

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN EM *Vasconcellea quercifolia* A. ST. – HIL. E IDENTIFICAÇÃO DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA MANCHA ANELAR EM CARICÁCEAS**

**Juliana da Silva Lopes Pereira**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
JULHO – 2023**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN EM *Vasconcellea quercifolia* A. ST. – HIL. E IDENTIFICAÇÃO DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA MANCHA ANELAR EM CARICÁCEAS**

Juliana da Silva Lopes Pereira  
Engenheira Agrônoma, UFRB, 2021.

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Agricultura Tropical).

**Orientador:** Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo  
**Coorientadoras:** Dra. Hellen Cristina da Paixão Moura  
Dra. Eva Maria Rodrigues Costa  
Dra. Fernanda Vidigal Souza Duarte

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
JULHO – 2023**

## FICHA CATALOGRÁFICA

P436c

Pereira, Juliana da Silva Lopes.

Criopreservação de grãos de pólen em *Vasconcellea quercifolia* A. St. – Hil. e identificação de resistência ao vírus da mancha anelar em Caricáceas / Juliana da Silva Lopes Pereira. – Cruz das Almas, BA, 2023.  
91f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo.

Coorientadora: Dra. Hellen Cristina da Paixão Moura.

Coorientadora: Dra. Eva Maria Rodrigues Costa.

Coorientadora: Dra. Fernanda Vidigal Souza Duarte.

1.Mamão – Cultivo. 2.Mamão – Doenças e pragas – Controle. 3.Melhoramento genético – Criopreservação – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 634.651

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB. Responsável pela Elaboração Antonio Marcos Sarmento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN EM *Vasconcellea quercifolia* A. ST. – HIL. E IDENTIFICAÇÃO DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA MANCHA ANELAR EM CARICÁCEAS**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de

Juliana da Silva Lopes Pereira.

Aprovada em 05 de julho de 2023.

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
(Orientador)

Dr. Renato Santa Catarina  
Universidade Federal do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF  
(Examinador Externo)

Dr. Jardel Oliveira Santos  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA  
(Examinador Externo)

## DEDICATÓRIA

À Deus, “Os que confiam no Senhor são como o monte de Sião, que não se pode abalar, mas permanece para sempre.” (Salmos 125:1)

Aos meus pais e irmão, pelo imenso amor, carinho, compreensão e apoio dado em todos os momentos da minha vida.

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Ao bom Deus, pelo dom da vida, pela proteção em cada passo dado, por estar sempre comigo e por me ajudar nos momentos difíceis, me concedendo força e fé para enfrentar os obstáculos, e iluminar meus caminhos.

Aos meus pais e irmão, Ana Helena, Gilberto Oliveira e João Gustavo que contribuíram para o meu sucesso e que me forneceram amor, dedicação e estímulo constantes para perseverar.

Ao meu orientador Dr. Carlos A. da Silva Ledo, agradeço pela confiança, disponibilidade em ajudar, pela paciência, e conhecimentos compartilhados.

À Dra. Hellen Cristina da Paixão Moura pela orientação, confiança e paciência depositada no desenvolvimento deste trabalho e pelas contribuições dadas durante todo o processo. Serei sempre grata!

À Dra. Eva Maria Rodrigues pela coorientação, disponibilidade, paciência, dedicação e por compartilhar seus conhecimentos. Gratidão!

À Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza pela coorientação, confiança e disponibilidade e total dedicação, dividindo seus conhecimentos e experiência.

Ao Dr. Diego Marmolejo pelas contribuições nas análises estatísticas, sempre disposto a ajudar.

Ao Dr. Paulo E. Meissner Filho, pelas valiosas contribuições, direcionamento e dedicação para a construção deste trabalho.

À Dra. Ana Cristina Loyola pela oportunidade do estágio docência e por todo conhecimento transmitido durante a atividade.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias que junto a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 me concederam a bolsa para a realização do Mestrado.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura pela infraestrutura e recursos materiais necessários que permitiram a realização desta pesquisa. Obrigada pelo apoio!

À equipe do Laboratório Cultura de Tecidos (LCT) pelo convívio e conhecimentos compartilhados. E à Michele Ferreira, pela amizade, contribuições e por toda ajuda.

À equipe do Laboratório de Virologia, em especial a Cícera Amaral pela disponibilidade, apoio, convívio e amizade. Muito obrigada!

À equipe de pesquisa do mamoeiro: Maria Celeste, Liliane Luquine e Sr. Djalma pelo convívio, amizade, conhecimentos compartilhados e apoio durante as atividades realizadas no campo.

Ao Sr. Santana, Sr. Benedito e Laércio pelo apoio, convívio e amizade.

E a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional, e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu agradecimento.

Muito obrigada!

# CRIOPRESERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN EM *Vasconcellea quercifolia* A. ST. – HIL. E IDENTIFICAÇÃO DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA MANCHA ANELAR EM CARICÁCEAS

## RESUMO GERAL

Estudos realizados em espécies silvestres de mamoeiro, principalmente representantes do gênero *Vasconcellea* têm mostrado fontes de resistência ao vírus da mancha anelar (PRSV-P). Nesse contexto, técnicas de conservação desempenham um papel fundamental na preservação da diversidade genética e na prevenção da erosão genética e, dentre elas, a criopreservação de pólen tem sido uma ferramenta auxiliar na preservação de alelos de interesse. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de criopreservação de grãos de pólen de *Vasconcellea quercifolia* A. St. – Hil e avaliar a resistência ao PRSV-P em caricáceas cultivadas e silvestre. No primeiro capítulo foi estabelecido um protocolo de criopreservação do pólen para a espécie *V. quercifolia*. Foram realizados ensaios para a escolha do melhor tempo de desidratação e criopreservação dos grãos de pólen em nitrogênio líquido (NL) a  $-196^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e durante 1 ano. A viabilidade gamética foi verificada através de testes de germinação in vitro e in vivo, em plantas masculinas e femininas de *V. quercifolia*. Anteras inteiras foram coletadas na antese e o grau de umidade dos grãos de pólen foi determinado. Posteriormente, as anteras foram desidratadas por 1, 2, e 3 horas em sílica gel. Para o teste de germinação in vitro, as anteras com grãos de pólen desidratados foram colocadas em meio de cultura (BK 10% sacarose) a  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. No ensaio de criopreservação, as anteras foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio, inseridas no criotubo e imersas em NL a  $-196^{\circ}\text{C}$  por dois períodos: 24 horas e 1 ano. O descongelamento dos grãos de pólen foi realizado à temperatura ambiente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. Os dados foram avaliados no pacote Agro R, utilizando o software R. Os resultados mostraram que os grãos de pólen de *V. quercifolia* suportam desidratação por até 3 horas sem prejudicar a viabilidade, sendo 2h mais indicado por apresentar o maior percentual. A criopreservação em NL manteve a viabilidade do grão de pólen (in vitro) por 24 horas e uma leve redução quando conservado por 1 ano, sem, no entanto, comprometer a viabilidade gamética. No segundo capítulo foi avaliado a resistência de *V. quercifolia* e acessos de *C. papaya* ao PRSV-P. Foram semeadas duas sementes de cada acesso e um mês após a semeadura foi feito o desbaste deixando uma planta por saco. Após dois meses, quando as plantas apresentaram 3-4 folhas, foram realizadas duas inoculações em dez plantas de cada acesso, com intervalo de 15 dias, utilizando um isolado de PRSV-P. Os sintomas e o número de plantas afetadas foram monitoradas ao longo de dois meses. Utilizou-se uma escala de notas para avaliar a severidade dos sintomas e calculou-se a incidência da doença e a severidade dos sintomas. Realizou-se a análise de agrupamento dos acessos com base na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os dados de incidência da doença foram avaliados no pacote Agro R, utilizando o software R. O teste de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) foi realizado para detecção do vírus nas plantas inoculadas. A espécie silvestre é resistente ao PRSV - P pois mostrou-se imune, não apresentando sintomas da doença.

**Palavras-chave:** Mamoeiro, Nitrogênio líquido, PRSV – P, Severidade da doença, Viabilidade gamética.

**POLLEN CRYOPRESERVATION AND RESISTANCE TO RINGSPOT VIRUS IN  
*Vasconcellea quercifolia* A. ST. – HIL.: ALLELE PRESERVATION AND  
GENETIC IMPROVEMENT**

**ABSTRACT**

Studies conducted on wild papaya species, particularly representatives of the *Vasconcellea* genus, have demonstrated sources of resistance to *Papaya ringspot virus* (PRSV-P). In this context, conservation techniques play a crucial role in preserving genetic diversity and preventing genetic erosion, with pollen cryopreservation being an auxiliary tool for preserving alleles of interest. The objective of this study was to establish a pollen cryopreservation protocol for *Vasconcellea quercifolia* A. St. – Hil and evaluate its resistance to PRSV-P in both cultivated and wild caricaceas. In the first chapter, a pollen cryopreservation protocol was established for the species *V. quercifolia*. Trials were conducted to determine the optimal dehydration and cryopreservation times for pollen grains in liquid nitrogen (LN) at -196°C for 24 hours and over 1 year. Gametic viability was assessed through in vitro and in vivo germination tests on male and female plants of *V. quercifolia*. Whole anthers were collected at anthesis, and the moisture content of pollen grains was determined. Subsequently, anthers were dehydrated for 1, 2, and 3 hours using silica gel. For the in vitro germination test, anthers with dehydrated pollen grains were placed in culture medium (BK 10% sucrose) at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  for 24 hours. In the cryopreservation trial, anthers were placed in aluminum foil envelopes, inserted into cryotubes, and immersed in LN at -196°C for two periods: 24 hours and 1 year. Pollen grain thawing was performed at room temperature. The experimental design was completely randomized with three replications. Data were evaluated using the Agro R package in the R software. Results showed that *V. quercifolia* pollen grains can withstand dehydration for up to 3 hours without compromising viability, with 2 hours being more suitable due to the higher percentage. Cryopreservation in LN maintained pollen viability (in vitro) for 24 hours, with a slight reduction after 1 year, without compromising gametic viability. In the second chapter, the resistance of *V. quercifolia* and accessions of *C. papaya* to PRSV-P was evaluated. Two seeds of each accession were sown, and one month after sowing, thinning was performed, leaving one plant per bag. After two months, when plants had 3-4 leaves, two inoculations were carried out on ten plants of each accession, with a 15-day interval, using a PRSV-P isolate. Symptoms and the number of affected plants were monitored over two months. A severity rating scale was used, and disease incidence and severity were calculated. Cluster analysis of accessions was conducted based on the area under the disease progress curve (AUDPC). Incidence data were evaluated using the Agro R package in the R software. The Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) test was performed to detect the virus in inoculated plants. The wild species showed resistance to PRSV-P as it proved immune, displaying no disease symptoms.

**Key words:** Papaya, Liquid Nitrogen, PRSV-P, Disease severity, Gametic viability.

## LISTA DE TABELAS

**CAPÍTULO 2:** Resistência ao PRSV – P em *Vasconcellea quercifolia* A. St. Hil e Acessos de Germoplasma de Mamoeiro *Carica papaya* L.

**Tabela 1.** Acesso de Caricaceas provenientes do banco ativo de germoplasma do mamoeiro da Embrapa mandioca e fruticultura, inoculadas com PRSV - P em casa de vegetação no município de Cruz das Almas/ BA, para avaliação de resistência a mancha anelar em mamoeiro.....71

**Tabela 2.** Escala de classificação de severidade dos sintomas para avaliação da resistência do vírus da mancha anelar em acessos de mamoeiro (Alviar, Cruz e Hautea 2012).....72

**Tabela 3.** Médias das leituras do teste Elisa indireto dos acessos *V. quercifolia*, CMF 011 e 'Aliança' aos 83 dias de avaliação após inoculação mecânica com isolados de PRSV-P e mantidas em casa de vegetação. Valor de corte representa a média do controle negativo.....85

## LISTA DE FIGURAS

**CAPÍTULO 1:** Criopreservação de grãos de pólen em *Vasconcellea quercifolia* A. St. – Hil.: Estratégia Biotecnológica para Conservação de Germoplasma em Caricaceas

**Figura 1.** Representação esquemática das etapas sequenciais do ensaio de criopreservação de pólen de *Vasconcellea quercifolia*.....47

**Figura 2.** Médias do conteúdo de água, porcentagem de germinação in vitro e comprimento de tubo polínico dos grãos de pólen de *V. quercifolia* submetidos a desidratação em dessecador contendo sílica em gel durante 3 tempos (1, 2 e 3 horas). Tempo zero representa grãos de pólen não submetidos a desidratação.....49

**Figura 3.** Germinação in vitro de grãos de pólen de *V. quercifolia* submetidos a desidratação em dessecador contendo em sílica gel durante 3 tempos (1, 2 e 3 horas). Tempo zero representa grãos de pólen não submetidas a desidratação (a) 0; (b) 1 hora; (c) 2 horas; (d) 3 horas.....50

**Figura 4.** Médias de porcentagem do conteúdo de água, de germinação in vitro e comprimento de tubo polínico dos grãos de pólen de *V. quercifolia* submetidos a dessecação em dessecador contendo sílica em gel durante 3 tempos (1, 2, 3 horas) e criopreservados por 24 h. Tempo zero representa grãos de pólen não submetidos a dessecação.....51

**Figura 5.** Germinação in vitro de grãos de pólen de *Vasconcellea. quercifolia* submetidos a desidratação em dessecador contendo sílica em gel durante 3 tempos (1, 2 e 3 horas) e criopreservados por 24 h. (a) 1 hora; (b) 2 horas; (c) 3 horas desidratação.....53

**Figura 6.** Médias de porcentagem de germinação in vitro de grãos de pólen % (A) e comprimento do tubo polínico mm (B) de *Vasconcellea quercifolia* submetidos a desidratação em dessecador contendo sílica em gel por duas horas e criopreservados em nitrogênio líquido por 24 h e durante 1 ano. 0 refere-se ao tratamento controle, germinação, sem criopreservação. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.....54

**Figura 7.** Germinação in vitro de grãos de pólen de *Vasconcellea quercifolia* dessecados por 2 h e criopreservados em nitrogênio líquido (NL) por 24 horas e durante 1 ano. (a) 0; (b) 2 h de desidratação; (c) 2 h de desidratação + 24 h no NL; (d) 2h de desidratação + 1 ano no NL. Tempo zero representa grãos de pólen não submetidos a desidratação e criopreservação .....56

**Figura 8.** Frutos e sementes de *Vasconcellea quercifolia* (a) Fruto fechado formado após a polinização com pólen criopreservado (b) Fruto aberto longitudinalmente com sementes provenientes de polinizações com grãos de pólen criopreservados, (c) Germinação de sementes de *Vasconcellea quercifolia*.....60

**Figura 9.** Fruto de *V. quercifolia* obtido com pólen criopreservado após 1 ano em NL (a) corte longitudinal do fruto mostrando sementes imaturas (b).....61

**CAPÍTULO 2:** Resistência ao PRSV – P em *Vasconcellea quercifolia* A. St. Hil e Acessos de Germoplasma de Mamoeiro *Carica papaya* L.

**Figura 1.** Sintomas característicos de mancha anelar observados em mudas de mamoeiro em casa de vegetação de acordo com a escala de severidade. Nota 1: ausência de sintomas. Nota 3: mosqueado nas folhas. Nota 5: mosaico. Nota 7. Mosaico e deformação foliar, Nota 9: mosaico, deformação foliar, fio de sapato e/ou estrias oleosas nas hastes.....72

**Figura 2.** Severidade do PRSV – P, o vírus da mancha anelar, em dois acessos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) e na espécie *Vasconcellea quercifolia* após inoculação mecânica e mantidos em casa de vegetação.....77

**Figura 3.** Sintomas característicos de mancha anelar nas folhas da cultivar Aliança pertencente ao BAG de mamoeiro da Embrapa mandioca e fruticultura após 83 dias de avaliação. (a) Folha sadia (controle); (b) Mosqueado e clareamento das nervuras; (c) Mosaico e início da deformação foliar; (d) Deformação foliar.....80

**Figura 4.** Sintomas característicos de mancha anelar nas folhas do acesso CMF011 pertencente ao BAG de mamoeiro da Embrapa mandioca e fruticultura após 83 dias de avaliação. (a) Folha sadia (controle); (b) Mosqueado e clareamento das nervuras; (c) Mosaico e início da deformação foliar; (d) Deformação foliar.....81

**Figura 5.** Folhas de *Vasconcellea quercifolia* sem sintomas do vírus PRSV – P. (a) Folha sadia (controle); (b), (c) e (d) Folhas sem sintomas do vírus aos 83 dias após inoculação.....82

**Figura 6.** Regressão linear segmentada para análise da incidência e índice da doença PRSV avaliados em três acessos de mamoeiro (CMF011, Aliança, *Vasconcellea quercifolia*). Os valores representam a relação entre os valores preditos pelo modelo (linha azul) e os valores observados.  $R^2$ = coeficiente de determinação; RSE: erro padrão residual.....82

**Figura 7.** Média da área abaixo da curva de progresso da doença em dois acessos de *Carica papaya* (CMF011 e 'Aliança') e *Vasconcellea quercifolia* aos 83 dias de avaliação após inoculação mecânica com isolado do PRSV-P e mantidas em casa de vegetação.....84

## SUMÁRIO

<b>1.0</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>21</b>
<b>2.0</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>24</b>
2.1	Importância econômica do mamoeiro .....	24
2.2	Descrição botânica .....	25
2.3	Espécies silvestres de mamoeiro.....	26
2.4	O grão de pólen e a polinização .....	28
2.5	Criopreservação.....	29
2.6	Doenças e vírus da mancha anelar (PRSV – P) do mamoeiro .....	30
2.7	Resistência do mamoeiro a doenças .....	33
<b>3.0</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>35</b>
	<b>CAPÍTULO 1 - Criopreservação de grãos de pólen em <i>Vasconcellea quercifolia</i> A. St. – Hil. : Estratégia biotecnológica para conservação de germoplasma em Caricaceas</b> .....	<b>40</b>
	<b>RESUMO</b> .....	<b>40</b>
	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>41</b>
<b>1.0</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>2.0</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
2.1	Material genético e local e período .....	43
2.2	Desidratação dos grãos de pólen .....	44
2.3	Germinação <i>in vitro</i> dos grãos de pólen e viabilidade polínica .....	45
2.4	Criopreservação de grãos de pólen .....	46
2.5	Teste de Viabilidade <i>in vivo</i> dos grãos de pólen .....	47
2.6	Análise estatística dos dados.....	48
<b>3.0</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
3.1	Desidratação e germinação dos grãos de pólen.....	48
3.2	Criopreservação dos grãos de Pólen .....	51
3.3	Polinização <i>in vivo</i> .....	57
<b>4.0</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>61</b>
<b>5.0</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>62</b>
	<b>CAPÍTULO 2 - Resistência ao PRSV- P em <i>Vasconcellea quercifolia</i> A.St. Hil e acessos de germoplasma de mamoeiro <i>Carica papaya</i> L.....</b>	<b>67</b>
	<b>RESUMO</b> .....	<b>67</b>
	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>68</b>
<b>1.0</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>2.0</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>71</b>
2.1	Material genético.....	71
2.2	Inoculação e avaliação da sintomatologia da doença .....	71
2.3	Análise de dados .....	73
2.4	Teste ELISA indireto ("Enzyme linked immunosorbent assay") .....	74
<b>3.0</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>76</b>
<b>4.0</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>87</b>
<b>5.0</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>88</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma fruteira tropical com grande importância econômica devido ao valor nutritivo dos seus frutos e as propriedades farmacológicas. Com uma produção de 1,2 milhão de toneladas de frutos em 28,5 mil hectares colhidos em 2021, o Brasil é o segundo maior produtor mundial, com cerca de 8,9% da produção global. (FAOSTAT, 2023). É uma espécie amplamente cultivada no país, em especial nos estados do Espírito Santo (439.550 toneladas), Bahia (400.438 toneladas), Ceará (140.979 toneladas), Rio Grande do Norte (103.431 toneladas) e Minas Gerais (48.415 toneladas) que juntos respondem por cerca de 90,1% da produção brasileira. Além disso, o país figura também na segunda posição no ranking dos maiores exportadores da fruta, atrás do México e Guatemala, segundo estimativas da FAO (2023).

Apesar da importância econômica, a cultura apresenta um grande problema que acomete a sua produção e qualidade de frutos que é o vírus da mancha - anelar (*Papaya ringspot virus* - PRSV-P) que impossibilita o melhoramento genético intraespécie para desenvolvimento de cultivares resistentes. O nome da doença *Ringspot* é devido à ocorrência de uma mancha anelar nos frutos do mamoeiro, sendo este os principais sintomas da contaminação pelo vírus também acompanhados de clorose na lâmina foliar, distorção das folhas jovens e perda do vigor (SHARMA; TRIPATHI, 2014).

Logo, algumas estratégias de controle da doença vêm sendo utilizadas, dentre elas destacam-se o uso de mudas certificadas, plantio em áreas livres do vírus, evitar o consórcio com cucurbitáceas já que é outra forma do vírus infectar espécies dessa família, programas de erradicação que visam à eliminação de fontes de vírus nas áreas de plantio e em suas proximidades, proteção cruzada que consiste na infecção de uma estirpe fraca do vírus contra estirpes severas do mesmo vírus, e utilização de transgênicos com o gene de resistência para o PRSV-P (LIMA et al., 2001).

O primeiro mamoeiro transgênico (linha 55-1) foi obtido no início da década de 90 e expressava o gene da capa proteica de um isolado havaiano de PRSV- P (FITCH et al., 1992). Essa planta transgênica mostrou-se resistente a diferentes isolados havaianos, mas susceptível a isolados de outras regiões geográficas,

principalmente brasileiras (TENNANT et al., 1994).

No Brasil, nos Estados da Bahia e do Ceará, foram avaliadas plantas transgênicas produzidas pela Embrapa em parceria com a Universidade de Cornell (SOUZA JÚNIOR; NICKEL; GONSALVES, 2005), observando um retardo na infecção da doença, assim como produção cerca de 50% superior à das convencionais. No entanto, pesquisas com transgênicos na Embrapa foram descontinuadas devido à política da empresa e a critérios como a ausência de genes marcadores para resistência a antibióticos, uma vez que sua presença poderia dificultar sua liberação comercial pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e demais órgãos regulamentadores (FILHO, 2011).

A espécie *Vasconcellea quercifolia* tem sido relatada como resistente ao PRSV-P, porém barreiras reprodutivas tornam difíceis a obtenção de híbridos resistentes resultantes do cruzamento com a forma cultivada *Carica papaya* L. (DREW et al., 2006). Esta espécie, é frequentemente encontrada em margens de rios, capoeirões, bordas de matas e nas margens de rodovias, podendo ocorrer em locais com condições edafoclimáticas, como os bosques úmidos e montanhas altas (LIDIO; ALEXANDRE; ADEMIR, 2011).

Uma coleção de germoplasma de uma espécie deve conservar além de acessos representantes da forma cultivada, também acessos de espécies silvestres com genes para resistência a doenças. Porém, a conservação de germoplasma deve objetivar seu uso futuro e ser realizada de forma eficiente com técnicas adequadas. Diante disso, técnicas de conservação desempenham um papel fundamental na preservação da diversidade genética e na prevenção da erosão genética. Estudos envolvendo a conservação de pólen são importantes para manter a diversidade genética de espécies de importância econômica, possibilitando também superar impasses como a assincronia de florescimento (RAJASEKHARAN et al., 2013).

Uma das formas de conservação do germoplasma vegetal é a conservação em temperaturas ultrabaixas (-196°C), chamada de criopreservação. Esta técnica possibilita preservar o explante em longo prazo com baixo custo de armazenamento, já que demanda pouca intervenção humana e com potencial reduzido de variações somaclomais, sendo uma excelente alternativa como duplicata de segurança do germoplasma conservado. A criopreservação de pólen

é crucial para complementar a preservação do germoplasma, pela conservação de alelos (SILVA et al., 2017).

Nesse contexto, o estudo de espécies silvestres e sua relação com as espécies cultivadas são importantes para estudos de conservação e fornecem subsídios para o melhoramento genético.

## **OBJETIVOS**

### Objetivo geral

Estabelecer um protocolo de criopreservação de grãos de pólen de *Vasconcellea quercifolia* e avaliar a resistência dessa espécie e de dois acessos de mamoeiro cultivado (*C. papaya*) ao vírus da mancha - anelar (*Papaya ringspot virus* PRSV-P).

### Objetivos específicos

Estabelecer um protocolo para criopreservação de grãos de pólen da espécie silvestre de mamoeiro *Vasconcellea quercifolia* visando conservação a longo prazo sem a perda da viabilidade gamética.

Avaliar a manifestação de sintomas e a presença do vírus da mancha-anelar em plantas de *Vasconcellea quercifolia* e nos acessos de *C. papaya* (CMF 011 e CMF 248) após a inoculação controlada do vírus, comparando a resposta das plantas e determinando o nível de resistência da espécie à infecção.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância econômica do mamoeiro

Entre as fruteiras mais cultivadas, consumidas e estudadas no mundo, o mamoeiro é uma das que possui grande importância econômica e social por gerar empregos e renda. Devido a sua ampla distribuição geográfica e adaptabilidade às zonas climáticas tropicais e subtropicais, o seu local de origem ainda é bastante discutido. De acordo com Fluentes e Santamaría (2014), o sul do México e da América Central são as origens mais aceitas, pois, ainda existem populações silvestres nesses locais. No entanto, aceitam-se que a origem e a dispersão do mamoeiro podem ter ocorrido no Noroeste da América do Sul, precisamente, na Bacia Amazônica, onde ainda apresenta ampla diversidade genética (COSTA et al., 2021).

Os frutos do mamoeiro são consumidos em todo o mundo, suas características organolépticas, como sabor e aroma, os tornam apreciados tanto para consumo *in natura*, quanto na forma de subprodutos, como doces, geleias, polpas e farinhas. É uma fruteira que possui grande fonte de fibras, vitaminas A e C, ferro, potássio e cálcio, compostos bioativos, como a riboflavina, a tiamina, a niacina e o folato, além disso, possui fonte importante de enzima proteolítica, a papaína, na qual é bastante utilizada em diversas áreas, como na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética (CHÁVEZ-PESQUEIRA; NÚÑEZ-FARFÁN, 2017; COSTA et al., 2021).

O mamoeiro é amplamente cultivado em âmbito nacional. Com uma produção de 1,2 milhão de toneladas de frutos em 28,5 mil hectares colhidos em 2021, o Brasil é o segundo maior produtor mundial, com cerca de 8,9% da produção global (FAOSTAT, 2023). É uma espécie amplamente cultivada no país, em especial nos estados do Espírito Santo (439.550 toneladas), Bahia (400.438 toneladas), Ceará (140.979 toneladas), Rio Grande do Norte (103.431 toneladas) e Minas Gerais (48.415 toneladas) que juntos respondem por cerca de 90,1% da produção brasileira. Além disso, o país figura também na segunda posição no ranking dos maiores exportadores da fruta, atrás do México e Guatemala, segundo estimativas da FAO (2023).

## 2.2 Descrição botânica

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) cultivado comercialmente é pertencente à família Caricaceae, na qual é constituída por 35 espécies organizadas em seis gêneros: *Jaracatia* (7 espécies), *Jarilla* (3 espécies), *Carica* (uma espécie e a mais importante economicamente), *Horovitzia* (uma espécie), *Vasconcellea* (21 espécies) que são espécies distribuídas na América do Sul e *Cylicomorpha* (2 espécies) espécies distribuídas na África Equatorial (BADILLO, 2000).

O sistema radicular do mamoeiro é considerado pivotante, com raiz principal desenvolvida e com ramificações. Embora apresente grande quantidade de raízes, na qual são distribuídas nos primeiros 30 cm do solo, elas podem atingir profundidade até duas vezes a altura da planta chegando cerca de um metro (COSTA et al., 2021).

O caule do mamoeiro é considerado herbáceo, ereto, podendo atingir altura de 3 a 9 m na fase adulta, com diâmetro de 10 a 30 cm, fistuloso nas regiões dos entrenós, suculento e em seu ápice a coloração é considerada verde – clara e na base verde – grisácea a acinzentada, marcado por cicatrizes foliares, possuindo no ápice grandes folhas grandes, dispostas de maneira espiralada, entre 20 e 60 cm de comprimento e até 70 cm de largura. As folhas possuem nervuras de coloração verde-amareladas, cerosas e sustentadas por pecíolos oco de 25 a 100 cm de comprimento (COTRUT et al., 2017; COSTA et al., 2021).

De acordo com Costa et al. (2021), as flores do mamoeiro são consideradas pequenas, se apresentam na forma de funil, de coloração branca ou amarelada e comumente encontradas formando inflorescências ou solitárias dos tipos masculinas, femininas ou hermafroditas. Por ser considerada uma espécie polígama, o mamoeiro apresenta a classificação das flores em diferentes formas, sendo estas, flores femininas, estável e sem estames (pistiladas), flores masculinas (estaminadas), e flores hermafroditas, com dez estames, podendo ser pentândrica, intermediária, alongata, flor perfeita ou estéril (COSTA et al., 2021).

No mamoeiro hermafrodita ocorrem algumas alterações florais que são denominadas de anomalias florais e são influenciadas pelos fatores ambientais como a temperatura e a umidade do ar e do solo. Essas anomalias são identificadas como: carpeloidia, pentandria e reversão sexual (MARTELLETO et al., 2011;

COSTA et al., 2021).

Caracterizada pela transformação dos estames e carpelos durante sua fase de desenvolvimento floral, onde os carpelos normais são suprimidos e juntamente com os ovários em diversos graus de desenvolvimento, a carpeloidia, é uma anomalia que origina frutos variadamente deformados ou distorcidos, sem valor comercial e geralmente conhecidos como “cara de gato”. O motivo principal para o acontecimento dessa anomalia, é a temperatura, no entanto a umidade no solo e a disponibilidade em excesso de nutrientes como o nitrogênio, também favorecem para desenvolvimento de frutos carpelóides (MARTELLETO et al., 2011).

Outra anomalia floral bastante conhecida na cultura do mamoeiro é a modificação da flor hermafrodita em uma semelhante a feminina, sendo assim denominada de pentandria, onde acontece uma redução de estames, geralmente de dez para cinco, formando sulcos bastantes profundos na parede do ovário e originando frutos arredondados, com cinco sulcos longitudinais e profundos, além disso, a cavidade interna é maior que a espessura da polpa, o que torna os frutos não apropriados para a comercialização (COSTA et al., 2021).

A esterilidade feminina também conhecida como reversão sexual, é uma anomalia floral que ocorre nos meses mais quentes do ano e por ocorrer nesse período também é denominada de esterilidade de verão (COSTA et al., 2021). De acordo com Martelleto et al. (2011), a reversão sexual é definida pelo abortamento ou atrofiamento do pistilo, revertendo as flores para o sexo masculino, tornando-se não funcional e não originando frutos comercializáveis. Para Costa et al. (2021), essa anomalia ocorre sob a influência das mudanças climáticas e ambientais, em condições de temperaturas altas, estresse hídrico e também baixos níveis de nitrogênio.

O fruto do mamoeiro é do tipo baga e dependendo do tipo da flor apresenta forma variada, podendo ser cilíndrico, alongata, oblongo, arredondado e piriforme, possuem casca fina e lisa, com coloração amarelo claro a laranja, sua polpa pode apresentar cores alaranjada, amarela ou avermelhada, com espessura variando de 2,5 a 5 cm. O tamanho pode variar de 2 a 50 cm de comprimento e pesar até 3 kg.

### **2.3 Espécies silvestres de mamoeiro**

Nos programas de melhoramento genético do mamoeiro as espécies

silvestres são bastantes utilizadas como fonte de genes, principalmente para o desenvolvimento de variedades resistentes às doenças como por exemplo, ao vírus da mancha - anelar (PRSV-P).

O desenvolvimento de cepas resistentes ao PRSV-P tem sido considerado a melhor estratégia para o controle da doença e a introgressão genética de genes de resistência ao PRSV-P em *C. papaya* L. de seus parentais silvestres vêm se tornando a escolha mais otimista e disponível para os pesquisadores (CHALAK et al., 2017).

A exemplo, o gênero *Vasconcellea* possui espécies silvestres, a *V. quercifolia*, *V. cauliflora*, *V. monoica* e *V. cudinamarcenses* nas quais, possuem o gene de resistência para o PRSV-P. Além disso, são espécies que possuem características interessantes para o cultivo do mamoeiro, como por exemplo, resistência ao frio, textura de casca e firmeza de polpa (PISSATTO, 2015).

A espécie *V. quercifolia* dependendo do local de ocorrência é conhecida popularmente como mamoeiro do mato, mamoeirinho, mamãozinho, mamãozinho do mato, mamoeiro-bravo, pau-de-doce ou jacaratiá. Possui registros de ocorrência nos estados de Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo bastante frequente em regiões de maior altitude. Além disso, essa espécie também ocorre naturalmente na região sul do Peru, na Bolívia, no norte da Argentina, Paraguai e Uruguai (LORENZZI, 2008; PISSATTO, 2015; BISPO, 2020).

De hábito arbóreo, podendo atingir porte de 4 a 8 m de altura, a *Vasconcellea quercifolia* caracteriza-se como planta dióica, ou seja, flores femininas em uma planta e as masculinas em outra. As flores masculinas formam inflorescências axilares, enquanto as femininas são solitárias, ou dispõem-se de cachos com poucas flores (PISSATTO, 2015). São plantas dotadas de copa rala e irregular, tronco engrossado na base e marcado por cicatrizes foliares, de 20 a 30 cm de diâmetro. Suas folhas são simples alternas, alongadas, lobadas de até 30 cm de comprimento, por 15 cm de largura (LORENZI, 2008); caindo totalmente durante o inverno quando acontece a redução da radiação e da temperatura (LIDIO; ALEXANDRE; ADEMIR, 2011; BISPO, 2020).

Os frutos são considerados tipo baga piriformes, caracterizados por apresentarem polpa carnosa de coloração amarela-alaranjada quando maduros. Possuem cerca de 3 a 6 cm de comprimento, tamanho reduzido comparado ao *C.*

*papaya* L. e contém cerca de 30 sementes por fruto. São utilizados *in natura* ou processados na preparação de doces, geleias, sucos e licores, pois possuem polpa saborosa e aromática (LORENZI, 2008 ; PISSATTO, 2015).

Além do mais, os tecidos da *V. quercifolia* podem ser utilizados como hortaliça cozida, pois apresentam baixo teor de calorias, altos teores de nutrientes, fibras e papaína. Pissatto (2015), ainda afirma que essas espécies possuem também grande importância ecológica, pois são indicadas para reflorestamentos na recuperação de áreas degradada.

#### **2.4 O grão de pólen e a polinização**

Os grãos de pólen do mamoeiro são formados por dois mecanismos de divisão celular: microesporogênese e a microgametogênese. A microesporogênese consiste na divisão meiótica da célula mãe de grão de pólen que irá gerar no final os micrósporos ou grãos de pólen imaturos. Na microgametogênese o micrósporo sofrerá uma divisão mitótica resultando no núcleo generativo e vegetativo e posteriormente, o núcleo generativo irá sofrer outra mitose e dar origem aos dois núcleos espermáticos que irão promover a dupla fertilização por ocasião da polinização. Segundo Horner e Palmer (1995), todo esse processo pelo qual os grãos de pólen são formados está sob controle genético e vários são os genes que atuam durante a pré-meiose, meiose e pós-meiose; anormalidades ocorridas durante essas fases podem resultar no surgimento de grãos de pólen anormais ou inviáveis.

O processo de polinização inicia-se com o amadurecimento e a exposição do grão de pólen, que por sua vez é exposto a condições ambientais adversas e tem que atingir, durante sua vida, o estigma receptivo (DAFNI, 1992). De acordo com Damasceno Junior et al. (2009b), os grãos de pólen do mamoeiro já estão viáveis antes da antese, e apresentam alta viabilidade no dia da antese floral, permanecendo viáveis durante 3 meses, quando conservados em *freezer*, e dependendo do material genético, este pode se manter com uma alta viabilidade durante seis meses. Entretanto, Gaburro (2007) observou que os grãos de pólen de mamoeiro apresentam viabilidade polínica alta no verão comparada com o inverno; porém essa conclusão foi tirada com base na corabilidade dos grãos de pólen quando submetidos a soluções corantes. A viabilidade do grão de pólen, que é um fator chave no sucesso da polinização, pode ser estimada por vários métodos:

solução de lugol ( $I_2KI$ ), método FCR, solução tripla de Alexander, corantes vitais como sal de tetrazólio, e as geminações dos grãos de pólen *in vivo* e *in vitro* (DAFNI, 1992).

Para que a fertilização seja bem sucedida é necessário que o estigma esteja receptivo. Segundo Galen, Zimmer e Newport (1987), a receptividade do estigma é um estágio muito importante da maturação da flor, que pode influenciar grandemente a taxa de polinização. A idade da flor, o horário do dia, e a presença ou a ausência de exudato no estigma e a temperatura, são fatores que, podem influenciar a receptividade do estigma. A receptividade do estigma pode ser determinada por mudanças morfológicas, como por exemplo, a presença de exudatos e a mudança de coloração no estigma; por testes para verificação de enzimas ativas, como, a peroxidase e a esterase.

Alguns fatores podem influenciar na receptividade do estigma e na germinação dos grãos de pólen. A baixa umidade relativa do ar e a alta temperatura se constituem em uma desvantagem pois promove a desidratação da superfície do estigma e, em consequência, sua baixa receptividade, acompanhada de colapso do estilete, podendo afetar também a formação da semente (LAYNE, 1983; ZANANDREIA et al., 2011).

## 2.5 Criopreservação

No cultivo do mamoeiro existem alguns desafios que dificultam a ampliação dos pomares, como por exemplo, a sua estreita base genética e a suscetibilidade às diversas pragas e doenças, assim, são necessárias algumas ações para reduzir o impacto dessas condições. Nesse sentido, para a sustentabilidade da produção e para a busca de soluções que mudam ao longo do tempo, principalmente no que diz respeito às mudanças climáticas, a preservação e a caracterização do banco de germoplasmas é de fundamental importância, pois, o mamoeiro apresenta grande diversidade genética e guarda genes de grande importância para os programas de melhoramento (ABREU et al., 2022).

Dessa forma, um caminho considerado importante e que pode ser adotado como estratégia para a conservação do germoplasma de mamoeiro, é a preservação dos grãos de pólen, pois, o banco de germoplasma do mamoeiro se organiza em múltiplos genes e o torna eficiente na conservação da diversidade

genética da cultura.

Existem diferentes estratégias de conservação que se organizam em múltiplas opções. Assim, uma técnica bastante promissora, sendo considerada uma estratégia viável para diferentes espécies vegetais, é a técnica de criopreservação, na qual permite o armazenamento de materiais biológicos através do congelamento, utilizando temperaturas muito baixas, geralmente,  $-196^{\circ}\text{C}$  e em nitrogênio líquido (BENSON, 2008; SOUZA F; SOUZA E; SILVA R, 2018; GALLO et al., 2018; PAIVA; COIMBRA; CASTRO, 2023). Como exemplos de materiais vegetais podem ser utilizados os brotos, os grãos de pólen, sementes, embriões zigóticos e somáticos, protoplastos, entres outros (BENSON, 2008). Além disso, a criopreservação apresenta como vantagem baixo custo para o armazenamento, uma vez que, há pouca intervenção e com isso pouca mão-de-obra, no entanto, demanda infraestrutura e mão-de-obra especializada (PAIVA; COIMBRA; CASTRO, 2023).

Para criar um protocolo eficiente de criopreservação é preciso alguns cuidados, como por exemplo, a verificação da redução do conteúdo de água no processo de armazenamento, pois, evita a formação de gelo, a ruptura celular e também, assegura a integridade do material utilizado no processo de congelamento (PAIVA; COIMBRA; CASTRO, 2023).

## **2.6. Doenças e vírus da mancha anelar (PRSV – P) do mamoeiro**

No cultivo do mamoeiro, as ocorrências de doenças têm sido um grande entrave para o alcance de altos rendimentos para os produtores. De acordo com Oliveira et al. (2000), o aparecimento das doenças no mamoeiro ocorre em função da interação do ambiente (clima, temperatura e umidade), do hospedeiro (mamoeiro), dos patógenos como os fungos, os vírus e as bactérias e do homem, no qual atua na disseminação das doenças através da utilização de mudas infestadas ou pelas práticas culturais adotadas dentro do cultivo.

O mamoeiro é afetado por um grande número de doenças causadas por vírus, fungos, bactérias ou outros organismos que prejudicam a sua produção. Além disso, apresenta distúrbios e anomalias de causas desconhecidas e não parasitárias, ou seja, o mamoeiro pode ter problemas que não são causados por esses organismos, mas por fatores desconhecidos, como alterações genéticas, condições climáticas, deficiência nutricional ou outros. As doenças podem afetar a

cultura em diferentes estágios do seu desenvolvimento e podem acometer as folhas, os ramos, as raízes, as flores e os frutos, e, dentro do cultivo, os danos podem chegar a 100% de perdas na produção (COSTA et al., 2021).

De acordo com Oliveira et al. (2011), as doenças de maior importância econômica são as doenças fúngicas, tais como tombamento ou *Damping – off*, sendo problema comum em sementeiras, no entanto, pode ocorrer no campo. As podridões, que afetam as raízes, o caule e os frutos, ocasionam grandes perdas e ocorrem em todas as regiões produtoras. A antracnose, doença fúngica que acomete bastante os frutos deixando-os imprestáveis para a comercialização e consumo, a varíola ou pinta-preta, a mancha de *Corynespora*, a mancha chocolate, a podridão preta e o oídio. Já as bacterioses são registradas ocasionalmente e não afetam economicamente a cultura, porém, não se descarta a possibilidade de se tornar um problema futuramente.

As viroses constituem o maior entrave à implantação da cultura, pois, possuem dificuldades no seu controle e da necessidade de migração que elas impõem (OLIVEIRA et al., 2011). De acordo com Costa et al. (2021), as viroses, por causarem muitos danos à produção, elas constituem importantes problemas nos pomares e podem causar destruição completa de uma plantação infectada. As três viroses que afetam o mamoeiro e mais importantes economicamente são o vírus da meleira (*Papaya stick disease vírus – PSDV*) que causa a perda do látex pelos frutos e pelas folhas, alterando o sabor, a consistência e a qualidade comercial do mamão, o vírus do amarelo – letal (*Papaya lethal yellowing virus – PLYV*) que causa o amarelecimento e a morte das plantas e o vírus da mancha anelar (*Papaya ringspot virus PRSV - P*) conhecido também como mosaico do mamoeiro (OLIVEIRA et al., 2011; COSTA et al., 2021) a virose de maior importância econômica e de maior distribuição geográfica nos países produtores.

O *Papaya ringspot virus* é uma espécie de vírus pertencente à família *Potyviriidae* e do gênero *Potyvirus*, sendo classificada em duas estirpes, nas quais se diferenciam por características biológicas. Segundo Costa et al. (2021), a estirpe *Watermelon* (PRSV-W) afeta sistematicamente as cucurbitáceas, já a estirpe *Papaya* (PRSV-P) possui a capacidade de infectar tanto as cucurbitáceas quanto o mamoeiro, porém o seu hospedeiro natural e de maior importância é o mamoeiro.

No Brasil, o PRSV-P é considerado o patógeno mais importante para a cultura, pois tem ocorrência em quase todos os estados brasileiros e além disso, é

bastante comum à sua ocorrência nos quintais de casas, em pequenos pomares e em margens de estradas, o que pode se transformar em fontes constantes do vírus (COSTA et al., 2021).

A estirpe PRSV – P é caracterizada por possuir partículas filamentosas, não envelopadas, alongadas e flexuosas, medindo cerca de 760 – 800 nm de comprimento e 12 nm de diâmetro. É um vírus constituído por 94,5% de proteínas e 5,5 % de ácido nucléico, além disso, possui único RNA de hélice simples e de sentido positivo (COSTA et al., 2021).

Segundo Costa et al. (2021), o PRSV-P é transmitido por pulgões de maneira não persistente e não se multiplica no vetor. A transmissão se inicia quando o pulgão se alimenta das plantas de mamoeiro já infectadas por um curto período de tempo, cerca de 15 segundos e logo em seguida se alimenta de plantas sadias de mamoeiro, portanto, a disseminação do vírus ocorre com muita rapidez por causa das movimentações dos insetos dentro do pomar, não ocorrendo transmissão via sementes. As espécies de pulgões mais conhecidas e que transmitem o vírus são: *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *Aphis fabae*, *Aphis coreopsidis* e *Aphis spiraecola* (OLIVEIRA et al., 2000; COSTA et al., 2021).

As plantas infectadas pelo vírus apresentam nas folhas mosaico proeminente e clorose, distorção, clareamento das nervuras, rugosidade, intenso mosqueado e redução nas lâminas foliares. Nos frutos, os sintomas se apresentam em manchas na forma de anéis, esverdeados e com o passar do tempo tornam-se em anéis necróticos. E geralmente as plantas quando infectadas apresentam porte reduzidos (OLIVEIRA et al., 2000; COSTA et al., 2021).

A detecção de viroses no mamoeiro envolve a aplicação de diferentes testes, considerando o tipo de vírus e o material a ser analisado. Alguns dos testes comumente utilizados são os testes sorológicos, moleculares e biológicos.

Os testes sorológicos consistem em utilizar anticorpos específicos para detectar a presença de antígenos virais em amostras de plantas. Esses testes podem ser realizados por meio de técnicas como ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), DAS-ELISA (double antibody sandwich-ELISA) ou DIBA (dot immunobinding assay). São considerados rápidos, sensíveis e específicos, mas requerem reagentes e equipamentos adequados. Outros testes utilizados são os moleculares, que utilizam sondas ou primers específicos para amplificar e detectar o material genético do vírus em amostras de plantas. Podem ser realizados

por meio de técnicas como PCR (polymerase chain reaction), RT-PCR (reverse transcription-PCR) ou qPCR (quantitative PCR). São os mais sensíveis, específicos e quantitativos que os testes sorológicos, requerem mais cuidados com a qualidade das amostras e com a prevenção de contaminações (MACEDO; SOUZA JUNIOR., 2005b; FERREIRA et al., 2016)

E o teste biológico, que consiste utilizar plantas indicadoras para observar os sintomas causados pelo vírus em amostras de plantas. Esse teste pode ser feito por meio de técnicas como enxertia, inoculação mecânica ou inoculação por vetores. É o teste mais simples, barato e útil para identificar novos vírus ou variantes virais, mas é menos sensível, específico e rápido que os outros testes (FERREIRA et al., 2016). Esses testes podem ser utilizados isoladamente ou em combinação, dependendo do objetivo e da disponibilidade de recursos.

## **2.7 Resistência do mamoeiro a doenças**

O mamoeiro possui resistência natural a algumas doenças, mas também é suscetível a várias outras. Essa resistência pode estar atribuída a diversos fatores, incluindo a genética. De acordo com Vivas et al. (2013), existem variedades de mamoeiro que possuem predisposição genética para resistir a determinadas doenças. Além disso, o mamoeiro possui mecanismos de defesa naturais contra patógenos. Esses mecanismos de defesa podem envolver a produção de enzimas que destroem as paredes celulares dos patógenos, a síntese de substâncias antimicrobianas ou a ativação de vias de sinalização que desencadeiam uma resposta de defesa eficaz (VIVAS et al., 2013).

Adicionalmente, o mamoeiro possui a capacidade de ativar suas defesas naturais quando exposto a patógenos ou moléculas associadas a eles, o que é conhecido como resistência induzida. Esse pode fortalecer a sua capacidade de combater infecções futuras. Quando detecta a presença de patógenos, o mamoeiro pode desencadear uma resposta de defesa mais intensa, ativando vias de sinalização e mobilizando recursos para combater a infecção (OLIVEIRA et al., 2008).

Em alguns casos, o mamoeiro pode competir com os patógenos por recursos essenciais. Podendo secretar compostos antimicrobianos que inibem o crescimento dos patógenos ou ocupar o espaço disponível no hospedeiro,

dificultando o estabelecimento dos patógenos.

É fundamental ressaltar que esses mecanismos de resistência natural podem variar entre as diferentes variedades de mamoeiro. Cada variedade pode apresentar diferentes níveis de eficácia contra determinados patógenos, uma vez que a resistência é influenciada por fatores genéticos e adaptativos específicos de cada variedade. Segundo Gonsalves et al. (2012), não há resistência natural ao PRSV – P relacionado ao mamoeiro comercial *Carica papaya* L., no entanto, há resistência em espécies, como do gênero *Vasconcellea*. Portanto, embora o mamoeiro tenha mecanismos de defesa naturais, é importante reconhecer que eles não são universalmente eficazes contra todos os patógenos. A resistência natural do mamoeiro pode ser efetiva contra certos patógenos, enquanto outros podem encontrar maneiras de contornar essas defesas ou explorar vulnerabilidades específicas da planta (OLIVEIRA et al., 2008).

Em resumo, a resistência do mamoeiro a doenças é resultado de uma combinação de fatores genéticos, fisiológicos e ambientais. A diversidade genética, os mecanismos de defesa naturais, as interações com microrganismos benéficos e as boas práticas agrícolas desempenham papéis importantes no fortalecimento da resistência do mamoeiro. O contínuo investimento em pesquisa, melhoramento genético e adoção de práticas sustentáveis de manejo são essenciais para garantir a saúde e a produtividade da cultura.

### 3. REFERÊNCIAS

- ABREU, A. G. de et al. **Conservação e uso de recursos genéticos vegetais para a alimentação e a agricultura no Brasil: 2012 a 2019**. Brasília, DF: Embrapa, 2022, 116 p.
- ALMEIDA, A. M. R.; CARVALHO, S. L. C. Ocorrência do vírus do mosaico do mamoeiro no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v. 3, p. 220-225. 1978.
- ARADHYA, M. K. et al. A phylogenetic analysis of the genus *Carica* L. (Caricaceae) based on restriction fragment length variation in a cp DNA intergenic spacer region. **Genetic resources and Crop Evolution**, v. 46, p. 579-586, 1999.
- BADILLO, V. M. *Carica* L. vs *Vasconcellea* St.Hil. (Caricaceae): con le rehabilitación de este último. **Ernstia**, v. 10, p. 74-79.
- BADILLO, V. M. Monografía de la familia *Caricaceae*. **Editorial Nuestra América C. A.** Maracay Venezuela. 1971, p. 221.
- BENSON, E. E. Cryopreservation of phytodiversity: A critical appraisal of theory & practice. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 27, n. 3, p. 141-219, 2008.
- BISPO, G. L. **Fenologia e Desempenho Ecofisiológico de *Vasconcellea quercifolia* A. St. – Hill**. 2020. 88 p. Tese (Universidade Estadual Paulista – Unesp). Faculdade de Ciências Agrônômicas. Botucatu, SP. Brasil. Disponível em: content (unesp.br)
- CAI, W. et al. A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. **In Vitro Cellular & Development Biology – Plant: journal of the Tissue Culture Association**, v.35, n. 1, p. 61 - 69, 1999.
- CHALAK, S. et al., Papaya ring spot disease management: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.5, n.5, p. 1 – 9, 2017.
- CHÁVEZ-PESQUEIRA, M., NÚÑEZ-FARFÁN, J. Domestication and genetics of papaya: A review. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v 5, p. 1–9, 2017.
- CONCEIÇÃO, J. Q. da **Criopreservação de grãos de pólen como uma estratégia adicional para conservação de acessos de mamoeiro**. 2021. 46 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas, BA. Disponível em: Josimare\_Queiroz\_da\_Conceição.pdf (ufrb.edu.br)
- COSTA, A. et al. **A cultura do mamoeiro**. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Brasília, DF. 426p. 2021.
- COSTA, F. R da. **Estudos das relações genômicas em espécies de Caricaceae com base em marcadores citomoleculares**. 2008. 92 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de plantas) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goyataces, RJ. 2008. Disponível em: Tese DS Fabiane R Costa (uenf.br)
- COTRUT, R. et al. *Carica papaya* L. cultivated in greenhouse conditions. **Forestry, and Biotechnology**, v.3, p.130-136, 2017.
- DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. New York: Oxford University Press. 1992.

DAMASCENO JUNIOR, P. C. et al. Karyotype determination in three Caricaceae species emphasizing the cultivated form (*Carica papaya* L.). **Caryologia**, v.62, p.10-15. 2009 a.

DAMASCENO JUNIOR, P. C. et al. Preferential reproduction mode of hermaphrodite papaya plant (*Carica papaya* L.; *Caricaceae*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p.182-189. 2009 b.

DANTAS, J. L. L.; NETO, M. T. Aspectos botânicos e fisiológicos. In: TRINDADE, A.V. (Org.). **Mamão, Produção: aspectos técnicos**. Brasília: **Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia**, p.11-14, 2000.

DINESH, M. R. et al. Breaking the intergeneric crossing barrier in papaya using sucrose treatment. **Scientia Horticulture**, v. 114, n.1, p. 33–36, 2007.

FAO. **Food and agriculture organization of the United Nations for a world without hunger**. 2023. Area harvested, yield and production in 2021/FAOSTAT/FAO

StatisticsDivision.Disponível:<[https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries\\_by\\_commodity](https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity)>. Acesso em: 20 jun. 2023.

FERREIRA, S. A., et al. Detecção de vírus em mamoeiro. Em: **Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura**. [s.l.] Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular Técnica, 2016. v. 117.

FERREIRA, J. A. B. **Aspectos da biologia floral e reprodutiva de diferentes acessos de mamoeiro**. 2018. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA. Disponível em: DISSERTAÇÃO\_-\_PPGAGRA\_-\_JACQUELINE\_ALVES\_BORGES\_FERREIRA.pdf (ufrb.edu.br)

FITCH, M. M. et al. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. **Nature biotechnology**, v. 10, n. 11, p.1466-1472, 1992.

FUENTES, G.; SANTAMARÍA, J. M. Papaya (*Carica papaya* L.): Origin, Domestication, and Production. Em: **Genetics and Genomics of Papaya**. New York, NY: Springer New York, 2014. p. 3 -15.

GABURRO, N. de O. P. **Estudo da letalidade gamética e zigótica associada a letalidade observada no mamoeiro (*Carica papaya* L.)** Campos dos Goytacazes (RJ),47 p. Dissertação ( Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). 2007. Disponível em: Microsoft Word - Tese Completa Neuma.doc (uenf.br)

GALEN, C., ZIMMER, K. A., NEWPORT, M. E. A. Pollination in floral scent morphs of *Polemonium viscosum*: a mechanism for disruptive selection on flower size. **Evolution**, v.41, p. 599 - 606. 1987.

GALLO, C. M. et al. Cryopreservation of *Vasconcellea quercifolia* St.-Hil (Caricaceae) Zygotic Embryos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1318-1324, 2018.

HAMILTON, R. A. **A preliminary report on occurrence and control of papayamosaic virus in the Philippines**. Philippine Council for Agriculture, Forestry and Natural Resources Research and Development (PCARRD), Los Banos. 1986.

- HOLMES, F. O. et al. Ringspot of papaya (*Carica papaya*) in the Hawaii islands. **Phytopathology**, v. 38, p. 310–312. 1948.
- HORNER, H. T.; PALMER, R. G. Mechanisms of genic male sterility. **Crop Science**, v. 35, p.1527-1535, 1995.
- HOROVITZ, S.; JIMENEZ, H. Cruzamientos interespecíficos e intergenéricos em Caricaceae y sus implicaciones fitotécnicas. **Agronomia tropical**, v.17, p. 323-344, 1967.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção de Mamão 2020. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/mamao/br> > [acessado em: 16 dez. 2021].
- JAYAVALLI, R. et al. Breaking the intergeneric hybridization barrier in *Carica papaya* and *Vasconcellea cauliflora*. **Scientia Horticulturae**, v.130, n.4, p. 787-794. 2011.
- JIMENEZ, H.; HOROVITZ, S. Cruzabilidad entre especies de Carica. **Agricultura Tropical**, Maracay, v. 17, p.323-342, 1958.
- KELLER, E. R. J.; PANIS, B.; ENGELMANN, F. In vitro storage and Cryopreservation as substantial complements in concerted actions to better maintain and use crop germplasm. **Acta Horticulturae**, v. 961, p. 35-50, 2012.
- KIST, B. B. et al. **Anuário Brasileiro de Horti & Fruti 2021**. Santa Cruz do Sul: Ed. Gazeta Santa Cruz, 2021. 104 p.
- KITAJIMA, E. W. et al. Ocorrência do vírus do mosaico do mamoeiro (*papaya ringspot vírus*) no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p. 106 -108. 1987
- KITAJIMA, E. W. et al. Ocorrência do vírus do mosaico do mamoeiro (*papaya ringspot vírus*) no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p. 365. 1986. (Resumo).
- KNUDSEN, H. Directorio de colecciones de germoplasma en América Latina y el Caribe. Roma: IPGRI, 2000. 369 p.
- LAYNE, R. E. C. **Methods in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, p. 48-65, 1983.
- LIMA, J. A. A.; CAMARÇO, R. F. E. A. Viruses that infect papaya in Brazil. **Virus: Reviews & Reseach**, v.2, p.126-127, 1997.
- LIMA, J. A. A; GOMES, M. N. S. Identificação de "*papaya ringspot virus*" no Ceará. **Fitossanidade**, v.1, p.56-59, 1975.
- LINDNER RC, JENSEN DD, IKEDA W (1945) Ringspot: new papaya plunderer. **Hawaii Farm Home**, v. 8, p.10–14, 1945.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008, v.1, 368 p.
- MACEDO, M. A.; SOUZA JUNIOR, M. T. Diagnóstico de viroses em mamoeiro. Em: **Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura**. [s.l.] Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2005b. v. 161.
- MAGDALITA, P. M. et al. Screening *Carica papaya* x *C. cauliflora* hybrids for resistance to *papaya ringspot virus* - type-P. **Plant Pathology**, v.46, p. 837-

841,1997.

MANICA, I. **Fruticultura Tropical 3: mamão**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1982. 374 p.

MANSHARDT, R. M.; WENSLAFF, T. F. Interespecific hybridization of papaya with other *Carica* species. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v.114, p.689-694, 1989.

MARTELLETO, L. A. P. et al. Expressão da esterilidade feminina e da carpeloidia em mamoeiro sob diferentes ambientes de cultivo protegido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1185 - 1193, 2011.

MING, R., YU, Q., MOORE, P.H. Sex determination in papaya. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.18, n.3, p. 401 - 408, 2007.

OLIVEIRA, A. A. R. et al. **Mamão Fitossanidade. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura; Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia**. [s.l.] Frutas do Brasil, 2000. p. 60

OLIVEIRA, A. A. R. Indução de resistência para o controle de doenças do mamoeiro. Em: **Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, 2008, p. 53-71.

OLIVEIRA, A. A. R. et al. Manejo de doenças do mamoeiro. **Em: Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura**, 2011, p. 28.

OLIVEIRA, F. C. et al. Ocorrência e estudos ultramicroscópicos do vírus do mosaico do mamoeiro ("*Papaya ringspot virus*") no estado do Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p.195, 1992.

PAIVA, R. P.; COIMBRA, M. C.; CASTRO, A. H. F. Criopreservação de plantas medicinais: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 19, n. 4, p. 583 - 591, 2023.

PANIS, B.; NAGEL, M.; HOUWE, VAN DEN HOUWE, I. Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in vitro collections and/or in liquid nitrogen. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1634, 2020.

PEREIRA, T. N. S., COSTA, F. R., DAMASCENO JUNIOR, P. C. Espécies silvestres: um germoplasma importante para as atividades de melhoramento. Em: PEREIRA, T. N. S. (Ed.). **Germoplasma: Conservação, Manejo e Uso no Melhoramento de Plantas**. Viçosa: Arka, 2010. p. 205 - 254.

PISSATTO, M. **Comportamento Germinativo das Sementes de *Vasconcellea quercifolia* A. St.-Hil. (CARICACEAE)** 2015. 95 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia) - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. Brasil. 2015. Disponível em: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA (ufsm.br)

RAJASEKHARAN, P. E. et al. Pollen Cryobanking for Tropical Plant Species. Em: **Conservation of tropical plant species**. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 65 – 75.

RAMOS, H. C. C. et al. Genetic characterization of papaya plants (*Carica papaya* L.) derived from the first backcross generation. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 10, n. 1, p. 393-403, 2011

REZENDE, J. A. M. et al. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Doenças das**

**plantas cultivadas**, v. 2, p. 486-496, 1997.

SERAFINI, S. et al. **Aspectos e peculiaridades da produção comercial de mamão (*Carica papaya* Linnaeus) no Brasil: estratégias para o futuro da cultura.** *Research, Society and Development*, v. 10, n. 12, 2021.

SOUZA F. V.; SOUZA E. H.; SILVA R. L. Cryopreservation of pollen grains of pineapple and other bromeliads. **Em: Plant Cell Culture Protocols.** New York, NY: Springer New York, 2018, p. 279 – 288.

SOUZA JUNIOR. 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.

SOUZA JUNIOR. M. T. Mamão Transgênico: Uso da engenharia genética para obter resistência ao vírus da mancha anelar. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, p. 132-137, 2000.

TENNANT, P. F. **Evaluation of coat protein transgenic papaya ringspot virus isolates and development of transgenic papaya for Jamaica.** (Ph.D. Dissertation) Ithaca. Cornell University. 1996.

TENNANT, P.F. et al. 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.

VIVAS, M. et al. Herança da resistência do mamoeiro a doenças fúngicas com base em análise dialéctica de Hayman. **Bragantia**, v. 72, n. 4, p. 343-351, 2013.

YOUNG, B. A.; SHERWOOD, R. T.; BASHAW E. C. Cleared-pistyl and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p. 1668–1672, 1979.

ZANANDREA, E. et al. Receptividade do estigma e crescimento do tubo polínico em flores de pessegueiro submetidas a temperatura elevada. **Ciência Rural**, v. 41: 2066 – 2072, 2011.

ZERBINI, F. M.; ZAMBOLIM, E. M. Família *Potyviridae* - parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.7, p.1-67, 1999.

ZERBINI, F. M.; ZAMBOLIM, E. M. Família *Potyviridae* - parte II. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.8, p.225-265, 2000.

## CAPÍTULO 1

### **Criopreservação de grãos de pólen em *Vasconcellea quercifolia* A. St. – Hil. : Estratégia biotecnológica para conservação de germoplasma em Caricaceas**

**RESUMO:** A conservação dos grãos de pólen é fundamental para preservar alelos e superar desafios como, assincronia de florescimento, otimizar cruzamentos intra e interespecíficos e intercâmbio de germoplasma. Neste estudo, buscou-se estabelecer um protocolo para criopreservar grãos de pólen de *Vasconcellea quercifolia*. Foram realizados ensaios para a escolha do melhor tempo de desidratação e criopreservação dos grãos de pólen em nitrogênio líquido (NL) a  $-196^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e durante 1 ano. A viabilidade gamética foi verificada através de testes de germinação *in vitro* e *in vivo*, em quatro plantas masculinas e duas plantas femininas de *V. quercifolia*. Foram coletadas 15 anteras inteiras ao acaso na antese nos períodos de março a abril e setembro a novembro de 2022 e o grau de umidade dos grãos de pólen foi determinado. Posteriormente, as anteras foram desidratadas por diferentes tempos (1, 2 e 3 horas) em sílica gel. Para o teste de germinação *in vitro*, as anteras com grãos de pólen desidratados foram colocadas em meio de cultura (BK 10% sacarose) a  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Foram considerados germinados tubos polínicos com diâmetro igual ou superior ao diâmetro do grão de pólen. No ensaio de criopreservação, as anteras foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio, inseridas no criotubo e imersas em NL a  $-196^{\circ}\text{C}$  por dois períodos: 24 horas e 1 ano. O descongelamento dos grãos de pólen foi realizado à temperatura ambiente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. Os resultados mostraram que os grãos de pólen de *V. quercifolia* suportam desidratação por até 3 horas sem prejudicar a viabilidade, não havendo diferença estatística entre os tempos de 2 e 3h, sendo 2h mais indicado por apresentar o maior percentual. A criopreservação em NL manteve a viabilidade do grão de pólen (*in vitro*) por 24 horas e uma leve redução quando conservado por um ano, sem, no entanto, comprometer a viabilidade gamética. O comprimento do tubo polínico não foi afetado pela conservação em NL. As polinizações (*in vivo*) provenientes de pólen criopreservados mostraram a produção de frutos com sementes viáveis. Conclui-se que a criopreservação de grãos de pólen de mamoeiro silvestre pode ser uma estratégia complementar para conservação de alelos e superação de barreiras de assincronia de florescimento.

**Palavras chave:** Mamoeiro, Conservação, Nitrogênio Líquido, Viabilidade Gamética.

**Cryopreservation of *Vasconcellea quercifolia* A. St. - Hil. pollen: A biotechnological strategy for germplasm conservation in Caricaceae.**

**ABSTRACT:** The conservation of pollen grains is essential for preserving alleles and overcoming challenges such as flowering asynchrony, optimizing intra and interspecific crosses, and germplasm exchange. In this study, the aim was to establish a protocol for cryopreserving pollen grains of *Vasconcellea quercifolia*. Assays were conducted to determine the optimal dehydration and cryopreservation times for pollen grains in liquid nitrogen (LN) at -196°C for 24 hours and over 1 year. Gametic viability was assessed through in vitro and in vivo germination tests on four male and two female *V. quercifolia* plants. Fifteen randomly selected whole anthers were collected during the anthesis periods of March to April and September to November 2022, and the pollen grain moisture content was determined. Subsequently, the anthers were dehydrated for different durations (1, 2, and 3 hours) using silica gel. For the in vitro germination test, anthers with dehydrated pollen grains were placed in a culture medium (BK 10% sucrose) at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  for 24 hours. Pollen tubes with a diameter equal to or greater than the pollen grain diameter were considered germinated. In the cryopreservation assay, anthers were placed in aluminum foil envelopes, inserted into cryotubes, and immersed in LN at -196°C for two periods: 24 hours and 1 year. Thawing of pollen grains was done at room temperature. The experimental design was completely randomized with three replications. The results indicated that *V. quercifolia* pollen grains could endure dehydration for up to 3 hours without impairing viability, with no statistical difference between the 2-hour and 3-hour durations, with 2 hours being more favorable due to the highest percentage of viability. Cryopreservation in LN maintained pollen grain viability (in vitro) for 24 hours, with a slight reduction after 1 year of preservation, without compromising gametic viability. Pollen tube length was unaffected by LN preservation. Pollinations (in vivo) using cryopreserved pollen resulted in the production of fruits with viable seeds. It is concluded that cryopreservation of wild papaya pollen grains could be a complementary strategy for allele conservation and overcoming flowering asynchrony barriers.

**Keywords:** Papaya, Conservation, Liquid Nitrogen, Gametic viability.

## 1. INTRODUÇÃO

A família Caricaceae, é composta por 35 espécies distribuídas em seis gêneros: *Jaracatia* (7 espécies), *Jarilla* (3 espécies), *Carica* (uma espécie *Carica papaya* L. (é a mais importante economicamente), *Horovitzia* (uma espécie), *Vasconcellea* (21 espécies) e *Cylicomorpha* (2 espécies) (BADILLO, 2000).

Estudos envolvendo o gênero *Vasconcellea* têm despertado interesse nos programas de melhoramento genético do mamoeiro, pois, algumas espécies desse gênero apresentam genes de resistência ao PRSV-P (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2017), o vírus da mancha – anelar ou mosaico do mamoeiro, doença de maior importância econômica e de maior distribuição geográfica nos países produtores (SHARMA; TRIPATHI, 2016). A espécie *Vasconcellea quercifolia* (MARTINS e CARVALHO, 2023), é frequentemente encontrada em margens de rios, capoeirões, bordas de matas e beiras de rodovias, podendo ocorrer em locais com condições edafoclimáticas, como os bosques úmidos e montanhas altas (LIDIO; ALEXANDRE; ADEMIR, 2011).

As espécies silvestres são definidas como uma população de indivíduos que vivem em condições naturais sem interferência humana e, portanto, estão suscetíveis apenas à seleção natural, ou seja, são aquelas que vivem na natureza sem a ajuda ou controle dos seres humanos e se adaptam ao ambiente e aos recursos disponíveis por meio da seleção natural (CHALAK et al., 2017). Uma coleção de germoplasma de uma espécie deve conservar além de acessos representantes da forma cultivada, também acessos de espécies silvestres e dessa forma garantir a manutenção da variabilidade genética da cultura. A conservação dos recursos genéticos do mamoeiro desempenha um papel crucial na garantia da segurança alimentar, na adaptação às mudanças climáticas e no desenvolvimento de variedades produtivas, resistentes às doenças e melhor adaptadas às mudanças climáticas (DANTAS; NETO, 2000; DANTAS; LEDO; SOUZA JUNIOR, 2000). Portanto, a conservação de germoplasma deve objetivar seu uso futuro e ser realizada de forma eficiente com técnicas adequadas.

Nesse contexto, várias são as estratégias de preservação de germoplasma cultivado e exótico. A conservação de materiais biológicos em temperaturas ultrabaixas (-196°C) e em nitrogênio líquido denominada de criopreservação (CARVALHO; VIDAL, 2003), tem possibilitado preservar materiais vegetais a longo

prazo com baixo custo de armazenamento, já que demanda pouca intervenção humana e com potencial reduzido de variações somaclomais, sendo uma alternativa como duplicata de segurança do germoplasma conservado (CABANEZ et al., 2017; PAIVA; COIMBRA, CASTRO, 2023). A criopreservação do pólen é crucial para complementar a preservação do germoplasma, pela conservação de alelos (SILVA et al., 2017; SOUZA et al., 2015), e superar possíveis discrepâncias no florescimento e facilitar o cruzamento entre plantas que crescem em locais diferentes e distantes. O armazenamento de pólen nos métodos convencionais, reduzindo a temperatura e a umidade dos grãos de pólen permitem armazenamento dos mesmos por um curto período de tempo. Damasceno et al. (2008), avaliando a conservação de grãos de pólen de mamoeiro a curto prazo concluiu que é possível conservar os grãos de pólen das cultivares Golden e Tainung 01 diretamente no botão floral acondicionados em geladeira ou freezer por 30 e 60 dias, respectivamente e que não há diferenças estatísticas em relação a conservação em geladeira ou freezer. Entretanto, o armazenamento de pólen por longos períodos de tempo precisam ser avaliados pois amplia as possibilidades de uso.

Conceição (2021), analisando a criopreservação de pólen de 17 acessos de mamoeiro (*C. papaya*) provenientes do BAG de mamão da Embrapa mandioca e fruticultura observou que é possível criopreservar grãos de pólen de mamoeiro após um tratamento de desidratação por 2 h em sílica gel e estes apresentaram altos percentuais de germinação *in vitro* depois de imersos em NL por 24 horas e mostraram 80% das sementes viáveis.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de criopreservação de grãos de pólen da *V. quercifolia* com foco na conservação de alelos e na sua utilização no programa de melhoramento genético do mamoeiro.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material genético e local e período**

Este estudo foi realizado com plantas masculinas e femininas da espécie *V. quercifolia* (acesso 269) pertencente ao Banco de Germoplasma de Mamão da Embrapa Mandioca e Fruticultura (BAG-Mamão), em Cruz das Almas, Bahia (12°48`S; 39°06`W; 225 m) com plantas de 18 meses de idade. A adubação e os

tratos culturais seguiram as recomendações para a cultura do mamoeiro (OLIVEIRA; SOUZA; COELHO, 2010)

## 2.2. Desidratação dos grãos de pólen

As flores masculinas foram coletadas no período de primavera/verão, no início da manhã e na fase de antese. Logo foram conduzidas para o Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura para a retirada das anteras, que foram submetidas aos testes de desidratação e conservação em longo prazo.

Determinou-se o grau de umidade dos grãos de pólen frescos adotando a mesma metodologia utilizada para determinação do grau de umidade de sementes (BRASIL, 1992). As anteras foram coletadas em antese floral, no início da manhã, e conduzidas para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais na Embrapa Mandioca e Fruticultura para serem submetidas aos testes de desidratação e conservação em nitrogênio líquido.

Para a avaliação da tolerância dos grãos de pólen à desidratação, as anteras foram colocadas em dessecadores com sílica gel por diferentes períodos (1, 2 e 3 horas). Como controle da viabilidade polínica, foram utilizadas anteras sem desidratação.

Para obtenção do conteúdo de água do controle, ou seja, do pólen fresco e sem passar pela desidratação (tempo 0), envelopes de papel alumínio foram pesados em uma balança de precisão (balança com sensibilidade de 0,001g) para estabelecer o peso da tara (t). Em seguida, as anteras foram depositadas nos envelopes e pesadas para determinar o peso úmido (P). As anteras nos envelopes de alumínio foram desidratadas em estufa a 105° por 3 horas, e novamente pesadas para obtenção do peso seco (p). O conteúdo de água das amostras foi determinado pela seguinte equação:

$$U = \left( \frac{P_u - P_s}{P_u - P_t} \right) \times 100$$

Eq. (1)

Onde: U= conteúdo de água presente nas amostras; Pu = peso úmido; Ps = peso seco; Pt = peso da tara.

Para obtenção do conteúdo de água nos diferentes tempos de desidratação, inicialmente, os envelopes de papel alumínio, foram pesados em uma balança de precisão para estabelecer o peso da tara (t). Em seguida, as anteras foram

depositadas nos envelopes e submetidas a desidratação em dessecador contendo sílica gel nos diferentes tempos (1, 2 e 3 h). Após esse período, as amostras foram pesadas para a obtenção do segundo valor (P) e logo submetidas à estufa a 105° por 3 horas, e novamente pesadas para obtenção do peso seco (p). Os valores do conteúdo de água das amostras desidratadas, também foram determinados a partir da equação citada acima, conforme metodologia utilizada para determinação do grau de umidade de sementes (BRASIL, 1992).

### 2.3 Germinação *in vitro* dos grãos de pólen e viabilidade polínica

Após a desidratação, as anteras com os grãos de pólen foram distribuídas em meio de cultura com auxílio de um pincel e armazenadas em câmara climatizada sob a temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas. Em seguida, foram microfotografadas em estereomicroscópio Leica EZDA (Leica, Wetzlar, Alemanha), com objetiva de aumento de 35x. O mesmo procedimento foi realizado para o controle. Os grãos de pólen germinados foram corados com azul de toluidina a 1% para análises e fotomicrografias. Como controle da viabilidade polínica foram utilizadas anteras que não passaram pelo processo de dessecação.

A viabilidade dos grãos de pólen, controle e após a desidratação, foi averiguada pela germinação *in vitro* e pelo crescimento do tubo polínico em meio de cultura BK (BREWBACKER; KWACK, 1963), composto por:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,01%);  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,03%);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,02%);  $\text{KNO}_3$  (0,01%); sacarose (10%); ágar (0,5%) e pH 6,5. A escolha deste meio foi baseada no estudo de Ferreira (2018) que observou sua eficiência na germinação *in vitro* de grãos de pólen em acessos de mamoeiro.

A porcentagem de germinação dos grãos de pólen foi determinada pela contagem de 300 grãos de pólen de cada tratamento por repetição, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri, totalizando 900 grãos de pólen. As imagens para a contagem foram obtidas com o auxílio de um estereomicroscópio com amplitude de 35x.

Para avaliação do crescimento do tubo polínico foram selecionados aleatoriamente 60 tubos polínicos por tratamento (controle e desidratação), sendo 20 tubos por repetição. O comprimento do tubo polínico (mm) foi mensurado com o auxílio do software ImageJ 1.46r (RASBAND 1997-2016) utilizando as imagens

obtidas a partir do estereomicroscópio.

A germinação polínica foi considerada efetiva quando o comprimento do tubo polínico foi igual ou superior ao diâmetro do grão de pólen (PÉREZ et al., 2019).

A porcentagem de germinação dos grãos de pólen final foi calculada empregando a seguinte expressão:

$$PG(\%) = \frac{(GPGc)}{(TGPc)} \times 100$$

Eq. (2)

Onde:  $PG$  = porcentagem de germinação de grão de pólen;  $GPGc$ =número de grãos de pólen viáveis por campo;  $TGPc$  = número total de grãos de pólen por campo.

O delineamento experimental utilizado para o ensaio de germinação após a desidratação foi o inteiramente casualizado com três repetições sendo cada repetição representada por uma placa de Petri, com cinco anteras.

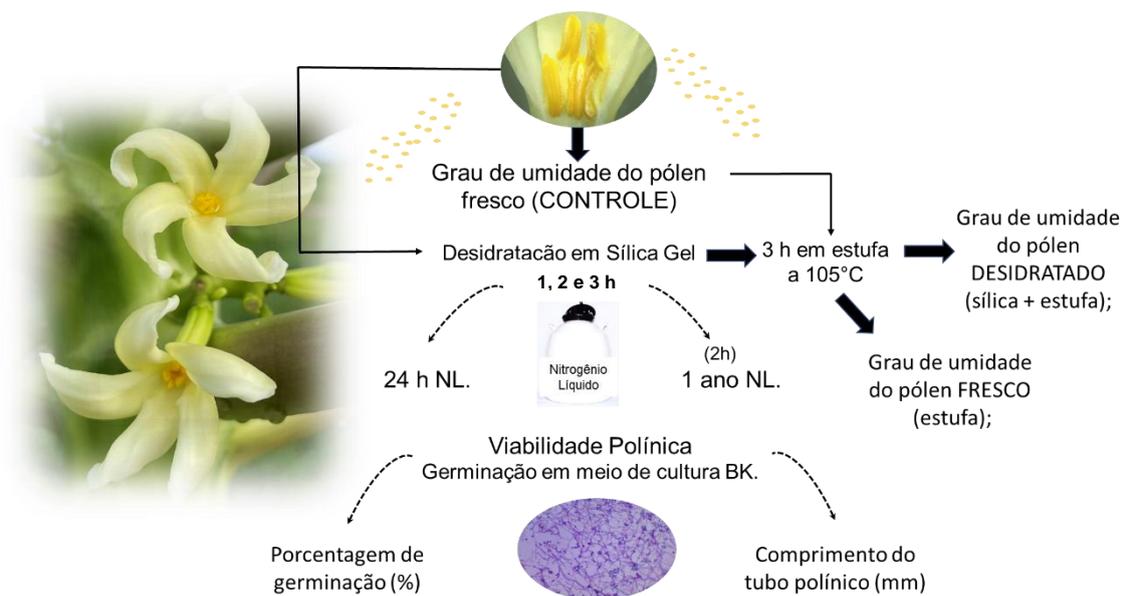
#### 2.4. Criopreservação de grãos de pólen

Para os ensaios de criopreservação foram utilizados os tempos de desidratação avaliados anteriormente, considerando-se os conteúdos de água obtidos. Após a desidratação (1, 2 e 3 horas), as anteras com os grãos de pólen foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio e colocadas em tubos criogênicos (2 mL), fixadas em *canisters*, que foram diretamente conduzidos para botijões contendo nitrogênio líquido (-196°C) por um período de 24 horas. Com base nos resultados de desidratação/criopreservação obtidos com os 3 tempos de exposição à sílica, optou-se pelo melhor tempo para avaliar a viabilidade polínica de grãos de pólen criopreservados pelo período de um ano (Figura 1).

A viabilidade dos grãos de pólen criopreservados foi verificada pela germinação *in vitro* e pela capacidade de crescimento do tubo polínico, seguindo o procedimento descrito anteriormente. Foi realizado também o teste de viabilidade *in vivo* (Figura1).

O delineamento experimental utilizado para o ensaio de germinação após criopreservação tanto nos tempos de 24 horas como durante 1 ano, foi o mesmo utilizado para o ensaio de germinação após a desidratação de grãos de pólen.

**Figura 1.** Representação esquemática das etapas sequenciais do ensaio de criopreservação de pólen de *Vasconcellea quercifolia*.



Autora: Juliana da Silva Lopes Pereira

## 2.5. Teste de Viabilidade *in vivo* dos grãos de pólen

Para a avaliação da viabilidade *in vivo* dos grãos de pólen foram realizadas dezessete polinizações nas plantas femininas de *V. quercifolia* utilizando os grãos de pólen previamente dessecados por 2 horas e criopreservados (-196°C) por 24 horas e 1 ano. Também foram realizadas polinizações com os grãos de pólen fresco como controle.

No período de floração, as flores das plantas receptoras foram protegidas na pré-antese com sacos de papel vegetal, para evitar polinizações naturais. Logo em seguida, foram inseridos no estigma da flor, com auxílio de um pincel, os grãos de pólen criopreservados. O descongelamento ocorreu no momento em que as anteras foram retiradas do nitrogênio líquido e levadas em placas de Petri ao campo, até plantas femininas de *V. quercifolia* pertencentes ao BAG-Mamão. Posteriormente, as flores polinizadas manualmente foram novamente protegidas com sacos de papel para evitar possíveis polinizações por insetos. Cada flor polinizada foi identificada com o número do tratamento e a data da polinização.

Após a realização das polinizações esperou-se um período de três a quatro meses para colher os frutos maduros. No período de amadurecimento dos frutos

foi realizado o teste de germinação com as suas sementes oriundas dos frutos polinizados, utilizando caixas plásticas do tipo gerbox com duas folhas de papel germitest, umedecidas com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco.

## 2.6. Análise estatística dos dados

Os dados do ensaio de desidratação e de criopreservação foram submetidos ao teste F da análise de variância considerando o delineamento inteiramente casualizado. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados de germinação foram normalizados por arcsen ( $\sqrt{x}/100$ ) para cumprir os pressupostos da análise de variância. As análises estatísticas e os gráficos foram gerados com auxílio do pacote AgroR do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2022).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

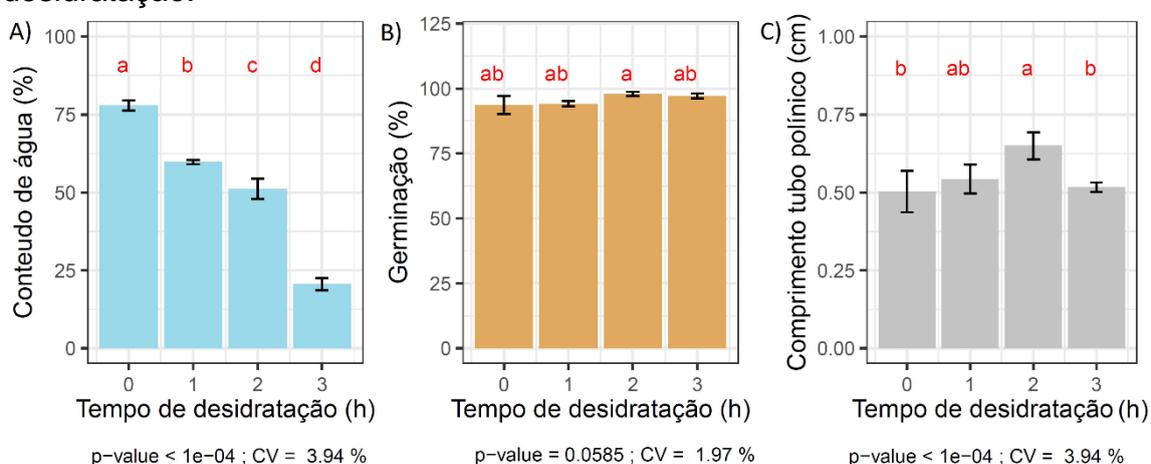
### 3.1. Desidratação e germinação dos grãos de pólen

O conteúdo de água medido dos grãos de pólen de *V. quercifolia* fresco foi de 77,94% (Figura 2a). Em relação aos dados de tolerância dos grãos de pólen sob diferentes tempos de desidratação em sílica, houve uma pequena variação da germinação entre os tratamentos (Figura 2b), incluindo o controle, apesar das diferenças estatísticas apresentadas no conteúdo de água (Figura 2a).

Todos os tratamentos apresentaram elevada porcentagem de germinação, acima de 90% (Figura 2b). Já para o crescimento do tubo polínico, após 24 h em meio de cultivo, o melhor resultado foi obtido com uma exposição de 2 horas à sílica, resultado que foi utilizado para a realização dos ensaios de criopreservação por um ano (Figura 2c). É possível perceber que a germinação e o comprimento do tubo polínico associados ao tempo de desidratação de duas horas (2 h) apresentaram destaque quando comparados com o tempo de desidratação de três horas (3 h) (Figura 2: A, B). Em um trabalho realizado com 17 acessos do Banco de Germoplasma de Mamão, Conceição (2021) também observou que o tempo de duas horas de desidratação dos grãos de pólen de *C. papaya* L. em sílica foi o mais adequado para a tolerância dos grãos de pólen, favorecendo, portanto sua criopreservação posteriormente. Uma diferença observada entre os trabalhos, se

refere ao conteúdo de água nos tratamentos de desidratação realizados. Nos acessos de *C. papaya*, o conteúdo de água com o tempo de desidratação de 2 horas, variou de 24% a 31%, enquanto para *V. quercifolia* esse valor foi praticamente o dobro (51%) (Figura 2a). Entretanto, essa diferença não influenciou nos resultados obtidos, como pode ser visto na Figura 2b, onde todos os tratamentos apresentaram taxas de germinação acima de 90%.

**Figura 2.** Médias do conteúdo de água (A), porcentagem de germinação *in vitro* (B) e comprimento de tubo polínico (C) dos grãos de pólen de *V. quercifolia* submetidos a desidratação em dessecador contendo sílica em gel durante três tempos (1, 2 e 3 horas). Tempo zero representa grãos de pólen não submetidos a desidratação.

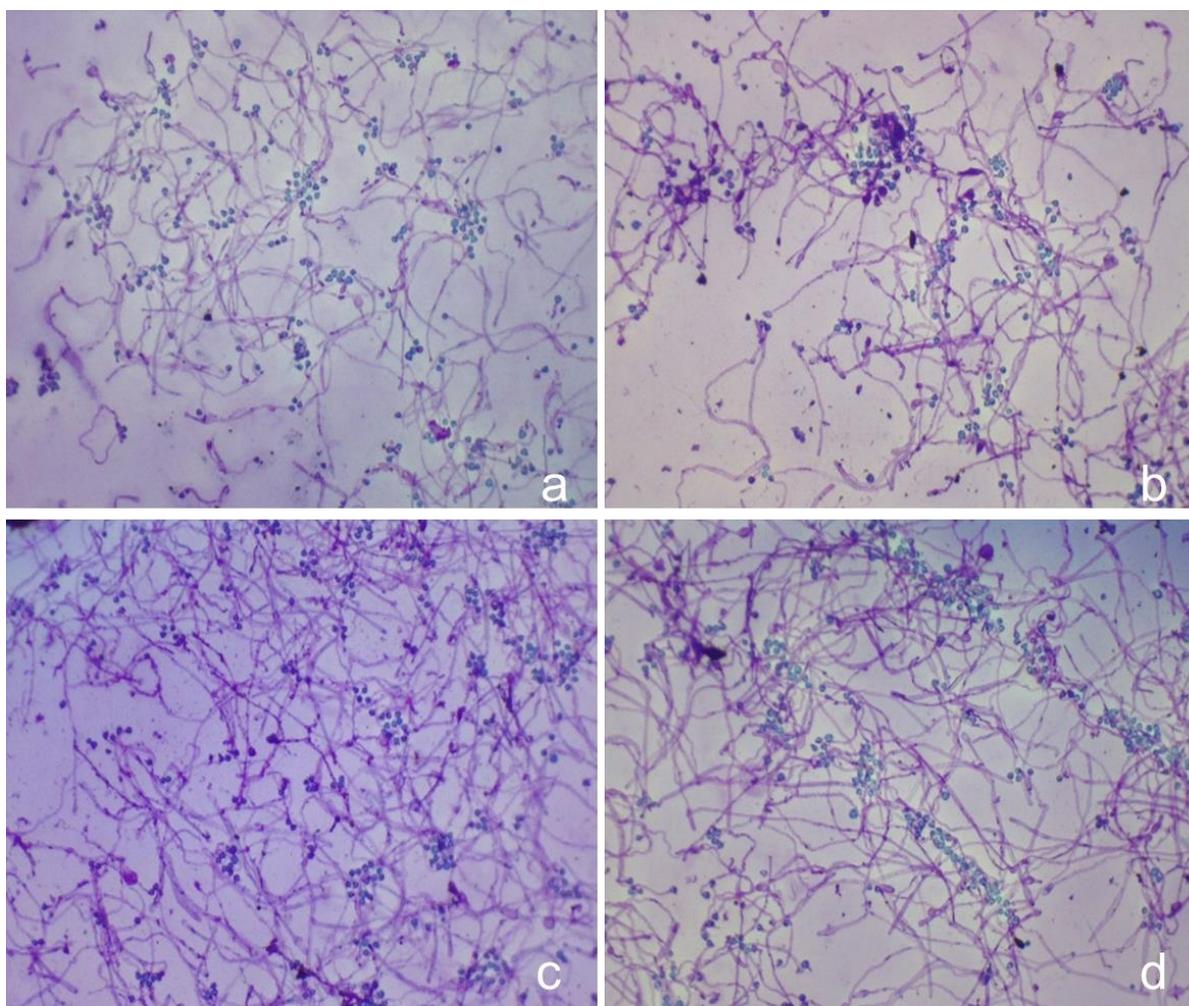


O aumento do comprimento do tubo polínico *in vitro*, após a desidratação por 2 horas deve ter relação a adaptação ao estresse hídrico, ativando mecanismos de defesa ou reparo celular. Esses mecanismos podem incluir a síntese de proteínas ou açúcares que protegem as células durante o processo de desidratação. Além disso, a desidratação pode facilitar a eclosão do grão de pólen e a emissão do tubo polínico, uma vez que a redução da pressão osmótica interna pode auxiliar nesses processos (FIRON; NEPI; PACINI, 2012; SCHEIBLE; MCCUBBIN, 2019).

Além do mais, a água é um importante solvente, meio de transporte, tamponante, é um constituinte essencial e estabilizador da estrutura de macromoléculas e organelas. Portanto, os ensaios de desidratação são essenciais para estabelecer um protocolo eficiente de criopreservação de grãos de pólen, determinando o limite de tolerância da estrutura, mas mantendo sua viabilidade. A retirada em excesso de água celular pode causar morte da célula, assim como o

excesso do conteúdo de água pode levar a formação de cristais, o que também compromete a sua viabilidade devido ao rompimento das membranas celulares (CARVALHO, 2006; REN et al., 2019). A desidratação foi um fator importante para a germinação *in vitro* de pólen de *V. quercifolia*, sendo que o período de 2 horas favoreceu um leve aumento na taxa de germinação e um aumento mais significativo no crescimento do tubo polínico (Figura 3c).

**Figura 3.** Germinação *in vitro* de grãos de pólen de *V. quercifolia* submetidos a desidratação em dessecador contendo em sílica gel durante 3 tempos (1, 2 e 3 horas). Tempo zero representa grãos de pólen não submetidos a desidratação. (a) 0 hora; (b) 1 hora; (c) 2 horas; (d) 3 horas;



Autora: Juliana da Silva Lopes Pereira

No entanto, o tempo ideal de desidratação pode variar de acordo com o método, com a espécie, com as condições ambientais no momento da coleta dos grãos de pólen e também pode estar relacionado com o tamanho e a morfologia

polínica (SOARES et al., 2015).

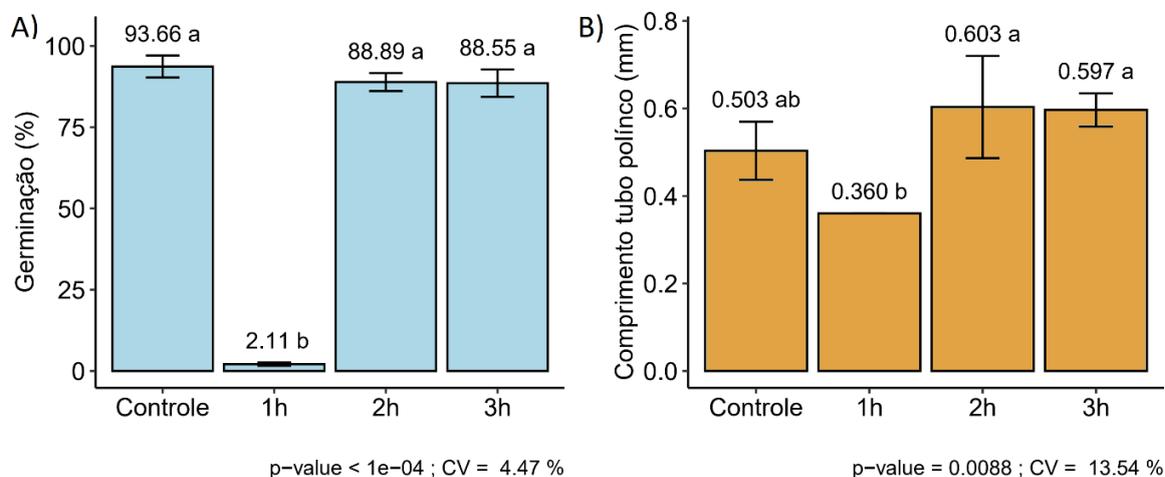
Em espécies do gênero *Anonas* foram necessários 90 minutos em sílica gel para alcançar as condições ideais de umidade (NETO et al., 2009). O pólen de *Paspalum notatum* necessitou de 120 minutos em sílica gel para obter a umidade necessária para ser criopreservado (DINATO, 2016). Em abacaxi é necessário um tempo de 6 horas em sílica gel para se atingir as condições ideais que estão em torno de 30% de conteúdo de água (SILVA et al., 2017), enquanto para algumas bromélias o tempo de 3 horas, também em sílica, é suficiente (SOUZA et al., 2015).

### 3.2. Criopreservação dos grãos de Pólen

A desidratação do pólen é um procedimento utilizado para reduzir o conteúdo de água dos grãos de pólen, antes do congelamento. A retirada de água pode ser realizada de várias formas, em cabine de fluxo laminar, estufa, mas a sílica vem sendo amplamente utilizada por sua eficiência e repetibilidade (SOUZA et al., 2015; SILVA et al., 2016).

Neste estudo foi observado uma redução no conteúdo de água dos grãos de pólen, conforme o aumento do tempo de exposição à sílica gel (59,79% em 1 h; 51,09% em 2 h; 20,57% em 3 h (Figura 4a). Essa constatação evidencia que a sílica gel foi eficaz na redução da umidade, o que confirma seu uso como uma ferramenta útil para se utilizar no processo de desidratação de grãos de pólen de mamoeiro.

**Figura 4.** Médias de germinação in vitro e comprimento de tubo polínico dos grãos de pólen de *V. quercifolia* submetidos a dessecação em dessecador contendo sílica em gel durante 3 tempos (1, 2, 3 horas) e criopreservados por 24 h. O controle representa grãos de pólen não submetidos a dessecação.



A partir dos resultados obtidos da viabilidade (germinação *in vitro* e comprimento do tubo polínico) dos grãos de pólen criopreservados por 24 horas, observou-se que o tempo de desidratação de 1 hora não foi adequado para o processo de criopreservação (Figura 5 a) demonstrando o quanto o excesso de água congelável é danosa para o pólen, pela formação de cristais de gelo que afetam de forma significativa e negativa a sua viabilidade (DINATO et al., 2016; BENSON, 2008), causando a ruptura do sistema de membranas, e consequente morte das células (STEGANI et al., 2017).

Os outros tempos de desidratação avaliados (2 h e 3 h) mostraram-se eficientes, apresentando altas taxas de germinação e comprimento do tubo polínico, sem diferenças estatísticas entre si (Figura 4 b e c). De acordo com Scorza e Sgerman (1995), é fundamental que a viabilidade do pólen criopreservado seja maior que 50%. No entanto, isso vai variar muito com a quantidade de pólen por antera, o que não foi quantificado neste trabalho. Em abacaxi, uma taxa de germinação de 30% a 40 % garante êxito na fertilização pela grande quantidade de pólen por antera (SILVA et al., 2015). No presente estudo, a germinação dos grãos de pólen criopreservados nos tempos de 2h e 3h se assemelham ao controle, que não passou pelo nitrogênio líquido, apresentando valores acima de 80% (Figura 4 a).

A criopreservação por 24 horas em nitrogênio líquido foi testado por Conceição (2021) em 17 acessos de mamoeiro que observou altos percentuais de germinação *in vitro*, entre 52,69 e 89,24% para a maioria dos acessos testados.

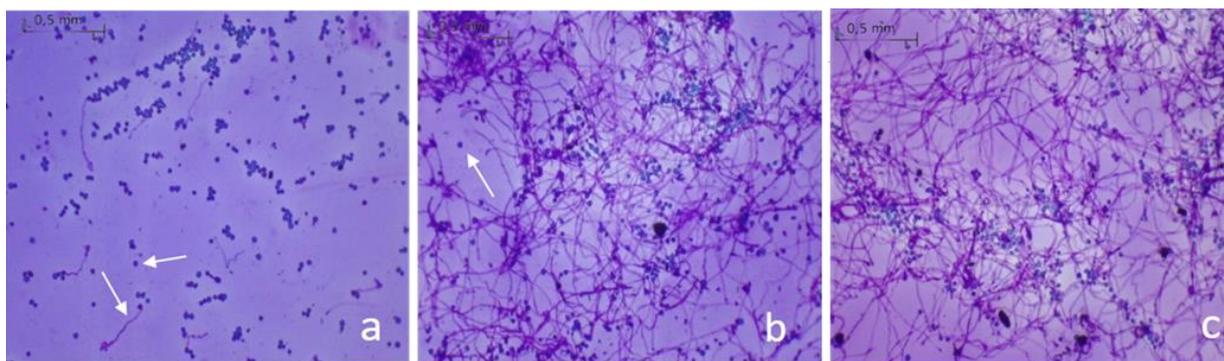
Na literatura é possível encontrar diversas respostas sobre diferentes períodos de armazenamento de grãos de pólen em nitrogênio líquido de várias espécies, com o objetivo de avaliar se ocorre perda de viabilidade a longo prazo. Silva et al. (2017), por exemplo, descobriram que após quatro meses o pólen de abacaxi criopreservado manteve sua viabilidade para todos os acessos, com porcentagens similares às que foram registradas para o armazenamento com 24h. Elhomosany e Sayed (2015), aplicaram a técnica em azeitona (*Olea europaea* L.) obtendo a viabilidade de 91,87% após 3 meses de armazenamento em nitrogênio líquido.

Souza et al. (2015), criopreservaram pólen de *Aechmea bicolor* por 1h, 24h, 8 dias, 30 dias, 6 meses e 1 ano em nitrogênio líquido e observaram que os grãos de pólen mantiveram-se viáveis, sem diferenças significativas, nos diferentes

tempos de conservação. Dinato et al. (2018), conservaram pólen de capim – bahia por 24h, 10, 60, 120, 180 dias e obtiveram resultados semelhantes, confirmando que a criopreservação do pólen por apenas 24 h apresenta respostas semelhantes da viabilidade do pólen conservados a longo prazo. Gomes et al. (2003), armazenaram grãos de pólen de cebola em nitrogênio líquido (-196°C) por um período de dois anos e observaram que o armazenamento nessa condição preservou a capacidade de germinação dos grãos de pólen.

É importante verificar a estabilidade da viabilidade de pólen em diferentes tempos de armazenamento em nitrogênio líquido (NL) considerando que o objetivo final é que ele seja mantido em NL por longos períodos. De acordo com Lambardi, Ozudogru e Benelli (2008), essa estabilidade do pólen ao longo do tempo ocorre devido a uma redução drástica do metabolismo, poucas horas após a imersão em nitrogênio líquido, garantindo assim sua viabilidade. Vale destacar, mais uma vez, a importância do conteúdo correto de água intracelular, tanto para evitar danos mecânicos, que afetam a integridade do grão de pólen, quanto para manter sua viabilidade. A retirada excessiva de água pode evitar injúrias, mas impede também a posterior germinação.

**Figura 5.** Germinação in vitro de grãos de pólen de *Vasconcellea quercifolia* submetidos a desidratação em dessecador contendo sílica em gel durante 3 tempos (1, 2 e 3 horas) e criopreservados por 24 h. (a) 1 hora; (b) 2 horas; (c) 3 horas desidratação;

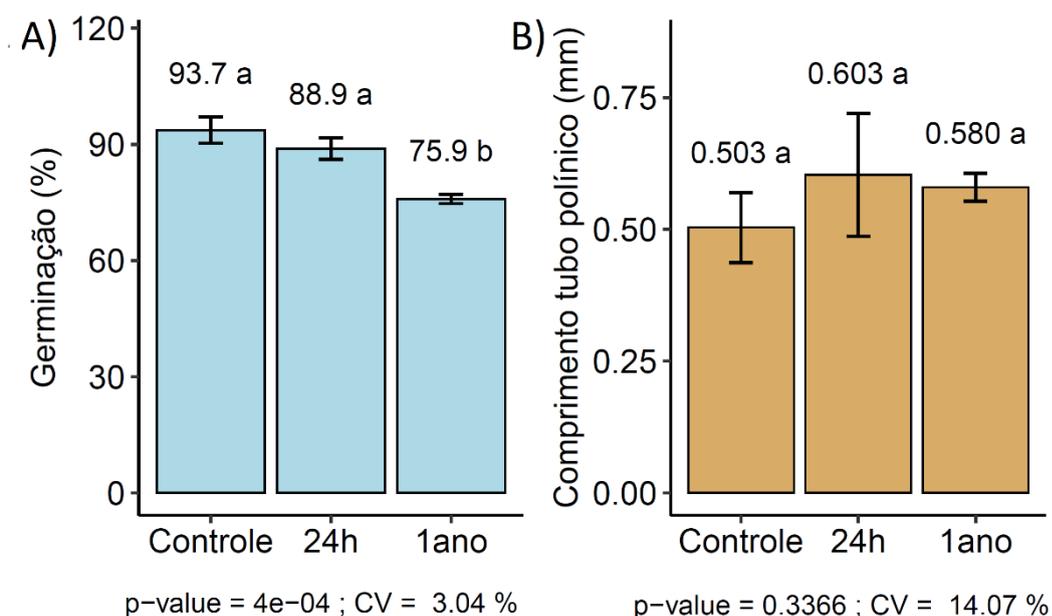


Autora: Juliana da Silva Lopes Pereira

Quando comparado a criopreservação do pólen de 24 h e por um período de 1 ano, os resultados apresentados na Figura 6 a revelaram que a germinação in vitro dos grãos pólen foi alta em todos os tratamentos, com médias superiores a 75%. O pólen criopreservado por 24 horas obteve média de 88,9%, enquanto o

pólen criopreservado por 1 ano apresentou média de germinação de 75,9%. Apesar da redução nas taxas de germinação, o aumento no tempo de armazenamento não afetou significativamente o comprimento do tubo polínico (Figura 6b).

**Figura 6:** Médias de porcentagem de Germinação in vitro de grãos de pólen % (A) e comprimento do tubo polínico mm (B) de *Vasconcellea quercifolia* submetidos a desidratação em dessecador contendo sílica em gel por duas horas e criopreservados em nitrogênio líquido por 24 h e durante 1 ano. O refere-se ao tratamento controle, germinação, sem criopreservação. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.



Uma hipótese possível é que a redução necessária (quase parada) do metabolismo celular não tenha atingido todos os grãos de pólen nas primeiras 24h, o que pode ter afetado a integridade da parede celular e da membrana plasmática resultando na perda de viabilidade.

A membrana plasmática é uma estrutura que controla a entrada e saída de substâncias na célula. Segundo Khan Academy (2023), a permeabilidade da membrana plasmática depende da interação entre os fosfolípidios, as proteínas e as moléculas que querem atravessá-la. A composição da membrana também influencia sua fluidez e sua capacidade de se adaptar a diferentes condições ambientais.

O congelamento pode levar a mudanças na fluidez da bicamada fosfolipídica, afetando a estrutura, a distribuição e o funcionamento das proteínas de membrana impactando os canais envolvidos no transporte de substâncias

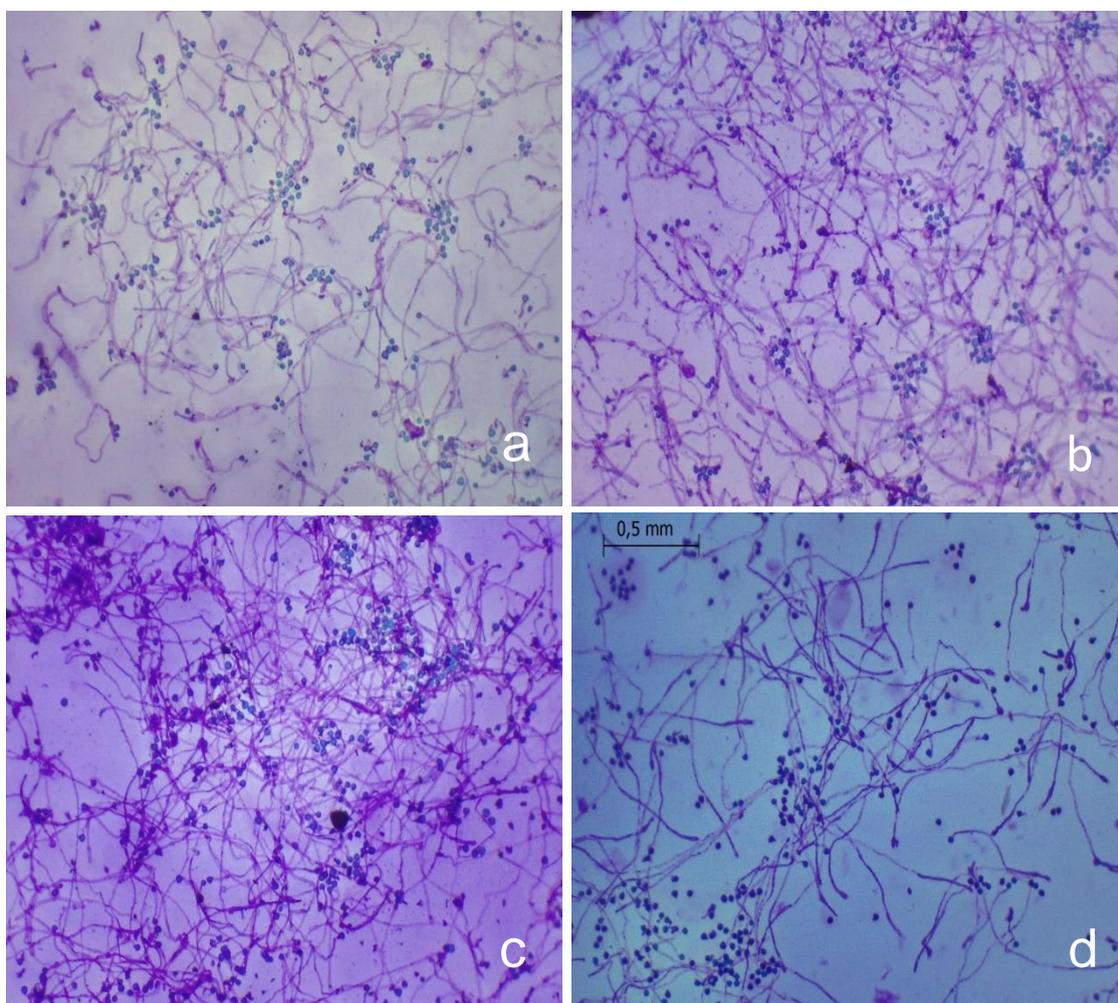
(PANIS; NAGEL; VAN DEN HOUWE, 2005; CUNHA NETO et al., 2007).

Essas alterações na membrana plasmática podem afetar a absorção de água e nutrientes durante a hidratação e germinação do pólen. De acordo com Panis, Nagel e Van Den Houwe (2005), a água é essencial para a reidratação do pólen e o início de seu metabolismo após o congelamento e os nutrientes são necessários para a produção de energia e biomoléculas que permitem o crescimento do tubo polínico. Se a membrana plasmática estiver danificada, o pólen pode sofrer dificuldades em absorver água e nutrientes, durante o descongelamento, ou pode ocorrer perda dessas substâncias para o meio externo e isso compromete a sua viabilidade. Dessa forma, a redução na germinação in vitro do pólen após 1 ano em nitrogênio líquido pode estar associada a essas alterações (permeabilidade ou composição da membrana plasmática) que pode ter afetado a absorção de água e nutrientes durante a reidratação e germinação. Damasceno et al. (2008), avaliaram a conservação de pólen de duas cultivares de mamoeiro a curto prazo em dois ambientes: geladeira e freezer. Os autores constataram que com 60 dias de armazenamento, os grãos de pólen da cultivar Tainung 01 apresentou maior resistência ao armazenamento em relação a 'Golden'. Porém, no ambiente geladeira, observou-se, a partir de 30 dias, ligeira queda na viabilidade dos grãos de pólen do 'Tainung 01', quando essa passou de 94,75 para 86,20%, sendo estes valores estatisticamente distintos.

Segundo Soares et al. (2018), o comprimento do tubo polínico é um indicador da fertilidade do pólen, que reflete sua capacidade de crescer e transportar os gametas masculinos até o óvulo. O fato de o comprimento do tubo polínico não ter sido afetado pelo tempo de armazenamento em nitrogênio líquido, sugere que o pólen de *V. quercifolia* criopreservado por 1 ano, pode ser utilizado para os estudos que visam cruzamentos entre diferentes espécies de mamoeiro possibilitando a criação de novas combinações genéticas e o aumento da variabilidade genética. É importante ressaltar que cruzamentos interespecíficos em mamoeiro apresentam desafios relacionados a barreiras pré e pós-zigóticas (DREW et al., 2006). Portanto, o pólen criopreservado deve ser usado em conjunto com outras ferramentas para facilitar a obtenção de híbridos interespecíficos/intergenéricos. No estudo realizado por Ganeshan (1986), que avaliou a criopreservação do pólen de mamoeiro em *C. papaya* e *Vasconcellea cauliflora* (anteriormente denominada como *Carica cauliflora*), não foram observadas diferenças significativas na taxa de germinação

do pólen ao avaliar oito tempos diferentes (0, 7, 30, 60, 90, 180, 365 e 435 dias) de armazenamento em nitrogênio líquido (NL). A média de viabilidade polínica foi de 67,04% para *V. cauliflora* e 63,80% para *C. papaya*. No entanto, é importante ressaltar que os valores de porcentagem de germinação do pólen obtidos no estudo do autor foram inferiores aos encontrados no presente trabalho, o que pode ser explicado pelo uso de meios de cultura diferentes entre os estudos, que pode ter influenciado o potencial de germinação polínica.

**Figura 7.** Germinação in vitro de grãos de pólen de *Vasconcellea quercifolia* dessecados por 2 h e criopreservados em nitrogênio líquido (NL) por 24 horas e durante 1 ano. (a) 0; (b) 2 h de desidratação; (c) 2 h de desidratação + 24 h no NL; (d) 2h de desidratação + 1 ano no NL. Tempo zero representa grãos de pólen não submetidos a desidratação e criopreservação.



Autora: Juliana da Silva Lopes Pereira

### 3.3. Polinização *in vivo*

Além da avaliação da viabilidade dos grãos de pólen por meio da germinação *in vitro*, é fundamental a avaliação da germinação *in vivo*, pois, de acordo com Ferreira et al. (2006), a germinação *in vitro* é uma técnica que busca simular as condições do estilo e estigma, estimulando a germinação do tubo polínico. No entanto, é importante destacar que esta técnica por si só não garante a ocorrência da fertilização na prática, pois a fertilização depende de diversos fatores, como a compatibilidade entre o pólen e o óvulo, a receptividade do estigma, as condições ambientais, entre outros (FERREIRA et al., 2006).

Dessa forma, os resultados obtidos em laboratório sobre a germinação e desenvolvimento do tubo polínico podem não ser conclusivos (NOGUEIRA et al., 2015), mas são indicadores do quanto o grão de pólen pode ser afetado pelo congelamento em nitrogênio líquido.

Neste trabalho as taxas de germinação *in vitro* foram superiores aos resultados encontrados com o teste de viabilidade *in vivo*. Em alguns trabalhos, uma alta correlação entre os testes *in vitro* e *in vivo* são apresentados, ainda que o mais importante é ver se as taxas de fertilização são compatíveis com as que são registradas para pólen não criopreservado (CONCEIÇÃO, 2021). Souza et al. (2015), obtiveram uma quantidade satisfatória de frutos e sementes a partir de pólen criopreservado de *Aechmea bicolor*, comparável à polinização com pólen fresco, demonstrando que o método de armazenamento manteve a integridade e a viabilidade do grão de pólen.

De acordo com Nogueira et al. (2015), a partir da hibridação é possível verificar se o pólen tem a capacidade de fecundar o óvulo e formar um fruto normal com sementes viáveis. Nessa lógica, a formação de sementes e o teste de viabilidade das mesmas é de fundamental importância para obtenção de respostas sobre a eficiência do protocolo de criopreservação e sua utilidade para o melhoramento genético do mamoeiro.

Assim, por ser uma espécie silvestre e cultivada em condições edafoclimáticas diferentes da região de origem, os resultados obtidos com as polinizações *in vivo* realizadas com grãos de pólen criopreservados (24 h e 1 ano) de *V. quercifolia* mostraram êxito com a produção de frutos, com aproximadamente 40% de sementes viáveis (Figura 8). Com esse resultado foi possível verificar a

eficiência do protocolo de criopreservação do pólen em termos de fertilidade e qualidade das sementes.

Conhecer as condições ideais para a germinação de sementes de uma determinada espécie é fundamental, pois cada espécie possui comportamento germinativo diferente devido a diversos fatores tais como, a dormência, a qualidade fisiológica e sanitária, a temperatura, o substrato, a umidade, a luz, entre outros, que podem influenciar nesse processo. Cada espécie possui uma faixa ideal de resposta a esses fatores, que pode variar conforme as condições ambientais e genéticas (SILVA et al., 2020).

Portanto, é de fundamental importância realizar estudos que avaliem as condições ideais para a germinação de sementes de diferentes espécies, nativas, exóticas ou ameaçadas de extinção (MORI; RODRIGUES; FREITAS, 2013), que podem fornecer impactos ecológicos, científicos, econômicos e sociais.

Ainda são bastantes escassos estudos relacionados à germinação das sementes de *V. quercifolia*. No entanto, Záchia et al. (2014), observaram que as sementes de *V. quercifolia* apresentam dormência tegumentar e endógena, ou seja, o tegumento e o embrião das sementes impedem a germinação. De acordo com os autores, essa dormência pode ser uma estratégia da espécie para evitar a germinação em condições desfavoráveis. Além disso, Záchia et al. (2014) e Urtasun, Giamminola e Viana (2020) observaram que o substrato vermiculita e a temperatura de 25°C são os fatores adequados para a germinação das sementes. Eles ainda sugerem que mais pesquisas sejam realizadas para entender melhor os mecanismos de dormência e germinação das sementes da espécie.

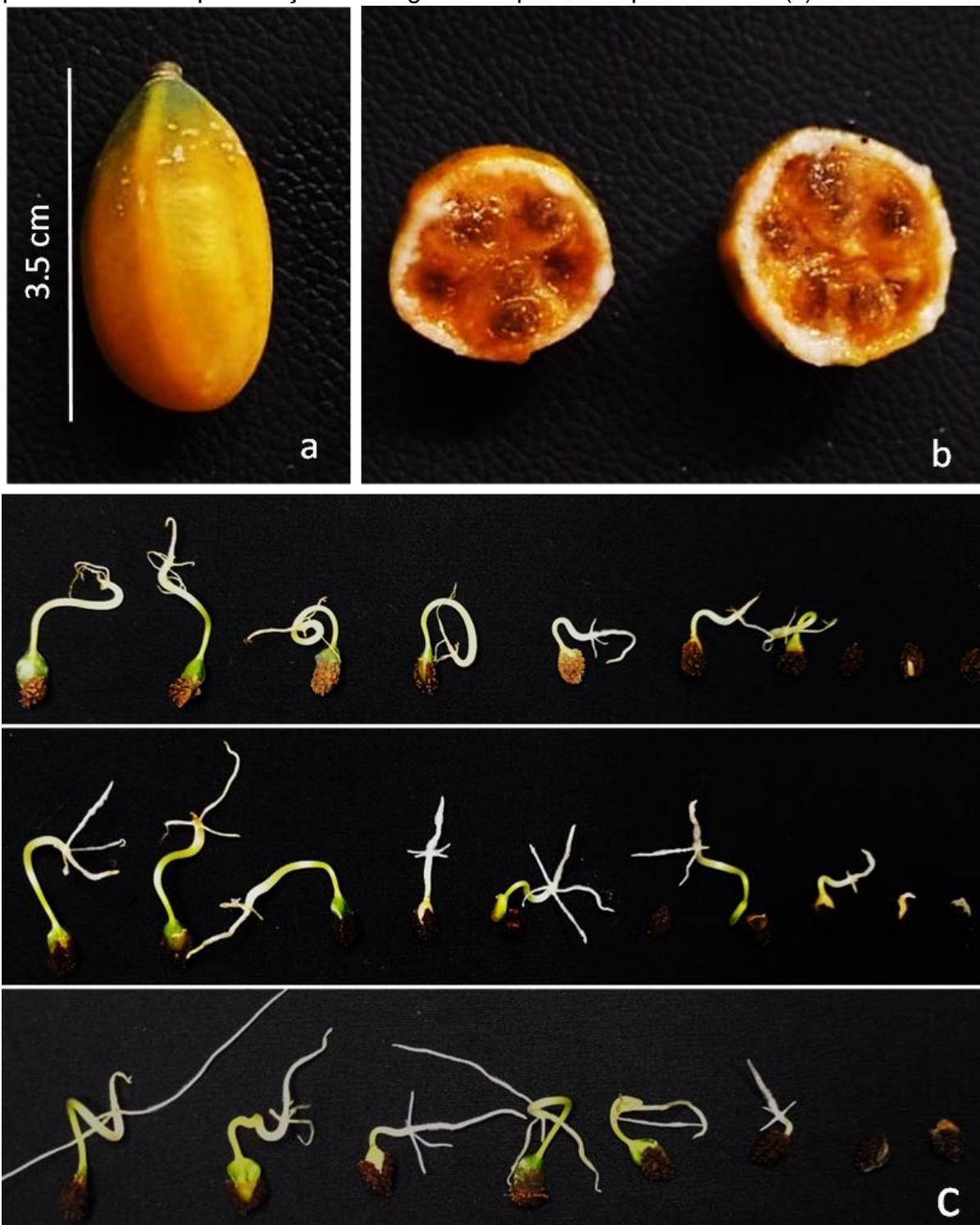
É sabido que dentre as diversas alternativas para se romper a dormência, além da embebição, escarificação e uso de fitormônios, o choque de temperatura pode dar bons resultados para a dormência tegumentar. Assim, este é mais um tema relacionado à espécie que precisa ser melhor estudado.

Urtasun, Giamminola e Viana (2020), também observaram que a maturação dos frutos e a época de colheita são fatores importantes para a qualidade das sementes, pois, as sementes provenientes de frutos maduros, coletados no início da estação apresentam maior taxa germinativa do que as sementes provenientes de frutos verdes, coletados no final da estação.

As polinizações in vivo foram realizadas com o intuito de confirmar a viabilidade do pólen de *V. quercifolia* após a conservação em nitrogênio líquido,

sendo possível observar a frutificação e a formação de sementes viáveis (Figura 8). Dessa forma, os resultados obtidos permitem afirmar que a técnica de criopreservação é uma estratégia complementar promissora, pois, através desta é possível manter a viabilidade e integridade dos grãos de pólen, se constituindo em mais uma ferramenta para o melhoramento genético do mamoeiro. *V. quercifolia* é uma espécie caducifólia e não floresce na mesma época que o *C. papaya* L. dificultando os cruzamentos interespecíficos, caracterizando uma assincronia de florescimento. Silva (2022), avaliando o florescimento e a frutificação desse mesmo genótipo pertencente ao BAG de mamão observou que as plantas masculinas de *V. quercifolia* produzem maior número de botões florais (NBF) e número de flores (NF) no mês de maio (mês de baixa temperatura na região de Cruz das Almas). A autora relata que as plantas femininas obtiveram números muito inferiores às masculinas, tanto de NBF quanto de NF, no entanto apresentaram frutos nos meses de julho e agosto meses de baixas temperaturas e elevados níveis de precipitação. Também houve produção de frutos em novembro, mês com altos níveis de precipitação pluviométrica no período do estudo.

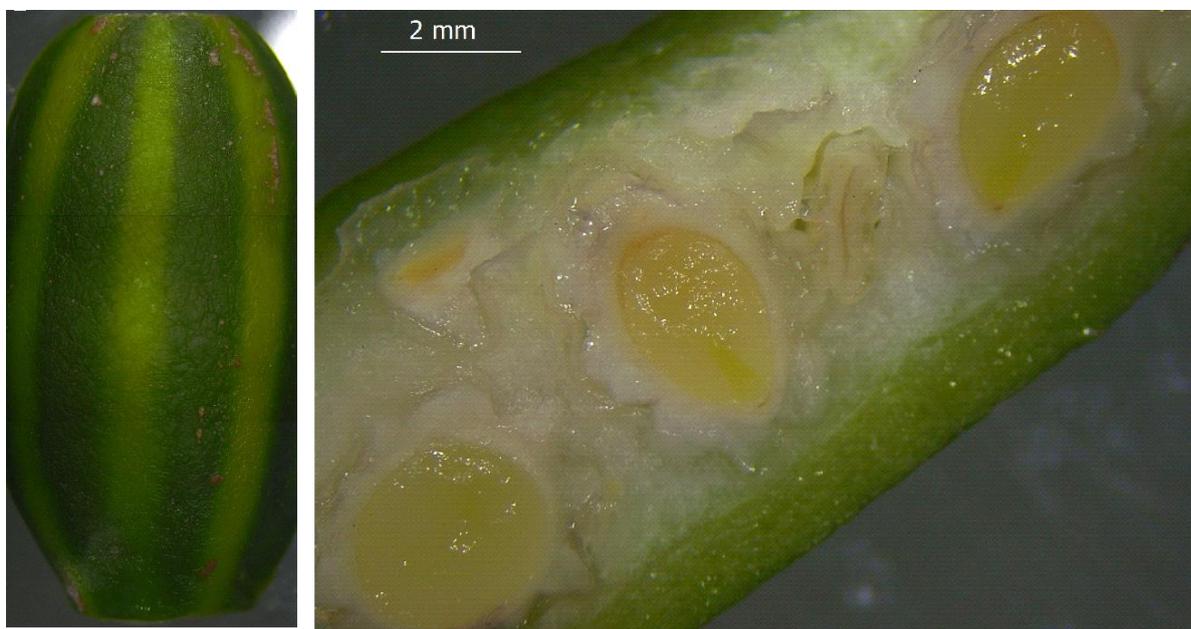
**Figura 8.** Frutos e sementes de *Vasconcellea quercifolia*.(a) Fruto fechado formado após a polinização com pólen criopreservado (b) Fruto aberto longitudinalmente com sementes provenientes de polinizações com grãos de pólen criopreservados, (c) Germinação de sementes de *Vasconcellea quercifolia* provenientes de polinizações com grãos de pólen criopreservados (c).



Autora: Juliana da Silva Lopes Pereira

Independente do comportamento germinativo encontrado, os resultados evidenciam que os grãos de pólen criopreservados mantêm sua viabilidade após 24 horas e durante 1 ano de imersão em nitrogênio líquido (NL) e parece ser suficiente para fazer inferências no que se refere à conservação dos grãos de pólen desta espécie. A polinização realizada com pólen criopreservado por um ano produziu frutos normais e com sementes (Figura 9a). Entretanto, fatores climáticos causaram a queda do fruto com as sementes ainda imaturas, mas com morfologia e distribuição normal no fruto (Figura 9b).

**Figura 9.** Fruto de *Vasconcellea quercifolia* obtido com pólen criopreservado após 1 ano em NL (a) corte longitudinal do fruto mostrando sementes imaturas (b).



Autora: Juliana da Silva Lopes Pereira

#### 4. CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer um protocolo eficaz para criopreservação de grãos de pólen de *V. quercifolia*. Os grãos de pólen da espécie *V. quercifolia* mostraram tolerância à desidratação, nas condições do trabalho realizado, até 3 horas de exposição em sílica gel. Ambos os tempos de exposição, 2h e 3h não diferiram estatisticamente, sendo 2h o tempo indicado de desidratação por apresentar o maior percentual de germinação dos grãos de pólen.

Grãos de pólen criopreservados por 1 ano em NL apresentam uma queda discreta na viabilidade, ficando ainda acima de 75%. O comprimento do tubo

polínico não foi afetado pelo tempo de armazenamento em NL. O uso de pólen criopreservado, seja por 24h ou por 1 ano em NL, são funcionais para a realização de cruzamentos, formando frutos normais com sementes viáveis.

Os resultados sugerem que o pólen de *V. quercifolia* criopreservado por 1 ano, pode ser utilizado para os estudos que visam cruzamentos entre diferentes espécies de mamoeiro, sempre atentando para possíveis barreiras reprodutivas comuns em cruzamentos interespecíficos, visando a criação de novas combinações genéticas e o aumento da variabilidade genética.

## 5. REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M. P. A. Versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, v. 1, n. 5, p. 13-18, 1980.
- ALMEIDA, C. et al. Conservação e germinação in vitro de pólen de milho (*Zea mays* subsp. *mays*). **Revista brasileira de botânica. Brazilian journal of botany**, v. 34, n. 4, p. 489-495, 2011.
- ASEEF, R. M. et al. An analysis of pollen parameters, fruit set and fruit development during attempts on intergeneric hybridization of papaya (*Carica papaya* L.). **Current Journal of Applied Science and Technology**, v. 40, n. 5, p. 74-86, 2021.
- BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: REED, B. M. (Ed). **Plant cryopreservation. A practical guide**. New York: Springer, p. 15-32, 2008.
- BISPO, G. L. **Fenologia e desempenho ecofisiológico de *Vasconcellea quercifolia* A. St. – Hill.** 2020. 88 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista – Unesp, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, SP, Brasil, 2020.
- BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, v. 50, p. 859-865, 1963.
- CABANEZ, P. A. et al. Criopreservação de sementes vegetais: uma revisão de literatura. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA, 26., 2017, São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos: Univap, p. 1-5, 2017.
- CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Crioconservação no melhoramento vegetal. Campina Grande: Embrapa Algodão.** [s.l.] Embrapa Algodão. Documentos, 2003. v. 115
- CARVALHO, V. S. **Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2008. 69f. Tese (Doutorado). Pós Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- CHALAK, S. et al., Papaya ring spot disease management: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, 2017.
- CONCEIÇÃO, J. Q. da **Criopreservação de grãos de pólen como uma estratégia adicional para conservação de acessos de mamoeiro.** 2021. 46 f.

Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas, BA. 2021. Disponível em:

[https://ufrb.edu.br/pgrecvegetais/images/phocadownload/Josimare\\_Queiroz\\_da\\_Concei%C3%A7%C3%A3o.pdf](https://ufrb.edu.br/pgrecvegetais/images/phocadownload/Josimare_Queiroz_da_Concei%C3%A7%C3%A3o.pdf). Acesso em: 15 de jan. 2024.

CORE TEAM, R. R: **A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.** Vienna, Austria. 2022.

DAMASCENO JUNIOR, P. C. et al. Conservação de pólen de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Ceres**, v. 55, n. 5, p. 433-438, 2008.

DANTAS, J. L. L., LEDO, C. A. S.; SOUZA JUNIOR, M. T. Conservação e uso do germoplasma de mamoeiro na Embrapa. **Revista Cultivar**, v.11, n.10, p. 22-24. 2000.

DINATO, N. B. **Conservação a longo prazo de grãos de pólen de *Paspalum notatum flüggé* visando o uso de espécies de florescimento assíncrono em programas de melhoramento genético.** 2016. Dissertação (Mestrado Genética Evolutiva e Biologia Molecular) Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2016. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1059891/1/DissNBD.pdf>

DINATO, N. B. et al. Importância da criopreservação de grãos de pólen em gramíneas forrageiras. **Revista RG News**, v. 2, 2016.

DINATO, N. B. et al. Storage of Bahiagrass pollen at different temperatures. **Crop Science**, v. 58, p. 2391 - 2398, 2018.

DINATO, N. B. et al. Pollen cryopreservation for plant breeding and genetic resources conservation. **Cryoletters**, v. 41, n. 3, p. 115-127, 2020.

DREW, R. A. et al. Breeding for *papaya ringspot virus* resistance in *Carica papaya* L. via hybridization with *Vasconcella quercifolia*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 46, p. 413-418, 2006.

ELHOMOSANY, A. A.; SAYED, H. A. E. Effect of low temperature and cryopreservation on in vitro pollen germination of some Olive cultivares. American-Eurasian. **Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 15, n. 9, p. 1803-1808, 2015.

FERREIRA, C. A. et al. Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 144-150, 2006.

FERREIRA, J. A. B. **Aspectos da biologia floral e reprodutiva de diferentes acessos de mamoeiro.** 2018. p. 1-91. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas. Disponível em: [DISSERTAÇÃO\\_-\\_PPGAGRA\\_-\\_JACQUELINE\\_ALVES\\_BORGES\\_FERREIRA.pdf](#) (ufrb.edu.br)

FIRON, N.; NEPI, M.; PACINI, E. Water status and associated processes mark critical stages in pollen development and functioning. **Annals of Botany**, v. 109, n. 7, p. 1201-1214, 2012.

FLECK, M. et al. Número de Cromossômico, Comportamento Meiótico, e Viabilidade de grãos de pólen em populações de *Vasconcella quercifolia* A. St.

Hill. (Caricaceae) Nativas no Vale de Taquari /RS. **Revista Eletrônica Científica da Uergs**, v.1, n.1, p. 19-24, 2015.

FRANÇA, L. V. et al. Tolerância à desidratação de pólen de berinjela. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p. 6-14, 2010.

GANESHAN, S. Criogenic preservation of papaya pollen. **Scientia Horticulturae**, v. 28, p. 65-70, 1986.

Germinação de sementes: fatores internos e externos. **Conecta Sementes**, 2021.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, O. et al. Resistencia de *Vasconcellea cauliflora* al Virus de la mancha anular de papaya (PRSV-P) y su relación con el contenido de proteínas y fenoles totales. **Revista mexicana de fitopatología**, v. 35, n. 3, p. 571-589, 2017.

KELLER, E. R. J.; PANIS, B.; ENGELMANN, F. In vitro storage and Cryopreservation as substantial complements in concerted actions to better maintain and use crop germplasm. **Acta Horticulturae**, v. 961, p. 35-50, 2012.

KINNUPP, W.; **Plantas alimentícias não convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS**. 2007. 2v. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. Disponível em: Microsoft Word - Parte 1.doc (ufrgs.br).

LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, A.; BENELLI, C. Cryopreservation of Embryogenic cultures. In: **REED, B.M (ed). Plant Cryopreservation, a practical guide. Springer**, p. 177-194, 2008.

LI, J. W. et al. Cryobiotechnology of forest trees: recent advances and future prospects. **Biodiversity Conservation**, v. 27, p. 795-814, 2017.

LIDIO, C. ALEXANDRE S.; ADEMIR, R. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro-região sul**. Brasília: MMA, 2011. 934 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v.1. 2008. 368p.

MARTINS, M. L. L.; CARVALHO, F. A. **Caricaceae in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [s.l: s.n].

MORI, E.; RODRIGUES, F. P.; FREITAS, N. P. **Sementes florestais: guia para a germinação de 100 espécies nativas**. São Paulo: Instituto Refloresta, 2013.

NETO, J. E. B. et al. Viabilidade e conservação de pólen de três Anonas comerciais. **Scientific Electronic Library Online**, v.68, n.4, p.825-837, 2009.

NOGUEIRA, P. V. et al. Germinação de pólen e aplicação de ácido bórico em botões florais de nespereiras. **Bragantia**, v. 74, n. 1, p. 1-6, mar. 2015.

OLIVEIRA, A. M. G; SOUZA, L. D.; COELHO, E. F. Recomendação de calagem e adubação para a cultura do mamoeiro. Cruz das Almas, Embrapa mandioca e fruticultura, **Comunicado Técnico**, 5 p., 2010.

PAIVA, R. P.; COIMBRA, M. C.; CASTRO, A. H. F. Criopreservação de plantas medicinais: uma revisão. **Revista Científica**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2023.

PANIS, B.; NAGEL, M.; VAN DEN HOUWE, I. Challenges and prospects for the

conservation of crop genetic resources in field genebanks, in in vitro collections and/or in liquid nitrogen. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1634, 2020.

PISSATTO, M. **Comportamento Germinativo das Sementes de *Vasconcellea quercifolia* A. St.-Hil. (CARICACEAE) 2015**. 95 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia) - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. Brasil. 2015. Disponível em: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA (ufsm.br)

REN, R. et al. Changes of pollen viability of ornamental plants after long-term preservation in a cryopreservation pollen bank. **Elsevier**, v. 89, p. 14-20, 2019.

SCHEIBLE, N.; MCCUBBIN, A. **Sinalização no crescimento do tubo polínico: além da ponta do iceberg da polaridade**. Escola de Ciências Biológicas. [s.l.: s.n.]. 2019.

SCHMITT, K. F. M. et al. Uso de testes colorimétricos na avaliação da viabilidade polínica de Urucum (*Bixa orellana* L.). **Enciclopédia Biosfera**, v. 11; n. 22, p. 2290. 2015.

SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. Peaches. In: **JANIK J.; MOORE, J.N. (Ed.). Fruit breeding**. New York: John & Sons, p.325-440, 1995.

SHARMA, S. K., TRIPATHI, S. Papaya ringspot virus-P: overcoming limitations of resistance breeding in *Carica papaya* L. Em: **Molecular Approaches and Viral Evolution**. Academic Press, 2016. p. 177-194.

SILVA, E. M. et al. Meiotic behavior of wild species of Caricaceae species potentially suitable for papaya improvement. **Crop Breeding na Applied Biotechnology**, v.12, p. 52-57. 2012.

SILVA, G. A. da et al. Fatores ambientais na germinação de sementes e mecanismos de defesa para garantir sua perpetuação. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. e93491110524, dez. 2020.

SILVA, N. J. **Florescimento e frutificação e anomalias florais em acessos de mamoeiro da Embrapa mandioca e fruticultura**. 2022. 46 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas, BA. 2022.

SILVA, R. L. et al. Cryopreservation of pollen of wild pineapple accessions. **Scientia Horticulturae**, v. 219, p. 326-334, 2017.

SOARES, T. L. et al. Viability of pollen grains of tetraploid banana. **Bragantia**, v. 75, p. 145 -151, 2015.

SOUZA, E. H. et al. Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea biocolor* (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic forest. **Euphytica**, v. 204, p. 13-28, 2015.

STEGANI, V. et al., Criopreservação de sementes de rainha do abismo (*Sinningia leucotricha*). **Ornamental Horticulture**, v. 23, n.1, p. 15-21, 2017.

URTASUN, M. M.; GIAMMINOLA, E. M.; VIANA, M. L. Southern highland papaya (*Vasconcellea quercifolia* A. St.-Hil.): Do fruit ripening and harvesting time affect seed germination? **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 42, 2020.

ZÁCHIA, R. A. et al. Germinação de sementes de *Vasconcellea quercifolia* A.St.-Hil (Caricaceae) submetidas a diferentes temperaturas e substratos e tratamentos pré-germinativos para superação da dormência tegumentar e endógena das sementes da espécie In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 3., 2014, Santos. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2014.

## CAPÍTULO 2

### **Resistência ao PRSV- P em *Vasconcellea quercifolia* A.St. Hil e acessos de germoplasma de mamoeiro *Carica papaya* L.**

**RESUMO:** O *Papaya ringspot virus* (PRSV-P), também conhecido como vírus da mancha-anelar, é a doença mais impactante e amplamente distribuída na cultura do mamoeiro. No Brasil, o PRSV-P é considerado o patógeno mais importante, ocorrendo em todos os estados e em diversas áreas servindo como fontes constantes do vírus. Ainda não existem cultivares resistentes de mamoeiro disponíveis no mercado brasileiro e todas as variedades de *Carica papaya* são suscetíveis a doença. No entanto, estudos recentes em espécies do gênero *Vasconcellea* têm mostrado a presença de genes de resistência ao vírus. *Vasconcellea quercifolia* tem sido considerada resistente ao PRSV-P no Hawaí, Florida e Austrália mas na Venezuela é suscetível. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência ao PRSV – P em acessos de caricáceas pertencentes ao germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura avaliados em casa de vegetação. Foram testados três acessos de mamoeiro pertencentes ao BAG de mamão da Embrapa mandioca e fruticultura: CMF 259 - *V. quercifolia*, o genótipo CMF 011 do grupo Formosa e a cultivar Aliança do grupo Solo (CMF 248). Foram semeadas duas sementes de cada acesso. Um mês após a semeadura foi feito o desbaste deixando uma planta por saco. Após dois meses, quando as plantas apresentaram 3-4 folhas, foram realizadas duas inoculações em dez plantas de cada acesso, com intervalo de 15 dias, utilizando um isolado de PRSV-P coletado na região de Cruz das Almas. Três plantas de cada acesso foram mantidas como controles. Os sintomas e o número de plantas afetadas foram monitoradas ao longo de dois meses. Utilizou-se uma escala de notas para avaliar a severidade dos sintomas e calculou-se a incidência da doença e a severidade dos sintomas. Os resultados foram apresentados em gráficos, mostrando a severidade da doença nos diferentes acessos. Realizou-se a análise de agrupamento dos acessos com base na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os dados de incidência da doença foram avaliados no pacote Agro R, utilizando o software R. O teste de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) foi realizado para detecção do vírus nas plantas inoculadas. A espécie silvestre *V. quercifolia* é resistente ao PRSV – P pois mostrou-se imune, não apresentando sintomas da doença. O acesso CMF011 foi considerado moderadamente resistente e a cultivar Aliança foi considerada altamente suscetível. O teste de ELISA indicou que *V. quercifolia* mostrou baixa reatividade em relação ao PRSV-P, o que sugere que essa espécie possui mecanismos de resistência que limitam a replicação e disseminação do vírus. A confirmação da resistência da espécie *Vasconcella quercifolia* ao vírus da mancha anelar possibilita seu uso para introgressão desses genes em *C. Papaya*.

**Palavras-chave:** Virose, *Papaya ringspot virus*, mosaico do mamoeiro, Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença, teste de ELISA.

## Evaluation of PRSV-P resistance in *Vasconcellea quercifolia* A.St. Hil and papaya germplasm accessions

**ABSTRACT:** The *Papaya ringspot virus* (PRSV-P), also known as the ring spot virus, is the most impactful and widely distributed disease in papaya cultivation. In Brazil, PRSV-P is considered the most important pathogen, occurring in all states and serving as a constant source of the virus. Currently, there are no resistant papaya cultivars available in the Brazilian market, and all *Carica papaya* varieties are susceptible to the disease. However, recent studies on species of the *Vasconcellea* genus have shown the presence of resistance genes to the virus. *Vasconcellea quercifolia* has been considered resistant to PRSV-P in Hawaii, Florida, and Australia, but susceptible in Venezuela. The objective of this study was to evaluate PRSV-P resistance in accessions of Caricaceae from the germplasm of Embrapa Cassava and Fruit. Three papaya accessions were tested: CMF 259 - *V. quercifolia*, genotype CMF 011 from the Formosa group, and the cultivar Aliança from the Solo group (CMF 248). Two seeds of each accession were sown, and one month after sowing, thinning was performed to leave one plant per bag. After two months, when the plants had 3-4 leaves, two inoculations were conducted on ten plants of each accession, with a 15-day interval, using a PRSV-P isolate collected from the Cruz das Almas region. Three plants of each accession were kept as controls. Symptoms and the number of affected plants were monitored for two months. A scoring scale was used to evaluate symptom severity, and disease incidence and symptom severity were calculated. Results were presented in graphs depicting disease severity among different accessions. Cluster analysis of the accessions based on the area under the disease progress curve (AUDPC) was conducted. Disease incidence data were evaluated using the Agro R package in the R software. The Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) test was performed to detect the virus in inoculated plants. The wild species *V. quercifolia* demonstrated resistance to PRSV-P, displaying immunity and no disease symptoms. The CMF011 accession was considered moderately resistant, while the Aliança cultivar was deemed highly susceptible. ELISA testing indicated that *V. quercifolia* exhibited low reactivity to PRSV-P, suggesting the presence of resistance mechanisms that limit virus replication and spread. Confirming *Vasconcellea quercifolia*'s resistance to the *ring spot virus* opens up possibilities for utilizing its genes to introduce resistance into *C. papaya*.

**Key words:** Disease, *Papaya ringspot virus*, papaya mosaic, Area Under Disease Progress Curve, ELISA test.

## 1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro é uma frutadeira tropical com grande importância econômica devido ao valor nutritivo dos seus frutos e as propriedades farmacológicas. Apesar da importância econômica dessa espécie frutífera alguns fatores têm sido limitantes para o desenvolvimento da cultura, entre eles a ocorrência de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus (FILHO et al., 2000).

A mancha anelar, causada pelo *Papaya ringspot virus* (PRSV-P), é a doença de maior importância econômica e de maior distribuição geográfica nos países produtores (REZENDE et al., 1997; ABREU et al., 2015). No Brasil o PRSV-P é considerado o patógeno mais importante para a cultura, pois tem ocorrência em quase todos os estados brasileiros, sendo bastante comum à sua ocorrência nos quintais de casas, em pequenos pomares e em margens de estradas, o que pode se transformar em fontes constantes do vírus (COSTA et al., 2021).

O PRSV-P é pertencente à família Potyviridae e do gênero Potyvirus (PURCIFULL et al., 1984; MAYO et al., 1995). Caracteriza-se por possuir partículas filamentosas, não envelopadas, alongadas e flexuosas, medindo cerca de 760 a 800 nm de comprimento e 12 nm de diâmetro. E único RNA de hélice simples e de sentido positivo (YEH et al., 1992; COSTA et al., 2021).

Na natureza o PRSV-P é transmitido por pulgões de maneira não persistente e não se multiplica no vetor. A transmissão se inicia quando o pulgão se alimenta das plantas já infectadas por um curto período de tempo, cerca de 15 segundos e logo em seguida se alimenta de plantas sadias (COSTA et al., 2021). As espécies de pulgões mais conhecidas e que transmitem o vírus são: *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *Aphis fabae*, *Aphis coreopsidis* e *Aphis spiraecola* (OLIVEIRA et al., 2000; COSTA et al., 2021). Experimentalmente o vírus é transmitido por inoculação mecânica e não há evidências da sua transmissão pelas sementes obtidas de plantas infectadas (FILHO et al., 2000).

Inicialmente, as plantas infectadas apresentam clareamento das nervuras foliares, amarelecimento das folhas mais novas, posteriormente ocorre mosaico, distorção foliar, manchas oleosas no pecíolo e anéis oleosos nos frutos e com o passar do tempo tornam-se em anéis necróticos. Geralmente as plantas em estágio jovens quando infectadas apresentam porte reduzidos (OLIVEIRA et al., 2000; COSTA et al., 2021) permanecem atrofiadas e não chegam a ser economicamente

produtivas (FILHO et al., 2000; GONSALVES et al., 2010).

Vários métodos têm sido utilizados para o controle da doença entre eles citam-se produção de mudas saudáveis, controle de insetos vetores, eliminação de plantas infectadas, eliminação de plantas hospedeiras do vírus como as cucurbitáceas, bem como das plantas hospedeiras dos insetos vetores (FILHO et al., 2000).

Muitos esforços têm sido feitos para superar a doença, sendo um deles focado no desenvolvimento de variedades resistentes (HAIREEN et al., 2019). Apesar disso, ainda não há cultivares de mamoeiro com resistência ao PRSV-P no mercado brasileiro. Contudo, estudos realizados em representantes do gênero *Vasconcellea* têm mostrado que existem espécies que apresentam gene de resistência ao vírus. As espécies *Vasconcellea cauliflora*, *V. pubescens*, *V. quercifolia* e *V. stipulata* foram consideradas resistentes, destas a *V. quercifolia* foi considerada resistente a essa doença na Flórida (CONOVER, 1964), no Havaí (MANSHARDT; WENSLAFF, 1989) e Austrália (DREW et al., 2006), mas suscetível ao PRSV-P na Venezuela (HOROVITZ; JIMENEZ, 1967). Entretanto, a obtenção de híbridos intergenéricos entre *Carica* x *Vasconcellea* é dificultada pelas barreiras reprodutivas de pré e pós fertilização, gerando híbridos estéreis.

Outra estratégia é o desenvolvimento de mamoeiro transgênico também como tentativas de controle para o PRSV- P. O primeiro mamoeiro transgênico (linha 55-1) foi obtido no início da década de 90 e expressava o gene da capa proteica de um isolado havaiano de PRSV- P (FITCH et al., 1992). Essa planta transgênica mostrou-se resistente a diferentes isolados havaianos, mas suscetível a isolados de outras regiões geográficas, principalmente brasileiras (TENNANT et al., 1994).

No Brasil, nos estados da Bahia e do Ceará, foram avaliadas plantas transgênicas produzidas pela Embrapa em parceria com a Universidade de Cornell (SOUZA JÚNIOR; NICKEL; GONSALVES, 2005), observando um retardo na infecção da doença, assim como produção cerca de 50% superior a das convencionais. No entanto, pesquisas com transgênicos na Embrapa foram descontinuadas devido à política da Empresa e a critérios como a ausência de genes marcadores para resistência a antibióticos, uma vez que sua presença poderia dificultar sua liberação comercial pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e demais órgãos regulamentadores (FILHO, 2011).

Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência ao PRSV-P vírus causador da mancha anelar no mamoeiro em acessos de Caricaceas (CMF 011 e CMF 248 – *Carica papaya* e CMF 259 – *Vasconcellea quercifolia*) do banco ativo de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura cultivados em casa de vegetação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material genético

Este estudo foi realizado em casa de vegetação da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada em Cruz das Almas, Bahia, sem controle de temperatura e umidade. Foram testados 3 acessos de mamoeiro previamente selecionados: a espécie silvestre *V. quercifolia*, o CMF 011 do grupo Formosa (em estudos com o BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura foi selecionado como genótipo tolerante ao PRSV-P) e a cultivar Aliança do grupo Solo como susceptível (Tabela 1). O critério adotado para seleção destes acessos foi a incidência do PRSV sob infecção natural em campo.

**Tabela 1.** Acesso de Caricaceas provenientes do banco ativo de germoplasma do mamoeiro da Embrapa mandioca e fruticultura, inoculadas com PRSV - P em casa de vegetação no município de Cruz das Almas/ BA, para avaliação de resistência a mancha anelar em mamoeiro.

Acesso	Espécie	Nome comum	Origem
CMF 011	<i>Carica papaya</i> L.	DCG440-3	Costa Rica
CMF 248	<i>Carica papaya</i> L.	'Aliança'	Brasil
CMF 259	<i>Vasconcellea quercifolia</i> A.St. Hil	Mamãozinho do mato	Brasil (coleta)

### 2.2 Inoculação e avaliação da sintomatologia da doença

Foram semeadas duas sementes de cada acesso em sacos plásticos de polietileno com capacidade de 15 x 25 x 0,006 cm, contendo substrato composto de terra e esterco bovino curtido. Um mês após a semeadura foi feito o desbaste deixando uma planta por saco. Após dois meses da semeadura, quando as plantas apresentaram 3-4 folhas, foram realizadas duas inoculações em dez plantas de

cada acesso, com intervalo de 15 dias, utilizando um isolado de PRSV-P coletado na região. Três plantas de cada acesso foram utilizadas como controle, sendo uma como controle tampão mais o abrasivo e duas como controle negativo.

O isolado foi preparado utilizando o tampão fosfato de sódio a 0,02 M, pH 7,0, contendo 0,02 M de sulfito de sódio. Como abrasivo foi utilizado o celite, sendo adicionados 0,4 g ao macerado. As amostras foram maceradas na diluição 2/20 (p/v) e as plantas foram inoculadas mecanicamente com o pistilo de um almofariz, sendo em seguida lavadas para retirar o excesso (STEVENS, 1997).

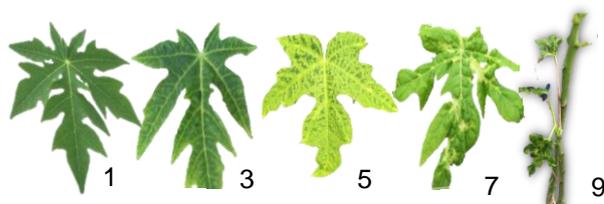
As plantas foram mantidas em casa de vegetação e avaliadas quanto aos sintomas apresentados a cada sete dias, e estas avaliações seguiram durante dois meses. Sendo avaliado a presença de sintomas típicos da doença na haste e folhas, de acordo com o descrito por Filho et al. (2000). Para isso, foi necessário a utilização da escala de classificação de severidade dos sintomas (ALVIAR; CRUZ; HAUTEA, 2012) (Tabela 2 e Figura 1).

**Tabela 2.** Escala de classificação de severidade dos sintomas para avaliação da resistência do vírus da mancha anelar em acessos de mamoeiro adaptada de Alviar, Cruz e Hautea, 2012.

Escala de classificação	Descrição dos sintomas
1	Sem sintomas
3	Mosqueado
5	Mosaico
7	Mosaico e deformação foliar
9	Mosaico, deformação foliar, fio de sapato e/ou estrias oleosas na haste

**Figura 1.** Sintomas característicos de mancha anelar observados em mudas de mamoeiro em casa de vegetação de acordo com a escala de severidade.

Nota 1: ausência de sintomas. Nota 3: mosqueado nas folhas. Nota 5: mosaico. Nota 7. Mosaico e deformação foliar, Nota 9: mosaico, deformação foliar, fio de sapato e/ou estrias oleosas nas hastes.



Fonte: ALVIAR; CRUZ; HAUTEA, 2012.

### 2.3 Análise de dados

Para realizar a análise de variância os dados de severidade foram transformados a porcentagem de severidade dos sintomas da doença (Tabela 1) e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados de severidade da doença foram avaliados com auxílio do pacote AgroR do software R versão 4.3 (R CORE, TEAM 2022).

A incidência da doença (I%) foi determinada pela formula:

$$(I\%) = (n_1/N_j) * 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que:

$n_1$ = número de plantas doentes no momento da observação;

$N_j$ = número total de avaliações realizadas.

As notas obtidas para as plantas de cada acesso foram transformadas para índice de doença (ID), conforme a seguinte fórmula proposta por Mckinney (1923):

$$ID (\%) = \frac{\sum (N \times N^n)}{N^t \times N_{max}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que:

ID = Índice de doença em %;

N = nota obtida por cada planta;

$N^n$  = número de plantas com aquela nota;

$N^t$  = número total de plantas avaliadas;

$N_{max}$  = nota máxima da escala utilizada.

O índice de doença para o PRSV-P foi calculado com base na incidência de infecção e severidade dos sintomas. Os acessos foram classificados em altamente resistente (ID 0-25%), moderadamente resistente (ID 26-50%), moderadamente suscetível (ID 51-75%) e altamente suscetível (ID 76-100%).

Os dados de incidência e índices da doença foram analisados por meio de regressão linear segmentada com platô utilizando o pacote segmented (MUGGEO, 2008) do software R versão 4.3 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2022). Considerando um único ponto de quebra o modelo segmentado é descrito conforme

a seguir:

$$(\theta): y = \beta_0 + \beta_1 x, x \leq \theta$$

$$y = \beta_0 + \beta_2 x + \theta(\beta_1 - \beta_2), x > \theta$$

(Eq. 3)

Se a covariável,  $x$ , é menor ou igual ao ponto de quebra  $\theta$ , o modelo apresenta uma reta representada por  $\beta_0 + \beta_1 x$ . Se a covariável for maior que  $\theta$ , o modelo apresenta uma nova reta descrita por  $\beta_0 + \beta_2 x + \theta(\beta_1 - \beta_2)$ , iniciando no ponto de quebra e com uma nova inclinação.

O grau de ajuste do modelo segmentado foi avaliado pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e pelo erro padrão residual (RSE).

O RSE mensura o valor padrão pelo qual o valor observado difere do valor estimado pela regressão, sendo obtido pela expressão:

$$RSE = \sqrt{\frac{(y - \hat{Y})^2}{n - 2}}$$

(Eq.4)

Em que:

$y$  = valor observado;

$\hat{Y}$ : valor estimado;

$n$ = número de amostras.

Os valores de severidade da doença foram utilizados para obtenção da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), de acordo com a fórmula proposta por Madden et al. (2007):

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \left[ \left( \frac{x_{i+1} + x_i}{2} \right) (t_{i+1} - t_i) \right] \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que:

$n$  = número de avaliações;

$Y$ =índice de doença;

$T$ = tempo de avaliação.

## 2.4 Teste ELISA indireto ("Enzyme linked immunosorbent assay")

Para o ELISA, foram coletadas uma folha do ápice das plantas, maceradas na

proporção de aproximadamente 0,7 g de tecido foliar fresco e 1/5 (p/v) de tampão carbonato + 1% de PVP. Foram utilizadas amostras de plantas sadias, sem inoculação, como controle negativo, e amostras de plantas inoculadas com o isolado PRSV-P, como controle positivo. Após a reação enzimática, a intensidade de coloração foi medida em leitora de microplacas (ELISA) LMR – 96 a 405 nm. Foi utilizado um antissoro para o PRSV cedido por José Albergio Lima da Universidade Federal do Ceará, e o antissoro conjugado foi o Goat-antirabbit conjugado com fosfatase alcalina (ALMEIDA; LIMA, 2001).

Na interpretação dos resultados foram utilizados critérios estabelecidos pelo Laboratório de Virologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, que utiliza um padrão pré-estabelecido para determinar se uma amostra é positiva ou negativa para o antígeno alvo. Esse padrão é baseado em valores de corte (*cut-off*) que indicam o limite entre resultados positivos e negativos.

Após a reação entre a amostra e o antígeno, foi realizada a leitura da absorbância óptica. Essa absorbância foi comparada com o valor de corte estabelecido previamente. O valor de corte foi calculado a partir da média de duas leituras do controle negativo (amostras que não continham o PRSV – P) acrescido de um fator de desvio – padrão multiplicado por um coeficiente específico, conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Controle negativo} = a + b = c / 2 = \text{média}$$

(Eq. 6)

$$\text{Média} \times 2 = \text{valor de corte}$$

Em que:

a: primeira leitura do controle negativo;

b: segunda leitura do controle negativo;

c: soma das leituras;

Dessa forma, se a absorbância da amostra for maior do que o valor de corte, ela será considerada positiva para o PRSV - P. Por outro lado, se a absorbância for igual ou menor que o valor de corte, a amostra será considerada negativa.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Figura 2 revelaram evolução da incidência do *Papaya ringspot virus* (PRSV – P), a mancha anelar, na cultivar Aliança ao longo do período de avaliação (83 dias). A cv. Aliança apresentou um aumento progressivo e significativo na incidência da doença, alcançando 99,99% após 76 dias de inoculação (DAI) e mantendo-se nesse nível até o final das avaliações. Esse resultado indica que a cultivar é altamente suscetível ao PRSV – P. Um dos fatores que pode ter contribuído para essa suscetibilidade é a compatibilidade entre o patógeno e a planta hospedeira que pode ser determinada pela presença de proteínas do patógeno que são capazes de suprimir ou contornar as defesas da planta, permitindo que o patógeno se estabeleça e se multiplique (CHISHOLM et al., 2006; RHODEN et al., 2019). Nesse contexto, o PRSV – P é um vírus que afeta mamoeiro, e a cultivar Aliança parece ser altamente compatível com esse vírus, permitindo sua fácil invasão e disseminação na planta.

Além do mais, a suscetibilidade de uma planta a um patógeno também pode estar relacionada à resposta imunológica da planta. De acordo com Fernandes et al. (2009), as plantas possuem sistemas de defesa naturais que podem reconhecer a presença de patógenos e desencadear uma série de respostas para combatê-los. No entanto, em algumas cultivares, esses sistemas de defesa podem ser menos eficientes, permitindo uma maior replicação e disseminação do vírus.

Com base nos resultados obtidos, o acesso CMF011 demonstrou suscetibilidade ao vírus nos primeiros dias após a inoculação, embora em menor intensidade em comparação com a cultivar Aliança. A incidência da doença variou de 13,33% a 55,55% nos primeiros 34 dias após a inoculação, conforme ilustrado na Figura 2. No entanto, ao longo do período de avaliação, a incidência da doença apresentou uma variação de 21,11% a 42,22%, atingindo o valor de 34,44% no final da avaliação. Esse resultado sugere que o CMF011 possui baixa suscetibilidade ao vírus e menor avanço na intensidade dos sintomas do que a cultivar Aliança. Essa menor suscetibilidade pode estar atribuída a uma provável adaptação às raças PRSV-P (RODRIGUEZ et al., 2013) e pode indicar uma possível interação entre a planta e o vírus.

Existem algumas possíveis explicações para esses resultados. Primeiramente, a diferença na suscetibilidade entre os dois acessos mencionados anteriormente

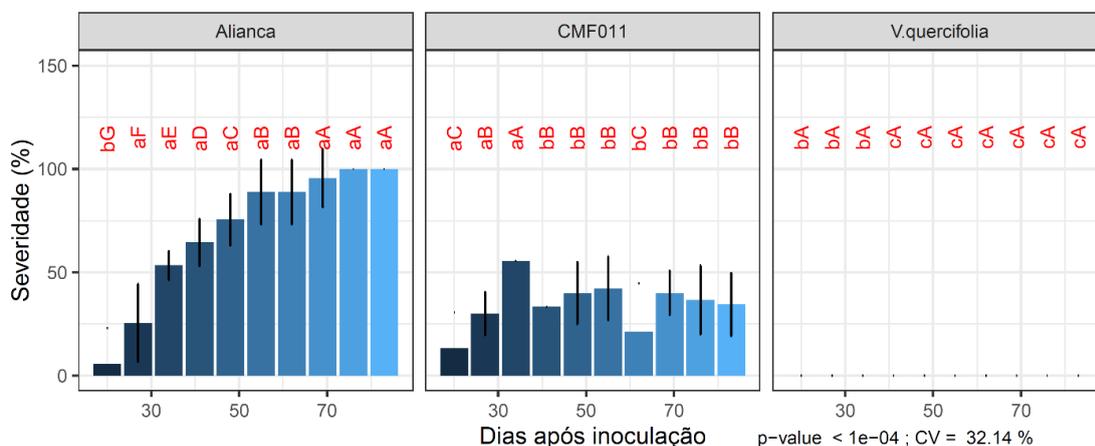
pode estar relacionada a fatores genéticos. Cada acesso possui uma composição genética única, resultante de suas características hereditárias e histórico de cruzamentos, o que pode influenciar sua capacidade de resistir ou tolerar a infecção pelo vírus (NELSON et al., 2018).

Além disso, outros fatores como a resposta imunológica das plantas e sua capacidade de ativar mecanismos de defesa também podem desempenhar um papel importante na suscetibilidade à doença. A eficácia desses mecanismos de defesa pode variar entre espécies de plantas e também genótipos dentro da mesma espécie. Algumas espécies podem ter mecanismos de defesa mais eficazes, como a produção de substâncias antimicrobianas ou a ativação de respostas de defesa celular, o que pode contribuir para uma menor incidência da doença (DODS et al., 2010; CUI; TSUDA; PARKER, 2015; JONES; VANCE; DANGL, 2016).

Barreto et al. (2002), conduziram um estudo para avaliar a resposta de diferentes genótipos de mamoeiro à infecção natural pelo PRSV - P. Os autores observaram níveis variados de suscetibilidade entre os genótipos, alguns apresentaram alta incidência e severidade da doença, enquanto outros foram menos afetados, exibindo menor incidência e severidade dos sintomas.

O estudo também destacou a presença de genótipos que exibiram uma resposta de resistência moderada, caracterizada pela incidência da doença, porém com sintomas mais leves e menor disseminação do vírus. Essa informação é consistente com os resultados encontrados no acesso CMF 011 no presente estudo (Figura 2).

**Figura 2.** Severidade do PRSV – P, o vírus da mancha anelar, em dois acessos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) e na espécie *Vasconcellea quercifolia* após inoculação mecânica e mantidos em casa de vegetação.



Para a *V. quercifolia* os resultados revelaram que a espécie mostrou-se resistente ao PRSV-P, não apresentando nenhuma severidade da doença durante o período de avaliação (Figura 2). Essa resistência pode estar relacionada a mecanismos de defesa presentes na espécie, como a presença de genes de resistência ou a capacidade de ativar respostas imunológicas eficientes contra o vírus (FERNANDES et al., 2009).

De acordo com Nicaise (2014), a presença de genes de resistência é um dos principais mecanismos pelos quais as plantas podem combater patógenos, incluindo vírus. Esses genes podem codificar proteínas que reconhecem componentes do vírus ou interferem em sua replicação, resultando em uma resposta de defesa eficaz. Seguindo esse raciocínio, os genes de resistência da *V. quercifolia* podem ter proporcionado defesa contra o PRSV – P, bloqueando a sua entrada e disseminação na planta.

Além disso, as plantas possuem a capacidade de desencadear respostas imunológicas como uma forma de defesa contra patógenos, incluindo vírus. As plantas também são capazes de produzir moléculas antimicrobianas, como proteínas e compostos químicos, que têm a capacidade de inibir o crescimento e a disseminação do vírus (JONES; DANGL, 2006).

Diante disso, é possível inferir que, neste estudo, a *V. quercifolia* não apresentou nenhuma incidência da doença devido à ativação de respostas imunológicas eficazes. Essas respostas podem ter incluído a produção de hormônios de defesa que desencadearam uma resposta celular coordenada contra o vírus, bem como a síntese de moléculas antimicrobianas (FERNANDES et al., 2009) que foram capazes de inibir o crescimento e a disseminação do PRSV – P. Esses mecanismos de defesa podem ter se originado e evoluído ao longo do tempo, levando a resistência da espécie.

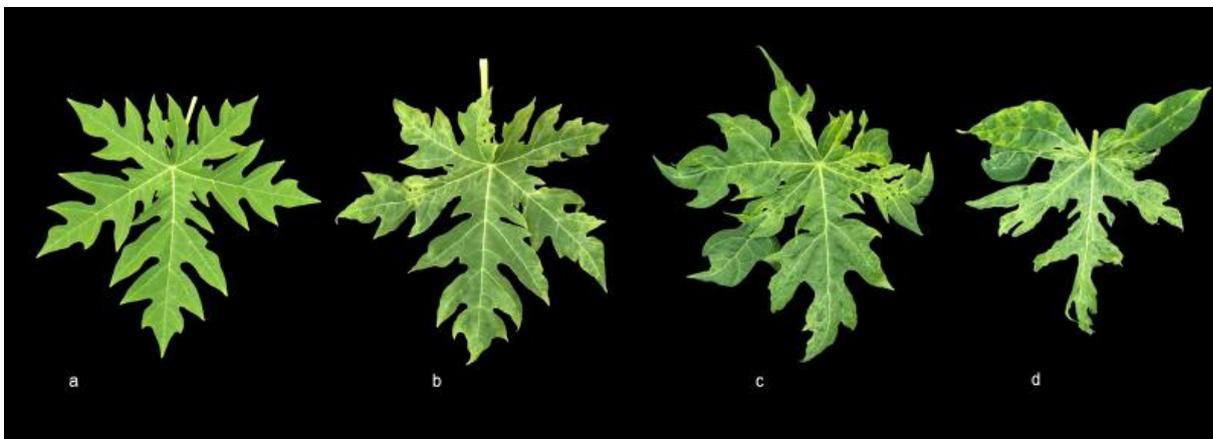
Para avaliações dos sintomas, foi utilizada a escala de classificação de severidade para avaliar o desenvolvimento e a progressão dos sintomas nas plantas. Essa escala foi aplicada de acordo com o padrão de desenvolvimento dos sintomas e foi considerada consistente na variedade suscetível 'Aliança'. Os acessos de mamoeiro foram avaliados em relação à sua resposta à infecção pelo PRSV-P, utilizando a cultivar Aliança como testemunha. As plantas utilizadas como controle permaneceram assintomáticas durante todo período de avaliação (Figura 3).

Os primeiros sintomas detectados no acesso CMF 011 e na cultivar Aliança foram clareamento das nervuras, mosqueado e mosaico. O mesmo foi observado por Alviar, Cruz e Hautea (2012). Mas, algumas plantas da cultivar Aliança apresentaram formação de bolhas de cor verde intensa nas folhas e muita distorção foliar (Figura 2 d) atingindo a nota máxima (9) da escala utilizada.

Ao avaliarem a resistência de diferentes genótipos do grupo Solo ao PRSV - P, Rodríguez et al. (2011), não observaram sintomas severos. Isso pode estar atribuído à possível infecção por raças específicas do vírus PRSV-P, que são responsáveis por sintomas foliares mais intensos. Além disso, a temperatura desempenha um papel crucial no desenvolvimento da doença. De acordo com Cabrera, Cruz e Porta (2010), a acumulação viral e a expressão dos sintomas atingem o máximo em temperaturas oscilantes entre 26°C e 31°C. Essa observação pode ser atribuída à supressão do mecanismo de silenciamento de RNA regulado pela defesa da planta, como mencionado por Mangrauthia et al. (2009), o qual pode ser facilmente afetado por variações na temperatura ambiente.

É importante ressaltar que este estudo foi conduzido em casa de vegetação sem controle adequado de temperatura e umidade, e as avaliações tiveram início em dezembro, período em que a temperatura oscila entre 23°C e 30°C em Cruz das Almas/BA. Essas condições ambientais podem ter afetado a resposta de defesa das plantas, permitindo uma maior replicação do vírus e a expressão de sintomas mais acentuados. Portanto, é possível inferir que as diferenças nos resultados obtidos entre o estudo de Rodríguez et al. (2011) e os resultados mencionados neste trabalho podem estar atribuídas à presença de raças distintas do vírus PRSV-P, bem como às variações nas condições ambientais, especialmente a temperatura, que desempenha um papel significativo na progressão da doença.

**Figura 3.** Sintomas característicos de mancha anelar nas folhas da cultivar Aliança pertencente ao BAG de mamoeiro da Embrapa mandioca e fruticultura após 83 dias de avaliação. (a) Folha sadia (controle); (b) Mosqueado e clareamento das nervuras; (c) Mosaico e início da deformação foliar; (d) Deformação foliar.

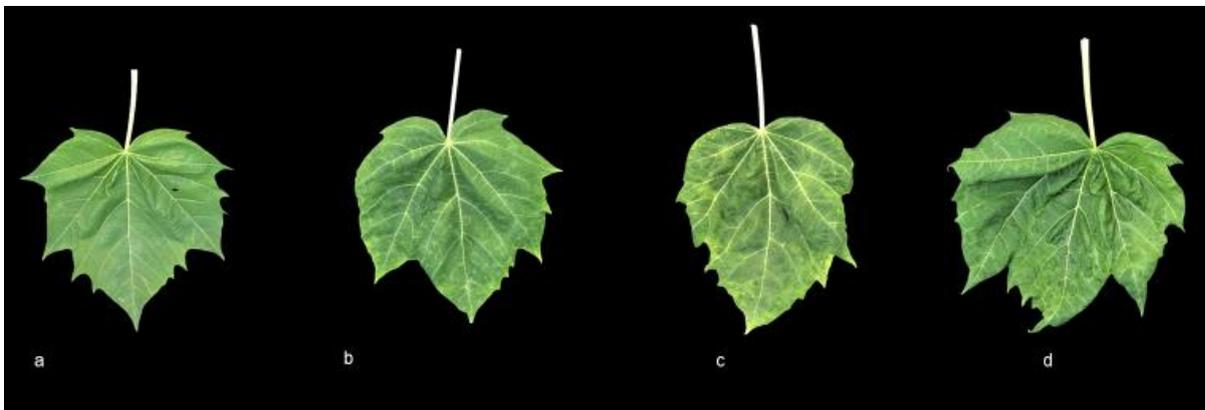


Autora: Juliana da Silva Lopes Pereira

O acesso CMF011 apresentou pouca distorção foliar. O material vegetal analisado apresenta uma forma foliar distinta daquela geralmente encontrada nos acessos de *C. papaya* e pertence ao grupo heterótico Formosa.

Na Figura 4, é possível observar a evolução dos sintomas de mancha anelar no acesso. O primeiro sintoma do PRSV é o clareamento das nervuras, à medida que a doença progredia as plantas do acesso CMF011 começaram a apresentar mosqueado com clareamento das nervuras, mosaico e leve distorção nas folhas que não chegava a comprometer toda a área foliar. O mosaico era mais tênue e não acometia todas as folhas da planta.

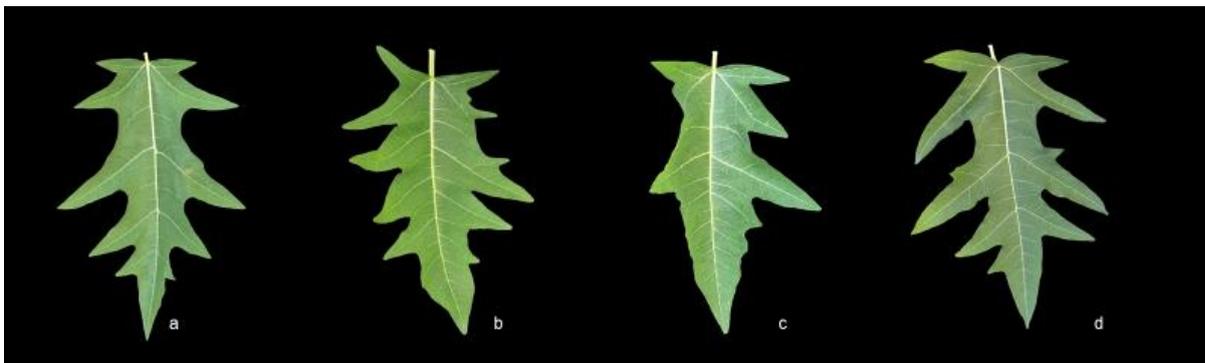
**Figura 4.** Sintomas característicos de mancha anelar nas folhas do acesso CMF011 pertencente ao BAG de mamoeiro da Embrapa mandioca e fruticultura após 83 dias de avaliação. (a) Folha sadia (controle); (b) Mosqueado e clareamento das nervuras; (c) Mosaico e início da deformação foliar; (d) Deformação foliar.



Autora: Juliana da Silva Lopes Pereira

Neste estudo, observou-se que a espécie *V. quercifolia* não apresentou nenhum sintoma relacionado à infecção pelo vírus da mancha anelar (Figura 5). Ao contrário dos outros acessos estudados, nos quais foram observados sintomas de forma crescente ao longo do período de avaliação, a *V. quercifolia* permaneceu livre de qualquer manifestação da doença. Isso indica uma notável resistência da espécie ao vírus, pois mesmo sob condições propícias para o desenvolvimento da doença, a espécie não apresentou sinais de infecção. Esses resultados sugerem a presença de mecanismos de defesa eficientes na espécie, que podem estar relacionados à ativação de respostas de defesa capazes de combater o vírus e proteger a planta contra a infecção e o surgimento de sintomas.

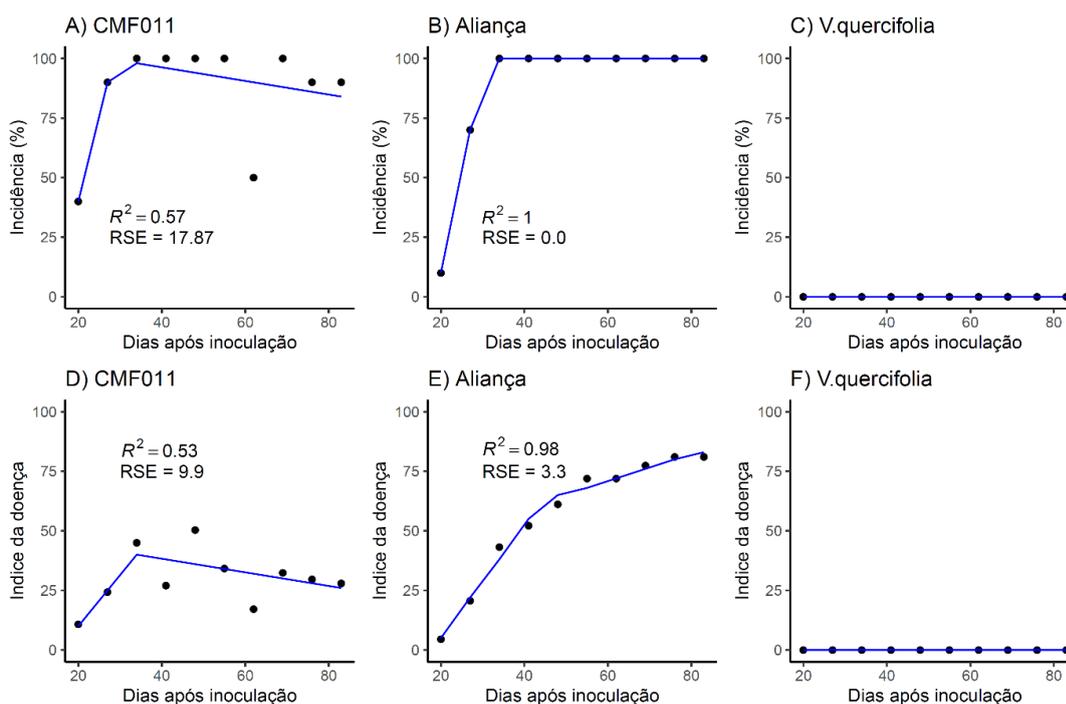
**Figura 5.** Folhas de *Vasconcellea quercifolia* sem sintomas do vírus PRSV – P. (a) Folha sadia (controle); (b), (c) e (d) Folhas sem sintomas do vírus aos 83 dias após inoculação.



Autora: Juliana da Silva Lopes Pereira

Além da severidade, a incidência da doença é um método de quantificação mais usual devido a sua rapidez e facilidade. A Figura 6 mostra a análise da incidência e índice da doença PRSV avaliados em três acessos de mamoeiro (CMF011, 'Aliança', *Vasconcellea quercifolia*).

**Figura 6.** Regressão linear segmentada para análise da incidência e índice da doença PRSV avaliados em três acessos de mamoeiro (CMF011, Aliança, *Vasconcellea quercifolia*). Os valores representam a relação entre os valores preditos pelo modelo (linha azul) e os valores observados.  $R^2$  = coeficiente de determinação; RSE: erro padrão residual.



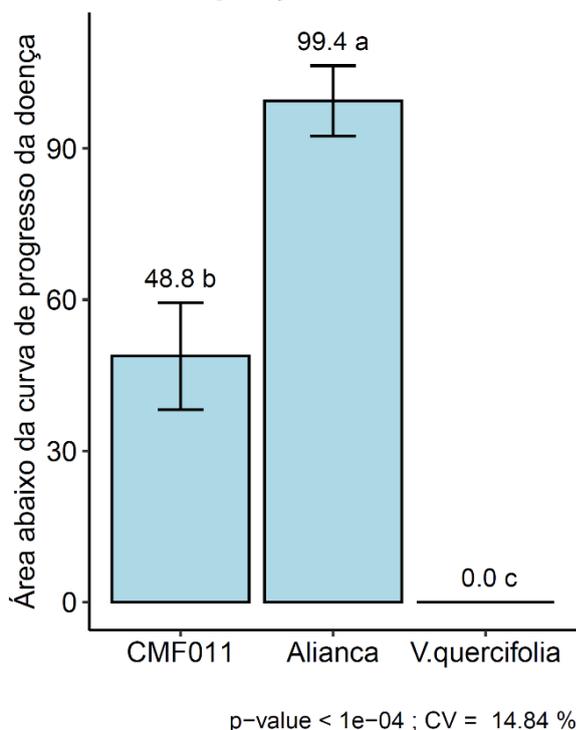
A incidência da doença estimada no acessos de *C. papaya* mostra que 34 dias após a inoculação há aumento da infecção das plantas pelo vírus com menor incidência do acesso CMF011 em relação à cultivar Aliança que mostrou-se altamente suscetível (Figura 6). O modelo de regressão segmentada apresentou perfeito ajuste para os valores de severidade da cv. Aliança ( $R^2=1$ ) indicando que a severidade apresenta um incremento linear entre 20 e 27 dias após a inoculação e depois uma estabilização (platô) com 100% das plantas infectadas pelo vírus. Para o acesso CMF011 o modelo apresentou  $R^2=0,53$  e  $RSE= 17,87$  indicando baixo grau de ajuste.

Em relação ao índice de doença a cultivar Aliança apresentou um incremento linear apresentando maiores valores em comparação ao acesso CMF011 e excelente grau de ajuste do modelo segmentado ( $R^2=0,98$ ). De acordo com os valores do índice de doença o acesso CMF011 mostra certa tolerância ao vírus com valores inferiores à cultivar aliança classificada como altamente suscetível, mostrando o potencial desse acesso para uso no melhoramento genético do mamoeiro visando produção de cultivares com certo grau de tolerância ao vírus.

A ausência da doença nas avaliações realizadas e mensurada em termos de incidência (0) e índice de doença (0) confirmam a resistência do acesso *V. quercifolia* ao vírus do mosaico do mamoeiro.

Os maiores valores de AACPD foram observados nas cultivares Aliança e CMF 011, indicando uma maior incidência e progressão da doença nessas plantas ao longo do período de avaliação (Figura 7). Por outro lado, a *V. quercifolia* não apresentou nenhum AACPD, o que significa que a espécie permaneceu completamente livre da doença, sem qualquer sinal de infecção ou desenvolvimento dos sintomas da mancha anelar.

**Figura 7.** Média da área abaixo da curva de progresso da doença em dois acessos de *Carica papaya* (CMF011 e 'Aliança') e *Vasconcellea quercifolia* aos 83 dias de avaliação após inoculação mecânica com isolado do PRSV-P e mantidas em casa de vegetação.



Na literatura, existem diversos estudos que investigaram a resistência de diferentes acessos de mamão à mancha anelar. Um exemplo relevante é o estudo conduzido por Rodriguez et al. (2013), no qual foi observada uma variação significativa na resistência entre os acessos de mamão cubano. Os resultados indicaram que alguns acessos apresentaram alta resistência, com ausência de sintomas ou baixa severidade da doença, enquanto outros foram considerados altamente suscetíveis. Filho et al. (2022), avaliaram a resistência de mamoeiros transgênicos à mancha anelar e observaram que os mamoeiros transgênicos apresentaram uma alta resistência ao PRSV – P. Eles exibiram uma redução significativa na incidência da doença e na severidade do sintomas em comparação com os mamoeiros convencionais.

Esses estudos são de grande importância para a cultura do mamoeiro, pois fornecem informações que podem contribuir para o desenvolvimento de cultivares resistentes que podem aumentar a resistência e a produtividade das lavouras de mamão.

Os resultados apresentados na Tabela 3 referem – se ao teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) realizado nos três acessos estudados. Através dos

resultados foi possível observar os valores de média obtidos para cada acesso, juntamente com o valor de corte (controle negativo).

**Tabela 3.** Médias das leituras do teste Elisa indireto dos acessos *V. quercifolia*, CMF 011 e 'Aliança' aos 83 dias de avaliação após inoculação mecânica com isolados de PRSV - P e mantidas em casa de vegetação. Valor de corte representa a média do controle negativo. Valores acima do valor de corte (0,013) e desde acima de 0,100 são positivos.

Acessos	Valor de corte	ELISA	
		Média	
<i>V. quercifolia</i>		0,028	-
CMF 011	0,013	0,266	+
'Aliança'		0,361	+

Valores acima do valor de corte (0,013) e desde acima de 0,100 são positivos .

Os valores de média representam a intensidade da reação detectada no teste ELISA, que pode ser um indicativo da quantidade do antígeno PRSV – P presentes nas amostras. A média foi calculada a partir de triplicatas das amostras, fornecendo uma medida geral da reatividade dos acessos em relação ao PRSV - P.

Para a interpretação dos resultados do teste foi estabelecido valor de corte, para determinar a amostra positiva e negativa para o PRSV - P. O valor de corte foi calculado a partir da média das leituras do controle negativo (amostras que não continham o PRSV – P) acrescido de um fator de desvio – padrão multiplicado por um coeficiente específico.

Controle negativo:  $0,000 + 0,013 = 0,013 / 2 = 0,0065$  (média).

$0,0065 \times 2 = 0,013$  .

Logo, valores acima desse valor e desde que acima de 0,100 são considerados positivos.

Para os acessos CMF 011 e Aliança, as médias obtidas foram de 0,266 e 0,361, respectivamente, indicando reações de intensidade relativamente alta. Esses valores são também maiores do que o valor de corte (controle), indicando que a quantidade do antígeno foi maior nesses acessos em comparação com o controle.

Para a *V. quercifolia*, a média obtida foi de 0,028. O sinal “-“ indica que esse valor está abaixo do valor de corte estabelecido, indicando uma baixa reatividade em relação ao PRSV – P. Isso pode sugerir uma menor presença ou quantidade do vírus em comparação ao controle.

No contexto do PRSV-P, uma baixa reatividade do acesso *V. quercifolia* sugere uma menor presença ou quantidade do vírus. Isso pode indicar que a espécie possui uma menor suscetibilidade ao vírus ou que possui mecanismos de resistência que limitam a replicação e disseminação do PRSV-P.

Segundo Fajardo e Nickel (2015), o resultado do ELISA é determinado por uma reação enzimática da fosfatase alcalina conjugada ao anticorpo atuando sobre um substrato específico. A avaliação é realizada pela leitura da absorbância em uma leitora de placas em que poços que receberam amostras infectadas desenvolvem cor amarelada. As amostras são consideradas positivas quando o valor da sua leitura for pelo menos duas vezes superior àquele do extrato da planta sadia, utilizado como controle negativo. Este método apresenta como vantagens: rapidez pois pode ser obtido em até 72 horas e poder ser utilizado para a avaliação de um grande número de amostras. As limitações do teste ELISA residem no fato de não haver anticorpos produzidos comercialmente para a identificação de todos os vírus que infectam as espécies e seus genótipos.

É importante ressaltar que a interpretação dos resultados do teste ELISA deve levar em consideração outros fatores, como a fase de desenvolvimento da planta, a quantidade de material vegetal analisado e as características genéticas. Esses fatores podem influenciar na intensidade da reação e nos níveis de detecção do antígeno.

#### 4. CONCLUSÕES

Foi possível observar diferentes níveis de resistência à mancha anelar dentre os três acessos avaliados.

O acesso CMF011 foi considerado moderadamente resistente ao PRSV-P e pode ser utilizado no programa de melhoramento visando resistência a doenças da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

A espécie *Vasconcellea quercifolia* foi considerada resistente à mancha anelar pois não apresentou sintomas da doença durante os 83 dias de avaliação e não obteve valor de AACPD. O teste de Elisa indicou que *V. quercifolia* mostrou baixa reatividade em relação ao PRSV – P sugerindo que a espécie possui mecanismos de resistência que limitam a replicação e disseminação do PRSV-P. A confirmação da resistência da espécie *Vasconcella quercifolia* ao vírus da mancha anelar possibilita seu uso para introgressão desses genes em *Carica papaya* L.

## 5. REFERÊNCIAS

- ABREU, P. M. V. et al. Current Overview of the Papaya meleira virus, an Unusual Plant Virus. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1853-1870, 2015.
- ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Londrina; Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, p. 186, 2001.
- ALVIAR, A. N.; CRUZ, F. C. S.; HAUTEA, D. M. Assessing the responses of tolerant papaya (*Carica papaya* L.) varieties severity rating scale for resistance screening. **Philippine Journal of crop science**, v. 37, n. 2, p. 20 - 28, 2012.
- BARRETO, P. D. et al. Genótipo de mamão sob infecção natural pelo vírus da mancha anelar. **Revista Ciência Agronômica**, v. 33, n. 2, p. 43-47, 2002.
- CABRERA, M. D.; CRUZ, M. M.; PORTA, I. V. O. Efecto de la temperatura en la virulencia del virus de la mancha anular de la papaya (PRSV-P). **Fitosanidade**, v. 14, n. 2, p. 123-125, 2010.
- CHISHOLM, S. T. et al. Host – Microbe natural interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. **Cell**, v.124, n. 4, p. 803-814, 2006.
- CONOVER, R. A. Distortion ringspot, a severe virus disease of papaya in Florida. **Florida State Horticultural Society**, v. 77, p. 447-448, 1964.
- CORE TEAM, R. R: **A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria. 2022.
- COSTA, A. et al. **A cultura do mamoeiro**. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Brasília, DF. 426p. 2021.
- CUI, H., TSUDA, K.; PARKER, J. E. Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, p. 487-511, 2015.
- DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews. Genetics**, v. 11, p. 539-548, 2010.
- DREW, R. A. et al. Breeding for papaya ringspot virus resistance in *Carica papaya* L. via hybridization with *Vasconcella quercifolia*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 46, p. 413-418, 2006.
- FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O. Técnicas de detecção e estudo de vírus em plantas. **Embrapa Uva e Vinho**, 2015.
- FERNANDES, C. et al. **Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos**. Documentos / Embrapa Rondônia: [s.n.]. v.14, 2009.
- FERREIRA, F. R.; OLIVEIRA, A. R. Resistência de plantas a vírus. Em: **Manejo Integrado de Doenças do Mamoeiro. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura**. [s.l:s.n.]. p. 171 – 192, 2006.
- FILHO, P. E. et al. Vírus. **Mamão – Fitossanidade. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**. Org.; Brasília: [s. n.]. 2000.
- FILHO, P. E. et al. Resistência de mamoeiro transgênico à mancha anelar no Brasil. **Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura**, [s.l: s. n.], 2022.
- FITCH, M. M. M. et al. Virus resistant papaya plants derived from tissue bombarded

with the coat protein gene of *papaya ringspot virus*. **Nature Biotechnology**, v.10, p.1466-1472, 1992.

GONSALVES, D.; et al. **Papaya ringspot virus**. **The Plant Health Instructor**. [s.l.: s.n.]. 2010.

HAIREEN, M. R. R. et al. Screening of PRSV-P resistance and profiling of defensive secondary metabolites in carica papaya and interspecific hybrid of *Vasconcellea*. **Asian Journal of Biotechnology and Genetic Engineering**, v. 2, n. 4, p.1-11, 2019.

HOROVITZ S.; JIMÉNEZ, H. Cruzamientos interspecificos y intergenericos in Caricaceas y sus implicaciones fitotecnicas. **Agronomía Tropical**, v. 17, p. 323-343, 1967.

JONES J. D.; DANGL J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323 – 329, 2006

JONES, J. D. G.; VANCE, R. E.; DANGL, J. L. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. **Science (New York, N. Y.)**, v. 354, n. 6316, p. 1113 – 1117, 2016.

MADDEN, L.V.; HUGHES, G.; BOSCH, F. **The Study of Plant Disease Epidemics**. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 421p, 2017.

MANGRAUTHIA, S. K. et al. Ambient temperature perception in papaya for *papaya ringspot virus* interaction. **Virus Genes**, v. 38, p. 429-434, 2009.

MANSHARDT, R. M.; WENSLAFF, T. F. Zygotic polyembryony in interspecific hybrids of *Carica papaya* and *C. cauliflora*. **Journal American Society Horticultural Science**, v. 114, p. 684–689, 1989.

MAYO, M. A. *The Potyviridae*. By D. D. SHUKLA, C. W. WARD and A. A. BRUNT. 25 x 17 cm. Pp. 516 with 110 text – figures and 30 tables, Wallingford: CAB International, 1994. Price: £60.00. **The new phytologist**, v. 131, n. 2, p. 289–290, 1995.

MCKINNEY, H. H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 26, p. 195 - 217, 1923.

NELSON, R. J. et al. Navigating complexity to breed disease-resistant crops. **Nature Reviews Genetics**, v. 19, n. 1, p. 21-33, 2018.

NICAISE, V. Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 660, 2014.

OLIVEIRA, A. A. R. et al. **Mamão Fitossanidade**. Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, BA) – Brasília: Comunicação para Transferência de Tecnologia. 2000.

PURCIFULL, D. E. et al. *Papaya ringspot virus*. **CMI/AAB. Description of plant viruses**. V. 292, p. 8, 1984.

RAMOS, H. C. C., MOURA, A. O., VENTURA, J. A. Genética da resistência do mamoeiro ao vírus da mancha anelar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 2, 2019.

REZENDE, J. A. M. et al. Doenças do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Doenças das**

**plantas cultivadas**, v. 2, p. 486-496, 1997.

RHODEN, S. A. et al. Aspectos físicos, químicos e genéticos na interação patógeno planta hospedeira. **SaBios: Revista De Saúde E Biologia**, v. 14, n.1, p. 34–41. 2019.

RODRÍGUEZ, D. et al. Severidade da mancha anelar do mamoeiro em diferentes genótipos do grupo solo introduzidos em Cuba. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 4, p. 28-36, 2011.

RODRÍGUEZ, M. D. et al. Evaluación de accesiones cubanas de papaya (*Carica papaya*) ante la mancha anular. **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 1, p. 24-27, 2013.

SOUZA JUNIOR, M.T.; NICKEL, O.; GONSALVES, D. Development of virus resistant transgenic papayas expressing the coat protein gene from a Brazilian isolate of Papaya ringspot virus. **Fitopatologia brasileira**, v. 30, n. 4, p. 357-365, 2005.

SOUZA JUNIOR, M. T., OLIVEIRA, E. J. Melhoramento genético do mamoeiro: estado atual e perspectivas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, n. 2, e-031. 2016.

STEVENS, W. A. Virology of flowering plants. **Brittonia**, v. 35, n. 3, p. 231, 1983.

STICHER, L.; MAUCH, M. B.; METRAUX. J. P. Systemic acquired resistance. Palo Alto-USA. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 235-270, 1997.

TENNANT, P. F. et al. Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. **Phytopathology**, v. 84, n. 11, p. 1359-1366, 1994.

YEH, S. D. et al. Complete nucleotide sequence and genetic organization of papaya ringspot virus RNA. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 2531-2541, 1992.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conservação do germoplasma do mamoeiro tem um papel importante na garantia da segurança alimentar, na adaptação às mudanças climáticas e no desenvolvimento de variedades resistentes a pragas/doenças. Uma coleção de germoplasma de uma espécie deve conservar além de acessos representantes da forma cultivada, também acessos de espécies silvestres e dessa forma garantir a manutenção da variabilidade genética da cultura. Portanto, a conservação de germoplasma deve objetivar seu uso futuro e ser realizada de forma eficiente com técnicas adequadas.

Este trabalho foi idealizado com o intuito de estabelecer um protocolo de criopreservação do pólen de *V. quercifolia* e avaliar a resistência dessa espécie e de acessos de mamoeiro do BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura em relação ao *Papaya ringspot vírus* (PRSV-P) causador da mancha anelar.

Foi obtido um protocolo eficiente para a criopreservação da espécie silvestre mostrando que não há perda na capacidade germinativa e nem no comprimento do tubo polínico após conservação em nitrogênio líquido. Foi possível confirmar a resistência de *V. quercifolia* cultivada no BAG de mamoeiro da Embrapa mandioca e fruticultura ao vírus da mancha anelar além de, concluir que um acesso de *C. papaya* (CMF011) pertencente ao BAG possui resistência moderada a esse vírus. Esses resultados indicam que *V. quercifolia* possui alto potencial para ser explorada em programas de melhoramento genético e conservação do germoplasma.

No entanto, há necessidade de outros estudos na espécie como contagem no número de óvulos, caracterização citogenética, contagem do número de grãos de pólen, conservação do pólen da espécie a curto prazo, estudos de herança da resistência do PRSV-P, análise de barreiras reprodutivas em cruzamentos entre *V. quercifolia* x *C. papaya* L.

Espera-se continuar com a pesquisa para definir um protocolo de criobanco de pólen para caricáceas e estudo de barreiras reprodutivas em cruzamentos intergenéricos em mamoeiro.