

ESTUDO DAS RELAÇÕES GENÔMICAS EM ESPÉCIES DE  
CARICACEAE COM BASE EM MARCADORES  
CITOMOLECULARES

**FABIANE RABELO DA COSTA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2008

ESTUDO DAS RELAÇÕES GENÔMICAS EM ESPÉCIES DE  
CARICACEAE COM BASE EM MARCADORES  
CITOMOLECULARES

**FABIANE RABELO DA COSTA**

Tese 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 Doutor em Genética e Melhoramento  
de Plantas

Orientadora: Profa. Telma Nair Santana Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2008

ESTUDO DAS RELAÇÕES GENÔMICAS EM ESPÉCIES DE  
CARICACEAE COM BASE EM MARCADORES  
CITOMOLECULARES

**FABIANE RABELO DA COSTA**

Tese 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 Doutor em Genética e Melhoramento  
de Plantas

Aprovada em 29 de fevereiro de 2008

Comissão Examinadora:

---

Prof. Alexandre Pio Viana (Doutor, Produção Vegetal) - UENF

---

Prof. Celso Valdevino Pommer (Doutor, Ciências) - UENF

---

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

---

Dr. Eder Jorge de Oliveira (Doutor, Agronomia) – CNPMF/EMBRAPA

---

Profa. Telma Nair Santana Pereira (Ph.D., Plant Breeding) – UENF  
Orientadora

## AGRADECIMENTO

A Deus, pela oportunidade de ter chegado até aqui.

À FAPERJ, CAPES, FINEP e UENF, pelo suporte financeiro.

À Texas A&M University e aos doutores David M. Stelly e George Hodnett, pelos suportes intelectual e laboratorial.

Aos meus pais, Christovão e Márcia, pelo amor incondicional e pela confiança em que eu seria capaz de realizar tudo o que eu quisesse.

Ao Dani, por todo amor, carinho e paciência, em todos os momentos, e também por estar sempre por perto nas decisões mais difíceis, apoiando-me sempre.

À minha orientadora, Telma Pereira, que sempre me ajudou a superar as dificuldades, acreditou no meu potencial e incentivou-me a ir mais longe.

Aos velhos e novos amigos, no Brasil e nos EUA, que dividiram comigo tantas alegrias e tristezas e mostraram-me que os sacrifícios sempre valem a pena.

E a todos que contribuíram para a realização desta pesquisa,

muito obrigada.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTO.....	ii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Breve histórico e classificação botânica.....	3
2.2. Origem e distribuição geográfica.....	6
2.3. Considerações econômicas e usos.....	12
2.4. Citogenética.....	13
2.5. Sistemas reprodutivos.....	15
2.6. Relações genômicas entre as espécies.....	20
2.6.1. Hibridação interespecífica e intergenérica.....	21
2.6.2. Marcadores moleculares.....	23
2.6.2.1. Marcadores ISSR.....	26
2.6.3. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	27
3. TRABALHOS	
ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE METÁFASES EM CARICACEAE	
Resumo.....	30
Abstract.....	31
1. INTRODUÇÃO.....	31

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1. Material vegetal e pré-tratamento.....	33
2.2. Obtenção de metáfases.....	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE COM SONDAS 18S E 5S RDNA EM	
MAMOEIRO ( <i>C. papaya</i> L.) E ESPÉCIES SILVESTRES RELACIONADAS	
Resumo.....	39
Abstract.....	40
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1. Material vegetal e pré-tratamento.....	43
2.2. Obtenção das metáfases.....	43
2.3. Isolamento e marcação das sondas.....	43
2.4. FISH.....	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
UTILIZAÇÃO DE MARCADORES ISSR COMO FERRAMENTA AUXILIAR EM	
ESTUDOS FILOGENÉTICOS NA FAMÍLIA CARICACEAE	
Resumo.....	56
Abstract.....	57
1. INTRODUÇÃO.....	57
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1. Material vegetal.....	59
2.2. Extração do DNA.....	60
2.3. ISSR.....	60
2.4. Análise dos dados.....	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.1. ISSR.....	61
3.2. Relações genéticas em Caricaceae.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

## RESUMO

COSTA, Fabiane Rabelo da; D. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro de 2008. Estudo das relações genômicas em espécies de Caricaceae com base em marcadores citomoleculares. Orientadora: Telma Nair Santana Pereira; Co-orientador: David M. Stelly; Conselheiros: Alexandre Pio Viana e Messias Gonzaga Pereira.

A família Caricaceae é composta por 35 espécies, distribuídas em seis gêneros. O mamoeiro (*Carica papaya* L.), única espécie de importância comercial, destaca-se no Brasil, que é o maior produtor e um dos maiores exportadores mundiais. Para chegar ao topo deste *ranking*, é necessário que o Brasil melhore a qualidade dos frutos de mamão produzidos, o que pode ser conseguido por meio do melhoramento genético e adoção de outras práticas culturais. Diversas características de interesse são encontradas em espécies silvestres de Caricaceae, principalmente em *Vasconcellea*, mas a transferência dos genes via hibridação vinha sendo limitada por barreiras pós-zigóticas. Com o surgimento do resgate de embrião, algum sucesso tem sido obtido, porém, sem um entendimento mais aprofundado sobre as inter-relações entre as espécies da família. O uso de marcadores moleculares tem sido intensamente explorado com este objetivo, auxiliando estudos filogenéticos e evolutivos; no entanto, poucos são os estudos na área citomolecular, especialmente devido ao fato de as espécies de Caricaceae possuírem cromossomos pequenos e similares. Através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), avanços importantes na

citogenética de plantas podem ser obtidos, permitindo que informações genéticas e físicas sejam compiladas de modo a auxiliarem os estudos genômicos. Outras determinações citológicas sobre a estrutura cromossômica, tais como localização dos centrômeros, regiões organizadoras de nucléolo e heterocromatina, embora consideradas básicas em termos citogenéticos, podem favorecer a genômica comparativa e o isolamento de genes. Para se obterem bons resultados nesta área, são necessárias boas preparações citológicas, isto é, núcleos intactos, com cromossomos bem condensados e espalhados. Assim, na primeira parte deste trabalho, determinou-se um protocolo para obtenção de boas metáfases mitóticas, utilizando-se a trifluralina 2  $\mu$ M a 4 °C por 21h como pré-tratamento de pontas de raízes e uma mistura de metanol/ácido acético, na proporção 2:1 para a suspensão de protoplastos, em *C. papaya*, *V. goudotiana* e *V. cundinamarcensis*. Em seguida, através da FISH, utilizando-se sondas de rDNA, foi feito um estudo comparativo entre estas três espécies, no qual verificou-se maior similaridade genética entre *V. goudotiana* e *V. cundinamarcensis*, em termos de número e distribuição das sondas, e, ainda, que o mamoeiro, em relação a estas seqüências repetitivas de rDNA, praticamente não se assemelha às espécies de *Vasconcellea*. Numa segunda etapa, foram comparadas as espécies *C. papaya*, *V. goudotiana*, *V. monoica* e *J. spinosa* utilizando-se marcadores ISSR, com o objetivo de verificar os polimorfismos entre elas. Através das análises da distância genética e do dendrograma, confirmou-se a estreita relação entre as espécies de *Vasconcellea*, verificando-se ainda a maior proximidade deste gênero com *Jacaratia* ao invés de *Carica*. Este fato corrobora a hipótese de que o mamoeiro tenha se separado das espécies de *Vasconcellea* e divergido em isolamento, o que o tornara geneticamente dissimilar em relação a este grupo.

## ABSTRACT

COSTA, Fabiane Rabelo da; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, February, 2008. Genomic relationships among caricaceae species based on citomolecular markers. Adviser: Telma Nair Santana Pereira; Co-adviser: David M. Stelly; Committee members: Alexandre Pio Viana and Messias Gonzaga Pereira.

The Caricaceae family comprises 35 species distributed in six genera. Papaya (*Carica papaya* L.) is the only species with commercial relevance. Brazil is considered the biggest papaya-producer and one of the biggest exporters worldwide. Progress in the quality of papaya fruits is a prerequisite to reach the top of this ranking, which can be done by genetic breeding and some crop management. Related genera, mainly *Vasconcellea*, must be considered prospective sources of germplasm for genetic improvement of papaya, even though the transference of these genes by hybridization had been impaired by post-zygotic barriers. The advent of embryo rescue allowed some successfully crosses, although there is no complete comprehension about interrelationships in Caricaceae. The utilization of molecular markers has been intensively investigated with this objective and their results have supported phylogenetic and evolutionary studies. In contrast, only a few cytomolecular studies have been developed, mainly due to Caricaceae species have small and similar chromosomes. Significant advances in plant cytogenetics have been obtained by fluorescent *in situ* hybridization (FISH). Physic and genetic information generated by this

analysis are combined to help genomic studies. Other cytological analyses about chromosomic structure as the location of centromeres, NORs and heterochromatin have the same purpose. In order to have satisfactory results in this area, good cytological preparations are needed. Slides from these preparations should present intact nuclei with spread and well condensed chromosomes. Therefore, the first part of this work was to determine a protocol to obtain well mitotic metaphases in *C. papaya*, *V. goudotiana* and *V. cundinamarcensis*. The pretreatment of root tips was conducted at 4 °C for 21h, using 2 µM of trifluralin. The protoplast suspension was obtained after enzymatic digestion, using a 2:1 methanol/acetic acid mixture. The best slides were selected to be FISHable subsequently. The rDNA probes were localized by FISH and a comparative study was conducted among the same three Caricaceae species. It was found a genetic similarity between *V. goudotiana* and *V. cundinamarcensis*, based on both probes number and their distribution. Papaya has a few similarities with *Vasconcellea* species. On the second part, the ISSR markers were used to compare *C. papaya*, *V. goudotiana*, *V. monoica* and *J. spinosa*, based on their polymorphisms. The analyses of the genetic distance and the dendrogram confirmed the close relationship between *Vasconcellea* species. This genus was closer to *Jacaratia* than to *Carica*. These results corroborate the hypothesis that *C. papaya* could have separated from *Vasconcellea* species and evolved in isolation, becoming dissimilar from this group.

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura do mamoeiro (*Carica papaya* L.) tem grande importância econômica para o Brasil. Segundo dados do IBGE (2006), o país produziu cerca de 1.900.000 toneladas de frutos de mamão, o que representou um aumento médio de 20,6% em relação à produção de 2005, mantendo o Brasil no topo do *ranking* mundial como maior produtor e exportador desta fruta. Embora a produtividade da cultura seja elevada, alguns aspectos ainda limitam seu aumento, especialmente as perdas causadas por pragas e doenças.

Dentre as principais doenças do mamoeiro está a mancha anelar, causada pelo PRSV-P (*papaya ring spot virus*). Diversas estratégias foram aplicadas visando ao controle dessa doença, entretanto, nenhuma delas garantiu um controle duradouro e amplo (Dantas *et al.*, 2002). Não há relatos sobre variedades de mamoeiro resistentes ao vírus, exceção feita ao mamão transgênico (Souza Júnior *et al.*, 2005). Uma vez não havendo variabilidade para esta característica dentro da espécie cultivada, pode-se recorrer às espécies silvestres e gêneros afins, visando à introgressão de genes desejáveis para a espécie cultivada, via hibridação interespecífica ou intergenérica, estratégia amplamente utilizada em programas de melhoramento.

Algumas espécies silvestres de Caricaceae são resistentes ao vírus da mancha anelar (Malaguetti *et al.*, 1957; Alvizo e Rojkind, 1987; Magdalita *et al.*, 1988), podendo apresentar ainda outras características de interesse agrônomo, tais como resistência à *Phytophthora*, tolerância ao frio, alto teor de açúcar, dentre

outras (Manshardt e Wenslaff, 1989; Drew *et al.*, 1998; Scheldeman *et al.*, 2003). No entanto, pela ocorrência de barreiras pré e pós-fertilização, cruzamentos entre *C. papaya* e espécies afins não têm sido bem sucedidos, exceto apenas pelo emprego do resgate de embrião (Magdalita *et al.*, 1996; Drew *et al.*, 1998; Manshardt e Drew, 1998). A hibridação interespecífica é uma das principais ferramentas que os melhoristas utilizam para a introgressão de genes de interesse em espécies cultivadas, porém ela depende das relações genéticas entre as espécies envolvidas. Assim, em Caricaceae, são necessários estudos que esclareçam como se dão estas relações, já que a literatura reporta a existência de problemas na transferência de genes entre espécies desta família. Para tal, técnicas como a hibridização *in situ* e os marcadores moleculares podem ser empregadas.

O Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Uenf) vem desenvolvendo um programa de melhoramento genético de mamoeiro. Diversos avanços vêm sendo obtidos, destacando-se o lançamento de um híbrido comercial, porém alguns aspectos básicos ainda precisam ser elucidados visando auxiliar os melhoristas quanto à adoção de estratégias futuras. Assim sendo, este trabalho teve por objetivo estudar as relações genômicas entre o mamoeiro, espécies e gêneros afins da família Caricaceae, com base na hibridização *in situ* fluorescente e em marcadores moleculares ISSR (*inter simple sequence repeats*).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Breve histórico e classificação botânica

O mamoeiro, mais importante membro da família Caricaceae, já era conhecido desde o descobrimento da América. De acordo com Badillo (1971), o primeiro relato sobre a existência desse material data de 1696, mas foi Linnaeus, em sua obra *Species Plantarum*, de 1753, quem fez a primeira descrição desta planta e classificou-a como *Carica papaya* L. Este evento representou o início da história de um grupo de espécies que, mais tarde, iriam constituir a família Caricaceae (Badillo, 1971).

Desde então, novos membros deste grupo foram sendo descritos e classificados ainda que erroneamente, pois, como não haviam sido estabelecidos os gêneros que o constituíam, os novos materiais eram identificados como *Carica* spp., o que ocorreu, por exemplo, com *C. spinosa*, descrita por Aublet em 1775 e atualmente conhecida como *Jacaratia spinosa*, e também com *C. monoica*, descrita por Desfontaines em 1802 e hoje classificada como *Vasconcellea monoica* (Badillo, 1971).

Em 1826, foi proposta a denominação Papayaceae para classificar, em nível de família, as espécies até então conhecidas. No entanto, apenas em 1829, o nome definitivo foi determinado como Caricaceae (Dumortier, 1829, citado por Badillo, 1971); esta nomenclatura é aceita e utilizada até os dias atuais.

Com base nas descrições de Badillo (1971, 1993 e 2000) e de forma resumida, a criação dos gêneros da família Caricaceae pode ser assim descrita:

**Carica:** o primeiro gênero a ser criado; baseou-se na descrição de *C. papaya* feita por Linnaeus em 1753. Posteriormente, foi subdividido em duas seções, *Eupapaya* e *Hemipapaya* (De Candolle, 1864, citado por Badillo, 1971). Depois, criou-se a seção *Vasconcellea* (Solms, 1889, citado por Badillo, 1971). Em sua monografia, Badillo (1971) considera novamente duas seções, *Carica* e *Vasconcellea* e, mais tarde, outra seção é criada, *Holostigma* (Lorence, 1988, citado por Badillo, 1993). O gênero *Carica* compreendia a grande maioria das espécies de Caricaceae, porém, atualmente, é considerado um gênero monoespecífico.

**Jarilla:** criado em 1832, com o nome de *Mocinna*, a partir da descrição de *M. heterophylla*, feita no México. Posteriormente, em 1921, Rusby propôs que o nome *Mocinna* fosse substituído por *Jarilla*, já que *Mocinna* havia sido usado para descrever um gênero de outra família que não a Caricaceae. De acordo com Badillo (1971), a característica que diferencia este gênero dos demais é a presença de anteras de uma só teca em sua série superior de estames.

**Vasconcellea:** criado em 1837 por St. Hilaire, esse gênero baseou-se na descrição de *V. quercifolia*. Essa classificação foi seguida por De Candolle e mantida até 1889, quando Solms passou a considerar esse táxon como uma seção do gênero *Carica*. Este critério foi seguido por Harms e outros pesquisadores e persistiu até bem recentemente, quando Badillo (2000) propôs a reabilitação de *Vasconcellea* à categoria de gênero.

**Jacaratia:** criado por De Candolle também em 1864. Baseou-se na descrição de *J. mexicana*. Espécies anteriormente classificadas como *C. spinosa* e *C. heptaphylla* foram transferidas para esse gênero. A presença de glândulas microscópicas na epiderme adaxial das folhas é característica das espécies desse gênero (Badillo, 1971).

**Cylicomorpha:** criado em 1901 por Urban. A primeira espécie de origem africana foi descrita por este autor em 1893, porém classificada como *Jacaratia solmsii*, embora o próprio Urban tenha duvidado desta classificação. Decorridos oito anos e após o surgimento do gênero, esta espécie foi reclassificada como *C. solmsii*, tendo sido descrita ainda uma nova espécie, *C. parviflora* (Urban, 1909, citado por Badillo, 1971).

**Horovitzia:** o mais recente, criado por Badillo em 1993. A espécie *Carica cnidoscoloides* foi inicialmente classificada dentro de *Carica*, seção *Holostigma*, por Lorence e Torres em 1988. Mais tarde, esta seção foi elevada à categoria de gênero e renomeada por Badillo, de forma que atualmente sua única espécie é classificada como *H. cnidoscoloides*.

Atualmente ainda há divergências quanto à classificação das espécies como *Carica* ou *Vasconcellea*. Devido ao grande número de informações existentes na literatura, estes dois gêneros serão um pouco mais detalhados neste trabalho.

Como já mencionado, *Vasconcellea* foi criado por St. Hilaire em 1837, como um gênero da família Caricaceae. Esta classificação foi seguida por Alphonse de Candolle, embora em sua obra, *Prodromus Systematis Naturalis* de 1864, o autor tenha considerado a família como Papayaceae e a existência dos gêneros *Papaya* (o qual corresponderia a *Carica*) e *Vasconcellea*, sendo este último subdividido nas seções *Hemipapaya* e *Euvasconcellea*.

Esta classificação foi mantida até 1889, quando Solms, em sua obra *Flora Brasiliensis*, voltou a utilizar *Carica* em sentido amplo, de forma que as espécies de *Vasconcellea* definidas até então foram transferidas para o gênero *Carica* e sub-agrupadas nas seções *Eupapaya*, *Hemipapaya* e *Vasconcellea*. A diferença entre elas baseava-se na forma dos estigmas e também no número de locos do ovário. Assim, as espécies reunidas na seção *Eupapaya* apresentavam ovário unilocular; em *Hemipapaya*, ovário pentalocular e estigma multipartido; e em *Vasconcellea*, ovário pentalocular e estigma não dividido. Este critério foi seguido por diversos pesquisadores, até que em 1971, Badillo, revisando os critérios de definição para o estabelecimento das seções, verificou que havia grande variabilidade intraespecífica em relação ao formato de estigmas, de forma que este aspecto não deveria ser considerado para defini-las. Assim, as seções *Hemipapaya* e *Vasconcellea* foram reunidas em uma única (*Vasconcellea*), e *Eupapaya* foi denominada *Carica*, diferenciando-se apenas pelo número de lóculos do ovário, penta e unilocular, respectivamente.

Em 2000, Badillo promoveu a reabilitação de *Vasconcellea* à categoria de gênero, com base não apenas em características morfológicas e taxonômicas, mas também em dados moleculares (Badillo, 2000). Desta forma, o gênero *Carica* é atualmente monoespecífico, composto apenas pela espécie *C. papaya*,

enquanto *Vasconcellea*, que compreende 21 espécies, é o maior dentro da família *Caricaceae* (Badillo, 2000, 2001).

## 2.2. Origem e distribuição geográfica

A família *Caricaceae* tem como principal centro de origem o continente americano, com maior distribuição na América do Sul, onde são encontradas espécies dos gêneros *Vasconcellea*, *Carica* e *Jacaratia*.

Segundo Badillo (1971), a grande maioria das espécies de *Vasconcellea* concentra-se e distribui-se na vertente oriental dos Andes, sendo a maior concentração na Bacia Amazônica Superior, sudeste da Bolívia até a Venezuela, passando pelo Peru e Equador. Este último, por conter pelo menos 15 das 21 espécies descritas, é considerado centro de diversidade das mesmas (Van Droogenbroeck *et al.*, 2004).

Quanto ao gênero *Carica*, mais especificamente *C. papaya*, existem controvérsias. De acordo com a hipótese de Candolle (1908), o mamoeiro teria se originado de um ancestral de frutos pequenos na América Central, sendo este, então, seu centro de origem e domesticação. Badillo (1993) acredita que o provável centro de origem dessa espécie é o sul do México e norte da América Central. Ele descarta a possibilidade do centro de origem de *C. papaya* ser as Antilhas, uma vez que outros materiais descritos, provenientes da América Central e das Antilhas que apresentavam ovários uniloculares, eram, na verdade, a própria espécie *C. papaya*. Outro dado que dá suporte a esta hipótese é que a ocorrência de ovário unilocular é reportada em outros dois gêneros, *Jarilla* e *Horovitzia*, originários também do México e América Central (Badillo, 1993).

O gênero *Jacaratia* tem como centro de origem a América do Sul e é formado por sete espécies arbóreas. Possui distribuição ampla, desde o México até o norte da Argentina. A espécie *J. spinosa* ocorre desde a Nicarágua até o norte da Argentina. Outras espécies como *J. heptaphylla* só são encontradas no Brasil, nas regiões de Mata Atlântica, enquanto *J. corumbensis*, espécie bastante adaptada à escassez hídrica, está circunscrita ao sul da Bolívia e às regiões de fronteira entre Brasil, Paraguai e norte da Argentina (Badillo, 1971).

*Jarilla* tem o México como centro de origem, embora algumas espécies sejam encontradas também na Guatemala (Badillo, 1971). Já *Horovitzia* tem sua única espécie nativa do México. Apenas *Cylicomorpha* é de origem africana (Urban, 1901, citado por Badillo, 1971), e estudos recentes sugerem que este pode ser o tipo primitivo que teria originado os demais gêneros (Olson, 2002; Kyndt *et al.*, 2005a)

O Quadro 1 resume a mais recente classificação taxonômica da família *Caricaceae*, em níveis genérico, específico e infraespecífico, bem como os principais locais de ocorrência das 35 espécies conhecidas. Essa nomenclatura será seguida ao longo deste trabalho.

Quadro 1 - Classificação botânica de Caricaceae e principais áreas de ocorrência das espécies

GÊNEROS	ESPÉCIES	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS DE OCORRÊNCIA
<i>Cylicomorpha</i>	<i>C. parviflora</i>	África Oriental (Tanzânia, Malawi e Quênia)	Regiões tropicais e subtropicais úmidas, 600-2.200 m
	<i>C. solmsii</i>	África Ocidental (Camarões, Nigéria, Congo e República Centroafricana)	Bosques tropicais úmidos
<i>Jacaratia</i>	<i>J. heptaphylla</i>	Brasil (RJ, SP, MG e BA)	Bosques tropicais úmidos, 0-900 m
	<i>J. digitata</i>	Oeste e sul da Bacia Amazônica: Colômbia, Equador, Peru, Brasil e Bolívia	Bosques tropicais quentes e úmidos, terras não-inundáveis, 100-700 m
	<i>J. spinosa</i>	Norte da Argentina até a Nicarágua, exceto Venezuela e Colômbia	Bosques úmidos tropicais, às vezes com grande estação seca, 0-1.300 m
	<i>J. corumbensis</i>	Sudeste da Bolívia, Paraguai, norte da Argentina e parte do sudoeste do Brasil	Zonas tropicais, ambientes xerófilos e terras arenosas, 300-1.000 m
	<i>J. dolichaula</i>	Sul do México até o Panamá	Bosques tropicais úmidos, 0-1.000 m
	<i>J. chocoensis</i>	Colômbia (Chocó)	Bosques muito úmidos, 600-800 m
	<i>J. mexicana</i>	México, Nicarágua e El Salvador	Terras aluviais e barrancas, 0-1.400 m
	<i>J. caudata</i>	México	1.500-1.900 m
<i>Jarilla</i>	<i>J. heterophylla</i>	México	1.500-2.700 m
	<i>J. chocola</i>	México e Guatemala	Regiões de vegetação xerófila e hemixerófila

Quadro 1; cont.

	<i>V. pulchra</i>	Vertente ocidental andina do Equador	Margens de bosques úmidos subtropicais, 1.800-2.000 m
	<i>V. stipulata</i>	Região centro-sul do Equador e norte do Peru	Solos bem drenados, inclinados e freqüentemente pedregosos, climas montanhosos temperados a secos, ocorrendo as vezes em bosques
		var. <i>fructifragrans</i> : Equador e Colômbia	Crescem em altitudes entre 1.600-2.800 m
	<i>V. x heilbornii</i>	var. <i>chrysopetala</i> : Equador	
		cv. <i>babaco</i> : Equador	
	<i>V. parviflora</i>	Vertente andina do pacífico, ao sul do Equador e noroeste do Peru	Solos secos ou muito secos, quase desérticos e também em selvas de transição, 0-1.800 m
<i>Vasconcellea</i>	<i>V. cundinamarcensis</i>	Andes: Colômbia e Venezuela até a Bolívia	Climas temperados, 1.500-3.000m
	<i>V. weberbaueri</i>	Zona subtropical andina do norte do Peru	Bosques subtropicais úmidos
	<i>V. goudotiana</i>	Colômbia	Bosques úmidos subtropicais, 1.500-2.200 m
	<i>V. monoica</i>	Equador, Peru e Bolívia	Regiões úmidas e sombreadas, 600-1.700 m
	<i>V. horovitziana</i>	Zona tropical baixa do Equador	Bosques tropicais úmidos
	<i>V. chilensis</i>	Região centro-ocidental do Chile	Colinas arenosas ou sítios escarpados, xerófilos, freqüentemente próximas à costa marítima

Quadro 1; cont.

	<i>V. glandulosa</i>	Vertente oriental dos Andes, desde o norte do Peru até o centro-oeste do Brasil, Bolívia e Argentina	Bosques tropicais e subtropicais úmidos, 300-2.800 m
	<i>V. candicans</i>	Norte a sul do Peru	Sítios medianamente secos, encostas ou sítios pedregosos descobertos, ascendendo na vertente ocidental até 3.000 m
	<i>V. quercifolia</i>	Sul do Peru, norte da Argentina, Brasil (BA, MG, RS, PR, RJ, SC e SP), Bolívia, Paraguai e Uruguai	Bosques úmidos, também em formações xerófitas e em montanhas altas
	<i>V. crassipetala</i>	Colômbia	Bosques subtropicais úmidos
	<i>V. cauliflora</i>	Sul do México até o Norte da América do Sul, incluindo a Ilha de Trinidad e Tobago	Selvas tropicais úmidas ou de transição, 0-1.200 m
<i>Vasconcellea</i>		subsp. <i>microcarpa</i> : Venezuela, Colômbia, Panamá, Equador, Peru, Brasil (AC, AM, MG, PA, RO) e Guiana Francesa	
	<i>V. microcarpa</i>	subsp. <i>pilifera</i> : Venezuela Ocidental	Bosques subtropicais úmidos, 1.200-2.400 m
		subsp. <i>baccata</i> : Equador Ocidental	Regiões tropicais úmidas, 0-800 m
		subsp. <i>australis</i> :	
		subsp. <i>heterophylla</i> :	
	<i>V. longiflora</i>	Colômbia	Selvas subtropicais úmidas, 1.000-2.000 m

Quadro 1; cont.

	<i>V. palandensis</i>	Equador	Florestas úmidas de montanha, 1.790-1.850 m
	<i>V. sprucei</i>	Andes orientais do Equador	Margens de bosques úmidos subtropicais, 1.300-2.400 m
<i>Vasconcellea</i>	<i>V. sphaerocarpa</i>	Cordilheira oriental e ocidental colombiana	Selvas ou bordas de selvas úmidas subtropicais, 700-2.440 m
	<i>V. omnilingua</i>	Equador	Bosques subtropicais úmidos, 1.800-2.000 m
<i>Carica</i>	<i>C. papaya</i>	Toda a América tropical	Solos bem drenados, 0-1.550 m
<i>Horovitzia</i>	<i>H. cnidoscoloides</i>	Sul do México	Florestas nubladas, cerca de 1.250 m

Adaptado de Badillo (1971, 1993, 1999 e 2001).

### 2.3. Considerações econômicas e usos

De todas as espécies existentes na família, apenas *C. papaya* possui importância comercial significativa. Países como Brasil, México, Nigéria, Indonésia e Índia são os principais produtores de mamão. No Brasil, o mamoeiro merece destaque por representar uma das principais fruteiras de exportação e movimentar cerca de 780 milhões de reais em volume de negócios (IBGE, 2006). Seu cultivo concentra-se na microrregião do extremo sul da Bahia e na região norte do Espírito Santo, consideradas as maiores regiões produtoras brasileiras.

As variedades de mamoeiro são classificadas em dois grupos: Solo e Formosa. O grupo Solo, no qual se encontra a maioria das cultivares utilizadas no mundo, apresenta frutos cujo peso médio varia entre 350 e 600 g. No Brasil, predomina o plantio das cultivares *Sunrise Solo* e *Improved Sunrise Solo cv. 72/12* cujas produtividades médias anuais são de 45 e 40 t/ha, respectivamente (EMBRAPA, 2005). A cultivar *Golden*, também do grupo Solo, embora com produtividade inferior às demais do grupo, é tolerante à mancha fisiológica do mamoeiro, o que a torna, atualmente, a cultivar de maior aceitação no mercado internacional.

O grupo Formosa abrange híbridos  $F_1$  desenvolvidos pela Estação Experimental de Fengshan, em Formosa, como o *Tainung 01* e o *Tainung 02*, além das cultivares *Tailândia*, *JS11* e *JS12*, selecionadas pela Estação Experimental de Fruticultura Tropical da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA), em Conceição do Almeida, na Bahia (Farias *et al.*, 1998). O *Tainung 01*, dentre os materiais desse grupo, é o mais amplamente cultivado no Brasil e apresenta produtividade média anual de 60 t/ha. O peso médio dos frutos varia entre 800 e 1.100 g (EMBRAPA, 2005).

Em 1995, a Uenf, em parceria com a empresa Caliman Agrícola, deu início a um programa de melhoramento para mamoeiro e, em 2002, surgiram os primeiros resultados: nove híbridos de mamoeiro foram registrados (Pereira, 2003), o que pode representar uma economia de aproximadamente dois milhões de dólares por ano, valor este gasto na importação de sementes do híbrido *Tainung 01*, de Taiwan. Esses híbridos têm se mostrado superiores ao *Tainung 01* quanto às características do fruto: melhor sabor, maior teor de sólidos solúveis (mais doces), melhor coloração de polpa e maior uniformidade de frutos, atingindo melhor

proporção de frutos exportáveis. Além disto, têm apresentado produtividade semelhante ao material importado (Pereira, 2003).

Quanto às espécies de *Vasconcellea*, algumas têm utilização apenas local. *V. heilbornii* cv. *babaco* é consumida sob a forma de doce, bem como *V. cundinamarcensis*, em regiões andinas desde a Venezuela até a Bolívia. *V. goudotiana* tem seu uso bastante difundido na Colômbia, na elaboração de sucos e refrescos (Badillo, 1971), bem como *V. crassipetala* (Badillo, 1993).

*V. heilbornii* cv. *babaco* foi introduzida na década de 70 na Nova Zelândia, depois Austrália, Itália, Espanha, França, África do Sul, Suíça e Canadá, onde é cultivado em casas de vegetação, em pequenas produções de ordem comercial (Scheldeman *et al.*, 2003). A propagação de plantas femininas é feita por estacas.

*V. parviflora*, espécie de frutos pequenos, mas de sabor agradável, flores de cores fortes e alto teor de papaína, é cultivada como planta ornamental, bem como *V. monoica*, que, além deste uso, pode ter seus frutos consumidos sob a forma de conservas (Badillo, 1993). *V. candicans* também possui frutos comestíveis, podendo ser obtidos nos mercados locais do Equador e Peru (Badillo, 1993). Há ainda relatos sobre o consumo *in natura* de frutos de *V. quercifolia* e *V. sphaerocarpha*.

Estudos preliminares sugerem que *V. stipulata* tenha um teor de papaína maior que o de *C. papaya* (cerca de 20 vezes), o que pode resultar em sua utilização pela indústria farmacêutica (Scheldeman *et al.*, 2003).

## 2.4. Citogenética

Os primeiros relatos sobre análises citogenéticas em espécies de Caricaceae datam de 1921 e foram realizados por Heilborn, que estudou as espécies *V. cundinamarcensis*, *V. heilbornii* cv. *babaco*, *V. heilbornii* var. *chrysopetala* e *C. papaya*. Posteriormente, *V. cauliflora* foi estudada por Storey (1941), *J. spinosa*, por Kumar e Srinivasan (1944), *V. quercifolia*, por Ammal e Darlington (1955), e *V. monoica*, *V. goudotiana* e *V. microcarpa* subsp. *microcarpa*, por De Zerpa (1959), todos eles chegando a um denominador comum: de que todas as espécies analisadas eram diplóides, com  $2n=2x=18$  cromossomos (citados por Badillo, 1971).

Kumar *et al.* (1945) descreveram a citologia de *C. papaya*, especialmente a meiose, relatando a homogeneidade cromossômica entre materiais provenientes de plantas femininas, masculinas e hermafroditas. Foi observada separação anafásica precoce de um bivalente particular, em células oriundas de plantas masculinas. Este evento pode estar relacionado à ocorrência de um par heteromórfico, embora não tenham sido observadas quaisquer relações entre a expressão sexual e diferenças morfológicas visíveis entre cromossomos autossomos e sexuais.

Segundo Datta (1971), que estudou o cariótipo de cinco variedades de mamoeiro, não houve variação no número de pares cromossômicos, nove no total, porém foram observadas pequenas diferenças entre as variedades, principalmente em relação ao comprimento total do lote haplóide e número de constrições secundárias. Os cromossomos foram descritos como pequenos, com comprimentos mínimos e máximos de 1,0 e 4,25  $\mu\text{m}$ , respectivamente, entre as variedades, embora a diferença intravarietal tenha sido pequena. Pela posição do centrômero, os cromossomos foram classificados como meta e submetacêntricos, tendo sido observadas constrições secundárias em três, quatro ou cinco pares cromossômicos, inclusive constrições supernumerárias, nas diferentes cultivares. Não foram verificados pares heteromórficos, cromossomos não pareados ou mesmo pedaços extras de cromatina, o que, de acordo com o autor, sugere que fatores responsáveis pela determinação sexual estão no citoplasma e não no núcleo, embora não existam indícios que dêem suporte a esta hipótese.

Em trabalho recente, Damasceno Junior *et al.* (2008), analisando a citogenética de *C. papaya*, *V. monoica* e *V. cundinamarcensis*, demonstraram que a variação no tamanho dos cromossomos entre e dentro destas espécies é bastante pequena, tendo sido encontrados valores de 17,18; 17,11 e 18,69  $\mu\text{m}$  para os respectivos lotes haplóides. Com base nos índices centroméricos e na razão entre braços, todos os cromossomos das três espécies estudadas foram classificados como metacêntricos, sendo bastante difícil distingui-los apenas com base em sua morfologia, bastante similar.

## 2.5. Sistemas reprodutivos

Com exceção de *V. monoica*, *V. cundinamarcensis* e *C. papaya*, que são monóica, monóico-dióica e dióico-hermafrodita respectivamente, as demais espécies da família são dióicas, com casos de anormalidades excepcionais e esporádicas, nas quais pode ocorrer o desenvolvimento de ovário em flores masculinas, como constatado em *V. sprucei*, *V. candicans*, *Jacaratia spinosa*, *J. digitata*, *V. microcarpa* subsp. *microcarpa*, *V. stipulata*, dentre outras (Badillo, 1971).

Pelo conceito clássico, ocorre em Caricaceae o mesmo que em outras famílias de angiospermas: flores unissexuais seriam resultantes de um processo evolutivo pelo qual flores completas ou bissexuais teriam uma de suas partes sexuais, masculinas ou femininas, alterada por perda de função, redução de tamanho ou até mesmo aborto completo dela (Ainsworth, 2000). Embora esse evento possa ser reconhecido em flores masculinas pela presença do pistilódio, ou seja, um pistilo abortado ou não funcional, não são encontrados quaisquer vestígios do sexo masculino em flores femininas das espécies dessa família (Badillo, 1971). Deste modo, todas as flores que se diferenciam das tipicamente descritas quanto à expressão sexual parecem ter se formado sempre a partir de flores masculinas, já que as femininas não diferem do padrão típico.

Em *C. papaya*, este controle sexual é um pouco mais complexo. De acordo com Storey (1941), cinco tipos florais podem ser encontrados:

**Flores femininas:** unissexuais, pistilo pentacarpelado, ausência de parte masculina;

**Flores pentândrias:** bissexuais, cinco estames pequenos, pistilo semelhante ao anterior, porém profundamente sulcado, por onde são distribuídos os estames;

**Flores carpelóides:** bissexuais, dois a 10 estames com estruturas semelhantes a carpelos, em diferentes níveis de intensidade, pistilos freqüentemente distorcidos, cinco a 10 carpelos, normalmente mal fusionados;

**Flores alongatas (hermafroditas típicas):** bissexuais, com duas séries de cinco estames cada uma, pistilo normalmente pentacarpelado, podendo, no entanto, variar de um a 10. Em alguns casos, anteras e estigmas localizam-se numa mesma altura, o que pode permitir a ocorrência de autofecundação, porém,

as anteras podem se localizar abaixo do estigma, reduzindo as chances de que este processo ocorra. Recentemente, Damasceno Junior (2004), com base na relação pólen/óvulo e por meio de estudos de viabilidade polínica e receptividade do estigma antes e depois da antese em flores hermafroditas, verificou que o mamoeiro pode, de fato, apresentar cleistogamia, sendo a cultivar *Golden* classificada como autógama facultativa e o híbrido *Tainung 01* simultaneamente classificado como autógamo e alógamo facultativo. Nesse tipo floral existe uma variante, a *elongata+*, que se diferencia da *elongata* normal apenas pela presença de um pistilo não funcional, mas que estruturalmente é bastante distinta do tipo masculino, sendo considerada um intermediário entre ambos;

**Flores masculinas:** unissexuais, pistilo rudimentar e ausência de estigmas. Por não possuírem a porção feminina, são incapazes de produzir frutos.

De acordo com Hofmeyr (1939) e Storey (1941), podem ocorrer alterações nos tipos florais, causadas principalmente por fatores genéticos e ambientais. A amplitude dessa transição de sexos é dependente da variedade, idade da planta e do ambiente (Storey, 1941). A reversão sexual ocorre principalmente no tipo hermafrodita. Sua transição em direção às formas mais femininas é induzida por condições favoráveis de crescimento, enquanto condições desfavoráveis, incluindo o aumento de temperatura (Storey, 1941), fazem com que esta transição tenda para o lado masculino (Hofmeyr, 1939). Já a frutificação de plantas masculinas, ou seja, a reversão da forma masculina para a hermafrodita, ocorre de maneira abundante em climas frios, fora dos trópicos e em locais de altitude elevada (Storey, 1941). Embora existam relatos sobre a ocorrência de reversão sexual em flores femininas, este fenômeno, além de muito raro, ocorre em pequena intensidade, não chegando a ocorrer uma transformação completa em outro tipo floral. Neste sentido, as flores femininas são consideradas as mais estáveis em termos de reversão sexual; as masculinas, intermediárias, enquanto as hermafroditas são as mais instáveis quanto a esta característica (Hofmeyr, 1939).

Storey (1969) propõe que a unissexualidade das flores em Caricaceae, mais especificamente em *C. papaya*, representa um desvio parcial do conceito tradicional. Ele sugere que tanto as flores femininas quanto as masculinas teriam evoluído a partir do tipo *hermafrodita elongata*, porém em duas linhas divergentes, culminando nas formas tipicamente conhecidas. Assim, *elongata* seria o tipo

primitivo de flor nesta espécie. A derivação de flores estaminadas seguiria o conceito clássico, ou seja, perda progressiva do gineceu, porém sem afetar a estrutura da flor ou o arranjo de outros órgãos florais. Já a derivação de flores femininas seria bem mais complexa, com uma série de modificações morfológicas sucessivas em que flores alongadas passariam a carpelóides, as quais seriam transformadas em pentândrias, e estas últimas, finalmente, em pistiladas.

Ronse Decraene e Smets (1999) contradizem esta teoria demonstrando que o desenvolvimento de flores masculinas e femininas inicia-se de forma semelhante em ambos os casos, diferindo significativamente a partir da iniciação dos estames. Outros resultados, baseados na ontologia floral e vascular, sugerem não ser possível a transformação de flores pentândrias em pistiladas, embora os autores tenham analisado apenas com flores unissexuais típicas.

Considerando todos os aspectos supracitados, as plantas de mamoeiro podem ser então classificadas, de um modo geral, como femininas, masculinas ou hermafroditas, de acordo com os tipos florais predominantes nelas. Desta forma, embora a espécie *C. papaya* seja descrita muitas vezes como dióica, a ocorrência de flores bissexuais e conseqüentemente de plantas hermafroditas torna as classificações dióico-hermafrodita ou ainda, segundo Storey (1941), polígama mais apropriadas.

A razão para esse panorama polimórfico observado no mamoeiro está em seu patrimônio genético e no impacto sobre este de fatores externos. Neste sentido, estudos sobre a herança de caracteres e a determinação sexual dessa espécie podem ser bastante esclarecedores. A existência de um balanço gênico na determinação do sexo em *C. papaya* pode explicar não apenas a existência dos genótipos letais, mas também o grau de estabilidade floral da espécie.

De acordo com Hofmeyr (1938) e Storey (1938), a determinação sexual em mamoeiro é controlada por um gene, com três formas alélicas,  $M_1$ ,  $M_2$  e  $m$ . Assim, genótipos  $mm$ ,  $M_1m$ , e  $M_2m$ , resultam em plantas femininas, masculinas e hermafroditas respectivamente, enquanto que os genótipos  $M_1M_1$ ,  $M_2M_2$  e  $M_1M_2$  são letais zigóticos. O alelo  $M_1$  apresenta uma região inativada, um pouco maior que a do alelo  $M_2$ , e a ausência de genes vitais nestas regiões resultaria na eliminação dos indivíduos  $M_1M_1$ ,  $M_1M_2$  e  $M_2M_2$ , enquanto que  $M_1m$  e  $M_2m$  seriam viáveis em função da presença do alelo  $m$  (Hofmeyr, 1941).

Os primeiros passos para o estabelecimento de um mapa de ligação no mamoeiro foram dados por Hofmeyr (1939), que identificou três locos ligados: cor de flor, cor do caule e sexo. Quase 60 anos depois, um novo mapa, baseado em 62 marcas RAPD foi criado, no qual foi identificado o loco *SEX1*, responsável pela determinação sexual, no grupo de ligação I (GL1) (Sondur *et al.*, 1996). Estes autores propuseram ainda que *SEX1-M* regularia o desenvolvimento das partes florais masculinas e inibiria a formação de carpelos. Já *SEX1-H* seria intermediário, induzindo a formação da parte masculina, mas, ao contrário do primeiro, apenas reduziria o tamanho dos carpelos, mantendo-os funcionais. O alelo *sex1-f* não seria capaz de induzir a formação de partes masculinas, porém, uma região funcional presente apenas nele seria a responsável pela viabilidade das formas heterozigotas que a contêm e letalidade das formas dominantes, uma vez que nos alelos *SEX1-H* e *SEX1-M* esta região vital teria sido deletada. Em 2004, um mapa genético de alta densidade baseado em marcas AFLP foi gerado, no qual foram identificados 12 grupos de ligação, tendo sido confirmada a posição do loco sexual no GL 1 e ainda localizadas as marcas para capa protetiva do PRSV-P e para cor de polpa no GL 7 (Ma *et al.*, 2004).

Não existem relatos sobre a existência de cromossomos heteromórficos ou não pareados, o que é esperado em espécies que possuem cromossomos sexuais desenvolvidos. De acordo com a proposta de Hofmeyr (1941), no mamoeiro não ocorreria recombinação genética dentro das regiões inertes dos cromossomos  $M_1$  e  $M_2$ , o que manteria a identidade destes alelos, e essa inibição de recombinação seria uma das etapas evolutivas para o heteromorfismo em cromossomos sexuais, hipótese a qual foi recentemente corroborada por Liu *et al.* (2004).

A classificação de *V. cundinamarcensis* também é complexa. Sua sexualidade manifesta-se de maneira diferenciada, sendo encontradas plantas contendo exclusivamente flores femininas, dispostas em inflorescências curtas; plantas masculinas, com inflorescências masculinas que podem se contraídas, curto-pedunculadas, largas ou largo-pedunculadas; e também plantas monóicas, porém com flores hermafroditas incompletas. Assim sendo, essa espécie é definida como monóico-dióica.

Nas plantas monóicas, as inflorescências são bissexuais, de formato curto-pedunculado ou contraído, sendo compostas, em sua grande maioria, por

flores masculinas, ocorrendo também flores femininas terminais, nas quais pode ser observado um ou dois estames; e, neste caso, geram frutos deformados, assemelhando-se às flores carpelóides em mamoeiro. Segundo Badillo (1971), estas plantas são, na verdade, masculinas, cujas inflorescências podem apresentar diversos graus de masculinidade. Esta “reversão” pode ocorrer em maior ou menor frequência, dependendo da população de onde provém o material. Há relatos ainda sobre o desaparecimento completo das flores femininas em determinadas épocas do ano.

De acordo com a hipótese de Horovitz e Jimenez (1972), a planta monóica pode passar por períodos de alta feminilidade e alta masculinidade, os quais são definidos pela proporção de flores femininas ou masculinas encontradas, respectivamente, numa mesma inflorescência. Essa condição seria resultante da interação entre o cromossomo sexual  $Y^{pm}$  e um citoplasma  $pm$ . Outras espécies de *Vasconcellea* possuiriam este tipo de citoplasma, no entanto, apenas *V. cundinamarcensis* teria o cromossomo  $Y^{pm}$ . Por exemplo, no cruzamento entre *V. monoica*, que não possuiria este citoplasma, e *V. cundinamarcensis*, metade dos indivíduos  $F_1$ s foi identificada como feminina e a outra metade, masculina, não sendo observada a ocorrência de plantas monóicas. No cruzamento recíproco, todas as plantas foram femininas. Contudo, quando foram cruzadas *V. stipulata* e *V. cundinamarcensis*, dos híbridos formados havia apenas plantas femininas e monóicas. Neste caso, o progenitor feminino utilizado tem um alto poder feminilizante. Por outro lado, ao se utilizarem *V. cundinamarcensis* como progenitor feminino e outras espécies como doadoras de  $Y$ , verificou-se que em nenhum destes cruzamentos ocorreram plantas monóicas, apenas masculinas e femininas. Assim, pode-se dizer que em *V. cundinamarcensis*, plantas femininas teriam uma constituição  $XX$ , masculinas  $XY^{pm}$  e hermafroditas  $X^{pm}Y^{pm}$ . Mais tarde, houve uma modificação nesta teoria, a qual sugeria que a expressão sexual do cromossomo  $Y^{pm}$  era influenciada por genes autossômicos, variando entre alta feminilidade, alta masculinidade e bissexualidade equilibrada. De Zerpa (1980), estudando o comportamento meiótico de híbridos  $F_1$ ,  $RC_1$  e  $RC_2$  entre *V. stipulata* e *V. cundinamarcensis*, corroborou a existência do cromossomo  $Y^{pm}$ , que foi transferido com sucesso à *V. stipulata*, tendo-se comportado como um homólogo de  $X^{st}$  durante a meiose e

conduzido a ocorrência de bissexualidade nesta espécie, que é estritamente dióica.

A espécie *V. monoica* é assim classificada por possuir flores femininas e masculinas na mesma inflorescência. Cada inflorescência normalmente apresenta uma ou duas flores femininas, cercadas por flores masculinas. Ocasionalmente, podem ocorrer flores hermafroditas incompletas pela transformação de estames em carpelos, os quais, às vezes, mal formados, podem conter, por exemplo, óvulos descobertos (Badillo, 1971). É a única espécie de Caricaceae que possui a monoicia estrita como sistema reprodutivo. De acordo com Horovitz e Jimenez (1972), as plantas de *V. monoica* seriam designadas de constituição ZZ.

## **2.6. Relações genômicas entre as espécies**

Grande parte da diversidade existente nos organismos vivos deve-se, em última análise, à variabilidade existente nos genes, tanto nucleares quanto de organelas. Com os recentes avanços tecnológicos, diversos métodos vêm sendo utilizados para um melhor entendimento sobre a organização e o funcionamento destes genomas, gerando conhecimento fundamental para o desenvolvimento de pesquisas básicas e aplicadas.

A utilização de análises citogenéticas e moleculares para o estudo dos genomas tem-se mostrado de grande utilidade para o entendimento da evolução, da genética e da estabilidade cariotípica dos indivíduos. Nos últimos anos, técnicas de alto nível tecnológico e grande poder informativo, como a citometria de fluxo, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH), e diversos tipos de marcadores moleculares têm-se destacado, embora outras, menos elaboradas, tais como a cariotipagem convencional, ainda sejam utilizadas rotineiramente nos laboratórios devido a sua importância. Desta forma, será apresentada abaixo uma breve revisão sobre o uso dos principais métodos aplicados no estudo da família Caricaceae e também os que foram desenvolvidos na presente tese.

### 2.6.1. Hibridação interespecífica e intergenérica

A hibridação interespecífica é um dos métodos mais usados para transferir genes de interesse de espécies silvestres para espécies cultivadas. No caso da família Caricaceae, muitas espécies silvestres relacionadas ao mamoeiro são intercompatíveis, podendo ser cruzadas e produzir híbridos com vários graus de fertilidade (Badillo, 1971). Essa transferência permite a combinação do potencial genético das espécies e também a introgressão de novos genes de interesse em variedades cultivadas. Desta maneira, complementam-se as características comerciais da espécie cultivada com um ou mais fatores desejáveis provenientes dos materiais silvestres.

Muitas espécies de Caricaceae possuem características desejáveis que podem ser usadas em programas de melhoramento e ser introgrididas em *C. papaya*. As espécies *V. cundinamarcensis*, *V. candicans*, *V. stipulata*, *V. cauliflora* e *V. quercifolia* são resistentes ao PRSV-P (Malaguetti *et al.*, 1957; Ricelli, 1963; Horovitz e Jimenez, 1967; Alvizo e Rojkind, 1987); *V. goudotiana* apresenta resistência a *Phytophthora*; *V. weberbaueri*, a *Fusarium* e *Meloidogyne* (Scheldeman *et al.*, 2003), e *V. parviflora*, a micoplasmas (Drew *et al.*, 1998). Além disso, *V. cundinamarcensis* e *V. stipulata* são tolerantes ao frio (Manshardt e Wenslaff, 1989) e *V. quercifolia* possui alto teor de açúcar (Drew *et al.*, 1998).

Diferentes níveis de compatibilidade são relatados em cruzamentos dentro do gênero *Vasconcellea*. No entanto, essa compatibilidade é quase nula no que se refere a cruzamentos envolvendo a espécie *C. papaya* (Warmke *et al.*, 1954; Jimenez e Horovitz, 1958; Sawant, 1958; Horovitz e Jimenez, 1967, 1972; Mekako e Nakasone, 1975; De Zerpa, 1980; Manshardt e Wenslaff, 1989; Drew *et al.*, 1998).

Jimenez e Horovitz (1958), com base na cruzabilidade de seis espécies da família Caricaceae, separaram-nas em três grupos distintos: o primeiro, com as espécies *V. monoica*, *V. cauliflora*, *V. microcarpa* e *V. cundinamarcensis*, todas intercruzáveis entre si; o segundo, contendo apenas *C. papaya*; e o terceiro, com a espécie *V. goudotiana*. O cruzamento entre os grupos 1 e 2 não formam sementes maduras, mas, em alguns casos, por meio da cultura de embriões imaturos, algumas plantas foram obtidas. Cruzamentos entre os grupos 2 e 3 não foram bem sucedidos.

Mekako e Nakasone (1975), também trabalhando com cruzamentos interespecíficos e intergenéricos, obtiveram resultados que variaram desde a obtenção de frutos com sementes viáveis, passando por frutos com sementes inviáveis, frutos partenocárpicos, até a ausência total de frutos, isto é, não-pegamento dos cruzamentos. Foi observada ainda a ocorrência de heterose nos F<sub>1</sub> resultantes dos cruzamentos entre *V. cauliflora* e *V. monoica* e entre *V. goudotiana* e *V. monoica*. Ainda no primeiro cruzamento, verificou-se que o híbrido era resistente ao PRSV-P, semelhantemente ao seu progenitor materno.

As barreiras de pré-fertilização podem resultar do retardamento ou inibição do crescimento do tubo polínico e da falta de germinação dos grãos de pólen. Após a fertilização, as principais barreiras são a morte do embrião, devido à degeneração do endosperma, e a esterilidade total ou parcial das plantas híbridas. No caso de alguns cruzamentos interespecíficos em *Vasconcellea* e principalmente em cruzamentos intergenéricos envolvendo *C. papaya* e espécies de *Vasconcellea*, o principal problema é o aborto de embrião, causado pelo não-desenvolvimento do endosperma (Jimenez e Horovitz, 1958; Manshardt e Wenslaff, 1989; Magdalita *et al.*, 1997; Drew *et al.*, 1998), o que tem limitado o sucesso na obtenção de híbridos.

De acordo com Mahaewaran *et al.* (1986), um dos mais importantes avanços no melhoramento de plantas é a quebra de barreiras interespecíficas e intergenéricas. Para tal, várias técnicas vêm sendo utilizadas, tais como resgate de embrião, regeneração de plantas a partir de calos de embriões, cultivo de sementes imaturas, misturas de pólen, seleção de linhagens de plantas silvestres compatíveis com as cultivadas, cruzamentos-ponte, dentre outras.

Através da hibridação interespecífica, associada ao resgate de embrião, tem se conseguido, com relativo sucesso, a introgressão de alguns genes de interesse no mamoeiro, especialmente o gene de resistência ao PRSV-P (Chen *et al.*, 1991; Magdalita *et al.*, 1996; Manshardt e Drew, 1998; Drew *et al.*, 1998). Foram obtidos híbridos interespecíficos entre *C. papaya* e *V. cauliflora* por meio de cruzamento e posterior resgate de embrião (Magdalita *et al.*, 1996). Drew *et al.* (1998) também obtiveram híbridos entre *C. papaya* e espécies silvestres de *Vasconcellea* como *V. quercifolia*, *V. cundinamarcensis*, *V. goudotiana* e *V. parviflora*, no entanto, vários deles apresentaram baixo vigor e não sobreviveram ao transplantio para o campo.

A espécie *V. x heilbornii* parece ser um híbrido interespecífico natural, originado na região centro-sul do Equador, onde seus prováveis progenitores, *V. stipulata* e *V. cundinamarcensis*, crescem em altitudes entre 1.600-2.800 m (Horovitz e Jimenez, 1967; Badillo, 1971, 1993). Atualmente, são conhecidas duas variedades e uma cultivar dessa espécie: *V. x heilbornii* cv *babaco*, *V. x heilbornii* var. *chrysopetala* e *V. heilbornii* var. *fructifragrans*. Esses híbridos apresentam um certo grau de partenocarpia e podem ser propagados vegetativamente (Badillo, 1993).

### 2.6.2. Marcadores moleculares

Estudos sobre as relações genéticas entre a espécie cultivada e espécies silvestres relacionadas, através do RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) e isoenzimas (Moore e Litz, 1984; Jobin-Decor *et al.*, 1997), RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) (Aradhya *et al.*, 1999; Van Droogenbroeck *et al.*, 2004), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) (Kim *et al.*, 2002; Van Droogenbroeck *et al.*, 2002; Kyndt *et al.*, 2005b), SSR (*simple sequence repeat*) (Kyndt *et al.*, 2006) e ITS (*internal transcribed spacer*) (Olson, 2002; Kyndt *et al.*, 2005a) têm demonstrado uma ampla distância genética entre *Carica* e *Vasconcellea*. Alguns desses trabalhos têm sugerido ainda que *Cylicomorpha* é o provável ancestral dos demais gêneros da família e que *Vasconcellea* é um táxon mais próximo de *Jacaratia* do que de *Carica* (Olson, 2002; Kyndt *et al.*, 2005a).

Aradhya *et al.* (1999), num estudo envolvendo 11 espécies de *Vasconcellea*, além de *C. papaya* e *Jacaratia mexicana*, através da análise de DNA cloroplastídico (cpDNA), observaram uma considerável divergência entre elas. Constatou-se uma maior proximidade entre as espécies *V. monoica* e *V. microcarpa*, e ainda entre *V. glandulosa* e *V. quercifolia*. Ao contrário do esperado, *Vasconcellea* e *Jacaratia* ficaram mais próximos entre si do que *Vasconcellea* e *Carica*, tendo este último ficado isolado. Esses resultados levaram à hipótese de que o mamoeiro teria se separado relativamente cedo das espécies sul-americanas e evoluído, em isolamento, provavelmente na América Central. Na América do Sul, o isolamento ecológico e as condições extremas dos Andes

teriam promovido a rápida diversificação e diferenciação das espécies de *Vasconcellea*, tornando-as bastante distintas da espécie cultivada.

Com base neste último trabalho, além de outros estudos prévios que sinalizavam para as diferenças entre as espécies (Badillo, 1971, 1993; Horovitz e Jimenez, 1967; Mekako e Nakasone, 1975; Manshardt e Wenslaff, 1989; Jobin-Decor *et al.*, 1997), Badillo propôs a reabilitação de *Vasconcellea* à categoria de gênero, no qual hoje estão enquadradas 21 espécies.

No estudo de diversidade genética utilizando marcadores AFLP, Kim *et al.* (2002) também encontraram diferenças bastante significativas entre *C. papaya* e outras seis espécies de *Vasconcellea*. A média de similaridade observada entre o mamoeiro e o grupo formado pelas espécies de *Vasconcellea* foi de 0,432, enquanto a média de similaridade intragrupo foi de 0,729. As espécies mais próximas entre si foram *V. cundinamarcensis* e *V. stipulata* (0,870), e a maior distância genética foi observada entre *C. papaya* e *V. goudotiana*, com uma similaridade de apenas 0,364.

Van Droogenbroeck *et al.* (2002), também utilizando AFLP, analisaram a diversidade genética entre *Carica papaya*, oito espécies de *Vasconcellea* e duas de *Jacaratia*. Foram formados três grupos principais, reunindo os acessos em nível de gênero. *Vasconcellea* foi subdividido em cinco subgrupos: o primeiro contendo *V. monoica* e *V. palandensis*; o segundo, apenas com *V. candicans*; o terceiro, *V. cundinamarcensis*; o quarto, *V. weberbaueri* e *V. parviflora*; e o quinto, *V. stipulata* e *V. x heilbornii*. A maior similaridade entre espécies (0,81) foi entre *V. stipulata* e *V. heilbornii* var. *chrysopetala*. Embora tenha sido observada uma diferença mínima em relação ao nível de similaridade entre os grupos formados, 0,23 entre *Vasconcellea* e *Carica* e 0,24 entre *Vasconcellea* e *Jacaratia*, na dispersão gráfica pela análise de componentes principais foi possível observar que *Jacaratia* e *Vasconcellea* são mais próximos entre si do que *Carica* em relação a *Vasconcellea*, corroborando a proposta de evolução de *C. papaya* de forma isolada das demais espécies sul-americanas (Aradhya *et al.*, 1999).

Olson (2002), através da análise de seqüências ITS e cpDNA, além de comparações morfológicas de espécies de quatro gêneros de Caricaceae, propôs que *Cylicomorpha* é o provável ancestral dos demais gêneros e que *Jarilla* é um taxon próximo ao complexo *Vasconcellea-Jacaratia*, os mais próximos entre si.

Van Droogenbroeck *et al.* (2004), observando e comparando mutações, deleções e inserções em seqüências de DNA mitocondrial (mtDNA) e cloroplastídico em Caricaceae, verificaram que, embora os resultados tenham sido insuficientes para se fazerem inferências sobre as relações intergenéricas na família, conclusões em níveis taxonômicos inferiores foram geradas. Dois grupos distintos foram formados: o primeiro, contendo nove espécies de *Vasconcellea*, e o segundo, com outras nove e mais *C. papaya*, duas espécies de *Jacaratia* e uma de *Cylicomorpha*. Com base nestes grupamentos, cruzamentos mais promissores entre espécies de *Vasconcellea* pertencentes a este último e *C. papaya* foram indicados. Verificou-se ainda que o híbrido *V. heilbornii* é apenas fracamente relacionado a *V. cundinamarcensis* e *V. stipulata*, os quais, de acordo com Badillo (1971), seriam os seus possíveis progenitores. Por outro lado, foi encontrada grande homologia entre este híbrido e *V. weberbaueri*, apontando-o como um dos seus possíveis progenitores. Com base na discrepância observada entre a morfologia e os padrões de cpDNA encontrados, foi sugerido que, além de *V. heilbornii*, outras espécies podem ter se originado por hibridação, o que indicaria um processo evolutivo reticulado em *Vasconcellea*.

Kyndt *et al.* (2005a), analisando cpDNA e também regiões ITS de rDNA nuclear, identificaram dois grandes grupos, resultando em duas prováveis linhas evolutivas dentro de *Vasconcellea*; a primeira contendo *V. heilbornii*, *V. weberbaueri*, *V. stipulata* e *V. parviflora*; e a outra, com as demais espécies do gênero. A incongruência observada entre os dados de ITS e de cpDNA em algumas espécies de *Vasconcellea* sugere que pode ter ocorrido evolução reticulada neste gênero, corroborando os resultados encontrados por Van Droogenbroeck *et al.* (2004). Além disso, as análises confirmam a monofilia de Caricaceae, que *Cylicomorpha* seria o provável ancestral dos demais gêneros, como proposto por Badillo (1971) e reforçado por Aradhya *et al.* (1999) e Olson (2002), e que os progenitores dos gêneros da América Central (*Carica*, *Jarilla* e *Horovitzia*) divergiram cedo dos gêneros sul-americanos e evoluíram isoladamente, mais ao norte do continente americano, de acordo com a hipótese de Aradhya *et al.* (1999). Esta hipótese também tem respaldo morfológico, uma vez que estes três gêneros têm ovário unilocular e os sul-americanos, pentalocular (Badillo, 1993).

### 2.6.2.1. Marcadores ISSR

Os ISSR (*inter simple sequence repeat*) são uma nova classe de marcadores moleculares gerados por PCR e consistem em seqüências de DNA amplificadas entre dois microssatélites idênticos, porém orientados em direções opostas. Esses marcadores vêm sendo utilizados desde a década de 1990 como fonte de polimorfismo na identificação de genótipos, confecção de mapas genéticos, seleção assistida em programas de melhoramento, além de estudos filogenéticos, avaliação e conservação de germoplasma (Gupta *et al.*, 1994; Zietkiewicz *et al.*, 1994; Kantety *et al.*, 1995; Parsons *et al.*, 1997; Ajibabe *et al.*, 2000; Raina *et al.*, 2001; Bornet *et al.*, 2002; Archak *et al.*, 2003; Saxena *et al.*, 2005).

Os microssatélites ou SSR (*simple sequence repeats*) mais comumente usados como *primers* são seqüências repetitivas de di, tri ou tetranucleotídeos, dispersas ao longo do genoma. Esses *primers*, normalmente entre 16 e 25 pares de bases, podem ser ancorados nas extremidades 5' ou 3', com um a quatro oligos degenerados, ou ainda ser não ancorados.

As principais vantagens desta técnica são a facilidade de utilização, especialmente por não requerer conhecimento prévio sobre a seqüência de DNA; o alto grau de polimorfismo gerado, o uso de pequenas quantidades de DNA por reação (5 a 20 ng), a especificidade e a reprodutibilidade devido ao tamanho relativamente grande dos *primers*. Um aspecto não vantajoso seria o fato de ser um marcador dominante, e, por não distinguir homozigotos e heterozigotos, não seria tão informativo quanto os SSR, por exemplo.

O único estudo com marcadores ISSR relatado até o momento em Caricaceae foi desenvolvido por Saxena *et al.* (2005). Estes pesquisadores trabalharam com 10 cultivares de *C. papaya* e compararam diferentes tipos de marcadores moleculares. Verificou-se que os ISSR foram mais polimórficos que os próprios microssatélites, além de mais confiáveis e de maior reprodutibilidade que o RAPD, confirmando o potencial desta técnica como uma poderosa ferramenta na caracterização genética e na diferenciação de genótipos.

### 2.6.3. Hibridização *in situ* fluorescente

Inicialmente, a caracterização citológica dos genomas era baseada apenas em caracteres morfológicos observados no cariótipo, tais como número de cromossomos, tamanho dos braços, posição dos centrômeros e localização das constrições secundárias. Com o surgimento de técnicas de bandeamento, essa caracterização foi significativamente melhorada, porém, para muitas espécies que apresentavam cariótipos com cromossomos de tamanho e padrão de bandas uniformes, a diferenciação dos materiais genéticos ainda era limitada. Assim, o desenvolvimento da técnica de hibridização *in situ* surgiu como um grande avanço, o qual possibilitou a identificação de cromossomos individuais, em função da localização de determinadas seqüências de DNA associadas a outras características cromossômicas (Brasileiro-Vidal e Guerra, 2002).

A FISH (*fluorescent in situ hybridization*) é uma técnica que vem sendo amplamente utilizada para estudar as relações cromossômicas e evolutivas entre espécies. Ela permite a localização citomolecular de seqüências únicas e repetitivas de DNA, diretamente nos cromossomos. A detecção dessas seqüências *in situ* tem gerado avanços importantes na citogenética de plantas, destacando-se a construção de mapas físicos, a investigação detalhada da estrutura cromossômica, o acompanhamento da quantidade de cromatina introduzida em cruzamentos interespecíficos e a análise de pareamentos intergenômicos em plantas híbridas. A visualização desta hibridização é possível devido à utilização de sondas marcadas com corantes fluorescentes. Estas sondas podem ser usadas como marcadores citológicos na identificação de cromossomos ou segmentos, com base em sinais loco-específicos.

Em eucariotos, os genes ribossomais (rDNA) têm sido os mais utilizados na hibridização *in situ*, tanto como sondas quanto como seqüências-alvo. Os rDNAs são basicamente de dois tipos: o que codifica para a sub-unidade 5S do ribossomo, uma seqüência repetitiva disposta em *tandem*; e a unidade conhecida como 45S, com aproximadamente 9,2 kb, que contém os genes que codificam para as sub-unidades 18S, 5,8S e 26S do ribossomo. Os genes rDNA, por estarem presentes em um ou poucos cromossomos, podem ser usados como marcadores cariológicos na sua identificação, o que tem-se mostrado bastante eficaz em espécies com cromossomos pequenos e similares (Leitch e

Heslop-Harrison, 1992), como é o caso das espécies da família Caricaceae. Além disto, por serem bastante conservados evolutivamente, permitem que uma seqüência extraída de uma determinada espécie vegetal hibridize em qualquer outra espécie (Guerra, 2000).

As principais vantagens da FISH são sua grande sensibilidade e especificidade, além da rapidez na obtenção dos resultados. Os sinais de fluorescência podem ser capturados por câmeras especiais ou microscópios a *laser* para serem analisados por sistemas digitais de imagem, o que permite maior precisão na localização das seqüências de interesse. As maiores desvantagens da fluorescência são a baixa durabilidade do sinal e a dificuldade de amplificá-lo. Os corantes mais comumente empregados na coloração das sondas são o FITC (*fluorescein isothiocyanate*), o Cy3 (*cyanine*), o vermelho do Texas e a rodamina (Guerra, 2000).

A FISH tem sido usada em diferentes culturas de importância econômica, como a soja (Griffor *et al.*, 1991), algodão (Bergey *et al.*, 1989; Hanson *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1998), tomate (Lapitan *et al.*, 1991), arroz (Kharb *et al.*, 2001), maracujá (Melo e Guerra, 2003), sorgo (Kim *et al.*, 2005), com diferentes finalidades.

Os trabalhos de Mukai *et al.* (1990, 1991) e Jiang e Gill (1994a, 1994b) em trigo, e de Leitch e Heslop-Harrison (1992; 1993) em cevada utilizaram a FISH não apenas para localizar genes ribossômicos, mas também para identificar determinados locos gênicos, cujo polimorfismo era insuficiente para ser detectado por uma análise RFLP convencional.

Em algodão, Hanson *et al.* (1996) utilizaram a FISH para determinar a localização e distribuição de locos de DNA ribossômico 5S e 18-28S, tanto na espécie cultivada, tetraplóide, quanto nos possíveis ancestrais diplóides. Os autores encontraram uma grande variabilidade no número, distribuição e tamanho destes locos, nas diferentes espécies estudadas. Entretanto, não se verificou, como era esperado, um aumento significativo no número de repetições destas seqüências na espécie tetraplóide em relação às diplóides, sugerindo uma maior complexidade e dinamismo evolutivo destas seqüências no gênero *Gossypium*. Já Zhao *et al.* (1998) utilizaram a FISH para localizar uma seqüência organizada *em tandem* no genoma D do algodão, a B77, de evolução relativamente rápida. Foi observado um maior número de cópias destas seqüências nas espécies

tetraplóides em relação às diplóides, o que pode estar relacionado com a sua evolução. O grande número de cópias de B77 encontrado na espécie *G. gossypoides* seria uma evidência de que ela seria o provável ancestral “doador” de genoma D.

Trabalhando com 20 espécies de *Passiflora*, Melo e Guerra (2003) utilizaram a FISH para estudar a variabilidade de sítios 5S e 45S de rDNA, com o intuito de verificar a relação existente entre elas, uma vez que estas espécies possuem diferentes números básicos de cromossomos. Com base no número e na localização destas regiões, foi possível sugerir que o genoma com  $x=6$  é o provável ancestral do gênero e que os grupos de espécies com  $x=9$ ,  $x=10$  e  $x=12$  tenham origem tetraplóide.

Nenhum trabalho utilizando a técnica de FISH foi desenvolvido em Caricaceae até o presente momento. Assim, este estudo será o primeiro com intuito de estabelecer número, localização e distribuição de seqüências de rDNA no mamoeiro e espécies relacionadas.

### **3. TRABALHOS**

#### **ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE METÁFASES EM CARICACEAE**

##### **RESUMO**

Em estudos citogenéticos, boas preparações citológicas são fundamentais para uma avaliação correta e confiável do conteúdo celular, especialmente para análises cromossômicas. A obtenção de células metafásicas com cromossomos bem condensados e sem sobreposição de braços é pré-requisito para o estabelecimento de um bom cariótipo e para utilização de técnicas mais refinadas como a FISH. Espécies de Caricaceae possuem cromossomos muito pequenos, de difícil condensação e visualização, o que torna esta preparação ainda mais complexa e delicada. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de um protocolo para obtenção de metáfases mitóticas em espécies de Caricaceae. Foram testados três agentes antimitóticos para o pré-tratamento e diferentes misturas fixadoras na etapa de obtenção de protoplastos, a fim de se verificarem quais combinações gerariam as melhores preparações celulares. Os melhores resultados foram obtidos com trifluralina a 4 °C por 21h e uma mistura de metanol/ácido acético, na proporção 2:1. Com

base no protocolo definido, foi possível observar células metafásicas com 18 cromossomos bem espalhados e individualizados em todas as espécies estudadas.

## ABSTRACT

In cytogenetic studies, good cytological preparations are essential to an accurate and reliable evaluation of cell content, especially to chromosomic analyses. Metaphasic cells with well condensed chromosomes and no arms superposition are prerequisites for good karyotypes and more complex techniques as FISH. Caricaceae species have very short chromosomes, which are hard to be condensed and visualized. These facts increase the complexity of the preparations. Therefore, the objective of this work was the elaboration of a routine protocol to obtain mitotic metaphases in Caricaceae species. Three antimitotic agents to the pre-treatment phase and several fixative solutions to the protoplast suspension phase were tested to verify which ones would generate the best cell preparations. The best results were obtained with trifluralin at 4<sup>o</sup> C during 21h and a mixture of 2:1 methanol/ acetic acid. Based on this protocol, metaphasic cells with 18 spread and well condensed chromosomes could be observed in all analyzed species.

## INTRODUÇÃO

A família Caricaceae é formada por 35 espécies, distribuídas em seis gêneros: *Carica*, *Vasconcellea*, *Jacaratia*, *Jarilla*, *Horovitzia* e *Cylicomorpha* (Badillo 1971, 2000, 2001). Todas as espécies são estritamente dióicas, com exceção de *V. monoica*, *V. cundinamarcensis* e *C. papaya*, que são monóica, monóico-dióica e dióico-hermafrodita, respectivamente (Badillo 1971).

O mamoeiro (*C. papaya* L.), única espécie cultivada e de importância econômica da família, é amplamente cultivado em países tropicais e tem grande destaque no Brasil, como produto de exportação. Por outro lado, diversas espécies de *Vasconcellea* são consideradas importantes repositórios de genes de interesse ao melhoramento do mamoeiro (Manshardt e Wenslaff 1989; Drew *et al.* 1998) e potencialmente genes dessas espécies podem ser introgridos na espécie cultivada.

Estudos citogenéticos em Caricaceae vêm sendo desenvolvidos desde a década de 1940. Os primeiros registros cromossômicos, utilizando câmara clara, foram feitos por Kumar e Abraham (1942), nos quais foram representados os cromossomos das espécies *C. papaya* e *V. cundinamarcensis*. Outros estudos desta natureza foram realizados, sendo todas as espécies descritas como diplóides, com  $2n=2x=18$  cromossomos e com uma cariomorfologia bastante similar, não tendo sido observados pares heteromórficos em nenhuma delas (Storey 1941; Darlington e Ammal 1945). Mais tarde, Datta (1971), trabalhando com cinco variedades de *C. papaya*, estimou o comprimento dos cromossomos e classificou-os como metacêntricos e sub-metacêntricos. O tamanho reduzido dos cromossomos, sua similaridade e a ausência de marcadores citológicos capazes de distingui-los têm dificultado a caracterização citogenética das espécies de Caricaceae.

A obtenção de boas preparações citológicas é essencial para uma correta e adequada avaliação dos cromossomos, especialmente quando estes são pequenos e similares, como é o caso dos da família Caricaceae. A obtenção de células metafásicas, com cromossomos bem condensados, espalhados e sem qualquer sobreposição de braços é um pré-requisito não apenas para o estabelecimento de um bom cariótipo, mas também para o desenvolvimento de estudos mais elaborados como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Sobre este aspecto, dois pontos merecem destaque: o pré-tratamento e o preparo da lâmina.

A etapa de pré-tratamento utiliza inibidores de mitose, os quais destroem as fibras do fuso, fazendo com que os cromossomos fiquem soltos no núcleo. Além disso, promovem uma maior condensação destes, a clarificação das constrições e ainda permitem uma rápida penetração do fixador na etapa

subseqüente, facilitando a observação da morfologia cromossômica (Sharma e Sharma 1994).

No que se refere ao espalhamento dos cromossomos, a etapa final de obtenção de células mitóticas envolve a absorção de água durante a evaporação do fixador presente na suspensão preparada (Claussen *et al.* 2002). Este processo é influenciado pela umidade e temperatura do ambiente em que a lâmina está sendo preparada, tamanho da gota e sua distância da lâmina, quantidade de fixador evaporado e a própria temperatura da lâmina no momento do preparo (Spurbeck *et al.* 1996).

Considerando esses aspectos, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para obtenção de metáfases em espécies de Caricaceae, de forma a permitir a elaboração dos seus cariótipos, bem como obter lâminas para aplicação da técnica de FISH. Assim, diferentes agentes antimitóticos, em diferentes tempos e temperaturas de exposição, foram avaliados, além de diversas soluções fixadoras com o intuito de se verificar qual delas geraria as melhores preparações celulares.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal e pré-tratamento

Plantas de *C. papaya*, 'Solo' e 'Maradol', hermafroditas e dióicas, respectivamente, de *V. cundinamarcensis* e *V. goudotiana* foram cultivadas em casa de vegetação, em condições recomendadas para a cultura. Pontas de raízes de 1-2 cm de comprimento foram coletadas destas plantas e pré-tratadas com diferentes inibidores mitóticos, em ensaios preliminares para escolha do melhor pré-tratamento (Tabela 1). Posteriormente, estes materiais foram fixados em solução de etanol: ácido acético (4:1) por 24h em temperatura ambiente (25 °C).

Tabela 1 - Antimitóticos, tempos e temperaturas de exposição avaliados

ANTIMITÓTICO	TEMPOS (h)	TEMPERATURAS ( °C)
$\alpha$ -bromonaftaleno (solução saturada)	1; 2; 4; 8	4 e 25
8-hidroxiquinolina (2,5 mM)	1; 2; 4; 8; 16	4 e 25
Trifluralina (2 $\mu$ M)	2; 4; 8; 16; 21;24	4 e 25

### Obtenção de metáfases

A digestão enzimática de pontas de raízes fixadas foi feita de acordo com o protocolo proposto por Jewell e Islam-Faridi (1994) e Kim *et al.* (2005), variando-se apenas a solução final na qual foram ressuspensos os protoplastos (4:1 e 2:1 etanol/ácido acético e 4:1 e 2:1 metanol/ácido acético).

Alíquotas (3  $\mu$ l) de cada uma destas suspensões foram gotejadas em lâminas previamente limpas, as quais foram colocadas para secar em câmara úmida. Assim, diversas lâminas contendo cromossomos em metáfase foram obtidas e examinadas em contraste de fase (Zeiss DCP-2E) para avaliação da melhor solução fixadora e posteriormente coradas com Azure B para captura das imagens em microscópio ótico. Foram avaliadas, individualmente, cerca de 20 metáfases mitóticas para cada inibidor, em cada um dos tempos e temperaturas testados, num total de pelo menos 600 análises.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O melhores resultados de pré-tratamento foram obtidos com uma solução de trifluralina 2  $\mu$ M durante 21h a 4 °C (Figura 1), sendo este o procedimento adotado como padrão para posterior avaliação das preparações mitóticas. De maneira geral, tempos inferiores a quatro horas, em ambas as temperaturas, não foram eficientes na condensação dos cromossomos das espécies avaliadas, exceto o  $\alpha$ -bromonaftaleno, em temperatura ambiente, por 4h. Embora este

composto químico tenha gerado uma condensação considerada satisfatória, permitindo a visualização clara dos centrômeros, não foi totalmente eficiente, uma vez que a delimitação dos braços cromossômicos não ficou bem definida.

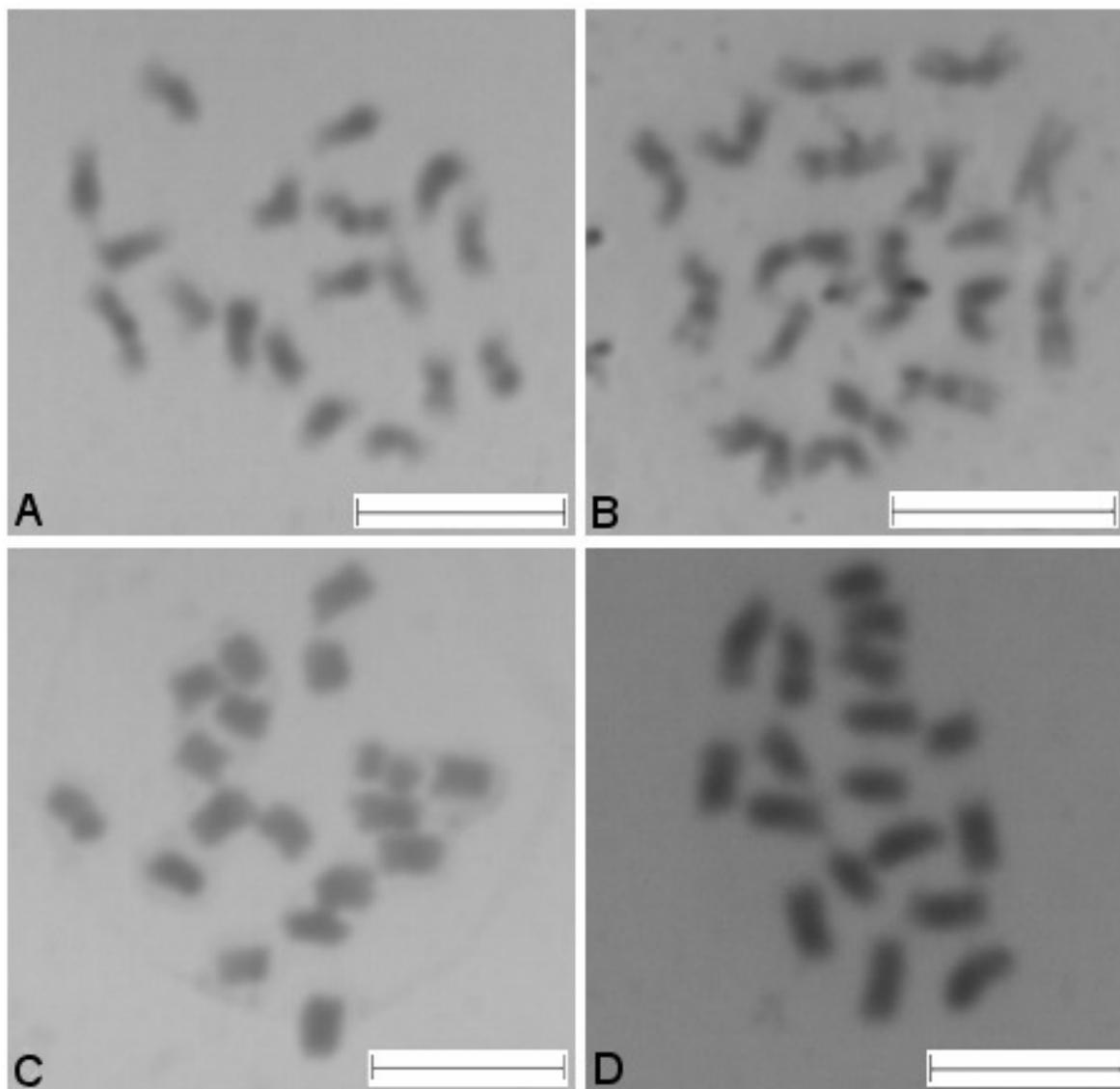


Figura 1. Cromossomos metafásicos pré-tratados com trifluralina 2  $\mu$ M a 4 °C por 21h e obtidos a partir de uma suspensão de protoplastos em solução 2:1 de metanol/ácido acético. A) *C. papaya* cv. Maradol; B) *C. papaya*, cv. Solo; C) *V. cundinamarzensis*; D) *V. goudotiana*. Barra = 5  $\mu$ m.

Por outro lado, com exceção da trifluralina, tempos de exposição iguais ou superiores a 8h mostraram-se demasiados, e a intensa condensação dos cromossomos reduziu muito seu tamanho, não permitindo a observação das

construções primárias nem a medição dos braços cromossômicos (dados não apresentados). O pré-tratamento com 8-hidroxiquinolina foi ineficiente, em todos os tempos e temperaturas testadas. Embora seja um antimitótico amplamente utilizado em estudos citogenéticos, tem sido observada uma maior eficiência em espécies com cromossomos médios a grandes (Sharma e Sharma 1994; Singh 2002).

A trifluralina foi o mais eficiente inibidor de mitose nas espécies avaliadas, produzindo um grande número de células mitóticas por lâmina (entre cinco e 14 células), além de melhor condensação dos cromossomos, permitindo uma eficiente identificação de sua morfologia (Figura 1).

No que se refere à obtenção de protoplastos, misturas contendo metanol foram superiores às com etanol, sendo a relação 2:1 metanol/ácido acético a mais eficiente no espalhamento dos cromossomos, para todas as espécies analisadas (Figura 1). Andras *et al.* (1999), avaliando diferentes proporções de álcool/ácido acético, verificaram que a mistura metanol/ácido acético na proporção 4:1 foi a melhor solução fixadora para obtenção de cromossomos bem espalhados em arroz, tomate, roseira e cacau.

Embora o metanol seja apenas ocasionalmente utilizado em plantas, é intensamente empregado em soluções fixadoras para cromossomos animais. Sua velocidade de evaporação é superior a do etanol e, além disso, enquanto o etanol promove a retração dos cromossomos, o metanol tem efeito oposto, sendo esta uma característica vantajosa em preparações citológicas nas quais, pela absorção de água e expansão mais efetiva dos protoplastos, ocorre melhor espalhamento dos cromossomos (Sharma e Sharma 1994).

Assim, neste trabalho, foi definido um protocolo de rotina eficiente para obtenção de metáfases mitóticas em espécies de Caricaceae. Para a aquisição de boas preparações celulares, o pré-tratamento foi feito com trifluralina 2  $\mu$ M a 4 °C por 21h; a fixação, com uma mistura de etanol/ácido acético 4:1 por 24h, seguida de digestão enzimática. Os protoplastos foram ressuspensos em uma mistura de metanol/ácido acético na proporção 2:1, e as melhores lâminas obtidas a partir desta suspensão foram selecionadas para a realização da FISH.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andras, S.C., Hartman, T.P.V., Marshall, J.A., Marchant, R., Power, J.B., Cocking, E.C., Davey, M.R. (1999) A drop-spreading technique to produce cytoplasm-free mitotic preparations from plants with small chromosomes. *Chromosome research* 7 (8):641-647.
- Badillo, V.M. (1971) *Monografía de la familia Caricaceae*. (Tese em Botânica) - Maracay, Venezuela, Universidad Central de Venezuela - Publicada por la asociación de profesores, 222p.
- Badillo, V.M. (2000) *Carica* L. vs *Vasconcella* St. Hil. (Caricaceae): con la rehabilitación de este último. *Ernstia*, 10 (2):74-79.
- Badillo, V.M. (2001) Nota correctiva *Vasconcellea* St. Hil. y no *Vasconcella* (Caricaceae). *Ernstia*, 11 (1):75-76.
- Claussen, U., Michel, S., Mühlig, P., Westermann, M., Grummt, U.W., Kromeyer-Hauschild, K., Liehr, T. (2002) Demystifying chromosome preparation and the implications for the concept of chromosome condensation during mitosis. *Cytogenetic and Genome Research*, 98:136–146.
- Darlington, C.D., Ammal, E.K.J. (1945) *Chromosome Atlas of Cultivated Plants*. George Allen and Unwin LTD., London, 315p.
- Datta, P.C. (1971) Chromosomal biotypes of *Carica papaya* L. *Cytologia*, 36:555-562.
- Drew, R.A., O'Brien, C.M., Magdalita, P.M. (1998) Development of interspecific *Carica* hybrids. *Acta Horticulturae*, 461:285-292.
- Jewell, D.C., Islam-Faridi, M.N. (1994) A technique for somatic chromosome preparation and C-banding of maize. In: Freeling, M., Walbot, V. (eds.) *The Maize Handbook*. New York: Springer-Verlag, p. 484-493.

- Kim, J., Klein, P.E., Klein, R.R., Price, H.J., Mullet, J.E., Stelly, D.M. (2005) Molecular cytogenetic maps of sorghum linkage groups 2 and 8. *Genetics*, 169 (2):955-965.
- Kumar, L.S.S., Abraham, A. (1942) Chromosome number in *Carica*. *Current Science*, 11:58.
- Manshardt, R.M., Wenslaff, T.F. (1989) Interspecific hybridization of papaya with other species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 114:689-694.
- Sharma, A.K., Sharma, A. (1994) *Chromosome techniques - A manual*. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 368p.
- Singh, R.J. (2002) *Plant Cytogenetics*. Boca Raton: CRC Press Inc., 512p.
- Spurbeck, J.L., Zinsmeister, A.R., Meyer, K.J., Jalal, S.M. (1996) Dynamics of chromosome spreading. *American Journal of Medical Genetics*, 61 (4):387-393.
- Storey, W.B. (1941) The botany and sex relationships of the papaya. *In: Hawaii Agr. Exp. St. Bull. 87. Papaya production in the Hawaiian Island*. University of Hawaii, p. 5-22.

## HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE COM SONDAS 18S E 5S rDNA EM MAMOEIRO (*CARICA PAPAYA* L.) E ESPÉCIES SILVESTRES RELACIONADAS

### RESUMO

O mamoeiro (*C. papaya* L.) é amplamente cultivado em regiões tropicais. Espécies relacionadas como *V. cundinamarcensis* e *V. goudotiana* são fontes de genes de interesse a serem introgrididos na espécie cultivada, mas, para isso, faz-se necessário um estudo das relações genéticas entre estas espécies. A existência de cromossomos pequenos e similares, ausência de cromossomos sexuais heteromórficos e de marcadores citomorfológicos dificultam a caracterização destas espécies via cariotipagem convencional. Assim, através da FISH, utilizando-se sondas de DNA ribossômico, podem ser gerados marcadores que auxiliem essa identificação e gerem informações sobre as relações genéticas entre as espécies em questão. Pelo número e posição de sítios de rDNA observados, verificou-se uma maior proximidade entre *V. cundinamarcensis* e *V. goudotiana*, enquanto *C. papaya* se diferenciou destas. Ambas espécies de *Vasconcellea* apresentaram apenas um par de sítios 5S, enquanto em *C. papaya* foram observados três pares. Por outro lado, apenas um par 18S foi encontrado no mamoeiro, tendo sido observados quatro e cinco sítios 18S em *V. goudotiana* e *V. cundinamarcensis*, respectivamente. Acredita-se que o sítio 18S não pareado em

*V. cundinamarcensis* esteja localizado no cromossomo sexual Y, no entanto, futuros estudos em FISH são necessários para confirmar esta hipótese.

## ABSTRACT

Papaya (*C. papaya* L.) is cultivated widely as a fruit crop in the tropics. Related species as *V. cundinamarcensis* and *V. goudotiana* are sources of desirable genes to be introgressed in the cultivated species, although it is necessary to understand the genetic relationships among these species to reach this purpose. Their chromosomes are very small and similar and there are no reports of heteromorphic pairs or cytomorphological markers, difficulting the characterization of these species by conventional karyotyping. For these reasons, analyses with the fluorescent *in situ* hybridization (FISH) using rDNA probes can provide several karyological markers able to distinguish chromosomes and to produce informations about the genetic relationships among these species. By the number and the position of rDNA sites, it was verified that *V. cundinamarcensis* and *V. goudotiana* were closer while *C. papaya* was isolated from them. Both *Vasconcellea* species showed only one pair of 5S site whereas three pairs were found in *C. papaya*. On the other hand, one 18S site was observed in papaya while four and five 18S sites were found in *V. goudotiana* and *V. cundinamarcensis*, respectively. It is possible hypothesize that the unpaired signal of 18S probe in *V. cundinamarcensis* can be located in a sexual chromosome, more specifically in Y chromosome. Further FISH studies are required to confirm this hypothesis of sex-chromosome linkage.

## INTRODUÇÃO

A família Caricaceae é composta por seis gêneros que, em conjunto, compreendem 35 espécies (Badillo 1993, 2000). Todas as espécies descritas

possuem  $2n=2x=18$  cromossomos e são classificadas como diplóides e dióicas, exceto *Vasconcellea monoica*, *V. cundinamarcensis* e *Carica papaya*, que são monóica, monóico-dióica e dióico-hermafrodita, respectivamente (Badillo 1971).

O mamoeiro (*C. papaya* L.) é a espécie de maior importância econômica da família Caricaceae e tem sido amplamente cultivado em países de clima tropical. Sendo a única espécie do gênero *Carica* (Badillo 2000), outros gêneros próximos e relacionados podem ser considerados como fontes de germoplasma para o melhoramento genético dessa espécie.

O gênero *Vasconcellea* reúne 21 espécies de Caricaceae, sendo, portanto, o maior gênero da família (Badillo 2000, 2001). Conseqüentemente, espécies de *Vasconcellea* são fontes potenciais de genes úteis ao melhoramento do mamoeiro. Dentre as diversas características presentes em *Vasconcellea* que poderiam ser vantajosamente introgrididas na espécie cultivada, três merecem destaque: resistência ao *papaya ring spot virus* (PRSV-P) (Malaguetti *et al.* 1957; Ricelli 1963; Horovitz e Jimenez 1967; Alvizo e Rojkind 1987; Magdalita *et al.* 1988), tolerância ao frio e altos teores de açúcar (Manshardt e Wenslaff 1989; Drew *et al.* 1998).

A fim de se conhecerem as relações interespecíficas e intergenéricas em Caricaceae, diversos estudos em nível molecular têm sido conduzidos. Resultados obtidos a partir de marcadores RAPD (Moore e Litz 1984; Jobin-Decor *et al.* 1997), RFLP (Aradhya *et al.* 1999; Van Droogenbroeck *et al.* 2004) e AFLP (Kim *et al.* 2002; Van Droogenbroeck *et al.* 2002; Kyndt *et al.* 2005) revelaram que *Carica* e *Vasconcellea* são geneticamente distantes. A utilização do germoplasma de *Vasconcellea* no melhoramento do mamoeiro depende, em última análise, do grau de relação genômica entre eles, particularmente no que se refere às semelhanças cromossômicas estruturais, pareamento meiótico e conseqüente recombinação, além da própria compatibilidade genética. Assim, a caracterização cariotípica destes táxons constitui um importante passo para futuras introgressões de germoplasma de *Vasconcellea* nos programas de melhoramento de *C. papaya*.

Todos os nove cromossomos do genoma haplóide do mamoeiro são bastante pequenos e similares, podendo ocorrer variações no comprimento, de acordo com o pré-tratamento e os cultivares analisados (Datta 1971; Damasceno Junior *et al.* 2008). Esta espécie possui ainda um reduzido conteúdo 1C de DNA, estimado em 368 Mpb por Bennett e Smith (1976), 372 Mpb por Arumuganathan e Earle (1991) e 404 Mpb por Ohri *et al.* (2004), o que significa cerca de 3,8 pg.

Embora o mamoeiro seja dióico, não há relatos de cromossomos não pareados ou pares heteromórficos, características estas que seriam esperadas em cromossomos sexuais evolutivamente avançados. Entretanto, uma região responsável pela determinação sexual nesta espécie vem sendo definida (Liu *et al.* 2004). De maneira geral, o reduzido tamanho dos cromossomos, a ausência de um par heteromórfico e de marcadores citomorfológicos têm gerado dificuldades para a cariotipagem do mamoeiro, de forma que estratégias adicionais fazem-se necessárias para se atingir este intento de maneira satisfatória.

Uma técnica relativamente nova que vem sendo usada para investigar relações genômicas entre espécies e em nível cromossômico é a hibridização *in situ* fluorescente (FISH - *fluorescent in situ hybridization*). Ela permite a identificação citomolecular direta de seqüências de DNA, repetitivo ou não, sobre os cromossomos, com base na hibridização homóloga-dependente de sondas de ácidos nucleicos. Os sinais gerados pelas marcações fluorescentes localizados nas regiões onde as sondas se hibridizam podem ser usados como marcadores citológicos na identificação de cromossomos ou segmentos destes. Em eucariotos, seqüências repetitivas organizadas em *tandem* como 18-26S e 5S de genes ribossômicos (rDNA) estão localizadas em uma ou poucas regiões cromossômicas, podendo ser convenientemente usadas como marcadores cariológicos na identificação de cromossomos, o que é especialmente útil em espécies cujos cromossomos são pequenos e/ou similares (Leitch e Heslop-Harrison 1992).

Os objetivos principais deste trabalho foram localizar regiões 18S e 5S rDNA em *C. papaya*, *V. goudotiana* e *V. cundinamarcensis* através da FISH e determinar o número e a posição destes sítios, gerando marcadores para a identificação de alguns cromossomos e outras informações que possam ser relevantes sobre a estrutura genômica destas espécies.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal e pré-tratamento

Plantas de *C. papaya*, cultivares 'Solo' e 'Maradol', hermafroditas e dióicas, respectivamente, além de femininas e masculinas de *V. goudotiana* e monóicas de *V. cundinamarcensis* foram cultivadas em vasos e mantidas em casa de vegetação, no período de maio a novembro, na cidade de College Station, Texas, EUA (30,61N, 96,32W). Pontas de raízes de 1-2 cm de comprimento de cada uma destas plantas foram coletadas e pré-tratadas com uma solução de trifluralina 2  $\mu$ M durante 21h a 4 °C (Costa *et al.* 2008) e em seguida, fixadas em solução de etanol/ácido acético (4:1) por 24h em temperatura ambiente.

### Obtenção das metáfases

Para a obtenção de lâminas contendo cromossomos metafásicos, seguiu-se o protocolo proposto por Jewell e Islam-Faridi (1994), modificado por Costa *et al.* (2008). Este material foi examinado em contraste de fase, em aumentos de 100X e 250X (Zeiss DCP-2E), e as cinco melhores lâminas de cada planta foram selecionadas para FISH.

### Isolamento e marcação das sondas

Os plasmídios pAm033, contendo o fragmento de 470 pb de 5S rDNA de *Acacia melanoxyton* em pUC118 (gentilmente cedido por Rudi Appels) e pGmr3, contendo o fragmento de 4,5 kb 18S-28S rDNA de *Glycine max* em pBR325 (gentilmente cedido pelo Dr. E. Zimmer), foram isolados através de lise alcalina e purificados com o *Plant DNeasy kit* (Qiagen, Valencia, CA). Os DNAs foram então marcados com biotina-16-dUTP ou digoxigenina-11-dUTP utilizando-se o *BioNick Labeling system* (Roche Molecular Biochemicals, Indiana, EUA).

## FISH

O processo de desnaturação das sondas e do DNA, hibridização, detecção e captura de imagem das lâminas pode ser assim resumido:

As lâminas foram desnaturadas a 70 °C com solução de formamida 70%/2x SSC por 1,5min, desidratadas em uma série crescente de etanol e secas ao ar. A mistura contendo as sondas foi desnaturada a 90 °C por 10min e 25 µl foram adicionados às lâminas, as quais foram cobertas com lamínulas, seladas e incubadas em câmara úmida a 37 °C por 24h.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas três vezes com 2xSSC a 40 °C e duas vezes com 4xSSC/Tween 20 0,2% à temperatura ambiente, 5 min cada uma. Cada lâmina foi bloqueada com 200 µl de BSA 5% (w/v) em 4xSSC/Tween 20 0,2%, cobertas com lamínulas e incubadas por 5min. Em seguida, as lamínulas foram removidas e foram adicionados 200 µl de uma mistura de Cy3-streptavidina (5 µg/ml) e FITC-antidigoxigenina (5 µg/ml) em BSA 5%/4xSSC/Tween 20 0,2% em cada lâmina, que foram então cobertas com lamínulas e incubadas em câmara úmida por 30min a 37 °C. Após quatro lavagens com 4xSSC/Tween 20 0,2% (2min a 37 °C cada uma) e posterior secagem, as lâminas foram contracoloradas com DAPI, cobertas com lamínulas e incubadas a -20 °C por 30min antes da visualização.

As imagens foram observadas em microscópio fluorescente Olympus AX-70 (Olympus America, Melville, MD, EUA) acoplado a uma câmera de 1,3 Megapixels (Photometric, Tucson, AZ, EUA), com a qual as imagens foram capturadas e analisadas com auxílio dos programas Mac-Probe v.4.2.3 e Optimas v 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número diplóide de cromossomos observado em *V. goudotiana* (Figura 1), *V. cundinamarcensis* (Figura 2) e *C. papaya* (Figura 3) foi  $2n=18$ , sendo suas respectivas cariomorfologias regulares e simétricas. A hibridização *in situ*, utilizando sondas 5S e 18S revelou sinais de diferentes intensidades. Em todas as

espécies analisadas, os cromossomos foram classificados como metacêntricos ou submetacêntricos. Embora nesta pesquisa não tenha sido proposta a aplicação da técnica de bandeamento DAPI (*4,6-diamidino-2-phenyl-indole*) e, portanto, não tenham sido concentrados esforços no sentido de otimizá-la para utilização em Caricaceae, foi observada uma coloração diferencial nos cromossomos das espécies estudadas, a qual, em associação com as sondas, permitiu a identificação dos respectivos pares cromossômicos (Figuras 1A, 2A e 3A). Variações longitudinais na intensidade do DAPI sugerem que as densidades de seqüências ricas em A-T não estão distribuídas aleatoriamente, ocorrendo em maiores níveis nas regiões próximas aos centrômeros.

A análise das metáfases de *V. goudotiana* por meio da FISH revelou a presença de sinais 5S rDNA em apenas um par de cromossomos homólogos, enquanto os sinais de 18S rDNA foram observados em dois outros pares, sendo um sítio maior e outro de tamanho médio, ambos próximos aos respectivos centrômeros (Figura 1B). Não foram observados sinais 5S rDNA e 18S rDNA num mesmo cromossomo.

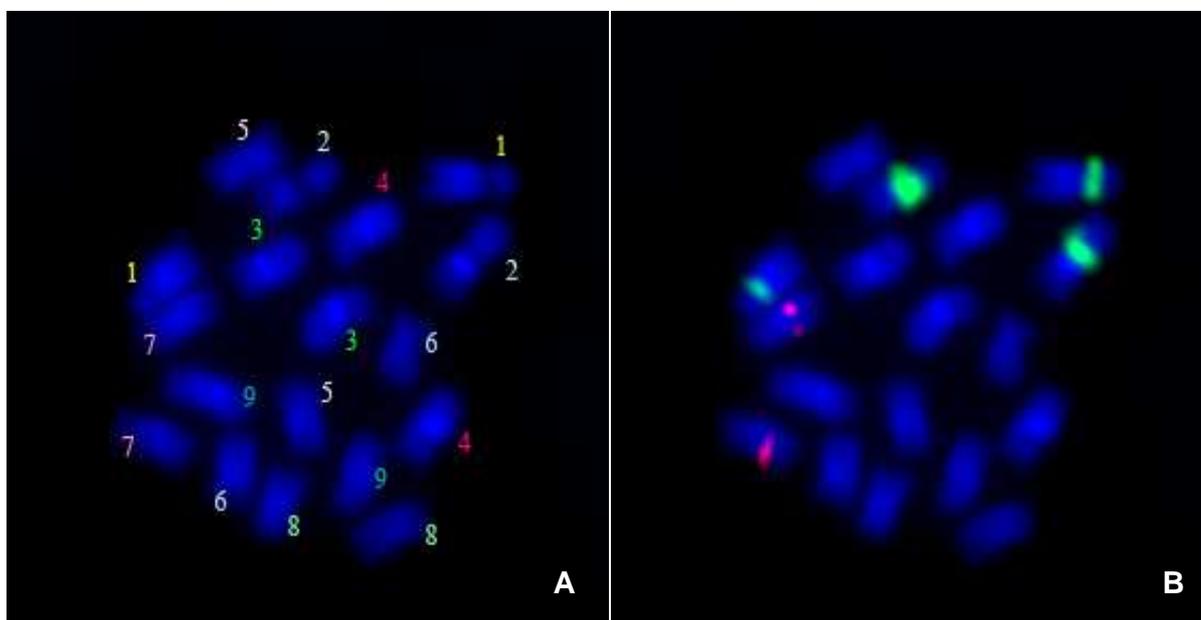


Figura 1. FISH em cromossomos metafásicos de *V. goudotiana* utilizando sondas de DNA ribossomal 5S (vermelho) e 18S (verde). (A) coloração com DAPI: números de 1 a 9 identificam os pares cromossômicos, porém não se referem à sua classificação; (B) sítios de 5S e 18S rDNA.

O maior sítio 18S foi localizado na região central de um dos maiores pares cromossômicos, enquanto o menor sítio 18S e também o 5S ocorreram em cromossomos de tamanho mediano. O sítio 5S rDNA foi posicionado submedialmente e o sítio menor 18S rDNA foi localizado na região subtelomérica. Não foram observadas diferenças quanto ao número e posicionamento das sondas entre metáfases provenientes de plantas femininas ou masculinas nesta espécie.

Na espécie *V. cundinamarcensis*, cerca da metade dos pares cromossômicos apresentou regiões com brilho mais intenso quando coradas com DAPI (Figura 2A). A análise da FISH revelou um par de sinais 5S rDNA e cinco sítios 18S rDNA, todos não-sintênicos (Figura 2B). A sonda 5S foi localizada num par de cromossomos de tamanho médio, muito próxima à região pericentromérica e heterocromática, intensamente corada com DAPI e muito próxima também à própria constrição primária.

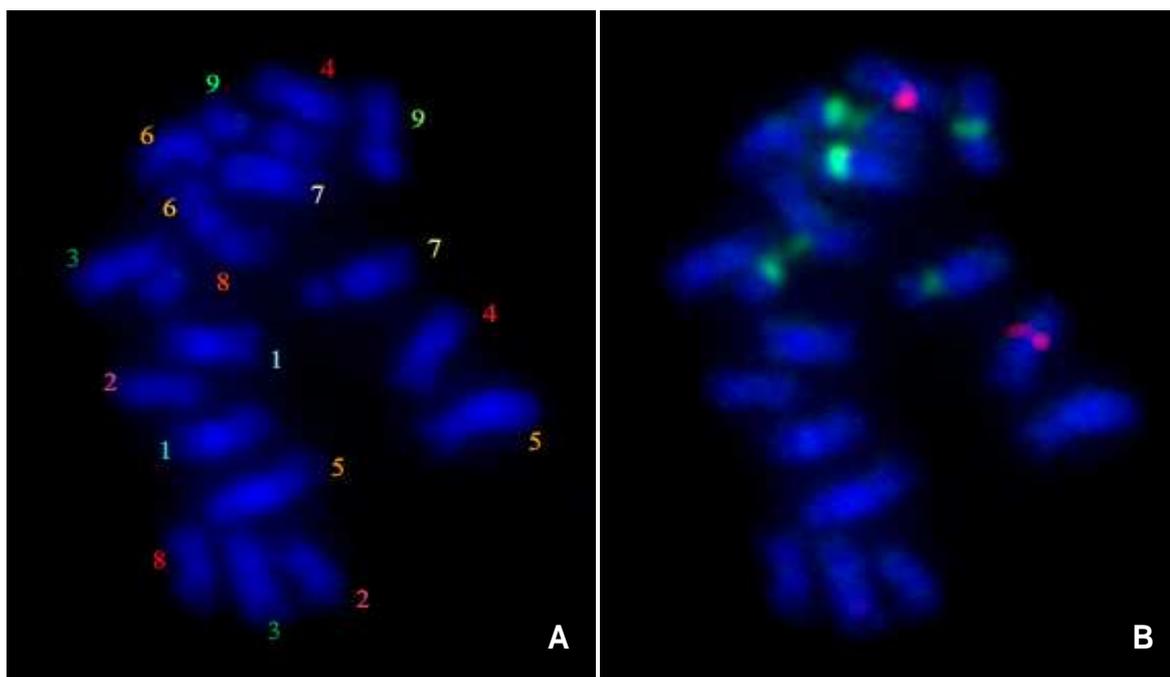


Figura 2. FISH em cromossomos metafásicos de *V. cundinamarcensis* utilizando sondas de DNA ribossomal 5S (vermelho) e 18S (verde). (A) coloração com DAPI: números de 1 a 9 identificam os pares cromossômicos, porém não se referem à sua classificação; (B) sítios de 5S e 18S rDNA.

Os cinco sítios 18S rDNA incluíram dois pares de sinais, um dos quais foi localizado na posição medial de um cromossomo, no qual não foi observada uma região brilhante na coloração com DAPI e para o qual a posição submedial da constrição primária classifica-o como submetacêntrico. O outro par de sítios 18S foi localizado subterminalmente num cromossomo metacêntrico cujo bandeamento DAPI foi moderadamente intenso na região pericentromérica. O sinal 18S isolado foi situado medialmente num cromossomo metacêntrico de tamanho médio, distalmente do qual existe uma pequena banda DAPI relativamente forte. Assim um par cromossômico pôde ser diferenciado dos demais não apenas pela presença da sonda 18S em um dos homólogos, mas também pelo seu estado relativamente distendido.

Em *C. papaya*, apenas um par de sítios 18S rDNA foi observado, localizado na posição medial, próximo à região centromérica do maior par de cromossomos. Por outro lado, dois pares de sítios maiores e um par menor de 5S rDNA foram observados, também próximos aos centrômeros (Figura 3B). A FISH revelou que sítios 5S rDNA foram não-sintênicos aos sítios 18S rDNA. Não foram observadas diferenças entre metáfases provenientes de plantas femininas, masculinas ou hermafroditas.

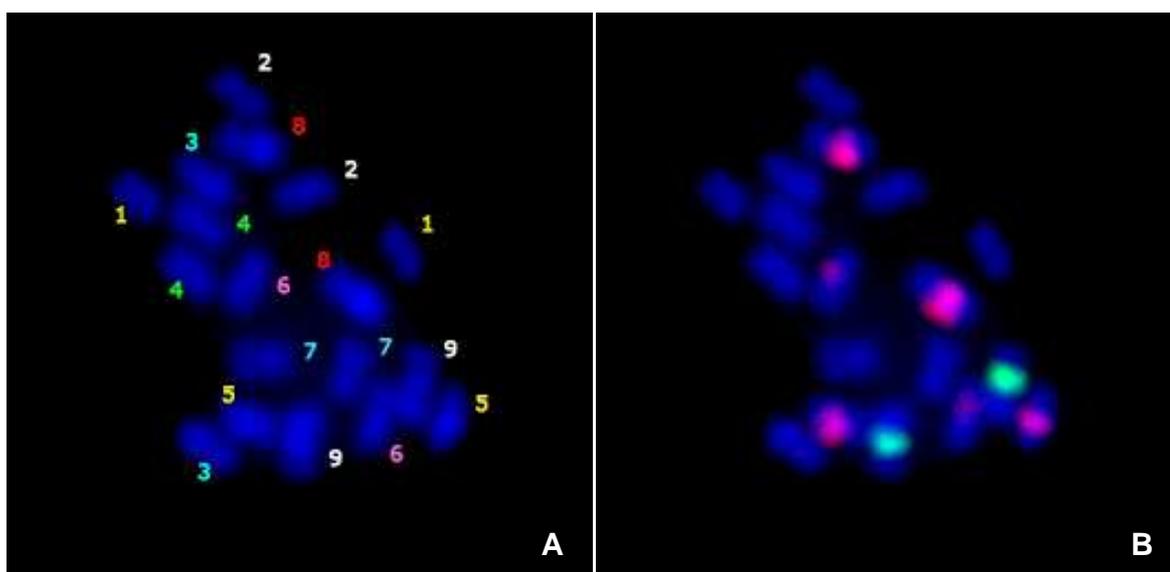


Figure 3. FISH em cromossomos metafásicos de *C. papaya*, utilizando sondas de DNA ribossomal 5S (vermelho) e 18S (verde). (A) coloração com DAPI: números de 1 a 9 identificam os pares cromossômicos, porém não se referem à sua classificação; (B) sítios de 5S e 18S rDNA.

Análises citológicas prévias em mamoeiro mostraram que seus cromossomos não diferem significativamente, nem em comprimento nem na relação de braços, o que dificulta sua distinção morfológica (Datta 1971; Damasceno Junior *et al.* 2008). Os resultados do presente trabalho, no entanto, sugerem que, em consonância com a morfologia cromossômica, o bandeamento DAPI, o tamanho relativo e a posição dos sítios de rDNA, é possível reconhecer quatro dos nove pares de cromossomos homólogos, nas diversas células estudadas. Na verdade, espera-se que apenas com o aprimoramento do bandeamento DAPI seja possível identificar todos os cromossomos nos cariótipos obtidos e também em outros relacionados, como por exemplo trissômicos primários derivados deste. No entanto, devido à resolução longitudinal limitada gerada por esta técnica, outras mais sofisticadas baseadas em FISH deverão ser aplicadas para uma análise mais robusta.

O número de sítios 5S e 18S rDNA observados sugerem que as espécies *V. cundinamarcensis* e *V. goudotiana* são mais próximas entre si que *C. papaya* destas duas. Ambas espécies de *Vasconcellea* apresentaram apenas um par de sinais 5S, enquanto em *C. papaya* foram observados três pares. Por outro lado, apenas um par de 18S foi encontrado no mamoeiro, e o número de sítios 18S em *V. goudotiana* e *V. cundinamarcensis* foram quatro e cinco, respectivamente.

Até pouco tempo, *Vasconcellea* era considerado uma seção, próxima à seção *Carica*, ambas pertencentes ao gênero *Carica*. A principal diferença entre estas seções baseava-se na morfologia do ovário, pentalocular e unilocular, respectivamente (Badillo 1971, 1993). Mais tarde, com base em evidências genéticas (Aradhya *et al.* 1999), *Vasconcellea* foi reabilitado à categoria de gênero, englobando 21 espécies e o gênero *Carica* tornou-se então monoespecífico, contendo apenas a espécie *C. papaya* (Badillo 2001). Diversas análises moleculares têm confirmado a distância genética entre *Carica* e *Vasconcellea* e têm dado suporte a esta elevação taxonômica (Jobin-Decor *et al.* 1997; Aradhya *et al.* 1999; Olson 2002; Kim *et al.* 2002; Van Droogenbroeck *et al.* 2002, 2004; Kyndt *et al.* 2005).

Um fator adicional que reitera a frágil relação taxonômica entre estes dois gêneros é a compatibilidade de cruzamentos. Embora muitas espécies de *Vasconcellea* possam ser intercruzadas e produzam híbridos com diferentes níveis de fertilidade (Jimenez e Horovitz 1958; Sawant 1958; Horovitz e Jimenez 1967;

Badillo 1971; Mekako e Nakasone 1975), barreiras pós-zigóticas foram relatadas em cruzamentos entre *C. papaya* e diversas espécies de *Vasconcellea* (Jimenez e Horovitz 1958; Manshardt e Wenslaff 1989; Magdalita *et al.* 1997; Drew *et al.* 1998), sendo que alguns híbridos foram obtidos utilizando-se resgate de embrião (Manshardt e Wenslaff 1989; Chen *et al.* 1991; Magdalita *et al.* 1996; Manshardt e Drew 1998; Drew *et al.* 1998).

Um aspecto bastante interessante observado no presente estudo foi o sítio de 18S não pareado em *V. cundinamarcensis*. Uma possível explicação para este resultado pode estar relacionada à existência de cromossomos sexuais em Caricaceae. O dioicismo estrito é o sistema reprodutivo que prevalece nesta família. Assim, a maioria das espécies teria os indivíduos masculinos heterogaméticos (XY), com cromossomo Y normal, enquanto as plantas femininas seriam homogaméticas (XX) (Horovitz e Jimenez 1972), havendo apenas três exceções: *V. monoica*, estritamente monóica (Badillo 1971) e homogamética (ZZ) (Horovitz e Jimenez 1972), *C. papaya*, dióico-hermafrodita, com plantas femininas (XX), masculinas (XY<sub>1</sub>) e hermafroditas (XY<sub>2</sub>) (Storey 1941; Hofmeyr 1941) e *V. cundinamarcensis*, monoico-dióica, com plantas femininas (XX), masculinas e dióicas (Badillo 1971), ambas de constituição genética do tipo XY<sup>pm</sup> (Horovitz e Jimenez 1972). Esta condição hermafrodita seria devida à interação existente entre o citoplasma *pm* e o cromossomo sexual Y<sup>pm</sup> (Horovitz e Jimenez 1972). Análises meióticas de *V. cundinamarcensis* mostraram a presença de três bivalentes associados ao nucléolo e que, dos nove bivalentes observados na metáfase I, um deles, freqüentemente, não estava alinhado na placa equatorial (De Zerpa 1980), o que poderia ser um indício de um par sexual, embora Damasceno Junior *et al.* (2008) não tenham observado qualquer par heteromórfico nesta espécie.

Acerca de *C. papaya*, embora nenhum heteromorfismo cromossômico tenha sido observado, há relatos sobre um par de cromossomos que apresentou atraso na separação durante a anáfase (Frankel e Galun 1977). Atrasos nesta separação são freqüentes em sistemas dióicos em animais, sendo considerados como um sistema XY incipiente (Lewis e John, 1968, citados por Frankel e Galun, 1977), o que, no entanto, ainda não havia sido confirmado em plantas. Um estudo molecular recente em mamoeiro revelou a existência de uma pequena região macho-específica no cromossomo Y que não recombina com o X, sugerindo que os cromossomos

sexuais nesta espécie podem ter evoluído a partir de um par de cromossomos autossomais (Liu *et al.* 2004), o que seria então um sistema XY incipiente.

Com base nestes fatores e considerando que todas as imagens analisadas de *V. cundinamarcensis* foram provenientes de plantas monóicas (heterogaméticas), é possível supor que o sítio 18S não pareado observado na espécie está localizado em um cromossomo sexual, mais especificamente no cromossomo Y. Além disso, existem pelo menos dois relatos que associam os sinais 18S com cromossomos sexuais em plantas, em *Marchantia polymorpha* (Nakayama *et al.* 2001) e em *Spinacia oleracea* (Lan *et al.* 2006). Em ambos os casos, os sinais 18S ocorreram aos pares em indivíduos femininos, enquanto que nos machos ocorreram isoladamente, ou seja, não pareados. No presente trabalho, não foram analisadas metáfases de plantas femininas de *V. cundinamarcensis*, de forma que futuros estudos com FISH serão necessários para confirmar a hipótese da relação de sítios 18S com cromossomos sexuais nesta espécie.

Além de determinar o posicionamento físico de locos 5S e 18S nas espécies estudadas, foi demonstrado que a FISH é, de fato, uma ferramenta bastante útil na cariotipagem cromossômica e na determinação de interações genômicas entre táxons relacionados. Como a localização dos locos gênicos 5S e 18S rDNA ainda não foi definida nos mapas de ligação do mamoeiro, este é provavelmente o primeiro relato não apenas destes locos em *C. papaya* e outras espécies de Caricaceae analisadas, mas também a primeira indicação de sintenia entre locos rDNA e de determinação sexual em Caricaceae.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Aradhya, M.K., Manshardt, R.M., Zee, F., Morden, C.W. (1999) A phylogenetic analysis of the genus *Carica* L. (Caricaceae) based on restriction fragment length

variation in a cpDNA intergenic spacer region. *Genet. Res. Crop. Evol.* 46:579-586.

Arumuganathan, K., Earle, E.D. (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Reporter*, 9:208-218.

Badillo, V.M. (1971) *Monografía de la familia Caricaceae*. (Tese em Botânica) - Maracay, Venezuela, Universidad Central de Venezuela - Publicada por la asociación de profesores, 222p.

Badillo, V.M. (1993) Caricaceae. Segundo esquema. *Rev. Fac. Agron. Univ. Centr. Venezuela*, 43:1-111.

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

Badillo, V.M. (2001) Nota correctiva *Vasconcellea* St. Hil. y no *Vasconcella* (Caricaceae). *Ernstia*, 11 (1):75-76.

Bennett, M.D., Smith, J.B. (1976) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 274:227-274.

Chen, M.H., Wang, C.C., Wang, D.N., Chen, F.C. (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Carica papaya* x *C. cauliflora* cultured in vitro. *Can. J. Bot.* 69:1913-1918.

Costa, F.R., Pereira, T.N.S., Damasceno Junior, P.C., Pereira, M.G. (2008) Estabelecimento de um protocolo para obtenção de metáfases em Caricaceae. *Crop Breed Appl. Biotec.* (no prelo).

Damasceno Junior, P.C., Costa, F.R., Pereira, T.N.S., Freitas Neto, M., Pereira M.G. (2008) Karyotype determination in three species of the Caricaceae with emphasis on the cultivated form (*C. papaya* L.). *Caryologia* (no prelo).

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

De Zerpa, D.M. (1980) Comportamiento meiótico de la descendencia híbrida producida al transferir el caracter bisexual de *Carica pubescens* a *Carica stipulata*. *Rev. Fac. Agron.* 11:5-47.

Drew, R.A., O'Brien, C.M., Magdalita, P.M. (1998) Development of interspecific *Carica* hybrids. *Acta Hort.* 461:285-292.

Frankel, R., Galun, E. (1977) *Pollination mechanisms reproduction and plant breeding*. New York: Springer-Verlag, 281p.

Hofmeyr, J.D.J. (1941) The genetics of *Carica papaya*. *Chronica Botanica*, 6 (11):245-247.

Horovitz, S., Jiménez, H. (1967) Cruzamientos interespecíficos e intergenéricos en Caricaceas y sus implicaciones fitotécnicas. *Agron. Trop.* 17:323-344.

Horovitz, S., Jiménez, H. (1972) The ambisexual form of *Carica pubescens* Lenne at Koch analyzed in interspecific crosses. *Agron. Trop.* 22 (5):475-482.

Jewell, D.C., Islam-Faridi, M.N. (1994) A technique for somatic chromosome preparation and C-banding of maize. In: Freeling, M., Walbot, V. (eds.) *The maize handbook*. Germany/New York: Springer-Verlag, p. 484-493.

Jimenez, H., Horovitz, S. (1958) Cruzabilidad entre especies de *Carica*. *Agron. Trop.* 7:207-215.

Jobin-Decor, M.P., Graham, G.C., Henry, R.J., Drew, R.A. (1997) RAPD and isozyme analysis of genetic relationship between *Carica papaya* and wild relatives. *Genet. Res. Crop. Evol.* 44:471-477.

Kim, J., Klein, P.E., Klein, R.R., Price, H.J., Mullet, J.E., Stelly, D.M. (2005) Chromosome identification and nomenclature of *Sorghum bicolor*. *Genetics*, 169:1169-1173.

Kim, M.S., Moore, P.H., Zee, F., Fitch, M.M.M., Steiger, D.L., Manshardt, R.M., Paull, R.E., Drew, R.A., Sekiota, T., Ming, R. (2002) Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. *Genome*, 45:503-512.

Kyndt, T., Romijin-Peeters, E., Van Droogenbroeck, B., Romero-Motochi, J.P., Gheysen, G., Goetghebeur, P. (2005) Species relationships in the genus *Vasconcellea* (Caricaceae) based on molecular and morphological evidence. *Am. J. Bot.* 92 (6):1033-1044.

Lan, T., Zhang, S., Liu, B., Li, X., Chen, R., Song, W. (2006) Differentiating sex chromosomes of the dioecious *Spinacia oleracea* L. (spinach) by FISH of 45S rDNA. *Cytogenet Genome Res.* 114:175-177.

Leitch, I.J., Heslop-Harrison, J.S. (1992) Physical mapping of the 18S-5.8S-26S rRNA genes in barley by in situ hybridization. *Genome*, 35:1013-1018.

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.

Magdalita, P.M., Adkins, S.W., Godwin, I.D., Drew, R.A. (1996) An improved embryo rescue protocol for a *Carica* interspecific hybrid. *Aust. J. Bot.* 44:343-353.

Magdalita, P.M., Drew, R.A., Adkins, S.W., Godwin, I.D. (1997) Morphological, molecular and cytological analyses of *Carica papaya* x *C. cauliflora* interspecific hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 95:224-229.

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

Malaguetti, G., Jimenez, H., Horovitz, S. (1957) Pruebas de transmisión del mosaico de la lechosa a otras especies de *Carica*. *Agric. Trop.* 7 (1):21-29.

- Manshardt, R.M., Drew, R.A. (1998) Biotechnology of papaya. *Acta Hort.* 461:65-73.
- Manshardt, R.M., Wenslaff, T.F. (1989) Interspecific hybridization of papaya with other species. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 114:689-694.
- Mekako, H.U., Nakasone, H.Y. (1975) Interspecific hybridization among 6 *Carica* species. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100 (3):237-242.
- Moore, G.A., Litz, R.E. (1984) Biochemical markers for *Carica papaya*, *C. cauliflora*, and plants from somatic embryos of their hybrid. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 109:203-218.
- Nakayama, S., Fujishita, M., Sone, T., Ohyama, K. (2001) Additional locus of rDNA sequence specific to the X chromosome of the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Chrom. Reserch*, 9 (6):469-473.
- Ohri, D., Bhargava, A., Chatterjee, A. (2004) Nuclear DNA amounts in 112 species of tropical hardwoods-new estimates. *Plant Biol.* 6:555-561.
- Olson, M.E. (2002) Intergeneric relationships within the Caricaceae-Moringaceae clade (Brassicales) and potential morphological synapomorphies of the clade and its families. *Int. J. Plant Sci.* 163 (1):51-63.
- Ricelli, M. (1963) Resistencia al virus del mosaico y adaptabilidad de tres especies de Caricaceae. *Agric. Trop.* 13:89-94.
- Sawant, A.C. (1958) Crossing relationship in the genus *Carica*. *Evolution*, 12:263-266.
- Storey, W.B. (1941) The botany and sex relationships of the papaya. *In: Hawaii Agr. Exp. St. Bull.* 87. *Papaya production in the Hawaiian Island*. University of Hawaii, p. 5-22.

Van Droogenbroeck, B., Breyne, P., Goetghebeur, P., Romeijn-Peeters, E., Kyndt, T., Gheysen, G. (2002) AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador. *Theor. Appl. Genet.* 105:289-297.

Van Droogenbroeck, B., Kyndt, T., Maertens, I., Romeijn-Peeters, E., Scheldeman, X., Romero-Motochi, J.P., Van Damme, P., Goetghebeur, P., Gheysen, G. (2004) Phylogenetic analysis of the highland papayas (*Vasconcellea*) and allied genera (Caricaceae) using PCR-RFLP. *Theor. Appl. Genet.* 108:1473-1486.

## UTILIZAÇÃO DE MARCADORES ISSR COMO FERRAMENTA AUXILIAR EM ESTUDOS FILOGENÉTICOS, NA FAMÍLIA CARICACEAE

### RESUMO

Os marcadores ISSR baseiam-se na abundância e variabilidade dos microssatélites presentes no genoma das plantas, utilizando-os como *primers* nas reações de amplificação das regiões entre eles, as quais têm-se mostrado bastante polimórficas. Além disso, apresentam uma alta reprodutibilidade de resultados, o que tem intensificado seu uso em estudos evolutivos e filogenéticos. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar um protocolo para análise de divergência genética em Caricaceae utilizando-se marcadores ISSR para a detecção de polimorfismos em níveis genérico e infragenérico. Foram analisadas quatro espécies da família Caricaceae: *Carica papaya*, *Vasconcellea goudotiana*, *V. monoica* e *Jacaratia spinosa*. O estudo foi conduzido com nove *primers*, os quais foram capazes de distinguir todas as espécies. Entre estes *primers*, (AGC)<sub>5</sub>GR foi o mais eficiente em relação ao número total de marcas e também em relação às bandas polimórficas (maior nível de polimorfismo). Com base nos resultados encontrados, foi possível concluir que as espécies *V. monoica* e *V. goudotiana* são geneticamente próximas e que *Jacaratia* é o gênero que mais se aproxima de *Vasconcellea*. O gênero *Carica* mostrou-se geneticamente distante dos demais. A formação dos grupos observada neste estudo corrobora outras

análises moleculares que sugerem uma ampla divergência genética entre *Carica* e *Vasconcellea*.

## ABSTRACT

The ISSR (inter simple sequence repeats) markers are based on the abundance and variability of microsatellites (SSR) dispersed along the plant genomes. The ISSR are generated by the amplification of inter-microsatellites regions, using the SSR as primers. The ISSR are very polymorphic. Moreover, their results are reproducible which have increased its use in evolutionary and phylogenetic studies. Thus, the objective of this work was to establish an ISSR protocol to study the genetic divergence in Caricaceae, detecting polymorphisms at generic and infra-generic levels. Four Caricaceae species were analyzed: *Carica papaya*, *Vasconcellea goudotiana*, *V. monoica* and *Jacaratia spinosa*. The ISSR-PCR was performed with nine primers and they were able to distinguish all species. Among the primers, the (AGC)<sub>5</sub>GR was the most powerful for ISSR amplifications regarding the number of amplified bands and polymorphism level. The results showed that *V. monoica* and *V. goudotiana* are closely related species and *Jacaratia* is closer to *Vasconcellea* than to *Carica*. The *Carica* genus was genetically distant from the others. The cluster distribution observed in this work corroborates other molecular and phylogenetic investigations suggesting a large genetic distance between *Carica* and *Vasconcellea*.

## INTRODUÇÃO

A família Caricaceae é composta por 35 espécies, distribuídas em seis gêneros: *Carica*, *Vasconcellea*, *Jacaratia*, *Jarilla*, *Horovitzia* e *Cylicomorpha* (Badillo 1971, 2000, 2001). Todas as espécies descritas são diplóides e possuem  $2n=2x=18$  cromossomos.

O mamoeiro (*C. papaya* L.), única espécie pertencente ao gênero *Carica* (Badillo 2000), é uma fruteira de grande importância econômica nos países tropicais, especialmente no Brasil, que é um dos maiores produtores e exportadores mundiais.

*Vasconcellea*, o maior gênero da família Caricaceae, contém 21 das 35 espécies descritas (Badillo 2000, 2001). Muitas destas espécies possuem características de interesse que podem ser introgridas no mamoeiro, tais como genes de resistência ao PRSV-P (Ricelli 1963; Horovitz e Jimenez 1967; Alvizo e Rojkind 1987; Magdalita *et al.* 1988), resistência a *Phytophthora*, tolerância ao frio, alto teor de açúcar, dentre outros (Manshardt e Wenslaff 1989; Drew *et al.* 1998).

Diferentes níveis de compatibilidade vêm sendo observados em cruzamentos envolvendo espécies de *Vasconcellea*, no entanto, ao se cruzarem estas espécies com o mamoeiro, os resultados não são satisfatórios (Warmke *et al.*, 1954; Jimenez e Horovitz 1958; Sawant 1958; Horovitz e Jimenez 1967, 1972; Mekako e Nakasone 1975; Manshardt e Wenslaff 1989). Mais recentemente, tem-se obtido um certo sucesso neste tipo de cruzamento intergenérico, devido à utilização da técnica de resgate de embrião (Magdalita *et al.* 1996; Manshardt e Drew 1998; Drew *et al.* 1998).

Para um melhor entendimento das relações interespecíficas e intergenéricas em Caricaceae, diversos estudos moleculares e filogenéticos vêm sendo realizados. Trabalhos envolvendo o uso de marcadores RAPD (Moore e Litz 1984; Jobin-Decor *et al.* 1997), RFLP (Aradhya *et al.* 1999; Van Droogenbroeck *et al.* 2004), AFLP (Van Droogenbroeck *et al.* 2002; Kyndt *et al.* 2005a), microssatélites (Kyndt *et al.* 2006) e regiões ITS (Olson 2002; Kyndt *et al.* 2005b) têm demonstrado que *Carica* e *Vasconcellea* são gêneros geneticamente distintos, ao contrário do que se supunha anteriormente.

Outra técnica que tem sido intensamente utilizada para detecção de polimorfismos em plantas é o ISSR (*inter simple sequence repeat*). Seu alto grau de polimorfismo baseia-se na abundância e variabilidade dos microssatélites (*simple sequence repeats* – SSR) existentes no genoma das plantas. Uma vez que os marcadores ISSR não necessitam de informações prévias sobre a seqüência de DNA e suplantam diversas limitações técnicas do RAPD e AFLP em função de sua alta reprodutibilidade e simplicidade, o objetivo deste trabalho foi a

determinação de um protocolo para análise de divergência genética, utilizando marcadores ISSR em Caricaceae.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Genótipos de *C. papaya* cv. *Sunrise Solo 72/12*, *V. monoica*, *V. goudotiana* e *J. spinosa* foram analisados neste estudo. Todos estes materiais pertencem à coleção de germoplasma de Caricaceae da Uenf. A lista completa é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Genótipos analisados neste estudo

Nº	Espécie	Codificação	Procedência
1	<i>V. monoica</i>	mon 1	ES, Brasil
2	<i>V. monoica</i>	mon 2	ES, Brasil
3	<i>V. monoica</i>	mon 3	ES, Brasil
4	<i>J. spinosa</i>	spi 4	RJ, Brasil
5	<i>V. monoica</i>	mon 5	ES, Brasil
6	<i>J. spinosa</i>	spi 6	RJ, Brasil
7	<i>J. spinosa</i>	spi 7	RJ, Brasil
8	<i>J. spinosa</i>	spi 8	RJ, Brasil
9	<i>C. papaya</i>	pap 9	ES, Brasil
10	<i>C. papaya</i>	pap 10	ES, Brasil
11	<i>V. goudotiana</i>	goud 11	USDA, EUA
12	<i>V. goudotiana</i>	goud 12	USDA, EUA

## Extração do DNA

O DNA total de cada amostra foi isolado de folhas jovens de cada genótipo, como proposto por Doyle e Doyle (1987), exceto pela adição de proteinase K ao tampão de extração, na concentração final de 0,125 mg/ml. A concentração final de DNA foi determinada em gel de eletroforese 0,8%, utilizando-se como padrão um material de concentração conhecida (DNA Lambda digerido com *HindIII* (Amersham Pharmacia, Biotech)).

## ISSR

Para a detecção de polimorfismos entre e dentro das espécies analisadas, 30 *primers* foram previamente testados, dos quais 9 foram selecionados para serem utilizados na amplificação de locos polimórficos. As temperaturas de anelamento (TM) foram otimizadas para cada *primer*. A Tabela 2 resume a seqüência dos *primers* utilizados, bem como suas temperaturas de anelamento.

Tabela 2 - *Primers* ISSR utilizados neste estudo e suas respectivas temperaturas de anelamento

<i>Primer</i> n <sup>o</sup> .	*Seqüência (5' → 3')	Temperatura média de anelamento (TM – °C)
1	(AGC) <sub>5</sub> GR	65
2	(AGC) <sub>5</sub> AY	65
3	CA(GA) <sub>8</sub>	58,5
4	(GCT) <sub>5</sub> Y	58,5
5	GC(GA) <sub>8</sub>	58,5
6	(AGC) <sub>5</sub> Y	56
7	GGGT(GGGGT) <sub>2</sub> G	56
8	(GA) <sub>8</sub> YC	53
9	(CAGA) <sub>4</sub>	45

\*Y = C ou T; R = A ou G.

As reações de amplificação foram realizadas num volume final de 20  $\mu$ l, contendo os seguintes reagentes e suas respectivas concentrações finais: 5 ng de DNA genômico, 0,4  $\mu$ M de *primer*, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M de cada dNTP, 0,6 U de Taq DNA polimerase, 5% de DMSO e tampão da enzima 1X. As reações de PCR foram conduzidas como se segue: 4min a 94 °C, 42 ciclos de 94 °C por 1min, TM por 1min e 72 °C por 3min e uma extensão final a 72 °C por 7min.

Os produtos da amplificação (bandas) foram então separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e submetidos à luz UV para visualização dos resultados. As imagens dos géis foram capturadas para posterior análise.

### **Análise dos dados**

A partir dos resultados dos géis foi construída uma matriz binária, na qual a presença de bandas foi designada como 1 e ausência de banda como 0. Essa matriz foi utilizada para calcular a matriz de dissimilaridade, considerando o complemento aritmético do índice de Jaccard, e, a partir desta matriz, foi feito o agrupamento dos genótipos pelo método UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*). A matriz de distância foi obtida com o auxílio do programa Genes (Cruz, 2006) e o dendrograma gerado com o auxílio do programa Statística (StatSoft Inc., 1995).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **ISSR**

Diversos *primers* foram testados com o objetivo de se verificar quais deles produziram um maior e mais informativo *fingerprint* dos genótipos avaliados.

Os *primers* utilizados variaram de 15 a 18 pares de bases de comprimento, sendo suas temperaturas ótimas de anelamento determinadas em ensaios preliminares utilizando-se amostras de DNA de mamoeiro.

Foram contabilizados 94 produtos de amplificação utilizando-se os nove *primers* previamente selecionados, sendo obtidas, em média, 10,4 bandas por *primer*. Deste total, 87 bandas foram polimórficas. O tamanho das bandas variou de 180 a 1.900 pares de bases (Tabela 3).

Os melhores resultados foram obtidos com o *primer* (AGC)<sub>5</sub>GR (Tabela 3 e Figura 1), enquanto os *primers* (GACA)<sub>4</sub>, (GATA)<sub>4</sub>, (GTG)<sub>5</sub>RG, (CT)<sub>8</sub>TG, (CT)<sub>8</sub>RC, ou não amplificaram ou não produziram bandas que fossem confiáveis o bastante para serem contabilizadas.

Tabela 3 - *Primers* ISSR utilizados neste estudo e seus produtos de amplificação

<i>Primers</i>	Bandas totais contabilizadas	Bandas polimórficas	Tamanho dos fragmentos (pb)
(AGC) <sub>5</sub> GR	19	18	280 – 1.900
(AGC) <sub>5</sub> AY	9	8	300 – 1.500
CA(GA) <sub>8</sub>	11	9	250 – 1.200
(GCT) <sub>5</sub> Y	14	14	300 – 1.200
GC(GA) <sub>8</sub>	10	9	270 - 800
(AGC) <sub>5</sub> Y	8	7	320 – 1.000
GGGT(GGGGT) <sub>2</sub> G	8	7	300 – 1.100
(GA) <sub>8</sub> YC	8	8	180 - 700
(CAGA) <sub>4</sub>	7	7	300 – 1.100

Saxena *et al.* (2005), trabalhando apenas com cultivares de *C. papaya*, compararam diferentes estratégias para a detecção de polimorfismos nessa espécie e reportaram que os marcadores ISSR foram mais polimórficos que os minissatélites, além de mais confiáveis e de maior reprodutibilidade que o RAPD. Os autores destacaram ainda o grande potencial de uso desta técnica em análises de *fingerprint* e na diferenciação de genótipos de base genética estreita, o que é relatado acerca do mamoeiro.

No presente trabalho, definiu-se um protocolo de rotina para análise de espécies de Caricaceae, utilizando os marcadores ISSR. Os resultados confirmaram não apenas a robustez desta técnica em termos de repetibilidade,

mas também sua grande capacidade em gerar polimorfismos com um número bastante reduzido de *primers*, quando comparada a outros marcadores como o RAPD por exemplo. Associando-se ainda a facilidade e a simplicidade de uso, este protocolo poderá ser adotado no laboratório como um procedimento padrão em análises de diferentes etapas do programa de melhoramento do mamoeiro, tais como distinção de genótipos, recomendação de cruzamentos mais promissores, seleção assistida, dentre outros.

### Relações genéticas em Caricaceae

A Figura 1 mostra que o perfil genômico entre e dentro das espécies estudadas difere substancialmente. Nela, é possível observar que cada uma das espécies tem um padrão de marcas ISSR próprio.

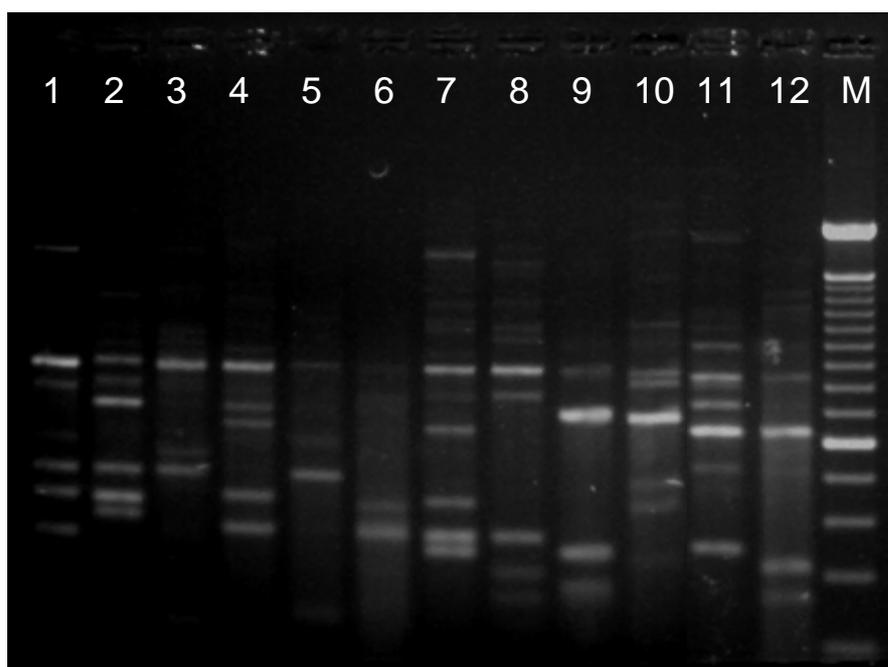


Figura 1. Gel de agarose 2% de quatro espécies de Caricaceae com *primer* (AGC)<sub>5</sub>GR. Os números 1 a 12 representam os genótipos identificados na Tabela 1; M representa DNA ladder (100pb).

Os marcadores moleculares ISSR vêm sendo utilizados de maneira bastante eficiente na estimação da diversidade genética em níveis intra e

interespecíficos (Kantety *et al.* 1995; Parsons *et al.* 1997; Ajibade *et al.* 2000; Raina *et al.* 2001; Borner *et al.* 2002), na determinação sexual (Danilova e Karlov 2006) e na geração de *fingerprints* (Gupta *et al.* 1994; Zietkiewicz *et al.* 1994; Archak *et al.* 2003), dentre outros. Neste trabalho, foi demonstrado que esta técnica foi eficiente para o estudo de relações genéticas em Caricaceae.

Os resultados obtidos com base no polimorfismo de locos ISSR estão de acordo com estudos prévios descritos na literatura sobre a família Caricaceae, em nível de espécie. O dendrograma gerado a partir dos dados moleculares (Figura 2) demonstra a formação de quatro grupos principais, nos quais todos os genótipos foram distintos entre si.

Foi observada uma grande dissimilaridade genética entre os acessos 9 e 10, ambos pertencentes à espécie *C. papaya*, cultivar SS 72/12. A amostra 9 foi composta por um *bulk* de plantas femininas e a 10, por um *bulk* de plantas hermafroditas. As cultivares do grupo Solo são bastante homogêneas e são provenientes de autofecundações sucessivas. Este processo leva à fixação de alelos, de forma que era esperada a ocorrência de poucas diferenças entre os materiais analisados. Assim, é possível supor que esta cultivar seja formada por um conjunto de linhas, o que explicaria essa diferença encontrada. Em outras palavras, embora as variedades sejam multiplicadas via autofecundação, a produção de sementes é tradicionalmente conduzida com a participação de várias plantas selecionadas, não se tendo o cuidado de fazer uma multiplicação do tipo linha pura. Conseqüentemente, pode ocorrer uma acumulação de polimorfismos ao longo das gerações.

Ainda com base nos grupos formados, pôde-se identificar que as espécies mais próximas entre si são *V. monoica* e *V. goudotiana*. *Jacaratia* está mais próximo de *Vasconcellea* do que de *Carica*, o que também é concordante com recentes estudos filogenéticos (Olson 2002; Kyndt *et al.* 2005b).

De fato, a proximidade genética entre *V. goudotiana* e *V. monoica* observada neste trabalho já havia sido reportada por Warmke *et al.* (1954). Através de cruzamentos interespecíficos entre *V. monoica* e *V. goudotiana*, utilizando este último como progenitor feminino, estes autores obtiveram híbridos F<sub>1</sub> férteis. Embora as características morfológicas observadas fossem intermediárias entre as dos parentais, o sistema reprodutivo observado nestes híbridos foi a monoicidia em 100% dos casos, semelhantemente ao progenitor

masculino, que é estritamente monóico (Badillo, 1971). Já na geração  $F_2$ , houve segregação para todas as características.

A distância genética observada entre *Vasconcellea* e *Carica* tem sido assinalada em vários trabalhos. Estudos prévios com base na morfologia do ovário (Badillo 1993) e barreiras de pré- e pós-fertilização em cruzamentos interespecíficos (Jimenez e Horovitz 1958; Mekako e Nakasone 1975; Manshardt e Wenslaff 1989) têm demonstrado que o mamoeiro é apenas distantemente relacionado ao gênero *Vasconcellea*. Aradhya *et al.* (1999), analisando DNA cloroplastídico de *C. papaya* e espécies de *Vasconcellea*, sugerem que o mamoeiro tenha divergido das espécies sul-americanas de *Vasconcellea* muito cedo na escala evolutiva e tenha evoluído, em isolamento, provavelmente na América Central. Estes dados deram suporte à recente reabilitação de *Vasconcellea* à categoria de gênero (Badillo 2000, 2001), antes classificado como uma seção dentro do gênero *Carica* (Badillo 1971). Além disto, dados gerados pela análise de FISH (trabalho 2 da presente tese) reiteram a distância genética existente entre *Carica* e *Vasconcellea*.

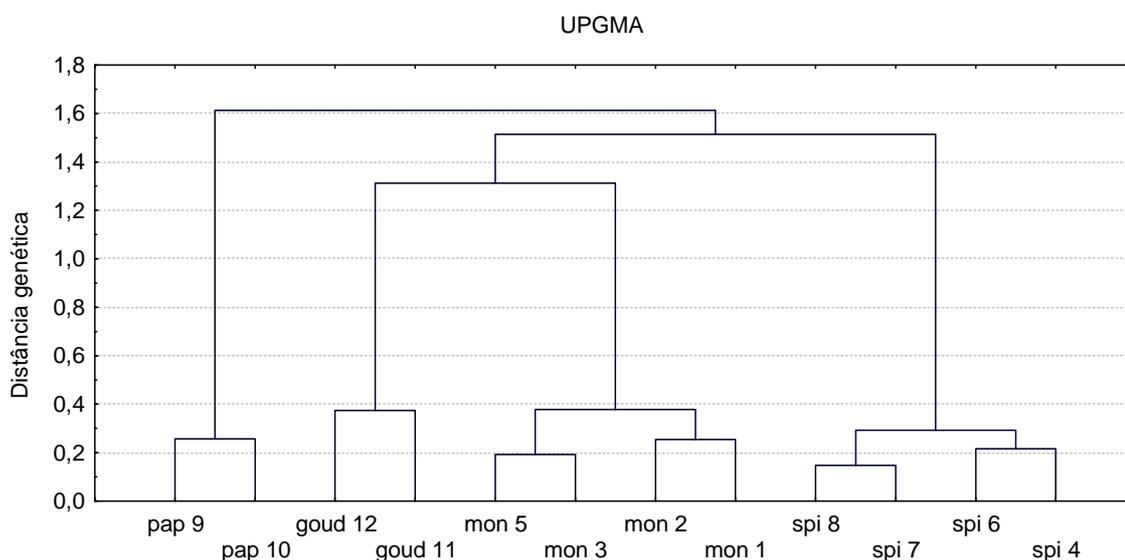


Figura 2. Dendrograma obtido pelo método UPGMA a partir das medidas de dissimilaridade genética entre quatro espécies de Caricaceae, expressas pelo complemento aritmético do índice de Jaccard. O eixo Y representa a distância relativa entre os acessos. No eixo X, estão representados os genótipos analisados, conforme referidos na Tabela 1.

Por outro lado, Van Droogenbroeck *et al.* (2004), analisando a diversidade de 18 espécies de *Vasconcellea* com base em DNA cloroplastídico e mitocondrial, além de *Carica*, *Jacaratia* e *Cylicomorpha*, via RFLP, deram suporte a proposta de evolução monofilética em Caricaceae. Ainda segundo estes autores, as espécies desta família podem ser divididas em duas linhas distintas, uma contendo parte das espécies de *Vasconcellea*, dentre as quais estariam as espécies *V. monoica* e *V. goudotiana*; e a outra, as demais espécies de *Vasconcellea* estudadas mais *C. papaya*, *Jacaratia* e *Cylicomorpha*. Mais recentemente, Kyndt *et al.* (2006), analisando seqüências microssatélites cloroplastídicas, corroboraram a teoria destas duas linhas evolutivas.

Este é o primeiro relato sobre o uso de marcadores ISSR em estudos de diversidade na família Caricaceae. Existe ainda um grande potencial de utilização desta ferramenta em análises mais complexas e com um maior número de espécies e gêneros, de forma que, com um maior número de dados, outras inferências sobre as inter-relações genéticas nesta família podem ser feitas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajibade, S.R., Weeden, N.F., Chite, S.M. (2000) Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. *Euphytica*, 111:47–55.

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

Aradhya, M.K., Manshardt, R.M., Zee, F., Morden, C.W. (1999) A phylogenetic analysis of the genus *Carica* L. (Caricaceae) based on restriction fragment length variation in a cpDNA intergenic spacer region. *Genet. Res. Crop. Evol.* 46:579-586.

Archak, S., Gaikwad, A.B., Gautam, D., Rao, E.V.V.B., Swamy, K.R.M., Karihaloo, J.L. (2003) Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD,

ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. *Genome* 46:362-369.

Badillo, V.M. (1971) *Monografía de la familia Caricaceae*. (Tese em Botânica) - Maracay, Venezuela, Universidad Central de Venezuela - Publicada por la asociación de profesores, 222p.

Badillo, V.M. (1993) Caricaceae. Segundo esquema. *Rev. Fac. Agron. Univ. Centr. Venezuela*, 43:1-111.

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

Badillo, V.M. (2001) Nota correctiva *Vasconcellea* St. Hil. y no *Vasconcella* (Caricaceae). *Ernstia*, 11 (1):75-76.

Bornet, B., Muller, C., Paulus, F., Branchard, M. (2002) Highly informative nature of inter simple sequence repeat (ISSR) sequences amplified using tri- and tetra-nucleotide primers from DNA of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.). *Genome*, 45:890–896.

Cruz, C.D. (2006) *Programa Genes, análise multivariada e simulação*. Viçosa: UFV, 175p.

Danilova, T.V., Karlov, G.I. (2006) Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica*, 151:15–21.

Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.

Drew, R.A., O'Brien, C.M., Magdalita, P.M. (1998) Development of interspecific *Carica* hybrids. *Acta Hort.* 461:285-292.

Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero-Severson, J., Owen, J.L. (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89:998–1006.

Horovitz, S., Jiménez, H. (1967) Cruzamientos interespecíficos e intergenéricos en Caricaceas y sus implicaciones fitotécnicas. *Agron. Trop.* 17:323-344.

Horovitz, S., Jiménez, H. (1972) The ambisexual form of *Carica pubescens* Lenne at Koch analyzed in interspecific crosses. *Agron. Trop.* 22 (5):475-482.

Jimenez, H., Horovitz, S. (1958) Cruzabilidad entre especies de *Carica*. *Agron. Trop.* 7:207-215.

Jobin-Decor, M.P., Graham, G.C., Henry, R.J., Drew, R.A. (1997) RAPD and isozyme analysis of genetic relationship between *Carica papaya* and wild relatives. *Genet. Res. Crop. Evol.* 44:471-477.

Kantety, R.V., Zeng, X., Bennetzen, J.L., Zehr, B.E. (1995) Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Mol. Breed.* 1 (4):365-373.

Kyndt, T., Romijn-Peeters, E., Van Droogenbroeck, B., Romero-Motochi, J.P., Gheysen, G., Goetghebeur, P. (2005a) Species relationships in the genus *Vasconcellea* (Caricaceae) based on molecular and morphological evidence. *Am. J. Bot.* 92 (6):1033-1044.

Kyndt, T., Van Droogenbroeck, B., Romeijn-Peeters, E., Romero-Motochi, J.P., Scheldeman, X., Goetghebeur, P., Van Damme, P., Gheysen, G. (2005b) Molecular phylogeny and evolution of Caricaceae based on rDNA internal transcribed spacer (ITS) and chloroplast sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37:442-459.

Kyndt, T., Van Droogenbroeck, B., Haegeman, A., Roldán-Ruiz, I., Gheysen, G. (2006) Cross-species microsatellite amplification in *Vasconcellea* and related genera and their use in germplasm classification. *Genome*, 49 (7):786-798.

- Magdalita, P.M., Adkins, S.W., Godwin, I.D., Drew, R.A. (1996) An improved embryo rescue protocol for a *Carica* interspecific hybrid. *Aust. J. Bot.* 44:343-353.
- Magdalita, P.M., Villegas, V.N., Pimentel, R.B., Bayot, R.G. (1988) Reaction of papaya (*Carica papaya* L.) and related species to ringspot virus. *Philipp. J. Crop Sci.* 13:129-132.
- Manshardt, R.M., Drew, R.A. (1998) Biotechnology of papaya. *Acta Hort.* 461:65-73.
- Manshardt, R.M., Wenslaff, T.F. (1989) Interspecific hybridization of papaya with other species. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 114:689-694.
- Mekako, H.U., Nakasone, H.Y. (1975) Interspecific hybridization among 6 *Carica* species. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100 (3):237-242.
- Moore, G.A., Litz, R.E. (1984) Biochemical markers for *Carica papaya*, *C. cauliflora*, and plants from somatic embryos of their hybrid. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 109:203-218.
- Olson, M.E. (2002) Intergeneric relationships within the Caricaceae-Moringaceae clade (Brassicales) and potential morphological synapomorphies of the clade and its families. *Int. J. Plant Sci.* 163 (1):51-63.
- Parsons, B.J., Newbury, H.J., Jackson, M.T., Ford-Lloyd, B.V. (1997) Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oryza sativa* L.) using different marker types. *Mol. Breed.* 3 (2):115-125.
- Raina, S.N., Rani, V., Kojima, T., Ogihara, Y., Singh, K.P., Devarumath, R.M. (2001) RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome*, 44:763–772.
- Ricelli, M. (1963) Resistencia al virus del mosaico y adaptabilidad de tres especies de Caricaceae. *Agric. Trop.* 13:89-94.

Saxena, S., Chandra, R., Srivastava, A.P., Mishra, M., Pathak, R.K., Ranade, S.A. (2005) Analysis of genetic diversity among papaya cultivars using single primer amplification reaction (SPAR) methods. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 80 (3):291-296.

Sawant, A.C. (1958) Crossing relationship in the genus *Carica*. *Evolution*, 12:263-266.

StatSoft Inc. (1995) *Statistica for Windows* (Computer program manual - release 5.0), Tulsa, OK, USA.

Van Droogenbroeck, B., Breyne, P., Goetghebeur, P., Romeijn-Peeters, E., Kyndt, T., Gheysen, G. (2002) AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador. *Theor. Appl. Genet.* 105:289-297.

Van Droogenbroeck, B., Kyndt, T., Maertens, I., Romeijn-Peeters, E., Scheldeman, X., Romero-Motochi, J.P., Van Damme, P., Goetghebeur, P., Gheysen, G. (2004) Phylogenetic analysis of the highland papayas (*Vasconcellea*) and allied genera (Caricaceae) using PCR-RFLP. *Theor. Appl. Genet.* 108:1473-1486.

Warmke, H.E., Cabanillas, E., Cruzado, H.J. (1954) A new interspecific hybrid in the genus *Carica*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 64:284-288.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20:176–183.

## RESUMO E CONCLUSÕES

A família Caricaceae é composta por 35 espécies, distribuídas em seis gêneros: *Carica*, *Vasconcellea*, *Jacaratia*, *Jarilla*, *Horovitzia* e *Cylicomorpha*. O mamoeiro (*C. papaya* L.), única espécie da família de importância comercial, tem-se destacado no cenário nacional como uma fruteira de exportação, sendo cultivada no Brasil, principalmente nos Estados do Espírito Santo e Bahia. Embora o Brasil seja o maior produtor mundial de mamão, existe ainda um grande potencial para aumentar suas exportações, elevando a qualidade do produto com o uso de programas de melhoramento genético. Uma série de características que podem ser introgridas na espécie cultivada, tais como resistência a doenças, aumento do teor de açúcar, dentre outras, pode ser encontrada em espécies relacionadas ao mamoeiro, principalmente nas do gênero *Vasconcellea*. No entanto, a transferência destes genes via hibridação é limitada por barreiras pós-zigóticas que a inviabilizam. Com o advento da técnica de resgate de embrião, alguns cruzamentos foram bem sucedidos, porém ainda realizados sem uma ampla compreensão de como se dão as relações entre as espécies inter cruzadas. Até recentemente, todo o trabalho de hibridação era feito apenas com base nas similaridades morfológicas, não se conhecendo, em termos de genoma, as similaridades e diferenças entre as espécies. Com os avanços da biologia molecular, iniciaram-se avaliações mais profundas sobre as inter-relações genômicas da família Caricaceae. O uso de diversos marcadores moleculares no estudo de DNA nuclear e de organelas tem possibilitado um melhor entendimento

sobre a filogenia e a evolução das espécies, desvendando as interações entre elas e direcionando os programas de melhoramento para a realização de cruzamentos mais promissores, baseados nas maiores similaridades genéticas entre determinadas espécies. Por outro lado, poucos são os estudos na área citomolecular, especialmente devido ao fato de as espécies de Caricaceae possuírem cromossomos pequenos e similares. Com a utilização da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), avanços importantes na citogenética de plantas, como a construção de mapas físicos, a investigação detalhada da estrutura cromossômica, o acompanhamento da quantidade de cromatina introduzida em cruzamentos interespecíficos e a análise de pareamentos intergenômicos em plantas híbridas, vêm sendo obtidos, permitindo que informações genéticas e físicas sejam compiladas e auxiliem os estudos genômicos. Outras determinações citológicas sobre a estrutura cromossômica, tais como localização dos centrômeros, RONS e heterocromatina, embora consideradas básicas em estudos citogenéticos, podem auxiliar o estudo da genômica comparativa e o isolamento de genes. Para se obter bons resultados nestes estudos, são necessárias, no entanto, boas preparações citológicas, o que significa núcleos intactos, com cromossomos bem condensados e espalhados. Assim, a primeira parte deste trabalho consistiu na determinação de um protocolo eficiente para obtenção de metáfases mitóticas que possibilitassem a visualização e a avaliação destes cromossomos, de forma que as melhores lâminas fossem selecionadas para a etapa subsequente, a FISH. Determinou-se que o melhor agente químico usado como pré-tratamento para pontas de raízes foi a trifluralina 2  $\mu\text{M}$  a 4 °C por 21h e que, após a digestão enzimática, a suspensão de protoplastos deveria ser ressuspensa em uma mistura de metanol/ácido acético, na proporção 2:1. Após isso, através da FISH, utilizando-se seqüências de rDNA como sondas, foi feito um estudo comparativo entre as espécies *C. papaya*, *V. goudotiana* e *V. cundinamarcensis*, no qual verificou-se maior similaridade genética entre estas duas últimas e, ainda, que o mamoeiro, em termos de seqüências repetitivas de rDNA, praticamente não se assemelha às espécies de *Vasconcellea*. Como não existem relatos sobre trabalhos utilizando-se a FISH em Caricaceae, o presente estudo pode ser considerado o pioneiro com esta família. Numa segunda etapa, foi determinado um protocolo de rotina para utilização de marcadores ISSR em espécies de Caricaceae. Neste trabalho, foram comparadas

as espécies *C. papaya*, *V. goudotiana*, *V. monoica* e *J. spinosa*. A partir do polimorfismo existente entre elas, foi construído um dendrograma no qual se confirmou, mais uma vez, uma estreita relação genética entre as espécies de *Vasconcellea*, verificando-se ainda a maior proximidade deste gênero com o *Jacaratia* do que com o *Carica*. Este fato corrobora a hipótese de que o mamoeiro tenha se separado das espécies de *Vasconcellea* e divergido em isolamento, o que o tornara geneticamente dissimilar deste grupo e, ainda, que *Vasconcellea* e *Jacaratia* possam ter a mesma origem, ou seja, um ancestral comum, o que implicaria duas linhas evolutivas distintas nesta família.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ainsworth, C. (2000) Boys and girls come out to play: The molecular biology of dioecious plants. *Ann. Bot.* 86:211-221.

Ajibade, S.R., Weeden, N.F., Chite, S.M. (2000) Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. *Euphytica*, 111:47–55.

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

Aradhya, M.K., Manshardt, R.M., Zee, F., Morden, C.W. (1999) A phylogenetic analysis of the genus *Carica* L. (Caricaceae) based on restriction fragment length variation in a cpDNA intergenic spacer region. *Genet. Res. Crop. Evol.* 46:579-586.

Archak, S., Gaikwad, A.B., Gautam, D., Rao, E.V.V.B., Swamy, K.R.M., Karihaloo, J.L. (2003) Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. *Genome*, 46:362-369.

Badillo, V.M. (1971) *Monografía de la familia Caricaceae*. (Tese em Botânica) - Maracay, Venezuela, Universidad Central de Venezuela - Publicada por la asociación de profesores, 222p.

- Badillo, V.M. (1993) Caricaceae. Segundo esquema. *Rev. Fac. Agron.* 43:1-111.
- Badillo, V.M. (2000) *Carica* L. vs *Vasconcella* St. Hil. (Caricaceae): con la rehabilitación de este último. *Ernstia*, 10 (2):74-79.
- Badillo, V.M. (2001) Nota correctiva *Vasconcellea* St. Hil. y no *Vasconcella* (Caricaceae). *Ernstia*, 11 (1):75-76.
- Bergey, D., Stelly, D.M., Price, H.J., McKnight, T.D. (1989) *In situ* hybridization of biotinylated DNA probes to cotton meiotic chromosomes. *Stain Technol.* 64:25-37.
- Bornet, B., Muller, C., Paulus, F., Branchard, M. (2002) Highly informative nature of inter simple sequence repeat (ISSR) sequences amplified using tri- and tetra-nucleotide primers from DNA of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.). *Genome*, 45:890–896.
- Brasileiro-Vidal, A.C., Guerra, M. (2002) Citogenética molecular em cereais. In: Brammer, S.P., Iorczeski, E.J. (orgs.) *Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, p. 277-298.
- Chen, M.H., Wang, C.C., Wang, D.N., Chen, F.C. (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Carica papaya* x *C. cauliflora* cultured in vitro. *Can. J. Bot.* 69:1913-1918.
- Damasceno Junior, P.C. (2004) *Estudo reprodutivo em mamoeiro (Carica papaya)*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - Uenf, 74p.
- Damasceno Junior, P.C., Costa, F.R., Pereira, T.N.S., Freitas Neto, M., Pereira, M.G. (2008) Karyotype determination in three species of the Caricaceae with emphasis on the cultivated form (*C. papaya* L.). *Caryologia*, (no prelo).
- Dantas, J.L.L., Dantas, A.C.V.L., Lima, J.F. (2002) Mamoeiro. In: Bruckner, C.H. (ed.) *Melhoramento de fruteiras tropicais*. Viçosa: UFV, p. 309-349.

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

De Candolle, A. (1908) *Origin of cultivated plants*. New York: D. Appleton & Co, 488p.

De Zerpa, D.M. (1980) Comportamiento meiótico de la descendencia híbrida producida al transferir el carácter bisexual de *Carica pubescens* a *Carica stipulata*. *Rev. Fac. Agron.* 11:5-47.

Drew, R.A., O'Brien, C.M., Magdalita, P.M. (1998) Development of interspecific *Carica* hybrids. *Acta Hortic.* 461:285-292.

Embrapa (2005) A cultura do mamoeiro; <http://www.cnpmf.embrapa.br> em 29/09/05.

Farias, A.R.N., Oliveira, A.M.G., Santos Filho, H.P., Dantas, J.L.L., Oliveira, M.A., Sanches, N.M., Medina, V.M., Cordeiro, Z.J.M. (1998) *A cultura do mamão*. Coleção Plantar, v. 37, Brasília: Embrapa-SPI, xp.

Griffor, M.C., Vodkin, L.O., Singh, R.J., Hymowitz, T. (1991) Fluorescent *in situ* hybridization to soybean metaphase chromosomes. *Plant. Mol. Biol.* 17:101-109.

Guerra, M. (2000) *Hibridização in situ*: princípios básicos. Apostila, Departamento de botânica, UFPE, 25p.

Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero-Severson, J., Owen, J.L. (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89:998-1006.

Hanson, R.E., Islam-Faridi, M.N., Percival, E.A., Crane, C.F., Ji, Y., McKnight, T.D., Stelly, D.M., Price, H.J. (1996) Distribution of 5S and 18S-28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma*, 105:55-61.

Hofmeyr, J.D.J. (1938) *Genetical studies of Carica papaya* L. I - the inheritance and relation of sex and certain plant characteristics. II – Sex reversal and sex forms. In: S. Afr. Dept. Agri. and Sci. Bull. 187, 64p.

Hofmeyr, J.D.J. (1939) Sex reversal in *Carica papaya* L. *S. Afr. J. Sci.* 36:286–287.

Hofmeyr, J.D.J. (1941) The genetics of *Carica papaya*. *Chronica Botanica*, 6 (11):245-247.

Horovitz, S., Jiménez, H. (1967) Cruzamientos interespecíficos e intergenéricos en Caricaceas y sus implicaciones fitotécnicas. *Agron. Trop.* 17:323-344.

Horovitz, S., Jiménez, H. (1972) The ambisexual form of *Carica pubescens* Lenne at Koch analyzed in interspecific crosses. *Agron. Trop.* 22 (5):475-482.

IBGE (2006) Levantamento sistemático da produção agrícola brasileira; <http://www.ibge.gov.br> em 12/12/2007.

Jiang, J., Gill, B.S. (1994a) Different species-specific chromosome translocations in *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* supports diphyletic origin of polyploid wheats. *Chromosome Res.* 2:59-64.

Jiang, J., Gill, B.S. (1994b) New 18S-26S ribosomal RNA gene loci: chromosomal landmarks for the evolution of polyploid wheat. *Chromosoma*, 103:179-185.

Jimenez, H., Horovitz, S. (1958) Cruzabilidad entre especies de *Carica*. *Agron. Trop.* 7:207-215.

Jobin-Decor, M.P., Graham, G.C., Henry, R.J., Drew, R.A. (1997) RAPD and isozyme analysis of genetic relationship between *Carica papaya* and wild relatives. *Genet. Res. Crop. Evol.* 44:471-477.

Kantety, R.V., Zeng, X., Bennetzen, J.L., Zehr, B.E. (1995) Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Mol. Breed.* 1 (4):365-373.

- Kharb, P., Dong, J.J., Islam-Faridi, M.N., Stelly, D.M., Hall, T.C. (2001) Fluorescence *in situ* hybridization of single copy transgenes in rice chromosomes. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 37 (1):1-5.
- Kim, J., Klein, P.E., Klein, R.R., Price, H.J., Mullet, J.E., Stelly, D.M. (2005) Chromosome identification and nomenclature of *Sorghum bicolor*. *Genetics*, 169:1169-1173.
- Kim, M.S., Moore, P.H., Zee, F., Fitch, M.M.M., Steiger, D.L., Manshardt, R.M., Paull, R.E., Drew, R.A., Sekiota, T., Ming, R. (2002) Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. *Genome*, 45:503-512.
- Kumar, L.S., Abraham, A., Srinivasan, V.K. (1945) The cytology of *Carica papaya* L. *Indian J. Agric. Sci.* 15:242-253.
- Kyndt, T., Van Droogenbroeck, B., Romeijn-Peeters, E., Romero-Motochi, J.P., Scheldeman, X., Goetghebeur, P., Van Damme, P., Gheysen, G. (2005a) Molecular phylogeny and evolution of Caricaceae based on rDNA internal transcribed spacer (ITS) and chloroplast sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37:442-459.
- Kyndt, T., Romeijn-Peeters, E., Van Droogenbroeck, B., Romero-Motochi, J.P., Gheysen, G., Goetghebeur, P. (2005b) Species relationships in the genus *Vasconcellea* (Caricaceae) based on molecular and morphological evidence. *Am. J. Bot.* 92 (6):1033-1044.
- Kyndt, T., Van Droogenbroeck, B., Haegeman, A., Roldán-Ruiz, I., Gheysen, G. (2006) Cross-species microsatellite amplification in *Vasconcellea* and related genera and their use in germplasm classification. *Genome*, 49 (7):786-798.
- Lapitan, N.L.V., Ganai, M.W., Tanskley, S.D. (1991) Organization of 5S ribosomal RNA genes in the genome of tomato. *Genome*, 34:509-514.
- Leitch, I.J., Heslop-Harrison, J.S. (1992) Physical mapping of the 18S-5.8S-26S rRNA genes in barley by *in situ* hybridization. *Genome*, 35:1013-1018.

Leitch, I.J., Heslop-Harrison, J.S. (1993) Physical mapping of four sites of 5S rDNA sequences and one site of the  $\alpha$ -amilase-2 gene in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome*, 36:517-523.

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.

Magdalita, P.M., Adkins, S.W., Godwin, I.D., Drew, R.A. (1996) An improved embryo rescue protocol for a *Carica* interspecific hybrid. *Aust. J. Bot.* 44:343-353.

Magdalita, P.M., Drew, R.A., Adkins, S.W., Godwin, I.D., (1997) Morphological, molecular and cytological analyses of *Carica papaya* x *C. cauliflora* interspecific hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 95:224-229.

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

Mahaewaran, G., Perryman, T., Williams, E.G. (1986) Use of an interspecific hybrids in identifying a new allelic specify generated at the self-incompatibility locus after inbreeding in *Lycopersicon peruvianum*. *Theor. Appl. Genet.* 50:391-398.

Malaguetti, G., Jimenez, H., Horovitz, S. (1957) Pruebas de transmisión del mosaico de la lechosa a otras especies de *Carica*. *Agric. Trop.* 7 (1):21-29.

Manshardt, R.M., Drew, R.A. (1998) Biotechnology of papaya. *Acta Hortic.* 461:65-73.

Manshardt, R.M., Wenslaff, T.F. (1989) Interspecific hybridization of papaya with other species. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 114:689-694.

- Mekako, H.U., Nakasone, H.Y. (1975) Interspecific hybridization among 6 *Carica* species. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100 (3):237-242.
- Melo, N.F., Guerra, M. (2003) Variability of the 5S and rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Ann. Bot.* 92:309-316.
- Moore, G.A., Litz, R.E. (1984) Biochemical markers for *Carica papaya*, *C. cauliflora*, and plants from somatic embryos of their hybrid. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 109:203-218.
- Mukai, Y., Endo, T.R., Gill, B.S. (1990) Physical mapping of the 5S rDNA multigene family in common wheat. *J. Hered.* 81:290-295.
- Mukai, Y., Endo, T.R., Gill, B.S. (1991) Physical mapping of 18S-26S rRNA multigene family in common wheat: identification of a new locus. *Chromosoma*, 100:71-78.
- Olson, M.E. (2002) Intergeneric relationships within the Caricaceae-Moringaceae clade (Brassicales) and potential morphological synapomorphies of the clade and its families. *Int. J. Plant Sci.* 163 (1):51-63.
- Parsons, B.J., Newbury, H.J., Jackson, M.T., Ford-Lloyd, B.V. (1997) Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oryza sativa* L.) using different marker types. *Mol. Breed.* 3 (2):115-125.
- Pereira, M.G. (2003) Melhoramento genético do mamoeiro (*Carica papaya*): desenvolvimento e recomendação de híbridos. *Seahortes*, 1 (1):73-77.
- Raina, S.N., Rani, V., Kojima, T., Ogihara, Y., Singh, K.P., Devarumath, R.M. (2001) RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome*, 44:763–772.
- Ricelli, M. (1963) Resistencia al virus del mosaico y adaptabilidad de tres especies de Caricaceae. *Agric. Trop.* 13:89-94.

Ronse Decraene, L.P., Smets, E.F. (1999) The floral development and anatomy of *Carica papaya* (Caricaceae). *Can. J. Bot.* 77:582-598.

Saxena, S., Chandra, R., Srivastava, A.P., Mishra, M., Pathak, R.K., Ranade, S.A. (2005) Analysis of genetic diversity among papaya cultivars using single primer amplification reaction (SPAR) methods. *J Horticult Sci Biotechnol* 80 (3): 291-296.

Sawant, A.C. (1958) Crossing relationship in the genus *Carica*. *Evolution* 12: 263-266.

Scheldeman, X., Van Damme, P., Urena Alvarez, J.V., Romero, M. (2003) Horticultural potential of Andean fruit crops exploring their centre of origin. *Acta Horticult.* 598:97-102.

Souza Junior, M.T., Nickel, O., Gonsalves, D. (2005) Development of transgenic papayas expressing the coat protein gene from a Brazilian isolate of papaya ringspot virus (PRSV). *Fitopat. Bras.* 30 (4):360-368.

Storey, W.B. (1938) Segregation of sex types in Solo papaya and their application to the selection of seed. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 35:83–85.

Storey, W.B. (1941) The botany and sex relationships of the papaya. *In: Hawaii Agr. Exp. St. Bull.* 87. *Papaya production in the Hawaiian Island*. University of Hawaii, p. 5-22.

Storey, W.B. (1969) Pistillate papaya flower – a morphological anomaly. *Science*, 163:401-405.

Van Droogenbroeck, B., Breyne, P., Goetghebeur, P., Romeijn-Peeters, E., Kyndt, T., Gheysen, G. (2002) AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador. *Theor. Appl. Genet.* 105:289-297.

Van Droogenbroeck, B., Kyndt, T., Maertens, I., Romeijn-Peeters, E., Scheldeman, X., Romero-Motochi, J.P., Van Damme, P., Goetghebeur, P., Gheysen, G. (2004) Phylogenetic analysis of the highland papayas (*Vasconcellea*)

and allied genera (Caricaceae) using PCR-RFLP. *Theor. Appl. Genet.* 108:1473-1486.

Warmke, H.E., Cabanillas, E., Cruzado, H.J. (1954) A new interspecific hybrid in the genus *Carica*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 64:284-288.

Zhao, X., Ji, Y., Ding, X., Stelly, D.M., Paterson, A.H. (1998) Macromolecular organization and genetic mapping of a rapidly evolving chromosome-specific tandem repeat family (B77) in cotton (*Gossypium*). *Plant Mol. Biol.* 38:1031–1042.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20:176–183.