASSENEGGER, M. & PELISSIER, T. A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Molecular Biology* 37(2): 349-362. 1998.
- YEH, S. D. & GONSALVES, D. Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection. *Phytopathology* 74: 1086-1091. 1984.
- YEH, S. D. & GONSALVES, D. Practices and perspective of control of papaya ringspot virus by cross protection. In "Advances in Disease Vector Research". (Harris, K. F., ed.). 10: 237-257. Springer-Verlag, New York, USA. 1994.