

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM ESPÉCIES CARICÁCEAS COM  
USO POTENCIAL NO MELHORAMENTO GENÉTICO DO  
MAMOEIRO**

**MONIQUE FREITAS NETO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO - 2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM ESPÉCIES CARICÁCEAS COM  
USO POTENCIAL NO MELHORAMENTO GENÉTICO DO  
MAMOEIRO**

**MONIQUE FREITAS NETO**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas”.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Telma Nair Santana Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2010

ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM ESPÉCIES CARICÁCEAS COM  
USO POTENCIAL NO MELHORAMENTO GENÉTICO DO  
MAMOEIRO

**MONIQUE FREITAS NETO**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas”.

Aprovada em 19 de fevereiro de 2010.

Comissão examinadora:

---

Dr. Eder Jorge de Oliveira (D.Sc., Agronomia) CNPMF/EMBRAPA

---

Prof. Geraldo de Amaral Gravina (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF

---

Prof. Messias Gonzaga Pereira (Ph.D.; Plant Breeding) - UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Telma Nair Santana Pereira (Ph.D.; Plant Breeding) – UENF  
(Orientadora)

À minha irmã Michelle Freitas que sempre esteve ao meu lado e por ser minha referência de vida, dedico este trabalho.

*“Aos homens cabem os projetos e a Deus as respostas.”*

(Provérbios 16:1)

## AGRADECIMENTO

A Deus, por mais um sonho realizado;

Aos meus pais Luiz Carlos e Maria da Penha, aos meus irmãos Marcelo, Marcos e Michelle, e aos meus sobrinhos Pâmella, Arthur e Anne, por me incentivarem e torcerem por mim sempre;

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Telma Pereira, por toda orientação, confiança, amizade e paciência durante esses anos;

Aos Professores Messias Pereira e Alexandre Viana, por todas as dicas;

Aos colegas da citogenética, Carlos, Hérika, Kellen, Marcelo, Milene e Sérgio por todo companheirismo e amizade, e em especial a Lyzia por toda ajuda durante a realização deste trabalho;

A todos os colegas e professores do LMGV;

Aos antigos e novos amigos conquistados por toda força e companheirismo;

Ao secretário Daniel, por toda atenção e esclarecimentos de dúvidas;

A UENF por contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal;

A FAPERJ e CAPES;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
3.1. Família Caricaceae .....	5
3.1.2. O gênero <i>Jacaratia</i> .....	6
3.1.2.1. <i>Jacaratia spinosa</i> .....	7
3.1.3. O gênero <i>Vasconcellea</i> .....	8
3.1.3.1. <i>Vasconcellea cauliflora</i> .....	9
3.1.3.2. <i>Vasconcellea quercifolia</i> .....	10
3.2. Aspectos citogenéticos .....	11
3.2.1. Determinação do cariótipo .....	13
3.2.2. Meiose .....	17
4. TRABALHOS .....	21
4.1. DETERMINAÇÃO CARIOTÍPICA EM <i>Vasconcellea cauliflora</i> e <i>Vasconcellea quercifolia</i> (Caricaceae) .....	21
4.1.1. RESUMO .....	21
4.1.2. ABSTRACT .....	22
4.1.3. INTRODUÇÃO .....	23
4.1.4. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
4.1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
4.1.6. CONCLUSÃO .....	33

4.1.7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
4.2. COMPORTAMENTO MEIÓTICO DAS ESPÉCIES <i>Jacaratia spinosa</i> e <i>Vasconcellea quercifolia</i> .....	37
4.2.1.RESUMO .....	37
4.2.2.ABSTRACT .....	38
4.2.3.INTRODUÇÃO .....	39
4.2.4.MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.2.5.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
4.2.6.CONCLUSÃO .....	50
4.2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
5. RESUMO E CONCLUSÃO .....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

## RESUMO

FREITAS NETO, M. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro 2010; Estudos citogenéticos em espécies caricáceas com uso potencial no melhoramento genético do mamoeiro. Orientadora: Prof<sup>a</sup> Telma Nair Santana Pereira. Conselheiros: Profs. Messias Gonzaga Pereira e Alexandre Pio Viana.

Os objetivos dessa pesquisa foram determinar o cariótipo convencional e avaliar o comportamento meiótico de espécies silvestres da família Caricaceae; assim a presente dissertação está composta por dois trabalhos. No primeiro trabalho foi determinado o cariótipo convencional das espécies *Vasconcellea cauliflora* e *Vasconcellea quercifolia*. Para tal, foram utilizadas pontas de raízes submetidas a pré-tratamento com paradiclorobenzeno durante 8h a 4°C. Em seguida, o material sofreu digestão enzimática (pectinase 20% e celulase 2%) por 1h 15min, à temperatura ambiente, centrifugação e coloração com Giemsa 5%. Placas metafásicas com cromossomos bem condensados e espalhados foram selecionadas e nelas foram medidos o comprimento total dos cromossomos, comprimento do braço longo e do braço curto. Com base nessas medidas foram estimadas as razões entre braços, o índice centromérico, o índice de assimetria, e o comprimento do lote haplóide. A metodologia permitiu a observação dos 18 cromossomos sendo todos do tipo metacêntrico em ambas as espécies. Na espécie *V. cauliflora* o tamanho dos cromossomos variou de 2,73 a 1,57µm e na espécie *V. quercifolia* variou de 2,17 a 1,47 µm. Com base nos índices de assimetria os cariótipos das espécies foram considerados simétricos, porém a

espécie *V. cauliflora* apresenta um cariótipo mais assimétrico do que *V. quercifolia*. No segundo trabalho, realizou-se o estudo do comportamento meiótico das espécies *Jacaratia spinosa* e *Vasconcellea quercifolia*. Foram estimados o índice de recombinação (IR), baseado no número de quiasmas de células em diacinese e o índice meiótico, baseado no número dos produtos pós-meióticos normais e anormais. Foi também estimada a viabilidade polínica. Para a observação de diferentes fases meióticas, botões florais de diferentes tamanhos foram fixados em 3:1 e quatro anteras foram maceradas em carmim acético 1%. Para a determinação da viabilidade polínica, botões florais na antese foram fixados em etanol 70% e armazenados em freezer. No preparo das lâminas quatro anteras foram maceradas em solução tripla de Alexander. O número de cromossomos e o nível de ploidia das espécies foram de  $2n=2x=18$  cromossomos. A meiose mostrou-se regular em ambas as espécies, apesar de *V. quercifolia* ter apresentado um maior número de irregularidades, como a falta de sincronia e a presença de cromossomos retardatários em algumas células. O índice meiótico estimado para *J. spinosa* foi de 96% e para *V. quercifolia* foi de 94%, sendo considerado alto e indica que as irregularidades detectadas nas diferentes fases meióticas não afetaram significativamente a formação dos produtos pós-meióticos. A viabilidade polínica para *J. spinosa* foi de 97% e para *V. quercifolia* foi de 90%, sendo considerada alta para ambas as espécies. Diante de tais resultados foi possível inferir que as espécies são citologicamente estáveis.

## ABSTRACT

FREITAS NETO, M. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2010. Cytogenetic Studies in species caricaceas with potential use in the genetic improvement of the papaya tree. Adviser: Prof<sup>a</sup> Telma Nair Santana Pereira. Committee Members: Profs Messias Gonzaga Pereira and Alexandre Pio Viana.

The objectives of this research were to determine karyotype and to study the meiotic behavior of the Caricaceae wild species; Thus this thesis is composed two works. In the first one, the karyotypes of *Vasconcellea cauliflora* and *Vasconcellea quercifolia* were determined. For this purpose, root tips were used and submitted the pre-treatment with paradichlorobenzene during 8h at 4°C. After that, the material was digested by enzymatic solution (20% pectinase and 2%celulase)) for 1h 15min, at room temperature, centrifugated and stained with 5% Giemsa. Metaphases with condensed chromosomes were selected and were measured the total chromosome length and long and short arms lengths. Based on these data, were estimated, the arm ratio (r), the centromeric index (CI), the symmetry index (SI), and the haploid lot length (HLL). The both species it was observed 18 chromosomes all metacentric. In *V. cauliflora* the chromosome sizes ranged from 2.73 to 1.57  $\mu\text{m}$ , and from 2.17 to 1.47 $\mu\text{m}$  in *V. quercifolia*. In the second study was evaluated the meiotic behavior of *Jacaratia spinosa* and *Vasconcellea quercifolia*. It was estimated the recombination index (RI), based on the number of chiasmata in diakinesis cells, and the meiotic index, based on the number of

normal and abnormal post-meiotic products. It was also estimated the pollen grain viability. For observation of the different meiotic phases, flower buds in different sizes were fixed in 3:1 and four anthers were macerated on slides, stained with 1% acetic carmine. In the pollen grain viability, flower buds in anthesis were fixed in 70% ethanol and the anthers were macerated in Alexander's triple solution. The chromosome number and ploidy of the species was  $2n=2x=18$  chromosomes. Meiosis was regular in both species, although *V. quercifolia* showed a higher number of irregularities, such as lack of synchrony and lagging chromosomes in some cells. The meiotic index for *J. spinosa* was 96% and for *V. quercifolia* it was 94%. These data suggest that the meiotic irregularities observed in the post-meiotic products were not affected. The pollen grain viability was 97% for *J. spinosa* and 90% for *V. quercifolia*, considered higher for both species. Based on the results, both species are considered cytologically stable.

## 1. INTRODUÇÃO

Caricaceae é uma pequena família formada por seis gêneros e 35 espécies, com origem nas Américas. O único gênero não-americano é o *Cylicomorpha*, com duas espécies arbóreas situadas no Oeste Africano; *Horovitzia* é um gênero monotípico de plantas herbáceas que ocorrem no México. O gênero *Jarilla* possui três espécies herbáceas no sul do México e Guatemala. *Jacaratia* tem sete espécies arbóreas que são amplamente difundidas em climas tropicais. *Carica* é o gênero formado por uma única espécie *Carica papaya* L., que se destaca como o representante mais importante da família, devido ao seu grande interesse comercial. *Vasconcellea* é o gênero da família com maior número de espécies (21) que se concentram na região dos Andes e Equador (Badillo 1971, 1993, 2000). O Equador e a Colômbia são os centros de origem da maioria das espécies, o que contribui para entender a diversidade genética e permite identificar genótipos potencialmente superiores que podem ser utilizados para fins comerciais (Badillo, 1993).

O mamoeiro se destaca na família Caricaceae, devido à sua grande importância econômica. A cultura encontra-se difundida pelas regiões tropicais e subtropicais, onde as condições são ecologicamente favoráveis ao seu desenvolvimento, como clima quente, pluviosidade elevada, solos férteis e bem drenados (Marin *et al.* 1995). Tais condições permitem que a espécie tenha um ciclo semiperene, o que lhe confere a capacidade de produzir o ano inteiro.

Nos últimos anos de acordo com a FAO, o Brasil vem se destacando como maior produtor de mamão, devido às excelentes condições que oferece, sendo que as regiões que mais se destacam são o extremo sul da Bahia e o Norte do Espírito Santo (IBGE, 2008). Embora a produtividade da cultura seja elevada, a mesma enfrenta problemas como perdas causadas por doenças e pragas, que induz a quedas de produção ou até mesmo inviabiliza o plantio em determinadas regiões. Um dos problemas mais observados em campo é a presença de viroses, representando o principal grupo de doenças da cultura, que induz a perdas e infecção de até 100% do pomar em poucos meses, caso nenhuma forma de controle seja utilizada (Tavares *et al.*, 2004).

Visto que não há variabilidade genética dentro da espécie cultivada, é necessário recorrer às espécies silvestres e aos gêneros afins, visando à transferência de genes desejáveis desses materiais genéticos para a espécie cultivada, por meio de hibridações interespecíficas ou intergenéricas. No caso do mamoeiro, uma boa alternativa é recorrer às espécies dos gêneros *Jacaratia* e *Vasconcellea*, que se destacam por apresentar espécies resistentes a alguns vírus, como o que causa a mancha anelar (*Papaya Ringspot Virus*) (Malaguetti *et al.*, 1957).

As hibridações têm papel interessante, pois permitem o estudo evolutivo das espécies além de produzir um considerável número de novos genótipos, aumentando assim a diversidade genética, o que pode levar ao estabelecimento de novos ecótipos, e levar o desenvolvimento de espécies que se adaptam a ambientes anteriormente inóspitos (Arnold e Hodges, 1995; Seehausen, 2004).

Algumas espécies silvestres que têm despertado interesse dos programas de melhoramento são: *V. cauliflora*, *V. quercifolia*, *V. cundinamarcensis*, *V. candicans* e *Jaracatia spinosa* e segundo a literatura são relatadas como resistentes ao vírus da mancha anelar (Malaguetti *et al.*, 1957; Ricelli *et al.*, 1963; Alvizo *et al.*, 1987; Magdalita *et al.*, 1988). Além da resistência à mancha anelar, essas espécies apresentam outras características importantes, como tolerância ao frio, textura de casca e firmeza de polpa.

Uma coleção de germoplasma de uma espécie deve conservar além de acessos representantes da forma cultivada, também acessos de espécies silvestres. Entretanto, a conservação do germoplasma deve objetivar seu uso futuro.

Recentemente foi introduzida à coleção de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), algumas espécies silvestres caricáceas dos gêneros *Jacaratia* e *Vasconcellea* para serem utilizadas pelo programa de melhoramento genético do mamoeiro. Porém, para que sejam realizados estudos genéticos de tais espécies inicialmente é necessário conhecer a base genética e a estabilidade meiótica do germoplasma.

Em se tratando de espécies silvestres de caricáceas, a literatura em qualquer área de conhecimento é muito incipiente, assim torna-se necessário gerar conhecimentos sobre este germoplasma. Várias metodologias podem ser utilizadas para a caracterização do germoplasma, como a caracterização morfoagronômica, a molecular, e a citogenética, apesar de ser pouco utilizada. Em relação à caracterização citogenética, os estudos básicos envolvem número de cromossomos somáticos e o nível de ploidia, estabilidade genética por meio do estudo do comportamento meiótico e da determinação da percentagem da viabilidade polínica.

Assim, é necessário que sejam gerados conhecimentos que possam auxiliar futuras pesquisas de melhoramento genético da forma cultivada.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi gerar conhecimentos citogenéticos sobre as espécies *V. cauliflora*, *V. quercifolia* e *J. spinosa*, importantes fontes gênicas que poderão ser utilizadas em programas de melhoramento do mamoeiro.

Os objetivos específicos foram:

a) Determinar o cariótipo convencional de *V. cauliflora* e *V. quercifolia* quanto ao número e à morfologia dos cromossomos metafásicos mitóticos, verificando a possível ocorrência de cromossomos heteromórficos;

b) Analisar o comportamento meiótico das espécies *J. spinosa* e *V. quercifolia*, bem como estimar o índice de recombinação, o índice meiótico e a viabilidade polínica destas espécies.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Família Caricaceae

A família Caricaceae pertence à classe Dicotyledoneae, subclasse Archichlamydeae, ordem Violales, subordem Caricinae (Badillo, 2000), que compreende seis gêneros: *Jacaratia*, com sete espécies encontradas desde o México até o Norte da Argentina; *Jarilla*, compreendendo três espécies encontradas no México e na Guatemala; *Cylicomorpha*, com duas espécies da África Equatorial; *Horovitzia*, gênero mais novo, com uma espécie no México; *Vasconcellea*, com 21 espécies, que se distribuem pela América do Sul com uma maior concentração nos Andes e nos vales do Equador, onde são encontradas 16 das 21 espécies descritas; e *Carica*, que é monoespecífico (*Carica papaya* L.), cujo centro de origem ainda é bastante discutido, mas segundo Badillo 1971, o centro de origem do *C. papaya* se localiza na região noroeste da América do Sul.

A importância econômica da família Caricaceae reside grandemente na produção de frutos por parte de sua principal espécie, *C. papaya*, que se destaca em várias regiões do mundo. A cultura é bastante difundida em regiões tropicais e subtropicais, onde se adapta bem à temperatura entre 21 e 33° C, sendo que a temperatura ótima para a espécie é em torno de 25 ° C e umidade relativa de 60 a 85% (Marin *et al.* 1995).

Segundo a FAO (2009), o Brasil é o principal produtor mundial de mamão, com 24% do total mundial. Atualmente o mamoeiro é cultivado na quase

totalidade do território brasileiro, sendo que os estados que mais se destacam são a Bahia e Espírito Santo (IBGE, 2004).

A qualidade dos frutos produzidos é de padrão internacional. Os principais países importadores do mamão brasileiro são os Estados Unidos, no qual somente importa dos estados do Espírito Santo, Bahia e Rio Grande do Norte, e na Europa são: Holanda, Portugal, Reino Unido, Portugal e Espanha (EMBRAPA, 2008).

De acordo com Hinojosa e Montgomery (1988), o mamão apresenta qualidades nutricionais relevantes, como acidez baixa, quando se compara com outras frutas tropicais, dessa forma, o mamão apresenta certa vantagem, podendo ser consumido por pessoas sensíveis a frutos ácidos, porém, tal vantagem se torna uma desvantagem quando se trata de conservação dos frutos, pois o pH alto, favorece a atividade das enzimas e o crescimento de microrganismos. De acordo com tais autores, o mamão apresenta componentes como açúcares e vitaminas A, B1, C e niacina (Hinojosa e Montgomery, 1988), e também é fonte de cálcio (Oliveira *et al.*, 1994), tornando este fruto um excelente alimento para todas as idades.

Diversos produtos podem ser extraídos do mamoeiro, como por exemplo, a papaína. Além da papaína, das folhas, frutos e sementes do mamoeiro extrai-se a carpaína, que é um alcalóide utilizado como ativador cardíaco (Oliveira *et al.*, 1994).

As demais espécies da família são de uso estritamente local e talvez parte destas espécies pode se tornar potencialmente importante no futuro (Scheldeman *et al.*, 2007). A seguir é feita uma breve descrição botânica dos gêneros e das espécies silvestres que foram utilizadas nesta pesquisa.

### 3.1.2. O gênero *Jacaratia*

O gênero *Jacaratia* é formado por sete espécies (*J. heptaphylla*, *J. digitata*, *J. spinosa*, *J. corumbensis*, *J. dolichaula*, *J. chocoensis* e *J. mexicana*), que se distribuem pela América Tropical desde o México até o Norte da Argentina (Badillo, 1993). As plantas são dióicas arbóreas, com tronco ramificado rico em acúleos. As folhas são compostas digitadas e as flores são verdes, unissexuais e pentâmeras. As flores masculinas possuem cálice pequeno, corola tubulosa e anteras biloculares. As flores femininas possuem cálice semelhante ao das flores

masculinas, ovário pentalouclar e estilo quase ausente ou ausente. Os frutos são ovóides ou elipsóides, lisos e levemente sulcados (Badillo,1993). Das espécies do gênero *Jacaratia*, umas das mais conhecidas é a *J. mexicana*. Esta espécie se destaca devido à sua importância econômica, sendo seus frutos muito vendidos em mercados de algumas partes do México (Gentry 1942, citado por Badillo 1971).

#### 3.1.2.1. *Jacaratia spinosa*

A espécie *Jacaratia spinosa* conhecida como “jacaratiá” (Argentina, Paraguai); “mamão bravo” ou “mamão do mato” (Brasil); e “papaya do cervo” (Costa Rica), habita bosques úmidos tropicais e às vezes regiões de seca. Sua distribuição vai do Norte da Argentina até a Nicarágua, não havendo indicativo da sua ocorrência na Colômbia e Venezuela (Badillo ,1993).

Ocorre no Brasil desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, passando por Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul (Lorenzi, 2002). É uma planta importante nas cadeias tróficas e apresenta potencial para cultivo, possibilitando a exploração do caule, frutos verdes e maduros e do látex (Paoli, 1986). Encontra-se em risco de extinção no Paraná (Hatschbach e Ziller, 1995), devido, provavelmente, ao fato da indústria de doces caseiros usar partes do seu caule em substituição à polpa do fruto de coco.

As plantas são arbóreas e podem atingir 15 metros de altura e até um metro de diâmetro, são bem ramificadas e seus troncos são ricos em acúleos. Suas folhas são digitadas de coloração verde-escura. De acordo com Piratelli *et al.* (1998), as flores têm antese noturna, sendo que as flores femininas são maiores que as masculinas. As flores masculinas medem aproximadamente 20 mm, têm cálice pentalobado, dez estames em dois verticilos de cinco, e ocorrem em inflorescências nas pontas dos ramos. As pétalas são de coloração verde e os estames têm coloração verde - amarelada. As flores femininas também ocorrem em inflorescências em grupos de três a quatro encerradas no ápice dos ramos. Os frutos são elipsóides, às vezes ovóides, amarelos alaranjados, com polpa doce e medem aproximadamente de 2 a 12 centímetros de comprimento e de 1,0 a 3,5 centímetros de diâmetro. As sementes são ovóides, numerosas, com sarcotesta mucilagenosa, e esclerotesta escura com cristas delgadas, semelhantes às do mamoeiro (Badillo, 1993).

### 3.1.3. O gênero *Vasconcellea*

*Vasconcellea* anteriormente considerado com uma seção do gênero *Carica*, é atualmente o maior gênero da família Caricaceae, formado por 21 espécies. As espécies de *Vasconcellea* são conhecidas como “papayas de montanhas” ou “papayas de terras altas” devido à sua ocorrência em grandes altitudes (Badillo 2000).

As espécies de *Vasconcellea* comparadas com o mamoeiro são geralmente menores, com sabor, textura, e aroma bastante diferenciados. Nos Andes, elas são consumidas frescas, usadas em sucos, doces, na preparação de conservas, molhos e recheios de tortas (Scheldeman *et al.*, 2007). Para consumo direto dos frutos as espécies que mais se destacam são a *Vasconcellea hellbornii*, com frutos açucarados, verdes e grandes, bastante consumidos no Equador, Andes, Venezuela e Bolívia. *Vasconcellea cundinmarcensis* conhecida também como “papaya de terras frias” também é consumida da mesma forma, ou seja, in natura. Na Colômbia *Vasconcellea goudotiana* é utilizada na produção de refrescos. Outras espécies do gênero *Vasconcellea* (*V. microcarpa*, *V. monóica*, e *V. pulchra*) são utilizadas por camponeses para produção de cozidos, onde para tal fim, se extrai as folhas das mesmas (Zerpa, 1980).

Além deste uso, as vasconcelleas são consideradas como fonte de papaína, como exemplo a *Vasconcellea parviflora*. A papaína é uma enzima proteolítica muito utilizada pelas indústrias farmacêuticas e de alimentos. As vasconcelleas também têm sido utilizadas em programas de melhoramento genético do mamoeiro, por apresentarem genes que lhes conferem resistência a determinadas doenças e aqueles que lhes conferem a capacidade de tolerância ao frio (Drew *et al.* 1998). O fluxo de genes entre as *Vasconcelleas* e *Carica papaya*, tem sido dificultado devido a barreiras pós-zigóticas (Mekako e Nakasone 1975; Drew *et al.* 1998).

Cinco das 21 espécies de vasconcelleas (*V. horovitziana*, *V. omnilingua*, *V. palandensis*, *V. pulchra*, *V. sprucei*), estão incluídas no livro das espécies ameaçadas de extinção (IUCN 2007), o que requer um monitoramento especial para a sua conservação. Talvez o motivo desta perda genética, seja a agricultura intensificada, que ocasiona a erosão genética de muitas espécies de *Vasconcellea* (IUCN, 2007).

### 3.1.3.1. *Vasconcellea cauliflora*

*Vasconcellea cauliflora*, antes denominada de *Carica cauliflora*, é uma reconhecida fonte de resistência natural ao *Papaya Ringspot Virus* (PRSV), causador da mancha anelar ou mosaico do mamoeiro. De acordo com Horovitz e Jimenez (1967), *V. cauliflora*, é a espécie mais utilizada em cruzamentos, devido à sua grande adaptabilidade a condições climáticas diversas. A espécie também conhecida como “papaya de montanha”, se distribui em regiões de clima tropical úmido, que vai desde o sul do México até o norte da América do Sul (Badillo, 1993).

As plantas são vigorosas, arbustivas ou arbóreas, as folhas se concentram no ápice do tronco que não possui ramificações e pode chegar a medir aproximadamente 6 cm de diâmetro. As folhas são grandes com 30-40 cm de diâmetro e até 41 cm de largura. As folhas são palmatilobadas com 1 ou 2 lobos inteiros e grandes de coloração verde-escura. A espécie é dióica, ou seja, apresenta plantas masculinas e femininas (Badillo, 1993).

As flores masculinas medem de 3 -3,5 cm de comprimento com pedicelo quase ausente e curto. A corola é de coloração verde-clara com filamentos dos estames superiores de 1 a 2 mm de comprimento, com anteras de 3mm de largura com conectivo sem prolongação ou com prolongação muito curta. Os estames inferiores com anteras de aproximadamente 1,7 mm de comprimento, com conectivo com prolongação. Pistilo é fino medindo aproximadamente 11 mm de comprimento. As flores masculinas se encerram em inflorescências masculinas densas, contraídas ramificadas e que partem das axilas das folhas e medem aproximadamente 30 cm de comprimento (Badillo, 1993).

As flores femininas são grandes, medem de 2,5 a 5 cm , com pedicelo de 2,5 cm de comprimento. O cálice é verde-escuro, a corola é branca ou creme. O ovário é ovóide, de base truncada, o ápice é acentuado ou redondo, às vezes formado por 5 sulcos leves que medem 15 mm por 8mm. O estilo é branco esverdeado e curto. Os estigmas são bífidos, às vezes alguns na mesma flor sem se dividir, outras vezes todos são digitiformemente lobados, medindo de 6 a 8 mm de comprimento. Os frutos são amarelos, ovóides ou quase esféricos ou até mesmo elipsóides, formados de 5 leves sulcos. As sementes medem

aproximadamente 5 a 8 mm de comprimento por 4 a 5 mm de largura, podem apresentar ou não sarcotesta (Badillo, 1993).

### 3.1.3.2. *Vasconcellea quercifolia*

A espécie *V. quercifolia* conhecida como mamão do monte, jacatatiá, mamãozinho, tem como centro de diversidade o sul do continente Americano (Scheldeman *et al.*, 2007). A espécie se distribui por toda América Latina (sul do Peru, Norte da Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai). No Brasil pode ser encontrada na Bahia, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina, em locais úmidos e regiões de temperatura baixa (Badillo, 1993).

As plantas são dióicas e arbóreas que podem atingir de 3 a 15 m de altura, pouco ramificadas, tronco com aproximadamente 60 cm de diâmetro, às vezes cônico com periderme lisa com casca amarela. As folhas são bastante variáveis, com a nervura central bastante desenvolvida (Badillo, 1993).

As flores masculinas são bem pequenas, verde- amareladas com 10-14 mm de comprimento. Apresentam três estames superiores com anteras ovais com aproximadamente 1 mm de largura, com conectivo prolongado e estames inferiores de anteras sublineares com 1.5 mm de comprimentos para 3 mm de largura. As flores masculinas se encerram em inflorescências de 4 – 6 cm de comprimento e largura (Badillo, 1993).

As flores femininas são um pouco maiores que as masculinas e medem aproximadamente de 10 a 18 mm de comprimento. Os lobos do cálice são muito longos, verde- amarelados, ovários acentuados até a base, com estilo situado na terceira parte do ovário, podendo ser muito curto ou às vezes ausente, estigmas inteiros, filiformes, mas bem curtos (Badillo, 1993).

Seus frutos são ovóides pequenos medindo aproximadamente de 2 a 8 cm de largura, sendo comestíveis. As sementes são ovóides, medindo aproximadamente de 4-5 mm de comprimento por 3-3.5mm de largura, com esclerostesta com proeminências irregulares muito pouco elevadas quase lisas (Badillo, 1993).

## 3.2. Aspectos citogenéticos

A citogenética é considerada como o estudo da genética por meio da citologia. Esta área da ciência engloba todo e qualquer estudo relacionado com o

cromossomo, isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução. É uma das fontes geradoras de questionamentos que impulsionaram a genética molecular, embasando a tecnologia de ponta, como a biotecnologia e a engenharia genética, permanecendo junto às mesmas, como um dos recursos de avaliação em várias pesquisas dessa natureza (Sacchet, 1999).

Apesar dos grandes avanços dos últimos anos nas pesquisas em biologia molecular, a citogenética ainda é considerada como uma área de pesquisa relevante, pois dá suporte às novas tecnologias, seja nas técnicas de engenharia genética ou nas pesquisas de seqüenciamento genômico.

A citogenética clássica desenvolveu-se principalmente a partir do início do século passado e seu crescente progresso acompanhou o aprimoramento de técnicas e equipamentos de microscopia. Os primeiros trabalhos citogenéticos foram desenvolvidos por meio do estudo da meiose do milho, mais precisamente do paquíteno, por Mc Clintock em 1929, onde o mapeamento cromossômico, possibilitou a identificação do tamanho de cada cromossomo, a posição do centrômero, regiões eucromáticas e heterocromáticas (Gill *et al.*, 1997). Anos mais tarde por volta de 1940, foram feitos achados importantes também em milho como relações entre mapa genético e mapa físico, estruturas das regiões organizadoras de nucléolo, dentre outras.

A análise cromossômica sempre foi um dos campos estimulantes da citologia e da genética, tendo relação entre estudos taxonômicos e evolutivos, bem como no melhoramento genético e na caracterização de germoplasma. Apesar da revolução provocada pela Genética Molecular, a análise cromossômica continua sendo a única maneira de observar o genoma de um eucarioto na forma de blocos individualizados de material genético, fáceis de serem mensurados, diferenciados em subunidades e manipulados de diferentes formas, pois de nenhuma outra forma o material genético é tão claramente observado (Brammer *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, houve grandes avanços na citogenética molecular com a implantação de técnicas de bandeamento cromossômico, hibridização *in situ*, que permitem a visualização de blocos de coloração diferenciada (bandas), melhorando significativamente a caracterização cromossômica e que

proporcionam a interação entre o conhecimento da biologia celular, da citogenética clássica e genética molecular.

Estudos citogenéticos, como número de cromossomos, nível de ploidia, comportamento meiótico, viabilidade polínica das espécies de Caricaceae ainda são bastante incipientes. Alguns autores já determinaram que os membros da família Caricaceae são diplóides com 18 cromossomos (Darlington e Ammal, 1945). Como *V. monoica*, *V. goudotiana*, *V. microcarpa*, *V. cauliflora*, *V. quercifolia* e *Jacaratia spinosa* (Zerpa, 1967), porém são poucos os trabalhos que dão um maior detalhamento, como morfologia dos cromossomos, nível de similaridade, dentre outras características, que ainda não foram bem elucidadas. Em mamoeiro alguns trabalhos já confirmaram que a espécie apresenta 18 cromossomos bastante similares e de tamanho pequeno (Datta, 1971; Dasmaceno Junior *et al.*, 2009).

Datta (1971) estudando cinco variedades indianas de mamoeiro observou que os cromossomos de todas as variedades estudadas foram em geral curtos, com comprimento variando entre 1µm a 4,23 µm. Já Dasmaceno Junior *et al.* (2009), observaram que o tamanho dos cromossomos variou de 1,43 µm a 2,29 µm. Essas diferenças de resultados podem ser explicadas pelo uso de diferentes metodologias, pré-tratamento e colorações (Sybenga, 1959).

Apesar da literatura já fazer menção ao número de cromossomos somáticos das caricáceas e à caracterização de alguns membros da família, ainda é necessário que seja explorada a análise do genoma, em termos de número e morfologia dos cromossomos, das demais caricáceas. Essa análise em nível citogenético é chamada de cariótipo, que é típico de cada espécie e bastante informativo, pois permite que seja avaliado os diferentes tipos de cromossomos que a espécie apresenta, a presença de constrições secundárias, o tamanho do lote haplóide e o nível de simetria dos cromossomos.

Os cromossomos são unidades de herança localizadas no núcleo de todas as células eucariotas. O conhecimento do número de cromossomos ou do nível de ploidia, além de importante para a caracterização de uma espécie, é importante para os trabalhos de melhoramento genético, quando são programados cruzamentos (Schifino-Wittmann, 2001).

Outra importante ferramenta utilizada na caracterização citogenética, é o estudo do comportamento meiótico da espécie. Neste estudo podem ser

detectadas irregularidades durante as diferentes fases meióticas como cromossomos retardatários, segregação cromossômica precoce, cromossomos pegajosos entre outras, além de confirmar o nível de ploidia da espécie através da observação do pareamento cromossômico e avaliar o nível de fertilidade da mesma a partir da determinação do índice meiótico e do estudo da viabilidade polínica da espécie.

### 3.2.1. Determinação do cariótipo

O cariótipo pode ser representado pelo cariógrama e ideograma. O cariógrama caracteriza-se por medidas físicas dos cromossomos tiradas em fotomicrografia, onde os cromossomos são organizados em ordem decrescente ou não, e ideograma, é o desenho esquemático do cariógrama (Guerra & Souza, 2002).

Os cromossomos podem ser visualizados via microscopia, já que, durante a divisão celular, mais precisamente na fase de metáfase mitótica, a dimensão e a localização das constrições primária (centrômero) e secundária (região organizadora nucleolar e satélite) podem ser observadas. Tais regiões são consideradas marcadores citológicos juntamente com as bandas heterocromáticas. O centrômero corresponde a uma constrição limitante em cromossomos metafásicos mitóticos e, normalmente, é um componente estrutural único e visível (Thompson *et al.*, 1991; Sybenga, 1992).

Os cromossomos são classificados de acordo com a posição do centrômero (Levan *et al.*, 1964). Guerra (1986) considera a classificação de Levan *et al.* (1964) mais adequada para cromossomos longos; para cromossomos pequenos ele indica a razão entre os braços longo e curtos ( $r$ ) e o índice centromérico (IC), que é estimado pela razão entre o comprimento do braço curto e o comprimento total do cromossomo. Com base nesses estimadores os cromossomos são classificados em quatro tipos: metacêntrico (M,  $r=1,00$  a  $1,49$ ;  $IC= 40,1\%$  e  $50,0\%$ ), submetacêntrico (SM,  $r=1,50$  a  $2,99$ ;  $IC= 25,1\%$  a  $40,0\%$ ), acrocêntrico (A,  $r= 3,00$  a  $\infty$ ;  $IC=0,01\%$  a  $25,0 \%$ ) e telocêntrico (T,  $r=\infty$ ;  $IC=0$ ) (Guerra, 1986).

O cariótipo pode ser simétrico ou assimétrico, sendo que no cariótipo simétrico os cromossomos apresentam tamanhos semelhantes e os centrômeros são medianos ou submedianos, enquanto que cariótipos assimétricos são aqueles

que apresentam cromossomos de tamanho mais heterogêneo e centrômeros mais terminais ou subterminais. De acordo com Paszko (2006), o aumento da assimetria pode ocorrer devido à mudança na posição do centrômero da posição mediana/submediana para a posição terminal/subterminal ou devido ao acúmulo de diferenças no tamanho relativo entre cromossomos que formam o complemento. Na literatura existem sete diferentes métodos de avaliação de assimetria cariotípica, no entanto, alguns destes métodos são utilizados para a elucidação de relações entre grupos taxonômicos.

Huziwara (1962) estabeleceu um índice, índice TF (*Total Form*), para avaliar a assimetria dos cariótipos; este índice corresponde à razão entre a somatória dos braços curtos e o comprimento do lote haplóide e pode variar de 0 a 50%, sendo este último valor característico de cariótipos extremamente simétricos; o índice TF é freqüentemente utilizado para determinar as relações cariotípicas entre espécies do mesmo gênero. Entretanto, Paszko (2006) comparando os diferentes índices de assimetria propôs um novo método (AI) que corresponde ao produto do coeficiente de variação do índice centromérico ( $CV_{CI}$ ) e do coeficiente de variação do comprimento total dos cromossomos ( $CV_C$ ) dividido por 100; segundo o autor este novo método é capaz de detectar as variações mínimas dos cariótipos, além de aumentar a precisão dos resultados em comparação com outros métodos existentes.

Na determinação do cariótipo, outras características também são levadas em conta como o tamanho do genoma, características do telômero, posição dos cinetócoros, tamanho e posição dos *knobs* heterocromáticos, comprimento absoluto e relativo dos cromossomos, além das constrições secundárias (RONS) (Singh, 1993).

A região organizadora nucleolar (RON) é um segmento cromossômico que apresenta cópias múltiplas (de 500 a 1.000 cópias) dos dois maiores fragmentos 18S e 28S de rRNA (Sybenga, 1992; Fukui e Nakayama, 1996; Caixeiro, 1999). Durante o estágio de contração mitótica dos cromossomos, a RON ativa na fase de interfase se torna visível como uma constrição, denominada de constrição secundária, que pode se situar na região terminal ou intersticial do cromossomo e quando localizado nesta última posição dá origem ao satélite (Schubert, 2007).

A cariotipagem pode ser caracterizada de duas formas: por coloração convencional, onde é utilizado um corante (Giemsa, Carmim acético, Orceína

Acética, Reativo de Schiff) que reage com todo o DNA fazendo com que este fique completamente destacado, ou seja, não há formação de bandas, ou por coloração diferencial onde são utilizados corantes específicos para certas regiões dos cromossomos gerando bandas. Essa técnica foi inicialmente desenvolvida para cromossomos humanos, e, mais tarde, para cromossomos animais e vegetais. As bandas são visíveis como regiões de alta e baixa intensidade sob o microscópio de fluorescência ou como áreas diferenciadas em coloração sob o microscópio (Sharma e Sharma, 1994).

Para a determinação do cariótipo convencional ou diferencial é necessário que células mitóticas em divisão apresentem os cromossomos espalhados e condensados de forma a permitir a contagem e medições dos braços cromossômicos. Para tanto, o tecido vegetal tem que ser preparado de maneira a preservar as condições dos cromossomos permitindo, assim, uma boa visualização dos mesmos. De maneira geral, o citogeneticista tem que aplicar algum pré-tratamento, o qual é seguido da fixação, com posterior coloração.

O pré-tratamento consiste em se submeter o tecido vegetal, normalmente pontas de raízes visando: a) clarear o citoplasma; b) dissolver a lamela média causando uma melhor separação e distribuição das células; c) causar o espalhamento dos cromossomos acompanhado da clarificação das constricções; e d) amaciar o tecido. O pré-tratamento também promove uma rápida penetração da solução fixadora como também facilita o estudo da estrutura dos cromossomos. Dependendo do pré-tratamento os cromossomos ficam curtos tornando fácil o seu exame (Sharma e Sharma, 1994).

O paradiclorobenzeno (PDB) é o mais útil do grupo dos benzenos na pesquisa cromossômica. Ele não somente causa a inibição do fuso, mas também torna as constricções cromossômicas mais visíveis devido à contração e à hidratação diferencial dos segmentos dos cromossomos. De todos os produtos utilizados na citogenética, o paradiclorobenzeno apresenta uma ampla utilização, podendo ser utilizado tanto para espécies com cromossomos longos quanto com cromossomos pequenos, variando o tempo de tratamento, de acordo com a espécie. Sua limitação deve-se ao prolongamento do seu uso (3h.) e temperatura requerida (10 a 16 ° C) para se obter bons resultados (Sharma e Sharma, 1994).

Dentre os corantes mais utilizados se destacam : a fucsina é um corante artificial, ácido ou básico, constituinte de um dos métodos mais utilizados para o

estudo de cromossomos, o reagente de Feulgen; o corante Feulgen que é muito utilizado em cariótipos, tem muitas vantagens como alta especificidade ao DNA, porém em espécies de baixo conteúdo de DNA e cromossomos muito pequenos, nem sempre os cromossomos são bem corados e delineados (Guerra, 1983); o Giemsa é uma mistura de vários corantes, do grupo azul de metileno e seus produtos da oxidação, os azuis bem como a eosina Y. A qualidade do corante varia com a proporção dos corantes usados no preparo. A solução de Giemsa é geralmente preparada por dissolução do pó em mistura de glicerina e metanol. Seu efeito na coloração torna a cromatina corada de vermelho e o citoplasma de azul. A importância de Giemsa na coloração de cromossomos tem aumentado substancialmente após o advento da técnica de bandeamento, em meados de 1970 (Sharma e Sharma 1994).

Além destas, podem ser utilizados corantes para regiões específicas do DNA formando bandas, também conhecida como coloração diferencial ou bandeamento, sendo importantes na caracterização de polimorfismos, permitindo a distinção de possíveis rearranjos cromossômicos.

O estudo do cariótipo tem sido fundamental para pesquisas que buscam caracterização citogenética de variantes genômicas ou para detecção de híbridos em programas de melhoramento, tanto quanto para estudos da evolução de cariótipos de grupos (Guerra *et al.*, 1997), todos fundamentados em mudanças causadas por alteração na morfologia dos cromossomos. Acredita-se que espécies que apresentam cariótipo assimétrico sejam evolutivamente mais avançadas (Coelho e Battistin, 1996; Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas, 1998), ou seja, o índice de assimetria indica alterações intracromossômicas no decorrer da evolução, ocasionadas por mutações naturais ou artificiais (Maffei *et al.*, 1996). Em *Phaseolus*, a variação cariotípica de espécies silvestres, relacionada a outras fontes de evidências, sugeriu uma provável direção na evolução cromossômica do gênero (Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas, 1998). A visualização do padrão de heterocromatina foi usada para estudos de parentesco evolucionário em milho (*Zea mays*) e seus parentes mais próximos (Mastenbroek e Wet, 1983). No gênero *Acrostichum*, os resultados de análises cariotípicas auxiliaram nas avaliações citoevolutivas e citotaxonômicas das espécies que ocorrem no Brasil, as quais exibem características morfológicas muito semelhantes (Marcon *et al.*, 1998).

Juntamente com o cariograma em muitas espécies é feito a coloração dos cromossomos com nitrato de prata. Essa técnica tem por objetivo a coloração de regiões de satélite ou regiões organizadoras de nucléolos (constrições secundárias ou outras regiões com sítios responsáveis pela transcrição de RNA ribossomal, também denominados RON) (Sumner, 1990 citado por Sousa, 2006).

### 3.2.2 Meiose

A meiose é um processo altamente conservado nos eucariotos e ocupa um papel central no ciclo de vida dos organismos que se reproduzem sexualmente (Hamant *et al.*, 2006). Os cromossomos encontrados no núcleo celular após ocorrer a replicação do DNA durante a interfase sofrem a divisão meiótica que se caracteriza por duas divisões seqüenciais, fazendo com que uma célula dê origem a quatro células haplóides. A divisão meiótica se divide em dois ciclos, o ciclo ou divisão I e o ciclo ou divisão II.

No primeiro ciclo meiótico os cromossomos que foram replicados na interfase apresentam as cromátides irmãs associadas pelo centrômero; este ciclo é também conhecido como reducional, pois é nele que ocorre a redução do número de cromossomos à metade. Este ciclo é dividido em subfases conhecidas como prófase, metáfase, anáfase e telófase. A prófase por sua vez é subdividida em subfases sendo a primeira delas, o leptóteno, que se caracteriza pela condensação da cromatina tornando os cromossomos parcialmente visíveis. No zigóteno os pares de homólogos se aproximam um do outro formando o complexo sinaptonêmico; essa aproximação é tão perfeita que o par recebe o nome de bivalente. No paquíteno, inicia-se a recombinação entre cromossomos homólogos via formação da "Double Strand Break" (DSB); estrutura formada devido à ocorrência de *crossing over* ou permuta. Cada permuta produz uma conexão entre os dois homólogos chamada de quiasma. Os homólogos agora fortemente conectados estão mais condensados, o que os tornam bem visíveis. Durante, o diplóteno e a diacinese os pares de homólogos iniciam o afastamento um do outro. Na metáfase I, os homólogos pareados posicionam-se na região mediana da célula, formando a placa equatorial; nessa fase os cromossomos então atingem o máximo de condensação. Os quiasmas são desfeitos durante o evento que precede a metáfase I, e na anáfase I ocorre a segregação dos pares de cromossomos homólogos (Hamant *et al.*, 2006). A segunda divisão meiótica é

conhecida como ciclo equacional e caracteriza-se, principalmente, pela separação das cromátides irmãs de cada cromossomo, o que leva à formação de quatro células haplóides.

As plantas juntamente com a *Drosophila* têm servido de modelo de estudo para elucidação de conceitos fundadores da herança e da meiose. Devido à facilidade de acesso aos meiócitos nas anteras, as plantas têm sido muito utilizadas em estudos de conservação e evolução em nível citológico (Hamant *et al.*, 2006).

O estudo do comportamento meiótico permite a compreensão de vários eventos e os resultados obtidos podem ser aplicados nos estudos de recursos genéticos, estudos evolutivos e também serem utilizados em programas de melhoramento (Techio *et al.*, 2006). Além destas, o estudo meiótico de uma dada espécie pode fornecer importantes informações, sobre recombinações cromossômicas, irregularidades meióticas e a viabilidade polínica.

O processo meiótico é evolutivamente conservado e controlado por fatores genéticos e sofre influência ambiental. Irregularidades meióticas como cromossomos pegajosos, cromossomos retardatários, segregações precoces, não-disjunção dos cromossomos, presença de produtos pós-meióticos anormais, indicam a ocorrência de anormalidades que podem estar diretamente relacionadas com as variações ambientais (Koduro e Rao, 1981). Tais irregularidades devidas a mutações são indesejáveis, pois alteram o genótipo da espécie, geram variação cromossômica, o que dificulta trabalhos de produção de híbridos pelos programas de melhoramento.

Quando se estuda o comportamento meiótico de uma determinada espécie, geralmente se estima o Índice Meiótico (IM), que foi desenvolvido por Love (1951) em trigo. Este índice avalia a estabilidade meiótica do genótipo. Para o cálculo do IM são contados os produtos pós-meióticos normais ou tétrades, e os produtos pós-meióticos anormais, mônades, díades, tríades e políades. A razão dos produtos normais, pelo número total de produtos pós-meióticos estabelece o IM cujos valores inferiores a 90% indicam que a planta apresenta uma baixa estabilidade meiótica, sugerindo a ocorrência de alguma anormalidade durante a meiose e índices superiores a 90% indicam alta estabilidade meiótica. Este índice é importante porque dá uma idéia da facilidade de obtenção de progênes com

número de cromossomos desbalanceados caso seja realizado o cruzamento entre plantas com IM inferior a 90%.

Outra importante ferramenta que compõe o estudo meiótico de uma espécie é o estudo da viabilidade polínica, que é referida como o percentual de grãos de pólen viáveis ou não. É sabido que plantas que apresentam arranjos cromossômicos como inversão, translocação, deleção e duplicação, tendem a apresentar um percentual de grãos de pólen abortados, que dependendo do valor, já é um indicativo da anormalidade que está acontecendo no material genético.

Esta é uma medida de fertilidade masculina que pode ser determinada por diversas técnicas e que fornece importantes informações úteis para estudos evolutivos, de conservação genética ou até mesmo em programas de melhoramento genético.

Alguns fatores podem influenciar diretamente o desenvolvimento do grão de pólen e a germinação do tubo polínico, como condições climáticas (temperaturas baixas, umidade relativa do ar) (Lima Filho *et al.*, 2002) e até mesmo diferenças genótípicas. Portanto, é de suma importância estimar a viabilidade polínica de espécies de interesse no melhoramento vegetal.

Segundo Souza *et al.* (2002), a viabilidade e a germinabilidade polínica constituem-se em fatores importantes para o melhoramento de plantas, pois em espécies cada grão de pólen leva consigo os materiais genéticos resultantes da recombinação, fazendo com que estas plantas transmitam à próxima geração genótipos amplamente diversificados, tamanha a probabilidade de diferentes combinações entre os alelos que ocorre na meiose.

Para estimar a viabilidade polínica são realizadas técnicas de contagem direta dos grãos de pólen onde são utilizadas diferentes soluções corantes, como a solução tripla de Alexander, aceto carmim, lugol, azul de anilina em lactofenol, sais de tetrazoilo (Kelly *et al.*, 2002). Com o uso destas soluções, a determinação entre grãos pólenes classificados como viáveis e inviáveis é feita pela diferenciação do tamanho e pela capacidade de coloração dos grãos de pólen.

Segundo Techio *et al.* (2006), análises utilizando a Solução tripla de Alexander que é composta pelos corantes verde malaquita, fucsina ácida e laranja G, fornecem dados mais acurados sobre a viabilidade dos grãos de pólen, pois tal corante permite que haja uma coloração diferencial entre pólenes viáveis e inviáveis. O corante verde malaquita tem afinidade com a celulose presente na

parede celular corando-a de verde, enquanto que o protoplasma é corado pela fucsina ácida de púrpura ou vermelha. Desta forma, por não apresentarem protoplasma, os grãos de pólen abortados coram-se de verde e os viáveis coram-se de púrpura (Alexander, 1969).

## 4. TRABALHOS

### 4.1. DETERMINAÇÃO CARIOTÍPICA EM *Vasconcellea cauliflora* e *Vasconcellea quercifolia* (CARICACEAE)

#### 4.1.1. RESUMO

O presente estudo teve por objetivo determinar o cariótipo das espécies *Vasconcellea cauliflora* e *Vasconcellea quercifolia* verificando a possível ocorrência de cromossomos heteromórficos. Para tal, foram utilizadas pontas de raízes de ambas as espécies, submetidas a um pré-tratamento com solução saturada de paradiclorobenzeno, seguido de fixação, digestão enzimática (pectinase 20% e celulase 2%), centrifugação e posterior coloração com Giemsa 5%. As lâminas assim preparadas foram observadas em microscópio ótico e as melhores lâminas foram selecionadas para a contagem dos cromossomos. Para a montagem do cariograma e do ideograma das espécies, foram utilizadas cinco placas metafásicas com cromossomos bem espalhados e com boa condensação. Foram mensurados o comprimento absoluto dos cromossomos, o comprimento dos braços longos e curtos, e a partir destes dados foram estimados a razão entre os braços ( $r$ ), o índice centromérico (IC), o comprimento do lote haplóide (CLH) e o índice de simetria (IS). A classificação dos cromossomos foi realizada com base

na razão entre braços e no índice centromérico. As medidas dos cromossomos foram submetidas à análise de variância e a testes de médias de Scott e Knott. Para as duas espécies foram observados 18 cromossomos todos de tamanho pequeno. O comprimento dos cromossomos de *V. cauliflora* variou de 2.73 a 1.57 $\mu\text{m}$ , e na espécie *V. quercifolia* variou de 2.17 a 1.47 $\mu\text{m}$ . Os cromossomos das duas espécies foram classificados como metacêntrico e o cariótipo foi considerado simétrico. As análises estatísticas mostraram que as diferenças observadas nas médias dos comprimentos cromossômicos e no tamanho dos braços cromossômicos foram significativas entre as espécies e dentro de cada espécie. Não foi detectada a presença de pares cromossômicos heteromórficos.

#### 4.1.2. ABSTRACT

The objectives of the present study were to determine the karyotype of the *Vasconcellea cauliflora* and *Vasconcellea quercifolia* and to verify the possible occurrence of heteromorphic chromosomes. To do that, root tips from both species, were submitted to a saturated solution of paradichlorobenzene as a pre-treatment; then they were submitted to a fixative solution, enzymatic digestion (pectinase 20% and cellulase 2%), centrifuged and finally dyed with Giemsa 5%. The slides were prepared, observed under optic microscope, and the best slides were selected to do the measurements. The kariogram and the ideogram were done by using five metaphasic plates with dispersed and well condensed chromosomes. It was measured the absolute length of the chromosomes, the size of the long and short chromosome arms, and based on these data it was estimated the relation between short and long chromosome arm ( $r$ ), the centromeric index (CI), the length of the haploid lot (LHL) and the symmetry index (SI). The chromosomes were classified based on  $r$  and CI. It was observed eighteen chromosomes for both species. The length of the chromosomes of *V. cauliflora* varied from 2.73 to 1.57  $\mu\text{m}$ , and *V. quercifolia* varied from 2.17 to 1.47  $\mu\text{m}$ . The chromosomes from both species were classified as metacentric and the karyotype was considered symmetrical. The statistical analyses based on the average of the chromosomic lengths and on the size of the chromosome arms

showed that there are significative differences between species and within species. It was not observed heteromorphic chromosome.

#### 4.1.3. INTRODUÇÃO

O gênero *Vasconcellea* pertencente à família Caricaceae, é formado por 21 espécies cujos centros de origens se concentram nas regiões do Andes e Equador (Scheldman *et al.*, 2007). Dentro do gênero *Vasconcellea*, algumas espécies destacam-se por apresentarem características interessantes como em *V. cauliflora* e *V. quercifolia* que são dióicas. Estas espécies são arbóreas e se distribuem por todo continente americano, estando mais concentradas na América Latina (Badillo, 1993). Além disso, apresentam características importantes como tolerância a temperaturas baixas, e são fonte de resistência a algumas doenças, o que as torna objeto de estudos genéticos para posterior uso em programas de melhoramento da forma cultivada, o mamoeiro (*C. papaya*).

A literatura reporta que todas as caricáceas são diplóides com 18 cromossomos ( $2n=2x=18$ ) (Darlington e Ammal, 1945), sendo que ainda são poucos os trabalhos sobre a morfologia, o tamanho e o nível de semelhança dos cromossomos entre as espécies Caricaceae. Tais informações além de serem importantes para a caracterização de uma coleção de germoplasma são importantes quando se planeja hibridações dentro de um programa de melhoramento genético.

Uma forma de se conhecer morfologicamente cada cromossomo que compõe uma espécie é por meio da determinação do seu cariótipo. De acordo com Hartl e Jones (1998), o cariótipo de um indivíduo ou de um organismo é representado pelo conjunto cromossômico metafásico, que é organizado de acordo com seu comprimento e a posição do centrômero. O cariótipo é representado pelo cariograma e ideograma, onde é definido o número de cromossomos da espécie, e determinado os tipos de cromossomos que compõem o genoma. Com a análise do cariótipo da espécie também é possível verificar a ocorrência de pares cromossomos que estejam relacionados com a determinação sexual. Em algumas espécies a determinação sexual é devido a presença de

pares cromossômicos homomórficos ou heteromórficos, sendo que em espécies dióicas dificilmente são encontrados pares cromossômicos morfologicamente distintos, ou seja, heteromórficos (Parker, 1994). No entanto, o sexo pode ser determinado por genes presentes em cromossomos autossômicos.

Em caricáceas a questão sobre a determinação sexual é bastante discutida. Alguns trabalhos com mamoeiro sugerem que o sexo é determinado por genes presentes em cromossomos autossômicos (Liu *et al.*, 2004).

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro desenvolve um programa de melhoramento genético para o mamoeiro e para tal tem uma coleção de germoplasma que apresenta acessos da forma cultivada e das silvestres. Dando continuidade às pesquisas citológicas de espécies Caricaceae, este trabalho teve por objetivo determinar o cariótipo das espécies *Vasconcellea cauliflora* e *Vasconcellea quercifolia*.

#### 4.1.4 MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.1.4.1. Obtenção de pontas de raízes

O tecido somático utilizado na pesquisa foram pontas de raízes obtidas de quatro plantas da espécie *V. cauliflora* e quatro de *V. quercifolia* obtidas via estaquia e mantidas em casa de vegetação na coleção de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), localizada em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

##### 4.1.4.2. Pré-tratamento

Pontas de raízes medindo aproximadamente 2 cm de comprimento, foram coletadas e pré-tratadas em solução antimitótica de paradichlorobenzeno durante 8h à temperatura de 4°C. Após o pré-tratamento as pontas foram enxaguadas em água destilada e fixadas em 3:1 (etanol: ácido acético) durante 24 h e mantidas em *freezer* até o momento do preparo das lâminas.

##### 4.1.4.3. Obtenção das placas metafásicas

Para a preparação das lâminas e obtenção das metáfases mitóticas, as pontas foram separadas por espessura e transferidas para tubos *ependorf* de 1ml e submetidas à digestão enzimática (pectinase 20% e celulase 2%) à temperatura de 37°C, por 1h e 15 min. Ao final da digestão o material foi transferido para tubos de 1ml contendo água destilada e em seguida centrifugado durante 10 min a 5000 rpm para a suspensão dos núcleos. Após este procedimento os núcleos foram resuspendidos em solução de 4:1 (metanol:ácido acético) e novamente centrifugados, duas vezes, e conservados em *freezer* até o momento da preparação das lâminas.

A montagem das lâminas foi feita em câmara úmida onde foi utilizado uma gota do material preparado e deixadas para secar à temperatura ambiente. Após a secagem, procedeu-se a coloração com solução de Giemsa 2% durante 15 min à temperatura de 37°C. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com lamínulas e levadas para observação em microscópio ótico Olympus BX 60 sob campo claro nas objetivas de imersão de 60X e 100X de aumento.

#### 4.1.4.4. Captura das imagens e análises dos cromossomos

As melhores imagens contendo cromossomos bem visualizados, condensados e bem espalhados, foram capturadas por meio de câmera digital (3.3 MPixel Qcolor3C) conectada ao microscópio ótico (Olympus BX 60, USA), utilizando-se o software de captura Image-Pro Plus versão 5.1 (Media Cybernetics, 2004). Cinco melhores células com cromossomos metafásicos foram mensurados utilizando-se o Software MicroMeasure versão 3.3 (Reeves e Tear, 2000). Foram mensurados o comprimento absoluto dos cromossomos ( $\mu\text{m}$ ), e o comprimento dos braços longo e curto.

Com base nos dados foi estimada a razão entre braços ( $r = \text{braço longo}/\text{braço curto}$ ), o comprimento do lote haplóide (CLH = soma do comprimento absoluto dos cromossomos metafásicos de cada espécie) e o índice centromérico (IC =  $[\text{comprimento do braço curto}/\text{comprimento total}] \times 100$ ).

Para avaliação da assimetria cariotípica foram utilizados o índice *Total Form* (TF) de acordo com Huziwara (1962) que corresponde:

$$TF = \frac{(\sum \text{comprimento dos braços curtos})}{CLH} \times 100$$

E o índice de assimetria (AI) proposto por Paszko (2006) onde:

$$AI = \frac{CV_C \times CV_{CI}}{100}$$

Os cromossomos foram classificados de acordo com Guerra (1986), o qual propôs quatro tipos cromossômicos: metacêntricos (M,  $r=1,00$  a  $1,49$ ;  $ic=40,1$  a  $50,0$ ), submetacêntricos (SM,  $r=1,50$  a  $2,99$ ,  $ic=25,1$  a  $40,0$ ), acrocêntricos (A,  $r=3,00$  a  $7$ ,  $ic=0,01$  a  $25,0$ ) e telocêntricos (T,  $r=\infty$ ,  $ic=0$ ). Para determinação dos cromossomos homólogos foram observados, a posição do centrômero, o tamanho absoluto e a relação de braços cromossômicos. Os cromossomos foram arranjados de acordo com a posição do centrômero, para montagem dos kariogramas e ideogramas, nos quais foram baseados em medições cromossômicas realizadas em cinco placas metafásicas de diferentes amostras.

#### 4.1.4.5 Análise Estatística dos dados

Para comparação das características cromossômicas de ambas as espécies, os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo cada metáfase considerada como repetição, seguindo o modelo hierárquico.

Na comparação das médias dos cromossomos das duas espécies, foi realizado o teste Tukey em nível de 5% de probabilidade; na comparação dos cromossomos dentro de cada espécie foi utilizado o Scott e Knott em nível de 5% de probabilidade com auxílio do programa estatístico GENES (Cruz, 2001). Foram estimadas as médias e os erros padrões do comprimento absoluto dos cromossomos (C), dos braços longos (BL), e braços curtos (BC), a razão dos braços longo/curto ( $r$ ) e o índice centromérico (IC).

#### 4.1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o protocolo utilizado foi possível observar que ambas as espécies apresentam 18 cromossomos (Figura 1), confirmando o que já é citado pela literatura para a família Caricaceae (Darlington e Ammal, 1945; Datta 1971, Eder e Silva, 2007; Damasceno Junior et al. 2009).

O comprimento dos cromossomos em *V. cauliflora* variou de 2,73 a 1,57 $\mu\text{m}$ , e em *V. quercifolia* variou de 2,17 a 1,47 $\mu\text{m}$ . Em ambas as espécies pode-se observar que os cromossomos são pequenos (Tabela 1). No entanto, a espécie *V. quercifolia* apresentou cromossomos menores do que *V. cauliflora*. O reduzido tamanho dos cromossomos já foi observado em *C. papaya* e em outras caricáceas. Damasceno Junior *et al.* (2009), ao determinarem o cariótipo do mamoeiro, observaram que o tamanho dos cromossomos variaram de 2,29 a 1,52  $\mu\text{m}$  e que *V. monoica* e *V. cundinamarcensis* apresentam 2,49 a 1,35 $\mu\text{m}$ , e 2,45 a 1,66 $\mu\text{m}$ , respectivamente. Schubert (2007) relata que em 856 angiospermas estudadas o tamanho do cromossomo metafásico variou de 0,6  $\mu\text{m}$  a um pouco mais de 14,6  $\mu\text{m}$  e o comprimento do lote haplóide variou de 14,6  $\mu\text{m}$  a 250  $\mu\text{m}$ ; assim pode-se concluir que o tamanho dos cromossomos das vasconcellas estudadas pode ser considerado pequeno.

O comprimento do lote haplóide (CLH) foi de 18,94  $\mu\text{m}$  para *V. cauliflora* e 16,18  $\mu\text{m}$  para *V. quercifolia*. Esses dados permitem inferir que a espécie *V. quercifolia* apresenta um genoma menor em relação a *V. cauliflora*. Damasceno Junior *et al.* (2009) observaram que o CLH de *V. monoica* foi de 17,11 $\mu\text{m}$ , de *V. cundinamarcensis* foi de 18,69 $\mu\text{m}$  e *C. papaya* de 17,18  $\mu\text{m}$  e concluíram que a espécie cultivada apresenta um dos menores genomas dentre as caricáceas por eles estudadas, entretanto, pode-se observar que *V. quercifolia* apresenta o CLH menor ainda que a forma cultivada.

De acordo com a classificação de Guerra (1986), ambas as espécies apresentam cromossomos do tipo metacêntrico conforme pode ser observado pelo ideograma (Figura 2); esse tipo cromossômico prevaleceu em outras espécies da família como em *V. goudotiana* (Silva, 2009), *V. monoica* e *V. cundinamarcensis* (Damasceno Junior *et al.*, 2009). Talvez essa característica seja comum para as vasconcellas, já que outras caricáceas como *J. spinosa*, apresentam cromossomos do tipo metacêntrico e tipo submetacêntrico (Eder-Silva, 2007).

O índice de assimetria (TF) estimado para *V. cauliflora* e *V. quercifolia* de acordo com Huziwara (1962) foi de 46% (Tabela 2). Segundo o autor, esse índice pode variar de zero a 50%, sendo que os cariótipos mais próximos ao último valor podem ser considerados extremamente simétricos.

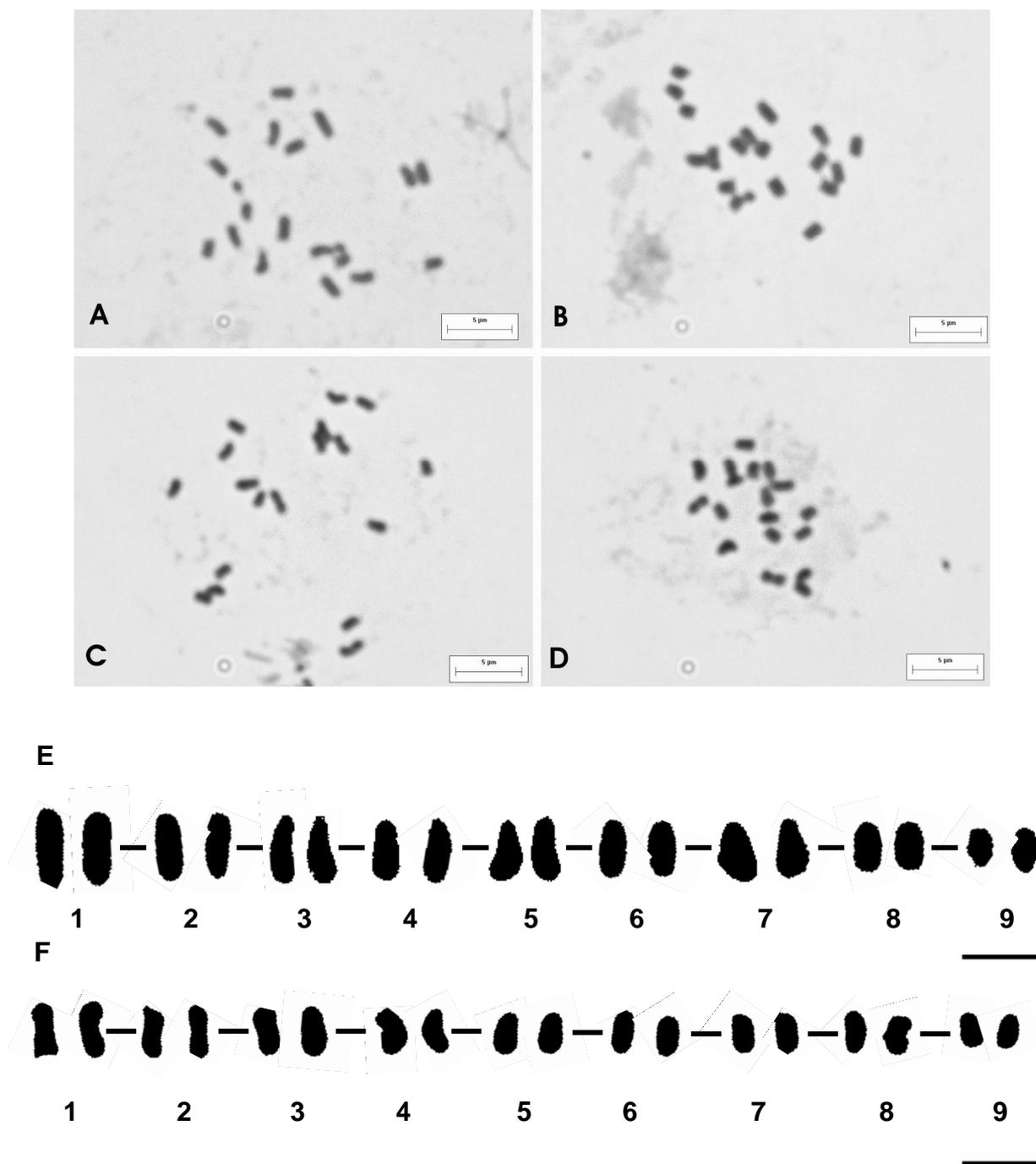


Figura 1- Metáfases mitóticas (A a D) e cariogramas (E e F) de duas espécies da família Caricaceae apresentando  $2n=18$  cromossomos. A e B) Cromossomos de *V. cauliflora*; C e D) Cromossomos de *V. quercifolia*; E) Cariograma de *V. cauliflora*; F) Cariograma de *V. quercifolia*. Barra = 5µm.

Tabela 1 – Comprimento ( $\mu\text{m}$ ) médio e erro padrão dos braços longos (BL), curtos (BC) e dos cromossomos (C), razão entre os braços longo/curto (r), índice centromérico (IC) e tipo cromossômico.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	CLH
<i>V. cauliflora</i>	BL	1.49 $\pm$ 0.28	1.31 $\pm$ 0.09	1.21 $\pm$ 0.07	1.14 $\pm$ 0.04	1.13 $\pm$ 0.05	1.09 $\pm$ 0.06	0.99 $\pm$ 0.04	0.93 $\pm$ 0.03	0.87 $\pm$ 0.03	
	BC	1.24 $\pm$ 0.27	1.07 $\pm$ 0.04	1.05 $\pm$ 0.03	1.02 $\pm$ 0.03	0.96 $\pm$ 0.03	0.93 $\pm$ 0.03	0.90 $\pm$ 0.04	0.84 $\pm$ 0.03	0.70 $\pm$ 0.02	
	C	2.73 $\pm$ 0.45	2.39 $\pm$ 0.11	2.26 $\pm$ 0.09	2.20 $\pm$ 0.08	2.09 $\pm$ 0.08	2.02 $\pm$ 0.08	1.90 $\pm$ 0.08	1.78 $\pm$ 0.06	1.57 $\pm$ 0.04	18.94
	r	1.25	1.23	1.14	1.13	1.16	1.17	1.10	1.12	1.24	
	IC	0.45	0.45	0.46	0.46	0.46	0.46	0.47	0.47	0.44	
	TC	M	M	M	M	M	M	M	M	M	
	<i>V. quercifolia</i>	BL	1.16 $\pm$ 0.04	1.12 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.02	0.98 $\pm$ 0.01	0.93 $\pm$ 0.01	0.92 $\pm$ 0.02	0.91 $\pm$ 0.02	0.85 $\pm$ 0.02	0.79 $\pm$ 0.02
BC		1.01 $\pm$ 0.02	0.88 $\pm$ 0.01	0.89 $\pm$ 0.01	0.85 $\pm$ 0.02	0.85 $\pm$ 0.01	0.81 $\pm$ 0.01	0.75 $\pm$ 0.02	0.75 $\pm$ 0.02	0.65 $\pm$ 0.02	
C		2.17 $\pm$ 0.05	2.01 $\pm$ 0.01	1.90 $\pm$ 0.03	1.84 $\pm$ 0.03	1.78 $\pm$ 0.03	1.74 $\pm$ 0.02	1.67 $\pm$ 0.04	1.60 $\pm$ 0.03	1.47 $\pm$ 0.03	16.18
r		1.15	1.27	1.12	1.16	1.08	1.13	1.23	1.15	1.16	
IC		0.46	0.44	0.47	0.46	0.47	0.46	0.45	0.46	0.46	
TC		M	M	M	M	M	M	M	M	M	

M = cromossomo do tipo metacêntrico  
 CLH = Comprimento do Lote Haplóide

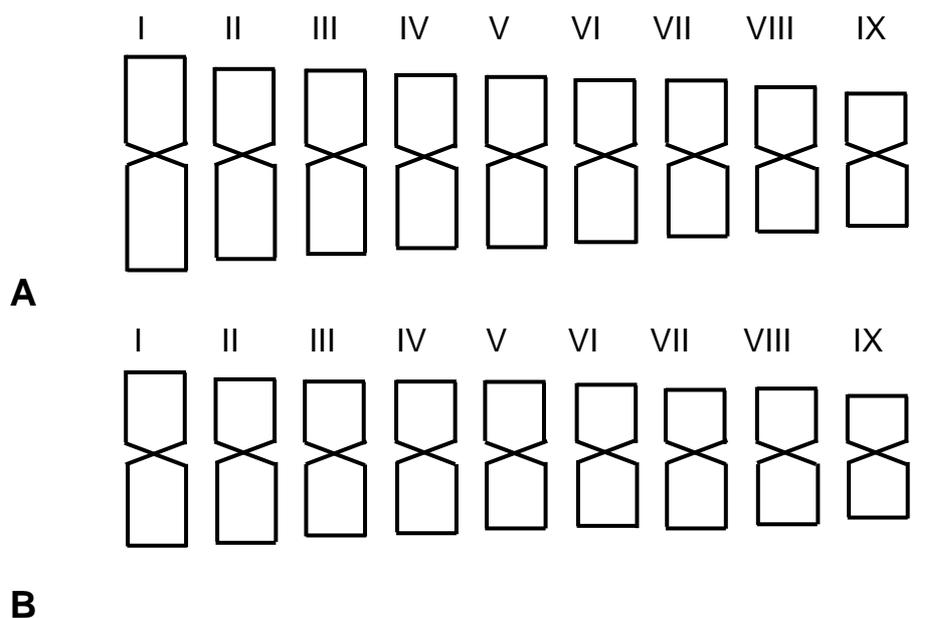


Figura 2- Ideograma das duas espécies da família Caricaceae. A) Ideograma de *V. cauliflora*; B) Ideograma de *V. quercifolia*. Barra = 1 $\mu$ m.

O índice de assimetria (AI) calculado conforme Paszko (2006) foi de 2,91 para *V. cauliflora* e para *V. quercifolia* foi de 1,20, indicando que ambas as espécies apresentam cariótipos simétricos, porém o cariótipo de *V. cauliflora* é mais assimétrico do que o de *V. quercifolia*, pois segundo o autor altos valores de AI, ou seja, acima de 50, indicam alta heterogeneidade do comprimento cromossômico e/ou do índice centromérico, caracterizando cariótipos assimétricos, e valores menores indicam grande simetria cariotípica.

De acordo com Stebbins (1971) citado por Paszko (2006), a assimetria cariotípica é determinada pela variação do comprimento cromossômico e da posição do centrômero. Porém, alguns métodos utilizam apenas a variação da posição do centrômero no complemento cromossômico para determinar a assimetria cariotípica, não sendo capaz de detectar possíveis diferenças mínimas. No entanto, uma variação relativa da posição do centrômero em cada cromossomo pode ser identificada com base no coeficiente de variação do índice centromérico, ou seja, aumenta a precisão dos resultados em comparação com outros métodos existentes. Isso justifica as diferenças observadas entre os métodos TF (Huziwara, 1962) e AI (Paszko, 2006), onde de acordo com o índice TF ambas as espécies não apresentaram diferenças quanto à simetria e conforme o índice AI, o cariótipo de *V. cauliflora* é menos simétrico do que o de *V.*

*quercifolia*, ou seja, provavelmente a espécie *V. cauliflora* durante sua evolução sofreu mais variações cromossômicas do que *V. quercifolia*. Acredita-se que espécies que apresentam cariótipo assimétrico sejam evolutivamente mais avançadas (Coelho e Battistin, 1996; Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas, 1998), ou seja, o índice de assimetria indica alterações intracromossômicas no decorrer da evolução, ocasionadas por mutações naturais ou artificiais (Maffei *et al.*, 1996). Segundo Mayeda (1997), os cariótipos simétricos são considerados mais primitivos e originaram os assimétricos.

Tabela 2 – Estimativas do desvio padrão do comprimento cromossômico ( $SD_c$ ), desvio padrão do índice centromérico ( $SD_{ic}$ ), coeficiente de variação do comprimento cromossômico ( $CV_C$ ), coeficiente de variação do índice centromérico ( $CV_{IC}$ ), Índice de Assimetria (AI) e Total Form (TF) para as duas espécies estudadas.

Espécies	$SD_c$	$SD_{ic}$	$CV_C$	$CV_{IC}$	AI	TF
<i>V. cauliflora</i>	0,14	0,02	6,7	43,47	2,91a	46%
<i>V. quercifolia</i>	0,1	0,1	5,55	21,73	1,2 b	46%

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade.

A determinação sexual em plantas pode ser devido à presença de cromossomos sexuais (homomórficos ou heteromórficos) ou genes presentes nos cromossomos autossômicos.

Neste trabalho não foi detectada a presença de cromossomos heteromórficos sexuais em nenhuma das espécies. Costa *et al.* (2008) aplicando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente FISH em *C. papaya* e *V. goudotiana* também não observaram a presença de pares cromossômicos heteromórficos sexuais, o mesmo não sendo constatado por Datta (1971) e Damasceno Junior *et al.* (2009), onde não detectou-se a presença de pares cromossomos heteromórficos em mamoeiro.

Liu *et al.* (2004) através de estudos moleculares do genoma de *C. papaya*, concluíram que a espécie apresenta uma pequena região genômica identificada como sendo o cromossomo Y. Foi observado que essa região não recombina com o cromossomo X, evidenciando que os cromossomos sexuais do mamoeiro, são originados de um par regular de cromossomos autossômicos.

Cromossomos sexuais heteromórficos são raramente encontrados em angiospermas; porém, há relatos de cromossomos sexuais heteromórficos em espécies como *Rumex*, *Cannabis*, *Humulus* e *Silene* (Parker, 1994). Em espécies dióicas o melhor exemplo descrito pela literatura é o do Capim Branco (*Silene latifolia*), onde foi identificado um par heteromórfico (Vyskot e Hobza, 2004). No entanto, segundo a literatura há espécies cuja determinação sexual é devida à presença de cromossomos homomórficos como é o caso da tamareira, do kiwi e do aspargo, ou seja, possuem cromossomos sexuais que não são distinguidos morfológicamente (Charlesworth e Gilmartin, 1998).

Como em outros trabalhos realizados na família Caricaceae, não foi identificada a presença de constrições secundárias que estão ligadas às regiões organizadoras de nucléolos (RON's). A RON é uma seqüência de DNA que apresenta cópias múltiplas (de 500 a 1.000 cópias) dos dois maiores fragmentos 18S e 28S de rRNA (Sybenga, 1992; Fukui e Nakayama, 1996; Caixeiro, 1999) e pode se situar na região terminal ou intersticial do cromossomo e nesta última posição dá origem ao satélite (Schubert, 2007). A não observação de tais regiões neste estudo pode estar relacionada com o antimitótico utilizado (paradiclorobenezeno), que não promoveu o tipo de condensação cromossômica capaz de possibilitar uma maior distinção dos segmentos cromossômicos, além da coloração que no caso das RON's é necessário que sejam aplicadas técnicas de coloração específicas como o nitrato de prata (Guerra e Souza, 2002).

As análises estatísticas realizadas mostraram diferenças quanto às características cromossômicas entre as espécies e dentro de cada espécie. As comparações entre as médias dentro de cada espécie revelaram que os cromossomos de *V. cauliflora*, de acordo com o teste de Scott e Knott a 5% de significância (Tabela 3), diferiram no comprimento cromossômico que variou de 2,73 $\mu$ m a 1,57 $\mu$ m, no comprimento dos braços longos que variou de 1,49 $\mu$ m a 0,87 $\mu$ m e curtos que variou de 1,24 $\mu$ m a 1,10 $\mu$ m. Para a razão entre braços e o índice centromérico, as médias não diferiram significativamente. Tais resultados permitem inferir que apesar dos cromossomos serem bastante pequenos e morfológicamente similares, para algumas características anteriormente mencionadas, estes apresentam diferenças significativas.

O teste Scott e Knott utilizado na comparação das médias cromossômicas de *V. quercifolia* (Tabela 4), revelou que os cromossomos da espécie também

apresentam diferenças estatísticas significativas para as características: comprimento cromossômico, comprimento do braço longo e do braço curto. Sendo que o comprimento cromossômico variou de 2,17 $\mu$ m a 1,47 $\mu$ m, ou seja, apresentaram comprimentos bem menores do que a espécie *V. cauliflora*. O tamanho dos braços longos e curtos variou de 1,16  $\mu$ m a 0,79 $\mu$ m e 1,01 $\mu$ m a 0,65 $\mu$ m, respectivamente. O teste também revelou que assim como em *V. cauliflora*, na espécie *V. quercifolia* as características de razão entre braços e índice centromérico não houve diferença significativa.

Na comparação das médias entre os cromossomos das duas espécies, o teste Tukey em nível de 5% de significância mostrou que as diferenças observadas foram significativas. O comprimento cromossômico médio em *V. cauliflora* foi de 2,11 $\mu$ m, enquanto que em *V. quercifolia* foi de 1,80  $\mu$ m, o tamanho do braço longo em *V. cauliflora* foi de 1.13 $\mu$ m e 0,96  $\mu$ m em *V. quercifolia*, e do braço curto, 0,97 $\mu$ m e 0,83  $\mu$ m em *V. cauliflora* e *V. quercifolia* respectivamente, e o CLH em *V. cauliflora* foi de 18,94 $\mu$ m e em *V. quercifolia* foi de 16,18 $\mu$ m, sendo esta diferença significativa em nível de 5% de significância (Tabela 5). Para as características de razão entre braços e o índice centromérico as diferenças observadas não foram significativas, o que era esperado, já que ambas as espécies apresentam cromossomos metacêntricos.

Tabela 3. Teste de média aplicado ao comprimento dos cromossomos (C), comprimento do braço longo (BL) e do curto (BC), razão entre braços (R) e índice centromérico em *V. cauliflora*.

Cromossomos	C ( $\mu$ m)	BL( $\mu$ m)	BC( $\mu$ m)	r	IC
1	2,73 a	1,49 a	1,24 a	1,25 a	0,47 a
2	2,39 b	1,31 b	1,07 b	1,24 a	0,47 a
3	2,26 c	1,21 b	1,05 b	1,23 a	0,46 a
4	2,21 c	1,14 c	1,02 b	1,17 a	0,46 a
5	2,09 d	1,13 c	0,96 c	1,16 a	0,46 a
6	2,02 d	1,09 c	0,93 c	1,14 a	0,46 a
7	1,91 e	0,99 d	0,90 c	1,13 a	0,45 a
8	1,78 f	0,93 d	0,84 c	1,12 a	0,45 a
9	1,57 g	0,87 d	0,70 d	1,10 a	0,44 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Scott e Knott em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 4. Teste de média aplicado ao comprimento dos cromossomos (C), comprimento do braço longo (BL) e do curto (BC), razão entre braços (R) e índice centromérico em *V. quercifolia*.

Cromossomos	C ( $\mu\text{m}$ )	BL( $\mu\text{m}$ )	BC( $\mu\text{m}$ )	r	IC
1	2,17 a	1,16 a	1,01 a	1,27 a	0,47 a
2	2,01 b	1,12 a	0,89 b	1,23 a	0,47 a
3	1,90 c	1,01 b	0,88 b	1,16 a	0,46 a
4	1,84 c	0,98 b	0,85 b	1,16 a	0,46 a
5	1,78 d	0,93 c	0,85 b	1,15 a	0,46 a
6	1,74 d	0,92 c	0,81 b	1,15 a	0,46 a
7	1,67 d	0,91 c	0,75 c	1,13 a	0,46 a
8	1,60 e	0,85 d	0,75 c	1,12 a	0,45 a
9	1,47 f	0,79 d	0,65 d	1,08 a	0,44 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Scott e Knott em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 5. Médias do comprimento dos cromossomos (C), dos braços longos (BL) e curtos (BC), da proporção dos braços longo/ curto (r), e do índice centromérico (IC), comprimento do lote haplóide (CLH) das espécies *V. cauliflora* e *V. quercifolia*.

	C ( $\mu\text{m}$ )	BL ( $\mu\text{m}$ )	BC ( $\mu\text{m}$ )	r	IC	CLH ( $\mu\text{m}$ )
<i>V. cauliflora</i>	2.11 a	1.13 a	0.97 a	1.17 a	0.46 a	18.94 a
<i>V. quercifolia</i>	1.8 b	0.96 b	0.83 b	1.16 a	0.46 a	16.18 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade.

#### 4.1.6. CONCLUSÃO

Baseado nas observações pode-se concluir que ambas as espécies apresentam 18 cromossomos todos do tipo metacêntrico e de tamanho pequeno.

Os cariótipos das espécies são considerados do tipo simétrico, sendo que a espécie *V. cauliflora* apresenta um cariótipo mais assimétrico do que a espécie *V. quercifolia*.

Com base nas análises estatísticas pode-se concluir que a espécie *V. quercifolia* apresenta cromossomos significativamente menores do que a espécie *V. cauliflora*.

Através da metodologia de cariotipagem convencional não se observou pares cromossômicos heteromórficos em ambas as espécies, o que leva a inferir que a determinação sexual em tais espécies pode não ser devida a presença de cromossomos sexuais heteromórficos.

#### 4.1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Badillo, V. M. (1993) Caricaceae - Segundo Esquema. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Univ. Central de Venezuela*. Maracay, 64p.

Caixeiro, A.P.A. (1999) *Caracterização citogenética da heterocromatina constitutiva e sua implicação na evolução do cariótipo de espécies do gênero Plebeia* (Hymenoptera: Apinae: Meliponini). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)-Viçosa- M.G, Universidade Federal de Viçosa - UFV, 68p.

Charlesworth, D. & Gilmarin, P. (1998). Lily or billy - Y the difference. *Trends in Genetics*. 14: 261-262.

Costa, F. R.; Pereira, T. N. S.; Hodnett, G. L.; Anderson, J. C.; Pereira, M. G., and Stelly, D. M. (2008) Fluorescent in situ hybridization of 18S and 5S rDNA in papaya (*Carica papaya* L.) and wild relatives. *Caryologia*.61:411- 416

Cruz, C. D. (2001) Programa GENES, *Aplicativo Computacional em Genética e Estatística* – Viçosa- MG, Universidade Federal de Viçosa. 648p.

Damasceno Junior, P. C., Costa, F. R., Pereira, T. N. S., Freitas Neto, M., Pereira, M. G. (2009) Karyotype determination in three Caricaceae species emphasizing the cultivated form (*Carica papaya* L.). *Caryologia* , 62:10-15.

Darlington C. D.; Ammal E. K. J. (1945) Chromosome atlas of cultivated plants. George Allen and Unwin LTD., London.

Datta P. C. (1971) Chromosomal biotypes of *Carica papaya* L. *Cytologia* 36:555-562.

Eder e Silva, E.; Felix, L.P.; Bruno, R. (2007) Citogenética de algumas espécies frutíferas nativas do nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 29: 110-114.

Fukui, K., Nakayama, S. (1996) Plant chromosomes: laboratory methods. *CRC Press*, U.S.A., 274p

Guerra, M.; Souza, M. J. (2002) *Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana*. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC. 131p.

Guerra, M. (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética*, 4:741-743.

Hartl, D.L.; Jones, E. W. (1998) *Genetics: Principles and analyses*. 4<sup>th</sup> edition., Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts, 842p.

Huziwara, Y. (1962) Karyotype analysis in some genera of compositae. VIII. Further studies on the chromosome of *Aster*. *American Journal of Botany*. 49: 116-119.

Liu, Z.; Moore, P. H.; Ma, H.; Ackerman, C. M.; Ragiba, M.; Yu, Q.; Pearl, H. M.; Kim, M. S.; Charlton, J. W.; Stiles, J. I.; Zee, F. T.; Paterson, A. H.; Ming, R. (2004) A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature*, 427:22-26.

Media Cybernetics (2004). *Image-Pro-plus, version 5.1 for Windows*. Media Cybernetics Inc, Maryland, USA.

Parker, M. A. (1994) Pathogens and sex in plants. *Evolutionary Ecology*. 8:560-584p.

Paszko, B. (2006) A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Plant Systematics and Evolution*. 258:39-48p.

Reeves, A.; Tear, J. (2000) *Micromesure. Version 3.3*. Free Program distributed by the authors over the internet from Department of Biology at Colorado State University.

Scheldeman, X.; Willemen, L.; Coppens d'Eeckenbrugge, G.; Romejin-Peeters, E.; Restrepo, M. T.; Romero Motoche, J.; Jiménez, D; Lobo, M.; Medina, C. I.; Reyes, C.; Rodríguez, D.; Ocampo, J. A.; Van Damme, P.; Goetgebeur, P. (2007) Distribution, diversity and environmental adaptation of highland papayas (*Vasconcellea* spp.) in tropical and subtropical America. *Biodivers Conserv*, 16:1867-1884p

Schubert, I. (2007) Chromosome evolution. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 109-115.

Silva, E. N. (2009) *Caracterização Botânica e Citológica da Espécie Silvestre Vasconcellea goudotiana (Caricaceae)*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)- Campos dos Goytacazes – RJ- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro –UENF , 36p.

Sybenga, J. (1992) Some sources of error in the determination of chromosome length. *Chromosoma*, 10: 355-364.

Vyskot, B.; Hobza, R. (2004) Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog. *Trends in Genetics* 20: 432.

## 4.2. COMPORTAMENTO MEIÓTICO DAS ESPÉCIES *Jacaratia spinosa* e *Vasconcellea quercifolia*

### 4.2.1. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar o comportamento meiótico das espécies *J. spinosa* e *V. quercifolia*, bem como estimar o índice de recombinação, índice meiótico e a viabilidade polínica destas espécies. Para tal foram utilizados botões florais em diferentes fases de desenvolvimento, que foram fixados em Carnoy (3:1), armazenados em *freezer* e no momento do preparo das lâminas quatro anteras/por botão/lâmina foram maceradas em carmim acético 1%. Para a determinação da viabilidade polínica, os botões florais antes da antese foram coletados em etanol 70%, armazenados em *freezer* e posteriormente quatro anteras de cada botão foram submetidas à coloração com solução Tripla de Alexander. Dez lâminas foram avaliadas tanto para o índice meiótico quanto para a viabilidade polínica, onde foram contados 500 produtos pós-meióticos e grãos de pólen, respectivamente. A partir da observação das fases meióticas confirmou-se que as duas espécies são diplóides com  $2n=2x=18$  cromossomos, e apresentaram pareamento regular dos cromossomos através da observação de nove bivalentes. Foram observadas algumas irregularidades meióticas, sendo que a espécie *V. quercifolia* apresentou maior número de anormalidades, dentre as quais, a presença de cromossomos retardatários. O índice de recombinação calculado para espécie *J. spinosa* foi de 23,6 sendo considerado baixo. O índice

meiótico e a viabilidade polínica estimada para *J. spinosa* foi 96 e 97% e para *V. quercifolia* foi de 94 e 96%, respectivamente. Esses dados sugerem que apesar de terem sido encontradas algumas irregularidades meióticas a viabilidade polínica das espécies não foi afetada, sugerindo que ambas podem ser consideradas meioticamente estáveis.

#### 4.2.2.ABSTRACT

The objective of this research was to study the meiotic behavior of the species *J. spinosa* and *V. quercifolia*, to verify the possible occurrence of abnormalities, as well as to estimate the meiotic index and the pollen grain viability. To do that flower buds were collected and fixed in different development phases. For the meiotic analysis and the estimation of the meiotic index, the flower buds were fixed in Carnoy fixative solution (3:1), stored in freezer and at the moment of slide preparation, four anthers of each button were squashed in acetic carmin 1%. For pollen grain viability determination, the flower buds at anthesis were collected in ethanol 70%, stored in freezer and at slides preparation four anthers of each button were squashed at drops of Alexander's triple solution. To the meiotic index and the pollen grain viability were prepared ten slides and were counted 500 post meiotic products and pollen grains respectively. The observation of the meiosis confirmed that the two species are diploid with  $2n=2x=18$  chromosomes and they presented normal chromosome pairing since nine bivalents were observed. Some meiotic irregularities were observed and *V. quercifolia* presented larger number of cells containing abnormalities such as lack of synchronism and lag chromosomes. The meiotic index and the polinic viability for *J. spinosa* were 96 and 97% and for *V. quercifolia* it was of 94 and 96% respectively. Those data suggest that in spite of some meiotic irregularities have been found the pollen grain viability was not affected, and the meiotic index values suggested that both species can be considered meiotically stable.

### 4.2.3. INTRODUÇÃO

A família Caricaceae possui seis gêneros (Badillo, 2000), os quais apresentam espécies de interesse para o melhoramento do mamoeiro (*Carica papaya* L.) As espécies *Jacaratia spinosa* e *Vasconcellea quercifolia* são pertencentes aos gêneros *Jacaratia* e *Vasconcellea*, respectivamente.

*Jacaratia spinosa* também conhecida como mamão bravo ou mamão do mato (Badillo, 1993), é uma espécie dióica cuja distribuição vai do Norte da Argentina até a Nicarágua (Badillo, 1971). No Brasil, sua ocorrência vai do Sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, sendo mais comum nos estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul (Lorenzi, 2002). Produz frutos comestíveis e apresenta um potencial para cultivo já que seus frutos apresentam casca lisa e polpa firme (Badillo, 1993), além de ser resistente ao vírus do mosaico (PRSV) (Piratelli *et al.*, 1998). Estudos citogenéticos em *J. spinosa* são bastante escassos, e algumas importantes informações como o comportamento meiótico e a viabilidade polínica da espécie ainda não têm sido encontradas. Isso pode ser justificado pelo pequeno tamanho dos cromossomos da espécie que dificulta o estudo meiótico da mesma.

*Vasconcellea quercifolia* conhecida popularmente como mamãozinho ou mamão do monte, ocorre comumente em locais úmidos e regiões de temperatura baixa (Badillo, 1993). O centro de diversidade da espécie é o Sul do continente Americano. No Brasil pode ser encontrada na Bahia, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina (Scheldeman *et al.* 2007). A espécie é dióica, e apresenta frutos ovóides pequenos que são comestíveis. Poucos são os relatos na literatura sobre a espécie. Segundo Magdalita *et al.*(1988), a espécie *V. quercifolia* é resistente ao vírus do mosaico, daí se faz necessário que sejam desenvolvidas pesquisas sobre a espécie para que possa ser utilizada por programas de melhoramento genético.

A meiose é considerada o mais importante evento entre os processos de diferenciação dos organismos, sendo responsável pelo sucesso evolutivo na reprodução sexuada de eucariotos. Na meiose são produzidas células haplóides que permitem que, após a fecundação, o número de cromossomos permaneça igual ao dos genitores. É durante a meiose que ocorre a recombinação de genes, evento de grande importância na evolução das espécies (Guerra, 1988).

A meiose é um evento bastante complexo que está sob controle de vários genes. Dentre os principais eventos pode ser destacado o pareamento cromossômico, que gera informações sobre o nível de ploidia da espécie, número de quiasmas, além de também ser possível detectar possíveis anormalidades, como segregação precoce ou retardatária dos cromossomos, e a formação dos produtos haplóides (Roeder, 1997).

Segundo Bajpai e Singh (2006), o entendimento da estrutura e comportamento cromossômico durante a meiose é um passo essencial rumo ao desenvolvimento de variedades superiores em programas de melhoramento.

O objetivo do presente trabalho foi estudar o comportamento meiótico das espécies *J. spinosa* e *V. quercifolia*, verificando a possível ocorrência de anormalidades, bem como estimar o índice meiótico e a viabilidade polínica destas espécies.

#### 4.2.4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.2.5.1. Obtenção do material vegetal

Foram utilizados botões florais coletados de cinco plantas da espécie *J. spinosa* e de quatro plantas da espécie *V. quercifolia* da coleção de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), localizada no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. As pesquisas citogenéticas foram realizadas pelo laboratório de Melhoramento genético Vegetal (LMGV) da UENF.

##### 4.2.5.2. Análise Meiótica

Foram coletados botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento e fixados em solução de álcool etílico absoluto e ácido acético glacial na proporção de 3:1 e conservados em *freezer* conforme Damasceno Junior (2008). Após 24h a solução fixadora foi substituída por etanol 70% e armazenada em geladeira até o momento do preparo das lâminas. No preparo das lâminas quatro anteras de cada botão foram maceradas (*squash*) em uma gota de carmim

acético 1%, em seguida, foram retirados os debrís e o excesso de corante e o macerado foi coberto com lamínula. As lâminas foram observadas em microscópio ótico (Olympus BX 60, USA). Foram analisadas as diferentes fases meióticas, e especial atenção foi dada a observação de possíveis irregularidades na divisão celular. As imagens foram capturadas utilizando software Image Pro-Plus versão 5.1 (Media Cybernetics, 2004).

Foi estimado o índice de recombinação (IR) conforme Darlington (1958):

$$IR = ([\sum n^{\circ} \text{total de qiasmas} \div n^{\circ} \text{de células analisadas}] + \text{valor de } n) \times 100.$$

Sendo  $n$  o número haplóide. Para o cálculo do IR, foi contada a ocorrência de qiasmas do tipo anel (ring) e do tipo bastão (rod) na diacinese. Foram feitas cinco lâminas onde foram contabilizadas dez células por lâmina, resultando em um total de 50 células analisadas.

#### 4.2.5.3. Estimativa do índice meiótico

A estimativa do índice meiótico foi feita de acordo com Love (1951) que corresponde:

$$IM = \frac{(\text{número total de tétrades normais})}{(\text{número de tétrades anormais})} \times 100$$

Para a observação de tais produtos pós-meióticos foram coletados botões florais das duas espécies na antese. Os botões foram fixados em Carnoy 3:1 e posteriormente transferidos para etanol 70% e conservados em geladeira até o momento da utilização. Para cada espécie, foram utilizados 10 botões florais, e foram feitas uma lâmina por botão e em cada lâmina foram contados 500 produtos pós-meióticos. No preparo das lâminas quatro anteras de cada botão foram maceradas em carmim acético 1%, e posteriormente foram observadas em microscópio ótico (Olympus BX 60, USA). Na observação foi analisado o número de produtos pós-meióticos normais (tétrades) e o número de produtos pós-meióticos anormais (mônades, díades, tríades, políades). Foi realizado teste de média para os dados obtidos usando o teste “t” utilizando o programa GENES (Cruz, 2001). Foi considerada como repetição cada lâmina analisada sendo preparadas 10 lâminas.

#### 4.2.5.4. Viabilidade polínica

Para a análise da viabilidade polínica, botões florais na antese foram coletados em etanol 70%, e conservados em geladeira até o momento do preparo das lâminas. Posteriormente, quatro anteras foram maceradas em solução tripla (Alexander, 1969). As lâminas foram observadas em microscópio ótico (Olympus BX60, USA). A presença de grãos de pólen viáveis/férteis foi detectada pela cor vermelha ou púrpura, enquanto grãos de pólen inviáveis apresentaram coloração verde. Para cada espécie preparou-se 10 lâminas, cada uma representando um botão floral, onde contou-se 500 grãos de pólen/lâmina, entre viáveis e não viáveis totalizando 5000 grãos de pólen contados por espécie. Por último, calculou-se a porcentagem de grãos de pólen viáveis por espécie e aplicou-se o teste “t” para comparação de médias entre as viabilidades polínicas de *J. spinosa* e *V. quercifolia*, considerando a lâmina como repetição.

#### 4.2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas células meióticas analisadas foi possível confirmar que ambas são diplóides, ou seja,  $2n=2x=18$  cromossomos, já que foram observados nove pares cromossômicos nas células em diacinese (Figuras 1A, 1C), em metáfase I (Figuras 1D e 2A ). Em *J. spinosa* foi possível observar nas células em diacinese (Figura 1A), um par cromossômico associado ao nucléolo, indicando que este par deve conter a região onde se localizam os genes responsáveis pela formação do nucléolo. Essa região é conhecida como região organizadora de nucléolo (RON), que contém sítios de seqüências repetitivas de DNA 45s, sendo considerada como um marcador citológico podendo estar na porção terminal ou intersticial do cromossomo (Schubert, 2007). Tais regiões já foram observadas em outras caricáceas. Damasceno Junior (2008), trabalhando com *C. papaya* e *V. monoica*, concluiu que ambas as espécies apresentavam um par cromossômico associado ao nucléolo a partir da análise de células em diacinese.

Em *V. quercifolia* não foi possível inferir quantos pares cromossômicos são responsáveis pela formação do nucléolo, já que não se observou nenhuma célula

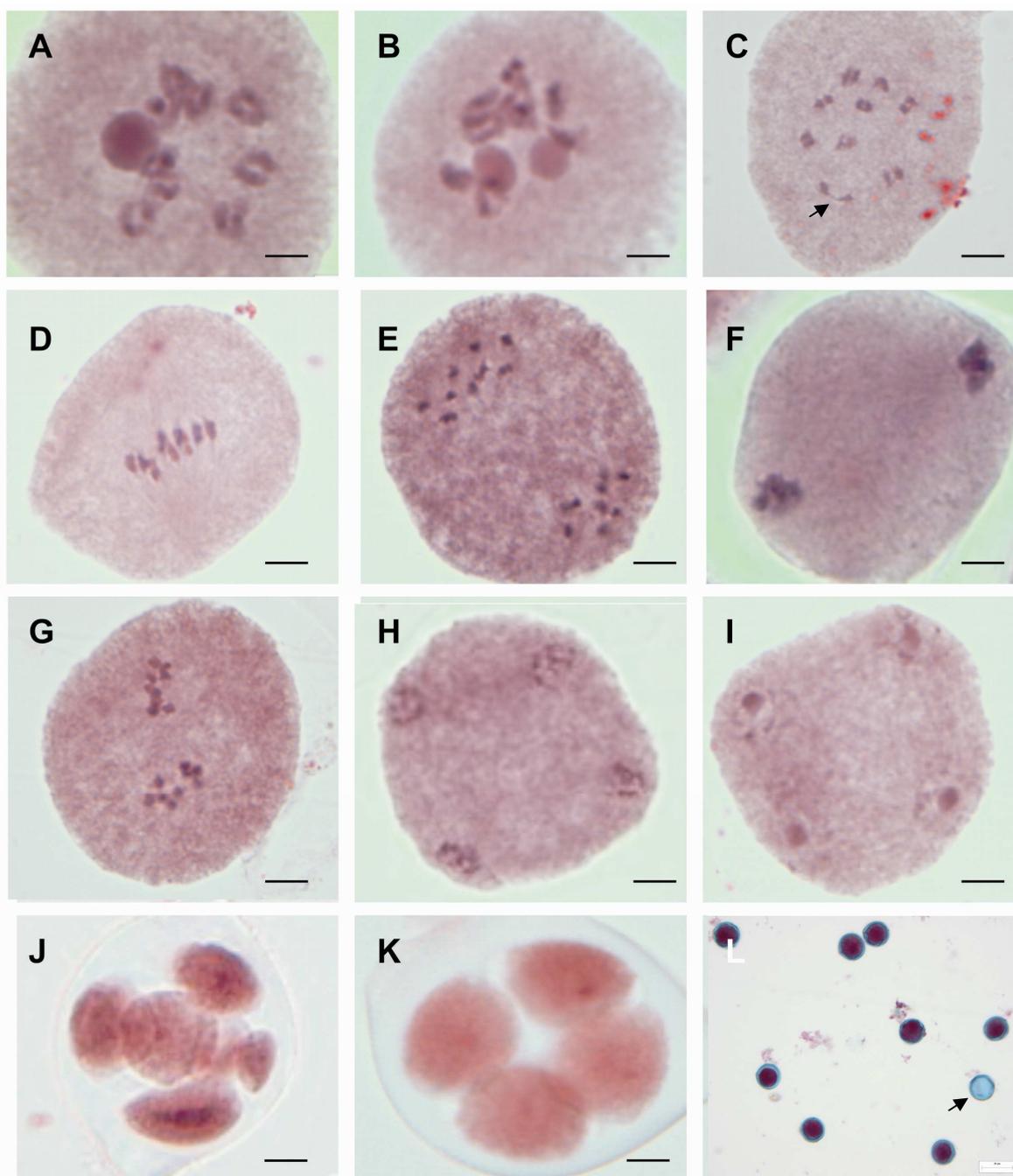


Figura 1- Meiose em *Jacaratiá spinosa*. 1A - Diacinese apresentando 9 pares cromossômicos, com pareamento do tipo anel; 1B - Diacinese apresentando dois nucléolos; 1C - Final de diacinese evidenciando um par de cromossomos com quiasma terminal (seta); 1D - Metáfase I evidenciando pareamento regular dos cromossomos; 1E - Final de Anáfase I apresentando nove cromossomos em cada pólo da célula; 1F - Telófase I; 1G - Falta de sincronia na célula apresentando cromossomos no pólo superior em metáfase II e no pólo inferior em anáfase II; 1H - Início de telófase II; 1I - telófase II normal antecedendo a citocinese; 1J - Políade; 1K - Tétrade; 1L - Grãos de pólen viáveis e inviável (seta) Barra = 5µm.

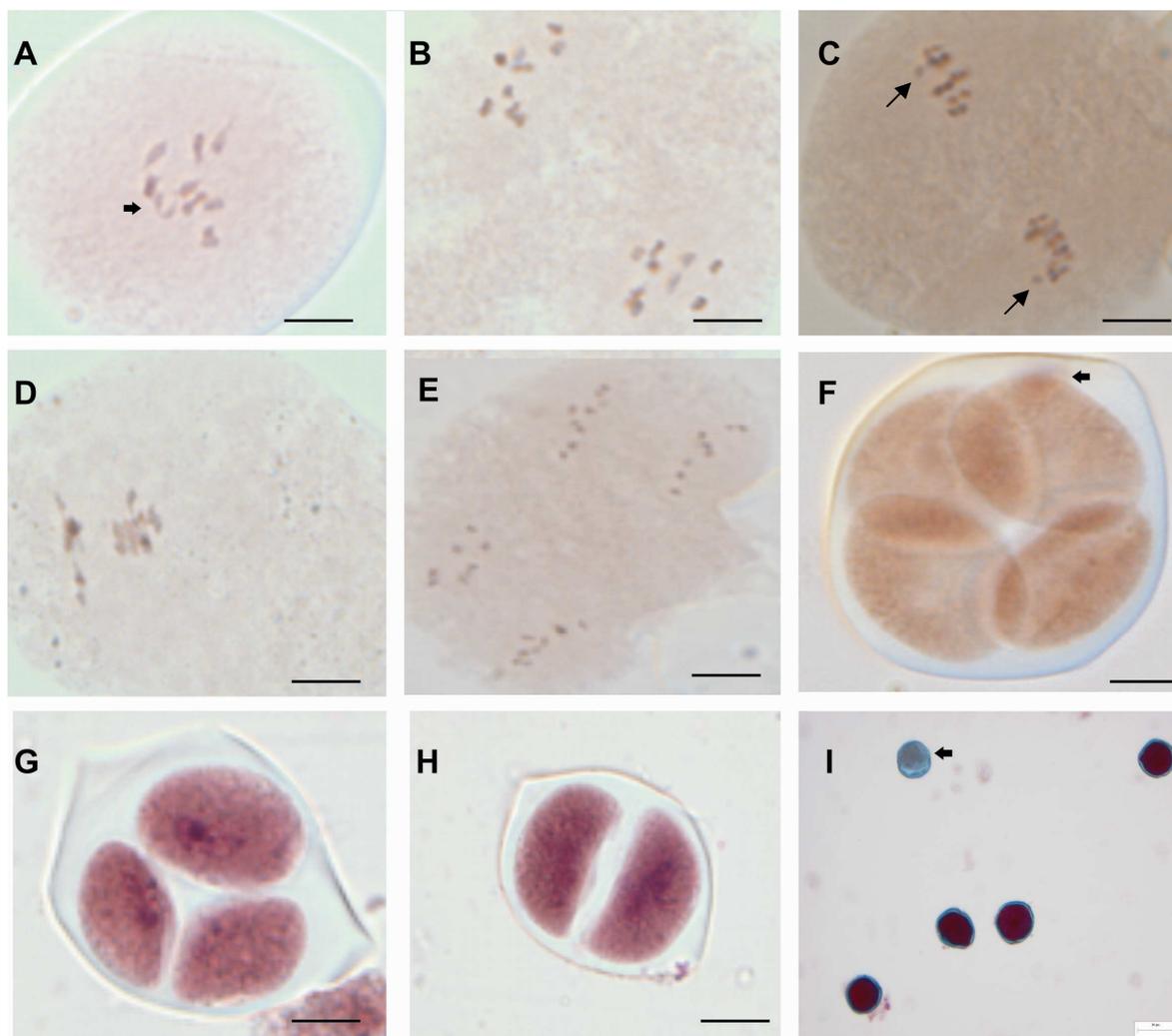


Figura 2- Meiose em *Vasconcellea quercifolia*. 2A – Metáfase I – evidenciando um par de cromossomos apresentando quiasma terminal; 2B-; Pró-metáfase II – nove pares cromossômicos em cada pólo da célula; 2C – Metáfase II – apresentando cromossomos retardatários (setas); 2D - Início de anáfase II em apenas uma metade da díade, e a outra apresentando um citoplasto, evidenciando a ocorrência de citomixia; 2E – Final de anáfase II – indicando o início da formação de quatro núcleos; 2F – Tétrade – apresentando micronúcleo (seta); 2G– Tríade; 2H - Díade; 2I – Grãos de pólen viáveis e inviável (seta). Barra = 5μm.

em diacinese na espécie, porém já que a espécie é diplóide acredita-se que um par de cromossomos seja responsável pela região organizadora de nucléolos.

Em algumas células de *J. spinosa* foram observados a presença de dois nucléolos (Figura 1B). Essas regiões foram observadas em outras *vasconcelleas*. Caetano *et al.* (2008), observaram em células meióticas de *V. cundinamarcensis* a presença de mais de um nucléolo em diacinese. Zerpa (1980) também reporta a presença de mais de um nucléolo em híbridos de *V. stipulata*. A presença desses

nucléolos está diretamente relacionada com os cromossomos que possuem a região organizadora de nucléolos. Em diplóides é comum encontrar um par de cromossomos associado ao nucléolo.

Em *J. spinosa* foram observados diferentes tipos de configurações meióticas em células em diacinese (Figuras 1A,1B e 1C), onde foi detectada a presença de cromossomos com configuração do tipo anel (“ring”), caracterizando a ocorrência de quiasmas intersticiais e cromossomos com configuração do tipo bastão (“rod”), evidenciando a ocorrência de quiasmas terminais (Figura 1C). Das 50 células analisadas, apenas dois pares de cromossomos apresentavam configuração do tipo bastão, prevalecendo a configuração meiótica do tipo anel na maioria das células. De acordo com Sendas *et al.* (2005), a ocorrência de configurações do tipo bastão indica a formação de apenas um quiasma, enquanto a ocorrência do tipo em anel indica a formação de dois quiasmas. De acordo com Zarchi *et al.* (1972), quiasmas terminais têm somente uma função física de manutenção da estrutura do bivalente, assegurando assim a perfeita segregação dos cromossomos; enquanto o quiasma intersticial é efetivo na recombinação genética.

Essas informações são relevantes quando se deseja verificar o número de quiasmas e conseqüentemente calcular o índice de recombinação da espécie. A contagem de quiasmas tem sido reconhecida como um dos métodos mais apurados para se avaliar o número total de eventos de permuta genética no genoma, principalmente em organismos em que a análise genética é dificultada (Baptista-Giaconelli *et al.* 2000). No entanto, estudos recentes têm proposto um novo modo de estimar e Colombo (1992) estabeleceu um novo índice de recombinação, porém o mesmo é indicado para espécies que apresentam cromossomos longos e permite com exatidão a determinação da posição exata dos quiasmas, o que não é o caso das espécies da família Caricaceae.

Diante dos dados contabilizados, foi estabelecido o índice de recombinação (IR) de acordo com Darlington (1958) para a espécie *J. spinosa* que foi de 23,6 (Tabela 1), já que não se observou células na fase diacinese em *V. quercifolia*. Tal índice é referente à taxa de permuta ou *crossing over* observada na espécie avaliada.

Índices de recombinação têm sido estimados para outras caricáceas. Silva (2009) estimou para *V. goudotiana* um IR de 26,2, já Damasceno Junior (2008)

estimou para *C. papaya* e *V. monoica*, índices de recombinação de 26,0 e 25,0, respectivamente. De acordo com Forni - Martins e Cruz (1996), entre espécies de uma mesma família não é esperado grandes variações no índice de recombinação quando calculado pelo método de Darlington (1958), pois o mesmo leva em consideração o número haplóide que regra geral é o mesmo para todas as espécies de um mesmo gênero e para Colombo (1992) esse índice de recombinação não leva em consideração as possíveis variações na posição do quiasma.

O valor obtido neste estudo, bem como os outros obtidos para as espécies caricáceas estão dentro de um intervalo razoável, com base no trabalho de Koella (1993), que fez uma revisão dos valores de IR para 194 espécies representantes de 46 gêneros e 15 famílias. Neste trabalho observou-se índices variando de 6,56 a 75,2 com uma média de 26,9. Forni-Martins e Cruz (1996), estimando o índice de recombinação de oito espécies de *Erythrina* observaram valores de IR variando de 45,91 a 50,18 e que a maioria dos quiasmas foi do tipo terminal.

Em ambas as espécies foram detectadas algumas irregularidades meióticas. Em *J. spinosa* foi observado em 5% das células analisadas a falta de sincronia dos cromossomos (Figura 1G), onde no pólo superior os cromossomos estão em metáfase II, e no pólo inferior nota-se o início de anáfase II com a separação dos cromossomos para os pólos opostos da célula. Esta falta de sincronismo é caracterizada quando duas fases distintas da divisão celular são observadas na mesma célula. Silva (2009) analisando a meiose de *V. goudotiana*, também observou a falta de sincronismo em algumas células.

Em *V. quercifolia*, a falta de sincronia foi observada em 16% das células, mas além desta irregularidade em 10% das células analisadas observaram-se a presença de cromossomos retardatários (Figura 2C), e em algumas células alguns cromossomos com segregação precoce. A segregação precoce de acordo com Schubert (2007) pode ocorrer em espécies que possuem cromossomos pequenos que podem apresentar problemas durante a separação dos cromossomos. Portanto, em *V. quercifolia* a segregação precoce pode ser pelo fato da espécie apresentar cromossomos pequenos.

Tabela 1- Percentual de anormalidades, bem como valores dos índices de recombinação e meiótico e o percentual de produtos pós-meioticos observados durante a meiose e pós-meiose em *J. spinosa* e *V. quercifolia*.

Características	<i>J. spinosa</i>	<i>V. quercifolia</i>
Cromossomos retardatários	-	10%
Falta de sincronia	5%	16%
Índice de recombinação (IR)	23,6%	-
Índice Meiótico (IM)	96%a	94%a
Políades	8,4%	10,2%
Tríades	-	8,2%
Díades	-	0,2%
Viabilidade Polínica	97%a	90%a

\*Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças significativas em nível de 5% de probabilidade pelo teste "t".

Outra anormalidade observada em *V. quercifolia* foi a ocorrência de citomixia (Figura 2D), onde se observa o início da anáfase II em apenas uma metade da díade e a outra apresentando o citoplasto. Segundo Latta *et al.* (2006), a citomixia caracteriza-se pela migração de cromatina, via canais citomíticos ou pontes intercelulares, em meiócitos localizados próximos um do outro. Embora a citomixia seja relatada em várias espécies de plantas, sua origem não é muito clara. Pagliarini (2000) reporta que fatores químicos, condições patológicas, radiação, temperatura, lesões mecânicas, hibridação e poliploidia podem estar diretamente relacionadas com este fenômeno. Porém, nem sempre a citomixia pode gerar grãos de pólen inviáveis. Bhandari *et al.* (1967) observaram a passagem do nucléolo de uma célula meiótica para outra sem que isto afetasse a fertilidade do pólen.

As anormalidades detectadas em ambas as espécies já foram reportadas em outras caricáceas como em *C. papaya* (Dasmaceno Junior, 2008; Bajpai e Singh, 2006), em *V. monoica* (Dasmaceno Junior, 2008), *V. cauliflora* e *V. cundinamarcensis* (Caetano *et al.*, 2008), e em *V. goudotiana* (Silva, 2009), e têm influência direta na formação de produtos pós-meióticos irregulares (mônades, díades, tríades e políades) e de grãos de pólen inviáveis. Isso pôde ser observado em *J. spinosa*, onde foi detectada a presença de alguns produtos pós-meióticos anormais, como políades, células apresentando mais de quatro núcleos (Figura

1J), sendo que a freqüência destas políades não foi tão significativa; já em *V. quercifolia*, foram observadas além de políades, tétrades com micronúcleo (Figura 2F), tríades (Figura 2G) e díades (Figura 2H).

De acordo com Koduro e Rao (1981), cromossomos retardatários observados em diferentes fases meióticas podem gerar gametas desbalanceados ou aneuplóides, ou podem ser eliminados na forma de micronúcleos. Bajpai e Singh (2006), trabalhando com cultivares de mamoeiro (*C. papaya*) atribuíram aos atrasos observados em anáfase I e II e outras anormalidades a possível formação de micronúcleos.

Caetano *et al.* (2008), verificaram que as anormalidades meióticas observadas em alguns acessos de *V. cauliflora* e *V. cundinamarcensis* comprometeram diretamente a formação dos produtos finais da meiose, e tiveram influência direta do índice meiótico e na viabilidade polínica.

Com base nas imagens observadas pode-se afirmar que as espécies apresentam uma citocinese normal, já que se observa a formação de quatro núcleos em cada pólo da célula que posteriormente darão origem a tétrades (Figuras 1H, 1I e 2E). Em angiospermas a citocinese pode ser simultânea ou sucessiva (Ramanna & Jacobsen, 2003). A citocinese sucessiva ocorre ao final da meiose I. Na do tipo simultânea não ocorre citocinese na primeira divisão, ou seja, caracteriza-se pela ocorrência de celularização a partir da telófase II conforme observado nas respectivas figuras.

O índice meiótico (IM) estimado para *J. spinosa* e *V. quercifolia* foi 96 e 94%, respectivamente (Tabela 1), sendo considerados altos e indicando que apesar de terem sido detectadas algumas irregularidades nas espécies, estas não comprometeram a formação dos produtos pós-meióticos. Isso pode ser explicado pela atuação de mecanismos denominados “pontos de checagem”. Quando ocorre algum tipo de problema durante a divisão mitótica ou meiótica, proteínas desse complexo atuam mantendo a integridade do genoma durante o ciclo celular (Hartl e Jones, 1998).

Índice meiótico de 90 a 100% indicam que o genótipo pode ser considerado estável citologicamente, enquanto que índice meiótico inferior a 90% indicam que as plantas são instáveis (Love, 1951).

A viabilidade polínica para *J. spinosa* foi de 97%, enquanto para *V. quercifolia* foi de 90% (Tabela 1), sendo alta para as duas espécies, o que já era

esperado devido ao alto índice meiótico observado em ambas. Alta viabilidade polínica também foi encontrada em *C. papaya*. (Damasceno Junior, 2008). Em outras vasconcelleas, a viabilidade polínica observada foi baixa como o relatado por Silva (2009), que trabalhando com *V. goudotiana* observou uma viabilidade de 63% e Damasceno Junior (2008) que trabalhando com *V. monoica*, observou uma viabilidade de 70,93%, valores considerados baixos. Os autores relatam que a baixa percentagem de pólen viáveis está diretamente relacionada às anormalidades observadas durante o estudo do comportamento meiótico das espécies.

Os resultados acima citados sugerem que apesar de ambas as espécies apresentem algumas irregularidades essas não afetaram diretamente a formação dos produtos pós-meióticos e a fertilidade das espécies, já que o índice meiótico e a viabilidade polínica estimados foram altos.

#### 4.2.6. CONCLUSÃO

Este estudo confirmou que as espécies *J. spinosa* e *V. quercifolia* são diplóides com  $2n=2x=18$  cromossomos apresentando meiose com pareamento normal dos cromossomos.

Foram detectadas algumas irregularidades meióticas nas duas espécies, sendo que a espécie *V. quercifolia* apresentou um número maior de anormalidades, porém a presença destas irregularidades não comprometeu significativamente a viabilidade dos grãos de pólen das respectivas espécies.

O índice de recombinação foi de 23,6 para *J. spinosa*, sendo considerado razoável. Os índices meióticos e a taxa de viabilidade das espécies foram altos, o que permite concluir que as espécies podem ser consideradas citogeneticamente estáveis.

#### 4.2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander, M. P. (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Techn.* 44: 117-122.

Badillo, V. M. (2000) *Carica L.* vs *Vasconcella St. Hil.* (Caricaceae): con le rehabilitación de este ultimo. *Ernstia*, 10:74-79.

Badillo, V. M. (1993) Caricaceae – Segundo Esquema. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Univ. Central de Venezuela.* Maracay 64p.

Badillo, V. M. (1971) Monografía de la familia Caricaceae. Maracay, Venezuela: Editorial Nuestra América C. A., 221p.

Bajpai, A.; Singh, A. K. (2006) Meiotic Behavior of *Carica papaya L.*; Spontaneous chromosome instability and elimination in important cvs. in North Indian conditions. *Cytologia*, 71(2): 131-136.

Baptista-Giaconelli, F. R.; Pagliarini, M. S.; Almeida, J. L. (2000) Chiasma frequency, distribution and terminalization in hexaploid oats (*Avena sativa L.*). *Acta Scientiarum.* 22 (2): 269-273.

Bhandari, N. N.; Tandon, S. L. & Jain, Sarmishtha (1967). Some observations on the cytology and cytomixis in *Canavalia DC.* *Cytologia* 34:22-8.

Caetano, M. C.; Burbano, T. C. L.; Sierra, C. L. S.; Tique, C. A. P.; Nunes, D., G. C. (2008) Citogenética de especies de *Vasconcellea* (Caricaceae). *Acta Agron (Palmira)* 57: 241-245p.

Colombo, P. C. (1992) A new index for estimating genetic recombination from chiasma distribution data. *Heredity.* 69: 412-415.

Cruz, C. D. (2001) Programa GENES, *Aplicativo Computacional em Genética e Estatística.* Viçosa- MG, Universidade Federal de Viçosa. 648p.

Darlington, C. D. (1958) *Evolution of genetic systems.* London: Oliver and Boyd.

Damasceno Junior, P.C., (2008), Estudos citogenéticos, genéticos e moleculares, como ferramenta auxiliar no melhoramento genético do mamoeiro. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) 60,61p.

Forni-Martins, E. R.; Cruz, N. D. (1996) Recombination index in species of *Erythrina* L. (Leguminosae, Papilionoideae). *Botanical Journal of the Linnean Society*,122:163-170.

Guerra, M.S. (1988). *Introdução à Citogenética Geral*. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 142p.

Hartl, D.L.; Jones, E. W. (1998) *Genetics: Principles and analyses*. 4<sup>th</sup> edition., Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts, 842p.

Koduro, P. R. K.; Rao, M. K. (1981) Cytogenetics of synaptic mutants in higher plants. *Theor.Appl. Gent.*,59:197-214.

Latto, S. K., Khan, S., Bamotra, S., Dhar, A. K. (2006) Cytomixis impairs meiosis and influences reproductive success in *Chlorophytum comosum* (Thunb) Jacq. – an additional strategy and possible implications. *J. Biosci.*, 31(5): 629-637.

Lorenzi, H. (2002) *Árvores brasileiras: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum :1.

Love, R. M. (1951) Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. *Agronomy Journal*, 43: 72-76.

Magdalita, P. M.; Villegas, V. N.; Pimentel, R. B.; Bayot, R. G. (1988) Reaction of papaya (*Carica papaya*) and related species to ringspot virus. *J. Crop Sci.*, 13:129-132.

Media Cybernetics (2004). Image-Pro-plus, version 5.1 for Windows. Media Cybernetics Inc, Maryland, USA.

Pagliarini, M. S. (2000) Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. *Genetics and Molecular Biology*, 23:97-1002 p.

Piratelli, A. J. ; Piña Rodrigues, F. C. M.; Gandara, F. B.; Santos, E. M. G.; Costa, L. G. S. (1998) Biologia da polinização de *Jacaratia spinosa* (AUBL) ADC. (Caricaceae) em mata residual do sudeste brasileiro. *Rev. Brasil. Biol.* 58: 671-679 p.

Ramanna, M. S.; Jacobsen, E. (2003) Relevance of sexual poliploidization for crop improvement – A review. *Euphytica* 133: 3 -18p.

Roeder G.S. (1997) Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes and Development* 11: 2600-2621p

Scheldeman, X.; Willemen, L.; Coppens d'Eeckenbrugge, G.; Romejin-Peeters, E.; Restrepo, M. T.; Romero Motoche, J.; Jiménez, D; Lobo, M.; Medina, C. I.; Reyes, C.; Rodríguez, D.; Ocampo, J. A.; Van Damme, P.; Goetgebeur, P. (2007) Distribution, diversity and environmental adaptation of highland papayas (*Vasconcellea* spp.) in tropical and subtropical America. *Biodivers Conserv*, 16:1867-1884p

Sendas, T., Hiraoka, Y., Tominaga, T. (2005) Cytological affinities and interfertilities between *Lolium temulentum* and *L. persicum* (Poaceae) accessions. *Hereditas*, 142: 45-50.

Silva, E. N. (2009) *Caracterização Botânica e Citológica da Espécie Silvestre Vasconcellea goudotiana (Caricaceae)*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)- Campos dos Goytacazes – RJ- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro –UENF , 36p.

Schubert, I. (2007). Chromosome evolution. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 111-115.

Zarchi, Y., Simchen G., Hillel J. e Tamar Schaap (1972). Chiasmata and the breending system in wild popilations of diploid wheats. *Chromosoma*. 38: 77-94p.

Zerpa, M. D. (1980) Comportamento meiotico de la descendencia hibrida producida al transferor el character bisexual de *C. pubescens* e *C. stipulata*. *Ver. Fac. Agronomia*, Maracay, Venezuela, 1-4: 5-47p.

Zerpa, D. M.; (1967) Informe sobre resultados de inoculaciones sobre lechosa (*Carica papaya* L.) com virus de la "deformation foliar y mancha em anillo" (distortion ringspot) em condiciones diversas. *Agronomia. Tropical*, 17: 361-370.

## 5. RESUMO E CONCLUSÃO

A cultura do mamoeiro apesar de sua grande expressividade no cenário nacional e mundial apresenta problemas que geram perdas significativas em sua produção. Muitos destes problemas são ocasionados por doenças e pragas que tornam a produção inviável em alguns locais. Na forma cultivada não existem relatos de genótipos resistentes, entretanto, algumas caricáceas silvestres são resistentes a determinadas doenças e apresentam outras características relevantes. Contudo, para serem utilizadas em programas de melhoramento genético da forma cultivada, é necessário que sejam feitas pesquisas que servirão de base para posteriores trabalhos de introgressão de genes e hibridações interespecíficas ou intergenéricas. Estudos citogenéticos, como determinação cariotípica, morfologia cromossômica, nível de ploidia, estabilidade meiótica e viabilidade polínica, são fundamentais quando se deseja utilizar espécies silvestres em programas de melhoramento, bem como quando se faz necessário conhecer a coleção de germoplasma. Assim, o objetivo desta dissertação foi gerar conhecimentos citogenéticos de espécies com potencial uso em programas de melhoramento do mamoeiro.

A determinação do cariótipo das espécies *V. cauliflora* e *V. quercifolia*, demonstrou que as espécies apresentam  $2n=18$  cromossomos, pequenos do tipo metacêntrico, bastante similares, porém estaticamente distintos.

As análises meióticas realizadas demonstraram que as espécies *J. spinosa* e *V. quercifolia*, são diplóides com nove pares cromossômicos e que apresentam

algumas irregularidades, mas podem ser consideradas meioticamente estáveis, já que as anormalidades detectadas não afetaram significativamente a formação dos produtos pós-meióticos e a viabilidade polínica das espécies.

Com base nesses estudos, pode-se inferir que os insucessos em hibridações realizadas entre a forma cultivada e espécies silvestres não se devem às diferenças entre aspectos morfológicos dos cromossomos e nem devido ao nível de ploidia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander, M. P. (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Techn.* 44: 117-122.

Alvizo, V.H.F.; Rojkind, M.C. (1987) Resistencia al virus mancha anular del papaya en *Carica cauliflora*. *Rev Mex de Fitopat* 5:61-62p.

Arnold, M. L.; Hodges, A. S. (1995) Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends e Ecology Evolution.* 10: 67-71.

Badillo, V. M. (1971) *Monografía de la familia Caricaceae*. Maracay, Venezuela: Editorial Nuestra América C. A., 221.

Badillo, V. M. (1993) Caricaceae – Segundo Esquema. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Univ. Central de Venezuela*. Maracay, p. 64.

Badillo, V. M. (2000) *Carica* L. vs. *Vasconcella* St. Hil. (Caricaceae): con la rehabilitación de este último. *Ernstia* 10:74-79.

Brammer, S. P.; Zanotto, M.; Caverzan, A. *Citogenética vegetal: da era clássica à molecular*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 9 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 85). Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do85.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do85.htm)>.

Caixeiro, A.P.A. (1999) *Caracterização citogenética da heterocromatina constitutiva e sua implicação na evolução do cariótipo de espécies do gênero Plebeia* (Hymenoptera: Apinae: Meliponini). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)-Viçosa- M.G, Universidade Federal de Viçosa - UFV, 68p.

Coelho, L.G.M., Battistin, A. (1996) Estudos dos cariótipos em espécies de *Adesmia* DC. nativas do Rio Grande do Sul. *Brazilian Journal of Genetics* (Supplement), 19(3): 130.

Damasceno Junior, P. C., Costa, F. R., Pereira, T. N. S., Freitas Neto, M.; Pereira, M. G. (2009) Karyotype determination in three Caricaceae species emphasizing the cultivated form (*Carica papaya* L.). *Caryologia* , 62:10-15.

Datta P. C.; (1971) Chromosomal biotypes of *Carica papaya* L. *Cytologia* 36:555-562.

Drew, R.A.; O'Brien, C.M.; Magdalita, P.M.; Drew, R.A. (1998) Development of *Carica* interspecific hybrids. *Acta Horticulture*, v.461, p.285-291, 1998.

EMBRAPA .Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária. On line. Disponível na Internet: [www.embrapa.br](http://www.embrapa.br) . Capturado em 20 de novembro, 2008

FAO. Papaya production and harvested area. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 24 de janeiro de 2009.

Fukui, K., Nakayama, S. (1996) *Plant chromosomes: laboratory methods*. CRC Press, U.S.A. 274.

Gill, B. S.; Friebe, B. (1997) Plant cytogenetics at the dawn of the 21st century. *Current Opinion in Plant Biology*. 1: 109-115p.

Guerra, M.; Souza, M. J. (2002) *Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana*. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC. 131.

Guerra, M. (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética*. 4:741-743.

Guerra, M. (1983). O uso do corante Giemsa na citogenética vegetal: comparação entre a coloração simples e o bandeamento. *Ciênc. Cult.* 35: 190-193.

Hamant, O.; Ma, H; Cande, W. Z. (2006) genetics of meiotic prophase I in plants . *Annual Revist Plant Biology* (57) 268p.

Hatschabach, G. G.; Ziller, S. (1995) *Lista vermelha de plantas ameaçadas de extinção no estado do Paraná*. Curitiba: Secretaria do Estado do Meio Ambiente.

Hinojosa, R.L.; Montgomery, M.W. (1998) Industrialização do mamão: aspectos químicos e tecnológicos da produção de purê asséptico. *In: Simpósio sobre a cultura do mamoeiro*. Jaboticabal, FCAV/UNESP, p.89-110.

Horovitz, S.; Jimenez, H.(1967) Cruzamientos interespecificos e intergenericos en Caricaceae y sus implicaciones fitotecnicas. *Agronomia Tropical* (Venezuela) 17:323-343.

Huziwara, Y. (1962) Karyotype analysis in some genera of Compositae. VIII. Further studies on the chromosome of Aster. *American Journal of Botany* 49:116-119.

IBGE. Produção agrícola municipal: quantidade e valor da produção, área plantada e colhida. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 14 de dezembro de 2008.

IUCN (2007) Red List of threatened species. [Http:// www.redlist.org](http://www.redlist.org). Disponível em dezembro de 2007.

Kelly, J. K.; Rasch, A.; Kalisz, S. (2002) Aethod to estimate pollen viability from pollen size variation. *American Journal of Botany* 89:1021 -1023.

Koduro, F.R., Rao, M. K. (1981) Cytogenetics of synaptic mutants in higher plants. *Theor. Appl. Genet.* 59: 197-214.

Kumar LSS, Srinivasan VK (1944) Chromosome number of *Carica dodecaphylla* Vell. Fl. Flum. *Current Science* 13:15.

Levan, A.; Frediga, K.; Sandberg, A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.

Lorenzi, H. (2002) *Árvores brasileiras: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum, 1.

Love, R. M. (1951) Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. *Agronomy Journal*, 43: 72-76.

Maffei, E.M.D.; Marin-Morales, M.A.; Ruas, P.M.; Ruas, C.F. (1996) Análise de assimetria cariotípica realizada em populações de *Mikania micrantha* HBK. (Asteraceae). *Brazilian Journal of Genetics* (Supplement), 19(3): 131.

Magdalita P.M.; Villegas V.N.; Pimentel R.B.; Bayot, R.G. (1988) Reaction of papaya (*Carica papaya* L.) and related species to ringspot vírus. *Philipp J Crop Sci* 13:129-132

Malaguetti, G.; Jimenez, H.; Horovitz, S. (1957) Pruebas de transmision del mosaico de la lechosa a otras especies de *Carica*. *Agricultura Tropical*, Maracay, v. 17.

Marcon, A.B.; Vanzela, A.L.L.; Guerra, M. (1998) Caracterização cariotípica da pteridófita *Acrostichum aureum* L. usando coloração convencional e bandeamento CMA-DA-DAPI. *Brazilian Journal of Genetics* (Supplement), 21(3): 161

Marin, S. L. D.; Gomes, J. A.; Salgado, J. S.; Martins, D. S.; Fullin, E. A. (1995) Recomendações para a cultura do mamoeiro dos grupos Solo e Formosa no Estado do Espírito Santo. Vitória:EMCAPA, 57.

Marstenbroek, I.; Wet, J.M.J. (1983) Chromosome C-banding of *Zea mays* and its closest relatives. *Genome* 25: 203-209.

Mekako, H.U.; Nakasone, H.Y. (1975) Interspecific hybridization among 6 *Carica* species. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 3: 237-242.

Mercado-Ruaro, P., Delgado-Salinas, A. (1998) Karyotypic studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae: phaseolinae). *American Journal of Botany* 85(1): 1-9.

Oliveira, A. M. G., Farias, A. R. N., Santos Filho, H. P., Oliveira, J. R. P.; Dantas, J. L. L.; Santos, L. B.; Oliveira, M. A.; Silva, M. J.; Almeida, O. A.; Nickel, O.; Medina, V. M.; Cordeiro, Z. J. M. (1994) Mamão para exportação: aspectos técnicos da produção. Brasília: EMBRAPA - SPI, 1994. 52p. (Série Publicações Técnicas *FRUTEX*, 9).

Paszko, B. (2006) A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Plant Systematics and Evolution*. 258:39-48.

Paoli, A. A. S. *Morfologia, anatomia e aspectos da germinação de Jacaratia spinosa (AUBL.) A.DC. (Caricaceae)*. 1986. Tese. (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências de Rio Claro. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro.

Piratelli, A. J. , Piña Rodrigues, F. C. M., Gandara, F. B., Santos, E. M. G., Costa, L. G. S. (1998) Biologia da polinização de *Jacaratia spinosa* (AUBL) ADC. (Caricaceae) em mata residual do sudeste brasileiro. *Rev. Brasil. Biol.* 58: 671-679 p.

Ricelli, M. (1963) Resistencia al virus del mosaico y adaptabilidad de tres especies de *Caricaceae*. *Agricultura Tropical*, Maracay, v. 13, p. 89-94.

Sacchet, A. M. O. F. (1999) Variabilidade genética: ponto de partida para o melhoramento de plantas. In: SACCHET, A. M. O. F. (Org.). *Genética para que te quero?* Porto Alegre: Ed. UFRGS. 99-104.

Scheldeman, X., Willems, L., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Romeijn-Peeters, E., Restrepo, M. T., Romero Motoche, J., Jiménez, D., Lobo, M., Medina, C. I., Reyes, C., Rodríguez, D., Ocampo, J. A., Van Damme, P., Goetgebeur, P. (2007) Distribution, diversity and environmental adaptation of highland papayas (*Vasconcellea* spp.) in tropical and subtropical America. *Biodivers Conserv*, 16:1867-1884.

Schifino-Wittmann, M. T. (2001) Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. *Ciência Rural*, 31(5): 897-2002.

Schubert, I. (2007). Chromosome evolution. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 111-115.

Seehausen, O. (2004) Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Evolution e Ecology* 19: 198-207.

Singh, R. J. (1993) *Plant cytogenetics*. United States: CRC Press. Inc.,391p.

Sharma, A.K., Sharma, A. (1994) *Chromosome Techniques - A manual*. Hardwood Academic Publishers. Switzerland. 368 p.

Souza, M. M.; Pereira, T. N. S.; Martins, E. R. (2002) Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro amarelo (*passiflora edulis* Sims. *Flavicarpa* Degener). *Ciência Agrotécnica*. Lavras 26: 1210.

Sybenga, J. (1959) Some sources of error in the determination of chromosome length. *Chromosoma*, 10: 355-364.

Tavares, E. T., Tatagiba, J. S., Ventura, J. A., Souza J.R.(2004) Dois novos sistemas de diagnose precoce da meleira do mamoeiro. *Fitopatol. bras.* [online]. 29: 563-566.

Techio, V. H., Lisete, C. D., Pereira, A. V. (2006) Meiosis in elephant grass (*Penisetum purpureum*), pearl millet (*Penisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interespecific hybrids. *Genetics and Molecular Biology*. 29:35-42.

Thompson, M.W., Mc Innes, R.R., Willard, H.F. *Genética médica*. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1991. 339p.

Zerpa, D. (1980) Comportamento meiotico de la descendencia hibrida producida al transferor el character bisexual de *C. pubescens* e *C. stipulata*. *Ver. Fac. Agronomia*, Maracay, Venezuela, 1-4: 5-47p.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)