

CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA E CITOLÓGICA DA ESPÉCIE
SILVESTRE *Vasconcella goudotiana* (Caricaceae)

EMANUELLI NARDUCCI DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ
MARÇO - 2009

CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA E CITOLÓGICA DA ESPÉCIE
SILVESTRE *Vasconcella goudotiana* (Caricaceae)

EMANUELLI NARDUCCI DA SILVA

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

Orientadora: Prof.^a Telma Nair Santana Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ

MARÇO – 2009

CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA E CITOLOGICA DA ESPÉCIE
SILVESTRE DE *Vasconcella goudotiana* (Caricaceae)

EMANUELLI NARDUCCI DA SILVA

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

Apresentada em 04 de março de 2009.

Comissão examinadora:

Francisco Filho da Silva (D.Sc. Produção Vegetal) – AGERP/MA

Alexandre Pio Viana (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

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

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

Dedico esta vitória à minha família, pelo apoio incondicional, em especial à minha Mãe Cida, mulher guerreira que dedica sua vida às filhas.

Ao meu namorado Matheus amor, companheiro, sempre acreditando em mim.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pois sem ele não estaria aqui;

A Nossa Senhora das Graças mãe companheira que sempre em todas as dificuldades esteve ao meu lado, me consolando e guiando nos momentos difíceis;

A UENF, pela oportunidade de cursar o mestrado;

A FAPERJ, pela concessão da bolsa.

À professora Telma por acreditar em uma estranha, por toda paciência, dedicação e compreensão, sem os quais não conseguiria chegar até aqui;

À minha família MARAVILHOSA, minha Mãe, Minha irmã Emarielli, Minhas Tias, Tia Bebel pelo apoio, Tia Lurdinha pelo incentivo, Tia Delina pelos puxões de orelhas, aos meus Tios em especial ao Tio Pedro que antes de todos acreditou que eu poderia chegar até aqui, aos meus Avós, pela paciência na minha constante ausência; Minhas primas, em especial as caçulinhas Dani e João Vitor que sempre souberam me entender;

Ao meu namorado Matheus, amor da minha vida, que sempre acreditou incentivou, teve paciência, e nunca mediu esforços para que eu alcançasse meus objetivos;

Aos amigos de Laboratório, Sérgio, Kellen, Carlos e Hérica, de forma especial a Fabiane, a Pedro pela ajuda e paciência sempre, e à minha amiga Monique, sempre disposta e parceira, me ajudando nos momentos mais difíceis;

Às amigas maravilhosas, Fefa, Karine, Jalile, Poli, Keila, Erica, Roberta, Marilene, Cláudia, Gazi, e a todos os amigos conquistados no dia a dia da UENF.

SÚMARIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	ix
1. Introdução.....	01
2. Revisão de Literatura.....	04
2.1. Aspectos Botânicos e Origem Geográfica.....	04
2.2. Determinação do Cariótipo.....	05
2.3. Meiose	09
2.4. Viabilidade Polínica.....	12
2.5. Aspectos Citogenéticos da família Caricaceae.....	14
3. Trabalhos.....	17
3.1. <i>Vasconcella goudotiana</i> : UMA DESCRIÇÃO BOTÂNICA SUMARIZADA DESSA ESPÉCIE SILVESTRE.....	17
3.1.1. Resumo.....	17
3.1.2. Abstract.....	18
3.1.3. Introdução.....	19
3.1.4. Material e Métodos.....	20
3.1.4.1. Material Vegetal.....	20
3.1.4.2. Metodologia.....	21
3.1.5.. Análise Estatística.....	22
3.1.6. Resultados e Discussão.....	22
3.1.7. Descrição das Plantas Masculinas.....	23
3.1.8. Descrição das Plantas Femininas.....	25

3.1.9. Referências.....	27
3.2. DETERMINAÇÃO DO CARIÓTIPO DA ESPÉCIE SILVESTRE	
<i>Vasconcella goudotiana</i>	29
3.2.1. Resumo.....	29
3.2.2. Abstract.....	30
3.2.3. Introdução.....	30
3.2.4. Material e Métodos.....	31
3.2.4.1. Material Vegetal.....	31
3.2.4.2. Pré-tratamento e Fixação.....	32
3.2.4.3. Preparo das Lâminas.....	32
3.2.5. Determinação do Cariótipo.....	33
3.2.6. Resultados e Discussão.....	33
3.2.7. Referências.....	38
3.3. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MEIÓTICO DA ESPÉCIE SILVESTRE <i>Vasconcella goudotiana</i>	41
3.3.1. Resumo.....	41
3.3.2. Abstract.....	42
3.3.3. Introdução.....	43
3.3.4. Materiais e Métodos.....	44
3.3.4.1. Material Genético.....	44
3.3.4.2. Metodologias.	45
3.3.5. Resultado e Discussão.....	47
3.3.6 Referências.....	59
4.0. Conclusão Geral.....	61
5.0. Referências.....	62

RESUMO

SILVA, Emanuelli Narducci; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março, 2009. Caracterização botânica e citológica da espécie silvestre *Vasconcella goudotiana* (Caricaceae). Orientadora: Telma Nair Santana Pereira. Conselheiros: Messias Gonzaga Pereira e Alexandre Pio Viana.

As espécies que compõem o gênero *Vasconcella* são cultivadas em pequena escala, sendo consumidas e cultivadas principalmente por populações indígenas, da região dos Andes e Equador. O gênero se destaca por ser considerada fonte de genes de resistência a doenças que são danosas para a cultura do mamoeiro (*Carica papaya* L.). Assim, a preservação, avaliação e caracterização de germoplasma silvestre relacionado à forma cultivada são essenciais para o melhoramento da cultura. Esta dissertação teve o objetivo de fazer uma caracterização citológica da espécie silvestre *Vasconcella goudotiana* e está composta de três artigos científicos: um sobre uma descrição botânica sumarizada da espécie cultivada nas condições de Campos dos Goytacazes; um segundo sobre a determinação do cariótipo da espécie e um terceiro sobre a caracterização meiótica e pós-meiótica da espécie. Para tanto, sementes foram adquiridas via doação feita pelo USDA / ARS - Hillo (HI) (United States Department of Agriculture / Agricultural Research Service) - Hillo (HI): (HCR 167) e as plantas foram cultivadas na casa de vegetação localizada na Unidade de Apoio à Pesquisa do CCTA. A descrição botânica foi realizada usando descritores do IBPRG para a cultura do mamoeiro. Pode-se observar que a espécie é dióica com plantas masculinas e femininas com fenótipos bem distintos: a planta

masculina apresenta folhas palmipartidas e onduladas com comprimento médio variando de 25,98 cm e largura média de 31,20 cm, não apresentam pubescência e nem cera. As flores são dispostas em inflorescências com pedúnculos compridos medindo em média 23,84 cm e apresentando em média 24,44 botões florais. As flores são de coloração amarelo creme, pentâmeras, simpétalas, apresentando dez anteras do tipo heterodinamo. As anteras são basifixas com deiscência longitudinal. A planta feminina apresenta folhas palmipartidas, onduladas, sem serosidade, pouca pubescência e com dimensões menores que as folhas masculinas. As flores são únicas, dispostas nas axilares foliares, pentâmeras, dialissepalo. O gineceu é gamocarpelar e o pistilo é pluricarpelar apresentando seis carpelos. O ovário é ínfero, plurilocular, apresentando cinco lóculos e 264 óvulos. Para a determinação do cariótipo foi utilizado um protocolo já definido no Laboratório para outras espécies da família, sendo que as pontas de raízes foram obtidas em plantas em desenvolvimento. Os dados de comprimento dos braços longos e curtos dos cromossomos permitiram estimar a razão entre braços, o comprimento total ou absoluto dos cromossomos, o índice centromérico e o índice de simetria. Com base nas imagens das células em metáfase observou-se que a espécie apresenta dezoito cromossomos, cujos comprimentos variaram de 3,06 μm a 2,03 μm , sendo quatro pares submetacêntricos e cinco pares metacêntricos. O cariótipo é do tipo simétrico com um índice de 40,16% e o comprimento do lote haplóide foi de 23,08 μm . Dentre as espécies Caricaceae analisadas até então, *Vasconcella goudotiana* é a que apresenta as maiores medidas dos cromossomos. A avaliação do comportamento meiótico foi realizada com a observação da formação de gametas masculinos baseada na análise meiótica, observando as diferentes fases meióticas. De um modo geral, a meiose seguiu normal gerando no final gametas balanceados, porém algumas irregularidades foram observadas como cromossomos pegajosos, cromossomos retardatários, segregação precoce, e distúrbio nas fibras do fuso. Considerando que a meiose é influenciada por fatores genéticos e ambientais, acredita-se que essas anormalidades foram decorrentes das condições ambientais como alta temperatura durante a formação dos gametas, já que esta espécie é originalmente de ambientes cuja elevação fica em torno de 1.500 a 2.200 m acima do nível do mar. O índice meiótico foi de 85,45%, sendo que foram observados díades, tríades e políades com certa frequência nas células. Esse

índice sugere que esta espécie é meioticamente instável. A avaliação da taxa de viabilidade polínica foi realizada com a solução tripla de Alexander, sendo os grãos de pólen classificados como viáveis (coloração púrpura) e inviáveis (coloração verde). A espécie apresentou uma viabilidade polínica de 67,93% considerada um percentual baixo, apesar de ter tido plantas com percentual de 85,05%, que é um percentual indicador de uma viabilidade média. Os valores baixos do índice meiótico e da viabilidade polínica são reflexos das anomalias observadas durante a divisão meiótica. Assim, conclui-se que a espécie *V. goudotiana* deve ser usada em programas de melhoramento via hibridação com certa cautela, já que provavelmente apresenta gametas desbalanceados.

ABSTRACT

SILVA, Emanuelli Narducci; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2009. Botanical and cytological characterization of the wild species *Vasconcella goudotiana* (Caricaceae). Adviser: Telma Nair Santana Pereira. Committee members: Messias Pereira Gonzaga and Alexandre Pio Viana.

In general, species within *Vasconcella* genus are cultivated in small scale by indigenous populations in Ecuador and Andean region. The genus is considered as a source of resistance genes that can be transferred to papaya (*Carica papaya* L.). Thus, the conservation, evaluation and characterization of this wild germplasm related to the cultivated form are essential to papaya breeding. The objective of this dissertation was to characterize *V. goudotiana*, a wild species related to papaya, in cytological terms. This dissertation is compound by three scientific works. The first one botanically describes the species under Campos dos Goytacazes climate conditions; the second one presents its karyotype and the last one shows the meiotic and post-meiotic analyses of this species. Seeds of *V. goudotiana* (accession HCAR 167) were kindly donated by USDA/ARS - Hillo (HI) (United States Department of Agriculture/Agricultural Research Service) - Hillo (HI) and the plants were cultivated under greenhouse conditions, at UAP/CCTA/UENF. The botanical description was based on the IBPGR descriptors recommended to papaya. *V. goudotiana* is a dioecious species and its male and female plants show a very distinct phenotypes. The male plants presented palmate leaves, with a mean length of 25.98 cm and a mean wide of 31.20 cm. These leaves presented

neither trichomes nor wax. The male flowers are disposed in inflorescences with long peduncles (mean length of 23.84 cm) and a mean of 24.44 floral buds per inflorescence. The flowers are yellow-cream, pentamerous, sympetalous, with ten anthers of heterodynamous type. The anthers are basefix with longitudinal dehiscence. The female plants have palmate leaves with no waxy, a few pubescence and smaller size than the male leaves. The solitary female flowers are localized in the axil of the leaf. They are pentamerous and dialysepalous. The gynoecium is syncarpous (multiple connate carpels) and the pistil shows six carpels. The ovary is inferior, 5-locular, with 264 ovules per ovary. Male plants flowered before female, with a mean of 8 months until flowering. The karyotype was obtained using the protocol that was already defined to the other Caricaceae species. Root tips were collected from developing plants. Data from long and short arms of the chromosomes were used to estimate the arm ratio, the total or absolute chromosome length, the centromeric index and the symmetry index. Based on the images from metaphase cells, it was verified that this species has 18 chromosomes, whose length is between 2.03 and 3.06 μm . Four chromosome pairs were classified as submetacentric and five pairs as submetacentric. The karyotype was symmetric and its symmetry index was 40.16%. The haploid lot length was 23.08 μM . Among the already Caricaceae species analyzed in the lab, *V. goudotiana* has the longest chromosomes. Its meiotic behavior was evaluated by the analysis of male gametes formation in different meiosis stages. In general, it was a normal meiosis, resulting in balanced gametes, although some abnormalities as sticky and delayed chromosomes, precocious segregation and fuse fibers disturbance had been observed. Considering that meiosis is influenced by genetic and environment factors, it is possible to suppose that these abnormalities would be a consequence from environment conditions such as the high temperatures during the gametes formation, since this species is native from altitudes between 1,500 and 2,200 m above sea, usually with low temperatures. The meiotic index was 85.45% and some dyads, triads and polyads were observed in the cells. This index value suggests that *V. goudotiana* is a meiotic unstable species. The pollen grain viability was analyzed using Alexander's triple solution. The viable pollen grains were red stained while the non-viable ones were green stained. A 67.93% can be considered low pollen grain viability, although some plants presented a value of 85.05%, indicating a moderate viability. The low

values of the meiotic index and the pollen grain viability can result from some abnormalities observed during the meiosis. Thus, the use of *V. goudotiana* in breeding programs that use hybridization crosses should be cautious due to its unbalanced gametes.

.

1. INTRODUÇÃO

A família *Caricaceae* é composta pelo gênero *Cylicomorpha*, originário da África Equatorial, e pelos gêneros *Carica*, *Jacaratia*, *Jarilla*, *Horovitzia* e *Vasconcella*, originários das Américas do Sul e Central (Badillo, 1993, 2000). Todas as espécies da família até então analisadas citologicamente são diplóides ($2n=2x=18$ cromossomos) e dióicas com exceção de *Vasconcella monóica* que é monóica, *Vasconcella cundinarmacensis* também conhecida com *Vasconcella pubescens*, que é monóica-dióica e *Carica papaya* que é dióico-hermafrodita. O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é a espécie mais importante da família devido à produção de seus frutos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Chen *et al.*, 1991).

A cultura do mamoeiro apresenta alguns problemas sérios que causam grandes perdas aos agricultores devido à presença de pragas e doenças, que algumas vezes dizimam plantações inteiras. A mancha anelar ou mosaico, causada pelo vírus PRSV (*Papaya RingSpot Vírus*), é considerada uma das principais doenças que ocorrem na cultura do mamoeiro (Souza Junior, 2000). Várias metodologias foram implementadas a fim de controlar a doença, mas até o presente nenhuma apresentou sucesso (Dantas *et al.*, 2002); uma das limitações encontradas pelos melhoristas para controlar o PRSV é a ausência de genótipos no germoplasma da forma cultivada que apresentem resistência ao vírus. Atualmente o monitoramento semanal do campo, é a técnica de controle aplicada em campos de produção. Por outro lado, algumas espécies silvestres da família *Caricaceae* apresentam genes de resistência ao vírus PRSV (Alvizo e Rojkind,

1987; Magdalita *et al.*, 1988), bem como são portadoras de outras características de interesse agrônomo, como resistência ao frio, alta concentração de açúcar, resistência à *Phytophthora*, entre outros caracteres (Manshardt e Wenslaff, 1989; Drew *et al.*, 1998; Scheldeman *et al.*, 2001).

Dentro do gênero *Vasconcella* pode-se destacar a espécie silvestre *Vasconcella goudotiana* que apresenta o caráter de resistência ao fungo *Phytophthora palmivora*, que age destruindo o meristema radicular das plantas. Esse fungo age também na forma de esporos ocasionando o desenvolvimento de uma massa micelial branca, a qual leva a podridão do fruto, sendo que as perdas de frutos maduros giram em torno de 7 a 10% da produção total do mamoeiro (Liberato *et al.*, 1993). A ação de fitopatógenos causa perdas pós-colheita que podem chegar a 75% na cultura do mamoeiro na fase de comercialização. Com tudo as pesquisas visando à resistência ao fungo ainda são incipientes.

Para que esse germoplasma seja utilizado em programas de melhoramento é necessário que se utilize a hibridação interespecífica que tem como objetivo a introgressão de genes de interesse em espécies cultivadas. Para tanto é importante que se conheça a espécie em questão e que se conheça as relações genéticas entre a espécie silvestre e a forma cultivada (Dantas *et al.*, 2002).

As espécies que compõem o gênero *Vasconcella* são cultivadas em pequena escala, sendo consumidas e cultivadas principalmente por populações indígenas, da região dos Andes e Equador (Scheldeman *et al.*, 2001). A literatura sobre os aspectos citogenéticos e genéticos desse gênero é muito incipiente. Assim, conhecer e caracterizar citogeneticamente o germoplasma silvestre da família Caricaceae permite um maior conhecimento a respeito das espécies e um melhor uso das mesmas em programas de melhoramento.

O Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) vem desenvolvendo um programa de melhoramento genético do mamoeiro desde 1995, e recentemente foram introduzidas na sua coleção de germoplasma as espécies *V. quercifolia*, *V. cauliflora*, *V. goudotiana*, *V. cundinamarcensis* e *V. monoica* importantes fontes de genes de interesse para o melhoramento genético da forma cultivada, o mamoeiro.

Dando continuidade às pesquisas citogenéticas de espécies da família Caricaceae, este trabalho teve por objetivo caracterizar citologicamente a espécie silvestre *Vasconcella goudotiana* via determinação do cariótipo, caracterização da meiose, determinação do índice meiótico e determinação da viabilidade polínica, visando gerar conhecimentos que possam ser usados no programa de melhoramento do mamoeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos Botânicos e Origem Geográfica

A família Caricaceae pertence à classe Dicotyledoneae, subclasse *Archichlamydeae*, ordem *Violales*, subordem *Caricineae*, família *Caricaceae* (Badillo, 1993). Dentro da família destaca-se o gênero *Vasconcella* que é composto por 21 espécies. De acordo com Scheldeman *et al.* (2001), algumas das espécies que compõem o gênero *Vasconcella* apresentam forma e textura da casca parecida com a *Carica papaya* L., sendo conhecidas como *papaya* de terras altas ou *papayas* das montanhas, e pela preferência por terras altas. Até o presente, as espécies da família analisadas são tidas como diplóides com $2n=2x=18$ cromossomos, ou seja, o número básico de cromossomos do conjunto haplóide é $n=x=9$ (Storey, 1941).

As plantas do gênero *Vasconcella* são arbustos que chegam a atingir até 10 m de altura; a haste medular pode se apresentar simples ou ramificada, seu tronco se apresenta mais largo acima da base podendo atingir até 20 cm de diâmetro. Apresentam folhas grandes, sendo formadas de sete a cinco nervuras, em âmbito semicircular (Badillo, 2000). A maioria das espécies do gênero *Vasconcella* é dióica, porém há representantes monóicos (*V. monóica*) e dióico-monóico (*V. cundinamarcensis* ou *V. pubescens*). Em *V. monóica* as flores são diferenciadas morfológicamente, porém ocorrem na mesma inflorescência, ocorrendo uma ou duas flores femininas e as demais masculinas (Badillo, 1993).

A espécie *V. goudotiana* é dióica e, portanto é alógama. Nas plantas masculinas as flores ocorrem em inflorescências e nascem nas axilas foliares; apresentam pedúnculos alongados que chegam a atingir 13 cm; as flores se organizam em grupos e apresentam o tubo do cálice curto, lóbulos curtos estreitos e agudos, de coloração verde enquanto os botões apresentam coloração amarelo-claro ao abrirem. Já as flores femininas se apresentam como flores isoladas e também nascem nas axilas foliares, são flores pequenas e com o pedúnculo muito curto (Badillo, 1993). As plantas de *V. goudotiana* também diferem em tamanho e estrutura foliar, as plantas masculinas apresentam folhas mais repicadas, enquanto as femininas apresentam folhas menos repicadas.

Os primeiros relatos sobre as Caricáceas datam de 1696, e foram descritos por *Linneaus*, em sua obra *Plantarum* em 1753 (Badillo, 1971). O gênero *Vasconcella* tem o Equador como seu centro de diversidade; na área se concentra 71% do total de espécies do gênero descritas, ou seja, 15 das 21 espécies do gênero. Devido a tal característica a área é considerada como portadora de um alto nível de diversidade genética (Badillo, 1993). *V. microcarpa* e *V. cundinamarcensis* são encontradas da região Andina e em direção ao norte do Panamá e *V. cauliflora* pode ser encontrada do norte ao sul do México (Badillo, 2000). As espécies que compõem o gênero são descritas como silvestres e ou semidomesticadas, e se desenvolvem em regiões de 1.500 a 2.200m de altitude, em bosques úmidos e subtropicais (Badillo 1971, 1993, 2000).

2.2. Determinação do Cariótipo

Cariótipo são a representação de todos os cromossomos ou conjunto cromossômico de uma espécie. Cromossomos são unidades de herança encontradas no núcleo de todas as células de organismos eucariontes. A determinação de um cariótipo geralmente baseia-se nos cromossomos mitóticos em metáfase. Três termos são freqüentemente utilizados na identificação de cromossomos: cariótipo, o exato conjunto básico (genoma) de um organismo; cariograma, medidas físicas dos cromossomos tiradas em fotomicrografia, onde os cromossomos são organizados em ordem decrescente ou não, e idiograma, que é o desenho esquemático do cariograma (Guerra & Souza, 2002).

A forma dos cromossomos monocêntricos fundamenta-se na posição da constrição primária ou centrômero que divide o cromossomo em braços de tamanho igual ou não; além dos centrômeros tem-se a região organizadora de nucléolo (RON), sitio da seqüência repetitiva 45S (rDNA), que pode ser terminal ou intersticial dando origem à constrição secundária e no último caso dando origem ao satélite (Schubert, 2007).

Levan *et al.* (1964), baseando-se na posição do centrômero, classificaram os cromossomos em seis tipos: metacêntrico (M) e telocêntrico (T), que são terminologias usadas para cromossomos que possuem o centrômero localizado exatamente no meio do cromossomo (metacêntrico) e na porção terminal do cromossomo (telocêntrico). Os outros quatro tipos foram classificados em concordância com a localização do centrômero que poderia ser na região mediana (m), submediana (sm), subterminal (st) e terminal (t); entretanto, essa classificação é indicada para cromossomos longos. Guerra (1986) revisou o trabalho de Levan *et al.* (1964) e sugeriu uma classificação baseada na razão entre braços (r) e no índice centromérico (IC) e com base nesses dois estimadores classificou os cromossomos em quatro tipos: metacêntrico (M, $r=1,0$ a $1,49$; $IC=40,1$ a $50,0$), submetacêntrico (SM, $r=1,50$ a $2,99$, $IC=25,1$ a $40,0$), acrocêntrico (A, $r=3,0$ a 7 , $IC=0,01$ a $25,0$) e telocêntrico (T, $r=\infty$, $IC=0$). O autor relata que esta classificação é mais adequada para espécies com cromossomos pequenos.

Outro conceito importante em citologia é a simetria e assimetria do cariótipo, cujos cromossomos de tamanho semelhante e centrômero mediano ou submediano são considerados como pertencentes a um cariótipo simétrico, enquanto que cariótipos assimétricos são aqueles que apresentam cromossomos de tamanho mais heterogêneo e centrômeros mais terminais (Mayeda, 1997). Os cariótipos mais simétricos são considerados mais primitivos e dariam origem aos cariótipos assimétricos. Huziwara (1962) estabeleceu um parâmetro para analisar a simetria dos cariótipos, o índice TF (índice de simetria). O índice TF corresponde à razão entre o somatório dos braços curtos e o comprimento do lote haplóide; o índice pode variar de 0 a 50%, sendo este último valor característico de cariótipos extremamente simétricos. Acredita-se que espécies que apresentam cariótipo assimétrico sejam mais avançadas evolutivamente (Coelho e Battistin,

1996; Mercado-Ruaro e Delgado-Salinas 1998), e que alterações cromossômicas ocorreram no decorrer da evolução da espécie (Maffei *et al.*, 1996).

Outras variáveis também são levadas em conta na análise do cariótipo como o tamanho do genoma, características dos telômeros, tamanho e posição dos *knobs* heterocromáticos, e comprimento absoluto e relativo dos cromossomos, além das constrições secundárias (Singh, 1993).

Para a determinação do cariótipo é necessário que células mitóticas em divisão apresentem os cromossomos espalhados e condensados de forma a permitir a contagem dos cromossomos e as medições dos braços cromossômicos. Para tanto, o tecido vegetal tem que ser preparado de maneira a preservar os cromossomos permitindo, assim, uma boa visualização dos mesmos. De maneira geral, é realizado um pré-tratamento com substâncias químicas, o qual é seguido pela fixação, com posterior coloração. O pré-tratamento consiste em submeter o tecido vegetal, normalmente pontas de raízes visando: a) clarear o citoplasma; b) dissolver a lamela média promovendo uma melhor separação e distribuição das células; c) promover o espalhamento dos cromossomos acompanhado da clarificação das constrições; e d) amaciar o tecido. O pré-tratamento também promove uma rápida penetração da solução fixadora como também facilita o estudo da estrutura dos cromossomos (Sharma e Sharma 1994)

Dentre os produtos químicos utilizados em pré-tratamentos tem-se a colchicina que é um alcalóide que altera o estado coloidal dos cromossomos e, no citoplasma, causa a inibição das fibras do fuso acromático, permitindo assim uma distribuição ao acaso dos cromossomos metafásicos por toda a célula. Essa substância em contato com os cromossomos promove o encurtamento dos mesmos e torna as constrições mais evidentes. Não há efeito letal nos tecidos, o qual deve ser fixado em uma solução fixadora, após tratamento com colchicina (Sharma e Sharma, 1994). As metáfases, bem espalhadas oriundas de tratamento com colchicina, são conhecidas como metáfase C. É a partir das metáfases C que são montados os kariogramas e idiogramas (Guerra, 1988).

A 8-hidroxiquinoleína, membro do complexo quinolina é outro produto utilizado como pré-tratamento, e seu uso promove a inativação do fuso e, conseqüentemente, não impede a expansão dos cromossomos; os braços cromossômicos contraem - se igualmente, permitindo a metáfase manter o seu arranjo relativo no plano equatorial da célula. A oxiquinoleína não afeta algumas

regiões dos cromossomos fazendo com que os dois braços fiquem bem contraídos e visíveis. As constrições secundárias também se tornam visíveis com o uso desta substância (Sharma e Sharma, 1994). Usualmente é indicado pré-tratar o tecido somático em solução aquosa 0,002 M por 3 a 4 h, em temperatura de 18 °C; temperaturas superiores têm causado o aparecimento de cromossomos pegajosos, sendo o seu uso adequado para espécies que apresentam cromossomos de tamanho grande (Singh, 1993).

O paradiclorobenzeno (PDB), pertencente ao grupo dos benzenos, é muito utilizado em determinação de cariótipos, pois ele não somente promove a inibição do fuso, como também torna as constrições cromossômicas mais visíveis devido à contração e a hidratação diferencial dos segmentos dos cromossomos. De todos os produtos utilizados na citogenética, o paradiclorobenzeno apresenta uma ampla utilização podendo ser utilizado tanto para espécies com cromossomos longos quanto com cromossomos pequenos, variando o tempo de tratamento, de acordo com a espécie (Sharma & Sharma, 1994).

Quanto à coloração dos cromossomos tem a coloração convencional e a diferencial ou bandeamento. As colorações ditas como convencionais, são as que utilizam produtos que coram o cromossomo por inteiro (Giemsa, Orceína Acética, Reativo de Schiff, hematoxilina/eosina, etc.). A solução corante Feulgen ou Reativo de Schiff, cujo corante é a fucsina ácida, tem muitas vantagens como alta especificidade ao DNA, daí ser considerado o mais efetivo para a coloração dos cromossomos, porém em espécies de baixo conteúdo de DNA e cromossomos muito pequenos, nem sempre os cromossomos são bem corados e delineados (Guerra & Souza, 2002).

O carmim ou carmine é um corante natural muito utilizado para coloração de cromossomos mitóticos e meióticos. Sua solução serve a duplo propósito, de fixação e coloração, pois o ácido acético é um bom fixador para cromatina e o fluído penetra rapidamente. Solução em 1 % do corante é preparada em ácido acético em 45 % quente; certos autores preferem sempre solução em 5 %, podendo ser adicionado hidróxido de ferro durante a preparação do corante para funcionar como mordente e intensificar a coloração. Para tecidos mais compactos como pontas de raízes ou folhas é aconselhável tratar o material com uma mistura HCl-carmim aquecido, o qual além de amaciar o tecido irá colorir os cromossomos (Sharma e Sharma 1994).

Giemsa é uma mistura de vários corantes, do grupo azul de metileno e seus produtos da oxidação, os azures bem como a eosina Y. A qualidade do corante varia com a proporção dos corantes usados no preparo. A solução de Giemsa é geralmente preparada por dissolução do pó em mistura de glicerina e metanol. Seu efeito na coloração torna a cromatina corada de vermelho e o citoplasma de azul. A importância de Giemsa na coloração de cromossomos aumentou substancialmente após o advento da técnica de bandeamento, em meados de 1970 (Sharma e Sharma 1994).

Além destes podem ser utilizados corantes para regiões específicas do DNA formando bandas, também conhecida como coloração diferencial ou bandeamento, sendo importantes na caracterização de polimorfismos, permitindo a distinção de possíveis rearranjos cromossômicos. O cariótipo convencional pode até constatar a ocorrência de polimorfismo intra-específico (Ferreira e Aguiar-Perecin, 1996), porém, técnicas de coloração convencional não distinguem cromossomos com características morfológicas similares (Ferreira e Aguiar-Perecin, 1996; Singh, 1993).

A análise do cariótipo permite avaliar rearranjos estruturais, os quais podem ser detectados em função de diferenças no tamanho relativo, posição do centrômero, número cromossômico básico e número, posição e tamanho do satélite. Variações na forma do cromossomo podem ser devidas a inversões pericêntricas e paracêntricas, enquanto que alterações na forma e no tamanho dos cromossomos podem ser devidas a translocações recíprocas, deleções, inserções, duplicações (Schubert, 2007); no estudo do cariótipo tais informações são de grande importância para a análise cito taxonômicas (Stace, 2000).

2.3. Meiose

A fertilidade de um organismo esta diretamente associada à sua regularidade meiótica. O estudo do comportamento meiótico permite a compreensão de uma maior parte do DNA funcional de um cromossomo, assim os resultados obtidos podem ser aplicados a estudos de genética de populações, na preservação de recursos genéticos e em programas de melhoramento (Techio *et al.*, 2007). A realização de estudos meióticos fornece importantes informações associadas ao genoma individual de uma espécie assim como sobre o pareamento na produção de híbridos (Gupta e Priyadarshan, 1987), tais estudos

geram também informações sobre a recombinação cromossômica, as irregularidades meióticas e a viabilidade no caso da produção de híbridos (Jong *et al.*, 1993).

O processo compreende dois ciclos sucessivos de divisão denominados meiose I (ou 1ª divisão) e meiose II (ou 2ª divisão). Na meiose I ocorre segregação de cromossomos homólogos, formando duas células com metade do número de cromossomos (n) da célula original, cada uma com conteúdo $2C$ de DNA, enquanto na meiose II ocorre segregação de cromátides irmãs, originando quatro células filhas n , e com conteúdo $1C$ de DNA (Guerra, 1988).

A primeira divisão, reducional, apresenta as fases Prófase I, Metáfase I, Anáfase I e Telófase I. A Prófase I é a mais longa e é constituída de cinco subfases: leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese. Em algumas espécies, a prófase é longa, representando mais que 90% da duração de toda a meiose. É nesta fase e nas subfases que ocorre o pareamento dos cromossomos homólogos e a permuta entre os mesmos que pode resultar em recombinação e conseqüentemente em variabilidade genética.

Embora os quiasmas apareçam no diplóteno eles são formados no final do zigóteno ou no paquíteno, quando as cromátides estão emparelhadas; nos bivalentes meióticos os quiasmas podem se localizar na região proximal (P), intersticial (I) ou distal (D) em relação ao centrômero (Guerra e Souza, 2002). A posição e o número de quiasmas são responsáveis pela determinação do nível de recombinação (IR – Índice de Recombinação), assim como o grau de segregação gênica das gerações subseqüentes.

De uma maneira resumida na metáfase I os pares de cromossomos homólogos alinham-se formando a placa equatorial; na anáfase I, os cromossomos homólogos segregam e migram para os pólos opostos devido ao encurtamento das fibras do fuso, completando a terminalização dos quiasmas. Usualmente é na metáfase I que os quiasmas são classificados em terminais e intersticiais de acordo com a configuração observada dos cromossomos na placa. Fernández-Calvin *et al.* (1995), relatam que a avaliação meiótica baseada apenas em células em metáfase I, pode vir a fornecer uma visão limitada do pareamento, de forma especial quando são utilizadas técnicas de coloração convencional. As configurações observadas nas metáfases I não são, necessariamente, as que melhor caracterizam a constituição cromossômica, pois

podem ser o resultado de quebras em configurações maiores de pareamento como consequência da limitada formação de quiasmas (considerando os possíveis efeitos das translocações).

Ao final da anáfase I cada pólo da célula contém o número de cromossomos reduzidos a metade (n). Na telófase I os cromossomos localizados nos pólos da célula iniciam um processo de descondensação parcial, o envoltório nuclear volta a reorganizar-se e o nucléolo se reconstitui.

A segunda divisão da meiose, a divisão equacional, se assemelha a uma mitose, exceto o fato de que há apenas uma cópia de cada par cromossômico por núcleo. Durante a prófase II, os cromossomos voltam a atingir seu grau máximo de condensação e se movem para a placa equatorial. Na metáfase II, os cromossomos se posicionam na região mediana da célula formando a placa equatorial e durante a anáfase II, há a separação e migração de cada cromátide irmã em direção a um dos pólos da célula. A telófase II marca o final da meiose, quando a membrana nuclear e o nucléolo voltam a se reconstituir.

A meiose é um evento de elevada estabilidade evolutiva que culmina na redução do número de cromossomos (Pagliarini, 2000). O processo de divisão meiótica caracteriza-se por uma série de eventos seqüenciais de elevada complexidade, tanto mecânica quanto bioquímica (Pagliarini e Pozzobon, 2004). Os estudos meióticos são de grande relevância, pois explicam fenômenos reprodutivos, mecanismos de hereditariedade e de variabilidade genética nas espécies. Afinal, a meiose se converte em uma das fontes de variabilidade genética utilizada pelos organismos para a adaptação ao meio ambiente e em consequência, a perpetuação através da descendência.

O curso normal e harmonioso da meiose garante a viabilidade do gameta (Pagliarini, 2000), entretanto os eventos da meiose são controlados por fatores genéticos, sendo assim mutáveis, e responsáveis por algumas das irregularidades meióticas como os cromossomos retardatários (Consolaro *et al.*, 1996), o processo de orientação diferenciada das fibras do fuso acromático (Tilquin *et al.*, 1984; Caetano-Pereira *et al.*, 1998). Segundo Defani-Scoarize *et al.*, (1996), as irregularidades meióticas são indesejáveis, pois altera os genótipos ocasionando a instabilidade meiótica característica indesejada por dificultar trabalhos de hibridação interespecífica em programas de melhoramento e a ocorrência dessas anomalias pode dificultar a produção de híbridos, por ter como consequência, a

variação cromossômica em função da perda ou ganho de cromossomos nas novas gerações (Souza *et al.*, 2000).

Cromossomos retardatários, cromossomos pegajosos, e outras anormalidades observadas durante a meiose podem ser causadas pela manifestação de genes ou pela influência ambiental sobre a planta durante a meiose (Kaul & Murthy, 1985; Koduru & Rao, 1981).

Love (1951) estabeleceu o Índice Meiótico (IM) como forma de avaliação da estabilidade meiótica dos genótipos; os índices abaixo de 90% são característicos de espécie com baixa estabilidade meiótica, o que sugere uma tendência para a ocorrência de anormalidades durante o processo de gametogênese; Já espécies portadoras de um índice superior a 90% são consideradas portadoras de alta estabilidade meiótica.

2.4. Viabilidade Polínica

A viabilidade polínica é uma medida da fertilidade masculina e pode ser determinada através de um grande número de técnicas. A realização de estudos associados à viabilidade polínica contribui para pesquisas associadas à ecologia e à taxonomia da espécie em estudo, gerando assim informações as quais podem ser utilizadas em processos de conservação genética, assim como na agricultura, e em programas de melhoramento genético.

A viabilidade polínica pode ser determinada através de métodos diretos, como a indução da germinação do pólen *in vivo* ou *in vitro* e por métodos indiretos, baseados em parâmetros citológicos como a coloração (Dafni, 1992; Techio *et al.*, 2006). Estes testes utilizam corantes químicos específicos que reagem com componentes celulares presentes no grão de pólen maduro. Dentre as soluções corantes pode-se citar a solução de lugol, solução de carmim acético em 1%, e a solução tripla de Alexander (Dafni, 1992).

Os testes utilizando lugol ou iodeto de potássio (I_2KI) baseiam-se em uma reação química que acontece entre o iodo da solução e a molécula de amido do grão de pólen, dando aos grãos de pólen viáveis uma coloração marrom e aos inviáveis, devido à ausência de amido, uma coloração amarelo-claro (Jonhansen, 1940). É indicado para espécies cujo material de reserva do grão de pólen é o amido. Na coloração com carmim acético em 1%, os grãos de pólen viáveis apresentam uma coloração rosa/vermelha forte, enquanto os grãos inviáveis

mostram-se transparentes e não corados devido à reação da solução corante com o material genético existente no citoplasma, como o DNA. Esses métodos apesar de serem usados com certa frequência não são considerados eficazes e seus resultados são questionáveis (Dafni, 1992).

A solução tripla de coloração utiliza uma solução composta por fucsina básica, verde malaquita, e laranja G. O corante fucsina básica reage com o citoplasma colorindo o mesmo de púrpura; o verde malachita reage com a parede do grão de pólen colorindo-a de verde e a laranja G é o intensificador da cor dando uma maior diferenciação entre os dois outros corantes. Sob o efeito desta solução grãos de pólen viáveis apresentam o citoplasma cor púrpura e a parede do grão de pólen de cor verde; enquanto grãos de pólen inviáveis colorem de verde por apresentarem apenas a parede do grão de pólen (Alexander, 1969). Esses métodos são fáceis e relativamente baratos, portanto podem ser utilizados de maneira rotineira nos laboratórios visando ter um indicativo da viabilidade polínica de um determinado genótipo. No entanto, apesar dessas vantagens alguns autores questionam a eficácia dos mesmos fornecerem informações sobre a capacidade germinativa do pólen, já que as soluções reagem com o citoplasma e núcleo do grão de pólen.

A capacidade germinativa do grão de pólen pode ser avaliada através de testes de germinação *in vitro* (Techio *et al.*, 2006) ou através do método via reação fluorocromática ou Teste do FCR. Nesta metodologia, os grãos de pólen que não são plenamente fluorescentes, ou seja, grãos pouco fluorescentes e sem fluorescência são considerados inviáveis, enquanto que os grãos de pólen fluorescentes são tidos como viáveis; a reação de fluorescência está diretamente correlacionada com a integridade da membrana do grão de pólen, que por sua vez participará da germinação e crescimento do tubo polínico (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1970).

A viabilidade do pólen se relaciona diretamente com a normalidade da microesporogênese e microgametogênese e com a eficácia dos cruzamentos, tanto entre cultivares quanto entre espécies. Uma alta porcentagem de grãos de pólen viáveis é esperada como resultado de um alto percentual de tétrades normais, as quais refletem um processo meiótico regular (Techio *et al.*, 2006). Considerando-se que a meiose está sob controle genético, mutações podem ocorrer (Defani-Scoarize *et al.*, 1996) e segundo Horner e Palmer (1995), há

genes mutantes que atuam durante os estádios de pré-meiose, meiose e pós-meiose, assim o desenvolvimento de grãos anormais ou inviáveis pode ser o resultado de anormalidades que tenham ocorrido durante este período. Singh (1993) relata que os grãos de pólen podem ser abortados devido à ocorrência de aberrações estruturais; a ocorrência de translocações heterozigotas causa aproximadamente 50% de grãos de pólen estéreis.

2.5. Aspectos citogenéticos da família Caricaceae

A cultura do mamoeiro mesmo sendo considerada como uma importante cultura tropical e subtropical, não apresenta muitos estudos associados à caracterização citogenética quando esta é comparada a outras espécies de interesse agrônomo; fato este justificado devido ao tamanho e à semelhança morfológica entre os cromossomos (Bajpai e Shing, 2006).

Kumar *et al.* (1945) relatam a importância do trabalho realizado por Heiborn em 1921, que descreveu que a espécie *C. papaya* era diplóide, com $2n=18$ cromossomos. Considerando relevante o trabalho, Kumar e Abraham (1942), a partir da avaliação de células de mamoeiro em metáfase, comprovaram que o número somático da espécie é $2n=18$ cromossomos, sendo estes metacêntricos ou submetacêntricos, concluindo ainda a não existência de cromossomos sexuais heteromórficos. Em termos de conteúdo de DNA, a espécie cultivada apresenta um genoma relativamente pequeno, sendo este composto por 327 Mpb (Arumuganathan e Earle, 1991).

A cariotipagem é importante para as espécies, pois por meio dela se podem avaliar os diferentes tipos de cromossomos que a espécie apresenta a presença das constrições secundárias, o tamanho do lote haplóide, e o tipo de cariótipo se simétrico ou não. Em Caricáceas a literatura faz referência ao número de cromossomos somáticos, porém poucos são os trabalhos de descrição desses cromossomos. Datta (1971) descreveu os cromossomos da espécie cultivada, como sendo todos muito pequenos, apresentando pequenas diferenças em seu comprimento, constrições primárias do tipo medianas ou submedianas, sendo que alguns cromossomos podem apresentar mais de uma constrição secundária. Os cromossomos das cinco variedades estudadas pelo autor foram em geral pequenos com comprimento variando de 1 a 4,23 μm .

Damasceno Junior (2008) trabalhando com as espécies *C. papaya*, *V. monoica*, *V. cundinamarcensis* e *J. spinosa* observou que as quatro espécies apresentaram cariótipos simétricos com 9 pares de cromossomos, ou seja $2n=18$ cromossomos, como já descrito na literatura para a família Caricaceae. Foi possível observar constrições secundárias nas espécies *C. papaya* (par 6), *J. spinosa* (par 1) e *V. monoica* (par 3), todas tratadas com paradiclorobenzeno, porém em *V. cundinamarcensis*, pré-tratada com trifluralin, não foi possível observar nenhuma constrição secundária nos cromossomos. O tamanho dos cromossomos de *C. papaya* variaram de 1,52 a 2,29 μm , de *V. monoica* variaram de 1,35 a 2,49 μm , de *V. cundinamarcensis* variaram de 1,66 a 2,45 μm , e de *J. spinosa* variou de 1,67 a 2,92 μm . As três primeiras espécies apresentaram cromossomos metacêntricos, e a última, metacêntricos e submetacêntricos. O comprimento do lote haplóide variou entre as quatro espécies, sendo para *J. spinosa* de 20,17 μm , para *V. cundinamarcensis* de 18,69 μm , para *V. monóica* de 17,11 μm , e para *C. papaya* de 17,18 μm , concluindo que a forma cultivada apresenta um dos menores genomas entre as espécies estudadas.

Por meio da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), utilizando sondas de rDNA (18S e 5S) Costa et al. (2008) fizeram um estudo comparativo entre as espécies *V. cundinamarcensis*, *V. goudotiana* e *C. papaya* e verificaram que há uma maior similaridade genética entre *V. goudotiana* e *V. cundinamarcensis*, em termos de número e distribuição das sondas, e que o mamoeiro, em relação a estas seqüências repetitivas de rDNA, praticamente não se assemelha às espécies de *Vasconcellea*. As espécies do gênero *Vasconcellea* apresentaram um par de sítios 5S, enquanto *C. papaya* apresentou três sítios 5S; já as sondas 18S ocorreram com maior freqüência no gênero *Vasconcellea*, tendo sido observado em *V. goudotiana* cinco sítios da sonda 18S, e em *V. cundinamarsencis* foram observados quatro sítios dessa sonda. Os autores confirmaram o número de cromossomos para as três espécies como sendo $2n=18$ cromossomos,

A meiose é também pouco estudada nas Caricáceas. Damasceno Junior (2008) analisando a meiose das espécies *C. papaya* e *V. monoica* confirmou que as duas espécies são diplóides com $2n=2x=18$ cromossomos, ambas apresentando pareamento regular dos cromossomos, observando-se nove bivalentes para ambas as espécies, confirmando assim o nível de ploidia das

mesmas. Entretanto, a meiose nas duas espécies apresentou algumas anormalidades. *C. papaya* apresentou 79% das células em anáfase I com cromossomos retardatários, e *V. monoica*, 92,31%. *V. monoica*, apresentou mais irregularidades do que a espécie cultivada, sendo cromossomos pegajosos (*sticky chromosomes*) a anormalidade mais freqüente e, provavelmente, responsável pela segregação irregular na anáfase I, produzindo células desbalanceadas, que resultaram em produtos meióticos desbalanceados. *C. papaya* apresentou índices meióticos e viabilidade polínica maiores do que *V. monoica*, sendo de 94,84 e 96,0%, e 77,83 e 70,93%, respectivamente. Esses dados sugerem que *V. monoica* é uma espécie meioticamente instável, e, portanto, pode apresentar problemas quando envolvida em hibridações. Os autores não observaram cromossomos sem pareamento em *C. papaya*, portanto sugerem a não existência de cromossomos sexuais heteromórficos.

3. TRABALHOS

3.1. *Vasconcella goudotiana*: DESCRIÇÃO BOTÂNICA SUMARIZADA DESSA ESPÉCIE SILVESTRE.

3.1.1. RESUMO

O gênero *Vasconcella* é o que mais se destaca dentro da família Caricaceae por apresentar um grande número de espécies com características desejáveis que poderão ser transferidas, via hibridização interespecífica, para a forma cultivada (*Carica papaya* L.). Recentemente, o Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) adquiriu sementes de espécies do gênero *Vasconcella* visando ampliar a base genética da sua coleção de germoplasma, bem como utilizar algumas dessas espécies em futuras pesquisas de melhoramento do mamoeiro. Considerando-se que a maioria das espécies desse gênero é silvestre ou semidomesticadas, é importante observar o seu comportamento vegetativo quando cultivada em local diferente do seu local de origem. Tendo como objetivos futuros a utilização de *Vasconcella goudotiana* em programas de melhoramento do mamoeiro, sementes foram colocadas para germinar e genótipos foram cultivados em casa de vegetação na Unidade de Apoio de Pesquisa do CCTA/UENF. Foram descritas folhas e flores das plantas masculinas e femininas

da espécie conforme descritores recomendados para a cultura do mamoeiro pelo IBPGR. As plantas masculinas apresentam folhas palmipartidas e onduladas, tendo em média comprimento de 25,98 cm e 31,20 cm de largura, não apresentam tricomas e nem cera nas folhas. As flores masculinas são dispostas em inflorescências e apresentam, em média, 24,44 botões ou flores por inflorescência. Quanto às plantas femininas, apresentam folhas também palmipartidas, com coloração verde-escuro, e comprimento médio de 22,71 cm e 27,9 de largura. As flores femininas são isoladas e surgem nas axilas foliares. O gineceu é gamocarpelar e o pistilo é pluricarpelar com seis carpelos. O ovário da planta é ínfero e plurilocular, apresentando cinco lócus. O número de óvulos por ovário é em média de 264 óvulos. As plantas masculinas floresceram antes das femininas e levaram em média oito meses para o florescimento.

3.1.2. ABSTRACT

Vasconcella is an important genus of Caricaceae family. It contains many species with desirable traits that can be transferred to papaya (*Carica papaya* L.) by interspecific hybridization. Recently, the Plant Breeding Laboratory (LMGV) from the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) acquired seeds from *Vasconcella* species aiming to increase the genetic base of its Caricaceae germplasm collection as well as to use some of these species in further researches of papaya breeding. Considering that almost all species within this genus are wild or semi-domesticated species, it is important to observe their vegetative behavior when cultivated under different conditions of their natural habitats. With the potential intent to use *V. goudotiana* in papaya breeding programs, seeds were germinated and the plants were cultivated under greenhouse conditions at UAP/CCTA/UENF. Leaves and flowers from male and female plants were described according to the papaya descriptors recommended by IBPGR. The male plants presented palmate leaves, with a mean length of 25.98 cm and a mean wide of 31.20 cm. These leaves presented neither trichomes nor wax. The male flowers are disposed in inflorescences with a mean of 24.44 floral buds per inflorescence. The female plants shows dark green

palmate leaves, with a mean length of 22.71 cm and a mean wide of 27.90 cm. The solitary female flowers are localized in the axil of the leaf. The gynoecium is syncarpous (multiple connate carpels) and the pistil shows six carpels. The ovary is inferior, 5-locular, with 264 ovules per ovary. Male plants flowered before female, with a mean of 8 months until flowering.

3.1.3. INTRODUÇÃO

Segundo Badillo (1971), o primeiro relato da família *Caricaceae* é datado de 1696, presente na obra *Plantarum de Lineus*, publicada em 1753. A família tem como principal centro de origem a América, apresentando uma maior concentração na América do Sul, onde se localizam os gêneros *Vasconcella*, *Carica* e *Jacaratia*. As espécies que compõem o gênero *Vasconcella* são descritas como silvestres e ou semidomesticadas, e se desenvolvem em regiões de 1.500 a 2.200m de altitude, em bosques úmidos e subtropicais (Badillo, 1971, 1993, 2001).

As espécies que compõem a família *Caricaceae* além de *C. papaya* L., são muito conhecidas regionalmente, sem apresentarem grande destaque econômico, mas suas características podem vir a ser consideravelmente exploradas futuramente (Badillo, 1971). As espécies do gênero *Vasconcella* são muito utilizadas por camponeses da região Andina e Peru, centro de origem dessas espécies, sendo que cada uma apresenta características muito específicas, sendo muito utilizadas na produção de sucos.

Considerando o conjunto de caracteres de interesse agrônômico presente no gênero *Vasconcella*, pode-se relatar a resistência ao frio, alta concentração de açúcar, resistência à *Phytophthora*, entre outros caracteres (Manshardt e Wenslaff, 1989; Drew *et al.*, 1998; Scheldeman *et al.*, 2003) *V. quercifolia* e *V. cauliflora*, são resistentes ao vírus da mancha anelar (Van Droogenbroeck *et al.*, 2004; Dillon *et al.*, 2005; Dillon *et al.*, 2006;). As variedades cultivadas do mamoeiro são suscetíveis à maioria dos agentes patológicos como fungos, bactérias e vírus; assim, torna-se imprescindível a realização de trabalhos de pré-melhoramento do

gênero para que se possa avaliar a possibilidade de sua utilização em programas de melhoramento.

A espécie *Vasconcella goudotiana* é considerada resistente ao fungo *Phytophthora palmivora*, que age destruindo o meristema radicular das plantas podendo ocasionar a podridão do fruto e causar perdas de frutos maduros em torno de 7 a 10% da produção total do mamoeiro (Liberato *et al*, 1993). Considerando que a UENF tem um programa de melhoramento genético de mamoeiro e que recentemente ampliou a sua coleção de germoplasma com aquisição de acessos de espécies silvestres e dentre elas a *Vasconcella goudotiana*, e considerando ainda a completa ausência de relatos na literatura sobre esta espécie em condições de cultivo no território nacional, o objetivo do presente trabalho foi fazer uma descrição botânica das plantas masculinas e femininas representantes da espécie em questão.

3.1.4. MATERIAL E METODOS

3.1.4.1. Material Vegetal

Foram utilizadas sementes da espécie silvestre *Vasconcella goudotiana* cedidas pelo USDA / ARS - Hillo (HI) (United States Department of Agriculture / Agricultural Research Service) - Hillo (HI): (HCR 167). Assim que as sementes chegaram a território nacional foram encaminhadas ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), localizado em Campinas – SP, onde passaram um período de quarentena.

Por serem sementes silvestres e adaptadas a baixa temperatura, as sementes foram submetidas a um pré-tratamento. As sementes foram imersas em solução de 1 M de Nitrato de Potássio. O material foi distribuído em Erlemeyer, e colocado no agitador (*shaker*) por 48 horas, a 99,3 rpm e 35 °C (Costa *et al.*, 2007). O tratamento teve como objetivo quebrar a dormência das sementes, e nutri-las a fim de acelerar, e garantir sucesso em sua germinação e desenvolvimento das plântulas.

Após o pré-tratamento, as sementes foram retiradas do agitador (*shaker*); em seguida foram semeadas em bandejas preenchidas com substrato. Em seguida as bandejas foram levadas para a estufa incubadora à temperatura de 25°C, e fotoperíodo de 8h, segundo Damasceno Junior (2008), sendo molhadas diariamente.

Doze dias após a semeadura as primeiras plântulas iniciaram a emergência das primeiras folhas e assim que as primeiras folhas verdadeiras se desenvolveram as plântulas foram transplantadas para copos plásticos de 200 ml preenchidos com substrato, e levadas para a casa de vegetação, mantidas à temperatura ambiente, e em local sombreado, com aplicação de água duas vezes ao dia.

Dois meses após serem levadas para casa de vegetação, as plantas foram transferidas dos copos para pequenos vasos de 3 litros, preenchidos com substrato na proporção de 1:1:1 (solo:esterco:areia), a fim de permitir o melhor desenvolvimento das plantas.

A adubação foi realizada de duas formas, semanalmente foi realizada a adubação com húmus, formando uma cobertura na base do caule da planta, com o objetivo de nutri-la e ajudar na manutenção da temperatura. Quinzenalmente, foi feita a adubação com ouro verde (N4. P14. K8), diluído em água, na proporção de 1g/l. As plantas foram regadas diariamente, e mantidas em local úmido e com alta luminosidade. Três meses após o transplante das plantas, elas foram novamente remanejadas para 5 litros, e a adubação foi mantida.

Cinco meses após o primeiro transplante, as plantas foram novamente transferidas para vasos de 50 litros com o mesmo preparado de 1: 1: 1 (solo: esterco: areia). A esta mistura foi adicionado o adubo "Osmocoti" (N4: P14: K8), próprio para fruteiras. A adubação realizada com húmus foi mantida semanalmente e foi aplicado em todas as plantas 0,5 g de sulfato de amônio.

3.1.4.2 Metodologia

A mensuração das peças florais das plantas masculinas e femininas, bem como a descrição botânica foi realizada seguindo os descritores do IBPGR (1988) recomendados para a cultura do mamoeiro e conforme Vidal & Vidal (1995).

Para a descrição botânica das plantas foram analisadas quatro plantas (tratamentos) femininas e cinco masculinas, devido à ausência do florescimento nas demais plantas.

Nas plantas femininas foram avaliados as variáveis comprimento e largura da folha adulta de cinco folhas (tratamentos), e três flores para as avaliações da estrutura floral, como número de ovúlos por ovário, e características da morfologia floral interna. Em plantas masculinas foram também coletadas cinco folhas para a avaliação das variáveis de comprimento e largura da folha, e cinco inflorescências para a avaliação das características comprimento do pedúnculo floral, número de botões por inflorescência, número de flores abertas por inflorescência. As medidas foram obtidas com utilização do paquímetro digital, a fim de se obter dados precisos. As folhas foram mesuradas com o auxílio de uma fita métrica, l e para a caracterização das estruturas internas das flores utilizou-se a lupa.

3.1.5. Análise estatística

Para a análise dos dados foi utilizado o Programa Genes (Cruz, 2001). Foi realizada a análise de variância, para as variáveis mensuradas. Aplicou-se o teste de média Scott-knott a 5% de probabilidade, para as mesmas variáveis.

3.1.6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas masculinas iniciaram o período de floração aos oito meses e as femininas aos nove meses e meio. Avaliando-se o crescimento das plantas, observou-se, que tanto as plantas masculinas quanto as femininas apresentam porte arbustivo quando cultivados sob as condições experimentais, sendo regadas diariamente, adubadas com húmus semanalmente e adubadas mensalmente com adubo químico.

3.1.7. Descrição das plantas masculinas

A análise de variância dos dados mensurados foi significativa em nível de 5% e em nível de 1% de probabilidade conforme pode ser verificado na Tabela 1. Nos genótipos masculinos, o caule da planta apresenta coloração verde-escura, e textura áspera como que se o caule estivesse constantemente escamando. As folhas são classificadas como folhas palmipartidas, tendo uma média de comprimento de 25,99 cm, e 31,20 cm de largura (Tabela 1), não apresentam tricomas e nem cera nas folhas. O pecíolo apresenta coloração verde com pigmentos avermelhados variando de intensidade (Figura 1).



Figura 1-Detalhe da folha masculina onde se observa o limbo bem recortado.

O florescimento das plantas masculinas iniciou aos oito meses após a germinação das sementes. Seu florescimento ocorre por inflorescências que apresentam, em média, 24,44 botões ou flores por inflorescência; o pedúnculo das inflorescências apresenta coloração verde-clara e um comprimento médio de 23,84 cm (Tabela 2).

Tabela 1. Resumo e análise da variância dos dados, Comprimento (C) e Largura (L) da Folha, Número de botões florais/inflorescência (NBF), Comprimento do pedúnculo da inflorescência (CPI) e Comprimento da corola (CC) mensurados em cinco plantas da espécie *Vasconcella goudotiana*.

FV	GL	QM				GL	QM
		C	L	CPI	NBF		CC
Trat.	4	95,524*	282,0454 *	507,6374*	553,2600*	4	6,53076**
Res.	20	5,256	15,8134	16,3864	133,6199	15	1,80502
Médias		25,988	30,904	24,464	24,32		7,6595
CV%		14,1907	23,6119	40,5172	9,9344		14,1907

*Significativo em nível de 1% de probabilidade; ** Significativo em nível de 5% de probabilidade; CV% = Coeficiente de Variação Genético.

Tabela 2. Comprimento (C) e Largura (L) da Folha, Número de botões florais/inflorescência (NBF), Comprimento do pedúnculo da inflorescência (CPI) e Comprimento da corola (CC) mensurados em cinco plantas da espécie *Vasconcella goudotiana*. Campos dos Goytacazes, 2008.

Plantas	Folha		Inflorescência		
	C (cm)	L (cm)	NBF (cm)	CPI (cm)	CC (mm)
1	27,30 /b	31,82 /b	37,6/ a	34,9 /a	8,80 / a
2	24,20 /b	27,4 /b	25,2 /a	29,4 / b	8,77 /a
3	20,84 /c	25,5 /b	29,2 /a	21,7 / c	6,67 / a
4	24,98 /b	27,7 /b	10,2 /b	10,8 / d	6,86 / a
5	32,62 /a	43,6 /a	20,0 /b	22,4 / c	9,31 / a
Média	25,99	31,20	24,44	23,84	8,10
Cv%	8, 8220	12, 8676	47, 5304	16, 5468	17, 5404

Coeficiente de Variação (Cv%). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott –Knott a 5% de probabilidade.

As flores são de coloração amarelo creme, unissexuais, pentâmeras, ou seja, com cinco pétalas, são classificadas como simpétalas, pois suas pétalas são soldadas parcialmente entre si (Figura 2). Quanto à disposição das peças florais são cíclicas, homoclamideas, com suas pétalas iguais entre si.

O comprimento médio da corola é de 8,10 mm e a coloração se apresenta com a base verde-clara com a presença de pigmentos roxos e vermelhos misturados, presentes em apenas um lado do botão floral, se estendendo por todo

comprimento do botão. As sépalas são de coloração verde-clara, começando com um verde mais claro e aumentando de tom gradativamente. O número de anteras por flor é de 10, sendo do tipo heterodinamo, cinco maiores e cinco menores, indicando assim que é uma planta diplostêmone, ou seja, apresenta o dobro de anteras em relação ao número de pétalas. As anteras são basifixas, pois o filete que as sustenta se insere na base da antera; apresentam deiscência longitudinal, e é dita introrsa, pois a abertura das anteras é voltada para o eixo da flor ou seja, voltada para a parte interna do botão (Vidal e Vidal, 1995).



Figura 2. Inflorescência (a), botão floral fechado (b), e a flor masculina(c) observado em plantas masculinas de *V. goudotiana*.

3.1.8. Descrição botânica das plantas femininas

As plantas femininas apresentaram o mesmo período de geminação, com as mesmas características A para coloração e textura B do caule. C O pecíolo foliar é de coloração ver A claro, sendo que as B₁as são classificadas C₁ no palmipartidas com coloração verde-escuro, e tem um comprimento médio de 22,71 cm e 27,9 cm de largura. Apresentam folhas sem serosidade, e baixa presença de tricomas, o tom de verde apresenta uma coloração mais opaca, e apresentam brotações no início do florescimento (Figura 3).

Quanto ao tempo para a primeira floração, este foi de nove meses e meio, após a germinação. Os botões se desenvolvem isolados nas axilas foliares, apresentam uma coloração verde com pigmentos roxos e avermelhados distribuídos na base das flores, concentrados apenas de um lado da flor; as pétalas são internamente de coloração amarelo-claro.



Figura 3. Folha feminina adulta, onde se observa ela é mais larga quando comparada com a folha masculina.

A flor é pedunculada (Figura 4); suas peças florais são dispostas em círculo, descritas assim como acíclicas, diperiantada, sendo composta por cálice e corola, são unissexuais, heteroclamídea, e hipógea, pois os seus verticilos florais estão dispostos abaixo do gineceu. Suas pétalas são livres, e descritas como dialissepalo. É uma flor pentâmera, com pétalas persistentes e apresenta um plano de simetria bilateral.

O gineceu é caracterizado como gamocarpelar, sendo os pistilos pluricarpelares, apresentando seis carpelos. O estilete apresenta uma inserção terminal, e o estigma da flor é descrito como indiviso ou único. O ovário da planta é ínfero e plurilocular, apresentando cinco lócus. Apresenta em média 264 óvulos por ovário.

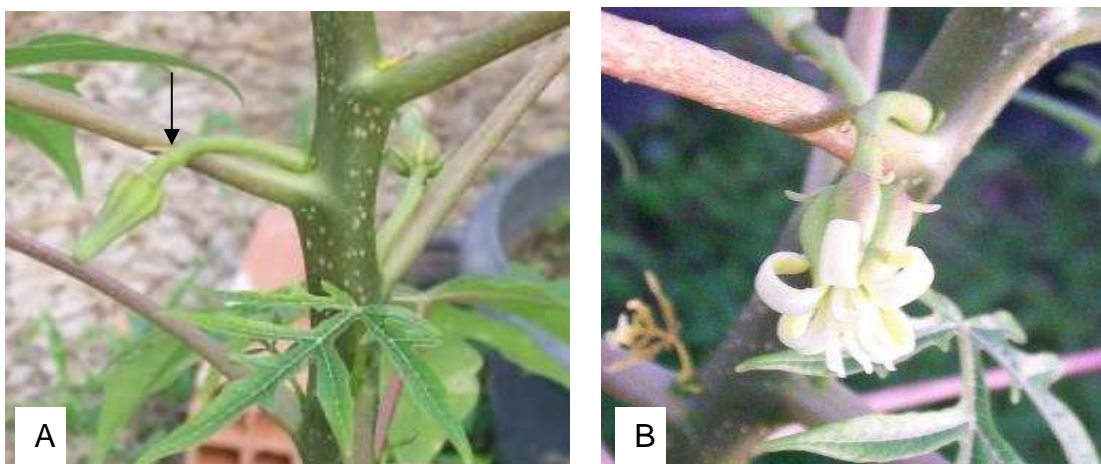


Figura 4 – Botão floral feminino (seta) (a), e flor feminina aberta (b) na axila foliar em *V. goudotiana*.

Devido à espécie ser dióica e devido à falta de sincronia no florescimento das plantas masculinas e femininas não foram obtidos frutos maduros. Porém, algumas poucas polinizações manuais foram realizadas, e observou-se que os frutos quando jovens apresentam coloração verde-escura, e apresentam a casca do fruto de textura lisa e firme.

Pode-se observar que mesmo considerando-se as condições ambientais desfavoráveis como altas temperaturas, durante o período em que o trabalho foi realizado, os genótipos apresentaram desenvolvimento satisfatório, pois todos floresceram, e apresentaram características botânicas conforme descrito por Badillo (1971).

Com base nos resultados conclui-se que é possível o cultivo e adaptação da espécie *Vasconcella goudotiana* nas condições edafo-climáticas do Norte Fluminense e que para a manutenção da espécie é necessário que haja uma programação de semeadura das sementes para que ocorra a sincronia da floração simultânea das plantas femininas e masculinas.

3.1.9. REFERÊNCIAS

- Badillo, V.M. (1971) Monografía de la familia Caricaceae. 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. (2001) Nota correctiva *Vasconcella* St. Hil. Y no *Vasconcella* (Caricaceae). *Ernstia*, 11 (1):75-76.
- Costa, F. R., Pereira, T. N. S., Hodnett, G. L., Pereira, M. G., Stell, D. M., (2007) Desenvolvimento de protocolo para obtenção de metáfase em mamoeiro (*Carica papaya* L.). Boletim técnico da III reunião de pesquisa do frutimamão. 241-242 p

- Damasceno Junior, P. C. (2008) Estudos citogenéticos, genéticos e moleculares, como ferramenta auxiliar no melhoramento genético do mamoeiro. (Tese doutorado) – Campos do Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 151p.
- Dillon, S.; Ramage, C.; Ashmore, S.; Drew, R.A. (2006) Development of a codominant CAPS marker linked to PRSV-P resistance in highland papaya. *Theoretical and Applied Genetics*, v.113, p.1159-11696.
- Dillon, S.; Ramage, C.; Drew, R.; Ashmore, S. (2005) Genetic mapping of a PRSV-P resistance gene in “highland papaya” based on inheritance of RAF markers. *Euphytica*, v.145, p.11–23.
- Drew, R.A., O’Brien, C.M., Magdalita, P.M. (1998) Development of interspecific *Carica* hybrids. *Acta Horticulturae*, 461:285-292.
- IBPRG (1988) Descriptors for papaya. Italy, Roma. 34pp
- 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.
- Scheldeman, X., Van Damme, P., Urena Alvarez, J.V., Romero, M. (2003) Horticultural potential of Andean fruit crops exploring their centre of origin. *Acta Hortic.* 598:97-102.
- 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.
- Vidal W N & Vidal M R R (1995) Botânica Organografia. Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa – Viçosa/MG. 114 pp.

3.2. DETERMINAÇÃO DO CARIÓTIPO DA ESPÉCIE SILVESTRE *Vasconcella goudotiana*

3.2.1. RESUMO

Essa pesquisa teve como objetivo a determinação do cariótipo convencional da espécie *Vasconcella goudotiana*. Para tanto, pontas de raízes foram coletadas, pré-tratadas, fixadas, e coloridas de acordo com protocolo já utilizado para espécies Caricáceas no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Células metafásicas que apresentavam os cromossomos condensados e bem espalhados foram selecionadas e as imagens foram capturadas utilizando-se o Programa Imedia ProPlus. Medidas como comprimento do braço longo e do braço curto foram realizadas usando o Programa Micromeasure. Com base nas medidas foram estimados o comprimento absoluto dos cromossomos, o índice centromérico, a razão entre braços, o comprimento do lote haplóide, e o índice de simetria. Os cromossomos foram classificados com base no índice centromérico (ic) e com base na razão entre os braços. Foram observados 18 cromossomos nas células metafásicas e o cariótipo da espécie é constituído por cinco pares de cromossomos metacêntricos e quatro pares submetacêntricos. O cariótipo é simétrico e o comprimento do lote haplóide estimado para a espécie foi de 23,08 µm. Não foi observada no conjunto haplóide nenhuma diferença que pudesse indicar a presença de cromossomos associados ao sexo da espécie.

3.2.2. ABSTRACT

The objective of this research was to determine the conventional karyotype of *Vasconcella goudotiana*. Root tips were collected, pretreated, fixed and stained according to the routine protocol defined to the other Caricaceae species. Cells with condensed and well spread chromosomes were selected and the images were captured using the Image ProPlus software. Measures of the long and the short chromosome arms were obtained using the Micromesure software. Based on these measures, the absolute chromosome length, the centromeric index, the arm ratio, the haploid chromosome length and the symmetry index were estimated. The chromosomes were classified according to their centromeric index (CI) and their arm ratios. Eighteen chromosomes were observed in metaphase cells and the species karyotype was constituted by five metacentric chromosome pairs and four submetacentric chromosome pairs. The karyotype was symmetric and the lot haploid length was 23.08 μm . It was not observed any difference in the haploid lot suggesting the presence of sexual chromosomes in this species.

3.2.3. INTRODUÇÃO

O gênero *Vasconcella*, o maior da família Caricaceae, pode ser considerado como um reservatório de genes importantes para ser incorporado no mamoeiro cultivado (*Carica papaya* L.), pois apresenta características agrônomicas de interesse para o melhoramento genético do mamoeiro (Van Droogenbroeck *et al.*, 2004; Dilon *et al.*, 2005; Dilon *et al.*, 2006). A transferência de genes de interesse agrônômico presentes em espécies silvestres, para espécies e/ou variedades cultivadas, pelo método de hibridação, é uma ferramenta de grande interesse, pois tem como objetivo combinar o potencial genético das espécies, a fim melhorar o material cultivado. Desta forma, as características de interesse tendem a ser melhoradas, complementadas pelos genes transferidos das espécies silvestres para as cultivadas.

Entretanto, a hibridação interespecífica apresenta uma série de dificuldades que são minimizadas quando as espécies envolvidas apresentam

similaridade genética, fazendo com que o pareamento dos cromossomos no híbrido seja perfeito resultando em alta fertilidade; assim, é necessário se conhecer as relações genéticas entre as espécies (Singh 1993).

Várias metodologias são utilizadas para se estudar as relações entre as espécies e dentre elas têm as citogenéticas, como a determinação do número de cromossomos somáticos ($2n$), o nível de ploidia das espécies envolvidas, e a determinação do cariótipo (Singh 1993).

Em Caricaceae alguns estudos foram realizados na forma cultivada do mamoeiro. Kumar e Abraham (1942) analisando metáfases em pontas de raiz de mamoeiro concluíram que a espécie tem $2n=2x=18$ cromossomos, sendo todos classificados como metacêntricos. Os autores destacam ainda que não foi encontrado nenhum cromossomo heteromórfico que pudesse estar associado ao sexo na espécie.

Mais recentemente outros trabalhos foram realizados visando à determinação do número de cromossomos do mamoeiro e de algumas espécies silvestres (Bajpai e Shing, 2006; Damasceno Junior *et al.*, 2008 e Costa *et al.*, 2008). Entretanto, estudos citogenéticos ainda são incipientes tanto na forma cultivada quanto nas espécies silvestres.

Considerando a importância das espécies silvestres do gênero *Vasconcella* e considerando a escassez de informações sobre as mesmas faz-se necessário a realização de estudos de caracterização citogenética dessas espécies silvestres a fim de utilizá-las em programas de melhoramento genético do mamoeiro.

Dando continuidade a pesquisas de caracterização citogenética de espécies Caricáceas (Damasceno Junior *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2008), a presente pesquisa teve por objetivo determinar o cariótipo com base em coloração convencional, da espécie silvestre *Vasconcella goudotiana*.

3.2.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.4.1. Material Vegetal

Para a realização da determinação do cariótipo foram coletadas pontas de raízes jovens, de plantas em fase de desenvolvimento, cultivadas em casa de vegetação.

3.2.4.2. Pré-tratamento e fixação

As pontas de raízes foram coletadas e imediatamente pré-tratadas em solução de paradiclorobenzeno, agente antimitótico, por 8hrs a 40⁰C. Após o pré-tratamento as pontas foram retiradas da solução antimitótica e foram lavadas em água corrente durante 3 minutos. Em seguida, as pontas de raízes foram transferidas para solução fixadora de Farmer (Berlyn & Miksche, 1976) e conservadas no freezer até o momento do preparo da lâmina (Guerra & Souza, 2002).

3.2.4.3. Preparo das lâminas

Para o preparo das lâminas utilizou-se protocolo para a obtenção de núcleos em suspensão (Costa *et al.*, 2007; Damasceno Junior *et al.*, 2008). Para tanto, as pontas de raízes foram lavadas com água deionizada, e separadas por tamanho. Posteriormente, o material foi transferido para tubos de 1 ml, e foram hidrolisadas, com solução 0,2 M de HCl durante 10 minutos. Após hidrolise, as pontas foram lavadas duas vezes em água destilada, colocadas em micro-tubos, recobertas na enzima pectinase em 20%, e celulase em 2%, e levadas em seguida ao banho-maria a 37⁰C por 60 min. Retirados do banho, os tubos contendo as pontas de raízes foram completados com água destilada e centrifugados com rotação de 25000rpm, por 10 minutos. Após centrifugação, o material foi lavado três vezes consecutivas a fim de paralisar a ação enzimática. Finalmente, após a última lavagem das pontas de raízes, a água foi substituída pela solução de metanol: ácido acético na proporção 2:1, e novamente os tubos foram centrifugados conforme descrito anteriormente.

Após centrifugação, as lâminas foram preparadas com uma gota da suspensão de núcleos, e em seguida o material foi levado à câmara úmida para secar. Uma gota do corante Giemsa 5% foi colocada sobre os núcleos em suspensão e a lâmina foi deixada para secar em temperatura ambiente. Depois

de coradas, as lâminas foram cobertas com lamínulas e observadas sob microscópio ótico. Foram selecionadas as cinco melhores metáfases e nessas foi observada a posição do centrômero e foram mensurados os tamanhos dos braços longos e curtos.

3.2.5. Determinação do cariótipo

As células com as melhores imagens de metáfases foram capturadas através do software IMAGE PRO-PLUS versão 5.1 (Media Cybernetics, 2004). As imagens posteriormente foram trabalhadas e utilizadas para a construção de um cariograma e de um idiograma da espécie.

Para a montagem do idiograma, os cromossomos foram mensurados utilizando o Programa MicroMeasure 3.3 (Reeves & Tear, 2000). Cinco células com metáfases bem definidas foram utilizadas para as mensurações dos braços longo e curto de cada par de cromossomos. Com base nos dados mensurados foram estimados comprimento total do cromossomo (soma dos braços longo e curto), a razão entre braços ($r = \text{braço longo}/\text{braço curto}$), o comprimento do lote haplóide (CLH = somatória dos comprimentos absolutos dos cromossomos), o índice centromérico ($ic = \text{comprimento do braço curto}/\text{comprimento total} \times 100$), e o índice de simetria ($\%TF = \text{razão entre o somatório dos braços curtos pelo comprimento do lote haplóide} \times 100$).

Para determinação dos pares de homólogos foram observados o tamanho absoluto dos cromossomos e a relação entre braços. Os cromossomos foram classificados de acordo com (Guerra, 1986), que considera a relação entre braços (Levan *et al.* 1964), o índice centromérico (ic).

3.2.6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso do paradichlorobenzene associado à coloração com Giemsa 5% permitiu observar dezoito cromossomos na espécie em estudo (Figura 1), conforme registrado pela literatura para a família Caricácea (Darlington & Ammal,

1945). O uso do agente antimitótico permitiu uma boa condensação e um bom espalhamento dos cromossomos sem sobreposições.

O paradiclorobenzeno é indicado tanto para cromossomos longos quanto para cromossomos pequenos, já o corante Giemsa é indicado para cromossomos pequenos, garantindo assim uma coloração mais intensa e com melhor contraste (Guerra & Souza, 2002).

Conforme pode observar na Tabela 1 os cromossomos de *Vasconcella goudotiana* são pequenos, sendo a média do maior par de cromossomos de 3,06 μm e a do menor de 2,03 μm . Entretanto, são maiores do que os reportados por Damasceno Junior (2008), que constatou que o tamanho dos cromossomos de *C. papaya*, *V. monoica* e *V. cundinamarcensis* variam de 2,29 a 1,52 μm ; 2,49 a 1,35 μm e de 2,45 a 1,66 μm , respectivamente. Ainda segundo Eder-Silva *et al* (2007), os cromossomos da espécie *Jacaratia spinosa*, outro membro da família Caricaceae, variando de 2,5 a 1,5 μm .

Pode-se concluir que as espécies que compõem a família Caricaceae até então estudadas apresentam cromossomos pequenos já que em 856 angiospermas avaliadas o tamanho do cromossomo metafásico variou de 0,6 μm há um pouco mais de 14,6 μm e o comprimento do lote haplóide varia de 14,6 μm a 250 μm (Levin & Funderberg, 1979; Schubert, 2007). O comprimento do lote haplóide estimado para a espécie aqui estudada foi de 23,08 μm , enquanto que em *V. cundinamarcensis* é de 18.69 μm e *V. monoica* é de 17.11 μm (Damasceno Junior *et al.*, 2008).

Não foram observadas constrições secundárias, RON e satélites, provavelmente devido à coloração utilizada, já que Giemsa não é indicado para este fim; entretanto, às vezes a condensação dos cromossomos permitiu esta observação mesmo com uma coloração não específica. Devido à sua constituição as constrições secundárias só colorem com o nitrato de prata (Guerra & Souza, 2002). Nas espécies de *C. papaya*, *J. spinosa* e *V. monóica*; foram observadas a presença de possíveis constrições secundárias, tais estruturas são de natureza heterocromática e se manifestaram nos pares 6, 1, e 3 das espécies, respectivamente. Assim, pode se inferir que tais pares cromossômicos possam estar associados à região organizadora de nucléolo (RON'S) (Damasceno Junior *et al*, 2008).

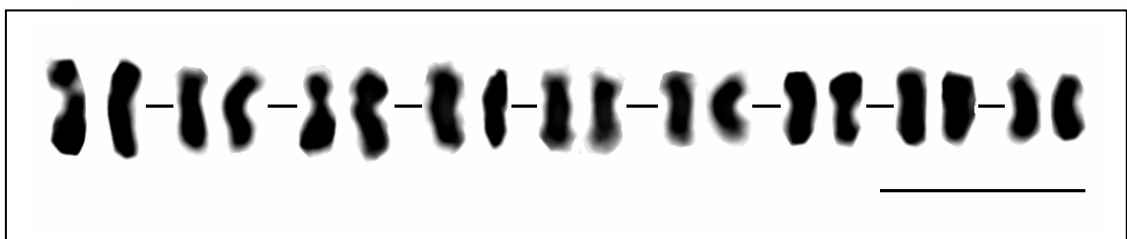
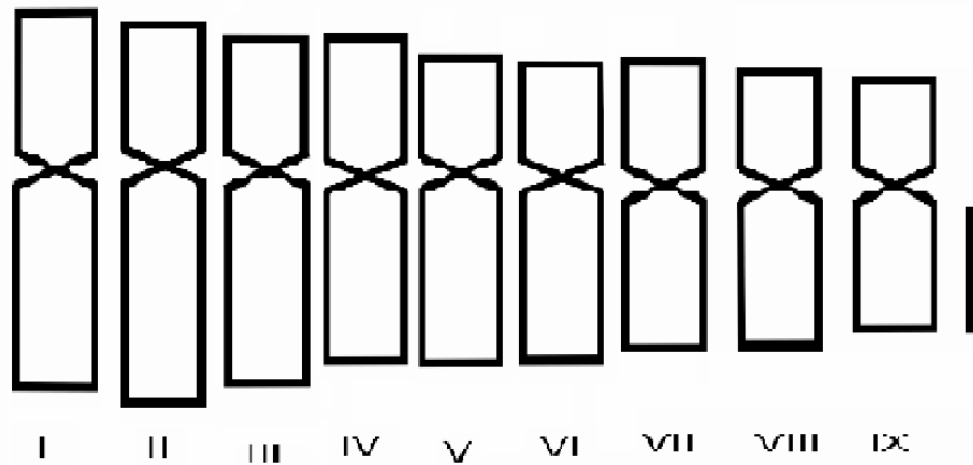
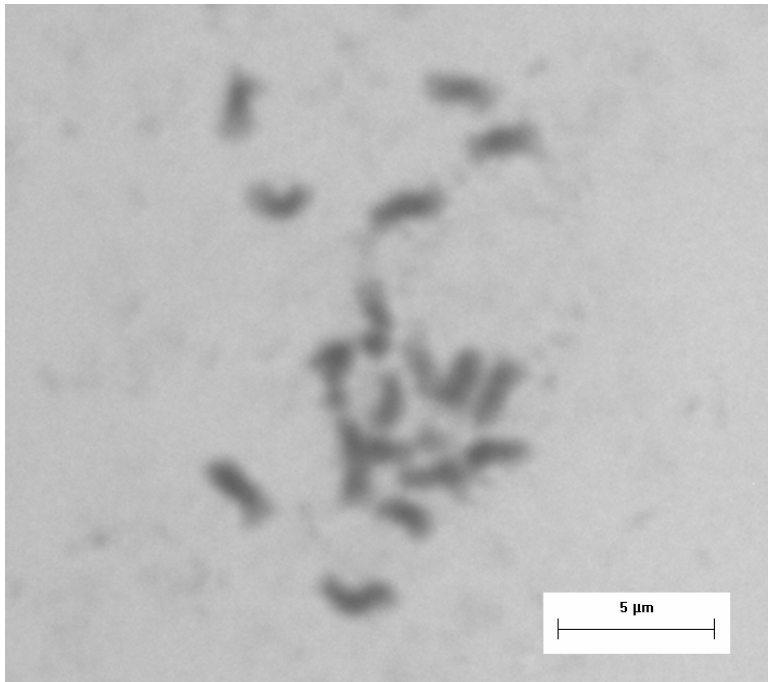


Figura 1- Cromossomos metafásicos; Cariograma e idiograma da espécie *V. goudotiana*, onde se observa os dezoito cromossomos e a similaridade entre os cromossomos. Barra= 5 μ m

O cariótipo de *V. goudotiana* é constituído por $2n=18$ cromossomos, sendo cinco pares do tipo metacêntrico e quatro pares do tipo submetacêntrico (Tabela 1 e Figura 1). Damasceno Junior (2008) relata que *V. cundinamarcensis* e *V. monoica* apresentam o cariótipo constituído por nove pares de cromossomos metacêntricos. A forma ou tipo dos cromossomos dentro de um determinado gênero pode ser alterado durante a evolução devido à presença de inversões enquanto número de cromossomos pode ser alterado devido às translocações, deleções, duplicações, por inserções, dentre outras aberrações estruturais cromossômicas (Schubert, 2007).

O índice de simetria (TF=40,16%) indica que o cariótipo de *Vasconcella goudotiana* é do tipo simétrico (Tabela 1); o TF pode ter uma variação de zero a 0,5 (0 a 50%), sendo este último valor característico de cariótipo extremamente simétrico. De acordo com Mayeda (1997), cariótipos assimétricos apresentam cromossomos de tamanhos variados e centrômeros mais terminais, enquanto que os cariótipos simétricos são considerados os mais primitivos e possivelmente originariam os assimétricos. Guerra (1988) estabelece que uma espécie apresenta cariótipo simétrico quando seus cromossomos apresentam uma variação de tamanho muito pequena e similar, pois estes são homomórficos. Resultados semelhantes foram relatados por Damasceno Junior (2008), cujos índices de simetria das espécies *C. papaya*, *V. monoica*, *V. cundinamarcensis* e *J. spinosa* foram 46%, 44%, 40% e 47%, respectivamente. Assim, com base nesses resultados pode-se supor que a espécie estudada é mais evoluída, que as demais espécies do gênero até o presente avaliado, por outros autores. O cariótipo simétrico é caracterizado pela predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos de tamanhos aproximados. O aumento da assimetria pode ocorrer ou pela mudança de posição do centrômero, de mediana para submediana, ou para terminal ou subterminal, ou pelo acumulo de diferenças no tamanho dos cromossomos de complementos tornando o cariótipo mais heterogêneo (Slébbieis, 1971).

Tabela 1 – Média do comprimento total dos pares cromossômicos (CT), média do braço longo (BL), média do braço curto (BC), razão entre os braços (r), Índice centromérico (IC), tipo de cromossomo (TC), Comprimento do Lote Haplóide (CLH) e Índice de Simetria (TF).

Cromossomo	CT (µm)	BL (µm)	BC (µm)	r	IC	TC
1	3,06	1,78	1,28	1,39	41,83	M
2	3,09	1,93	1,16	1,66	37,54	SM
3	2,63	1,51	1,12	1,34	42,58	M
4	2,80	1,71	1,09	1,56	38,92	SM
5	2,50	1,56	0,94	1,65	37,6	SM
6	2,41	1,50	0,91	1,64	37,75	SM
7	2,31	1,32	0,99	1,33	42,85	M
8	2,25	1,31	0,94	1,39	41,77	M
9	2,03	1,17	0,86	1,36	42,36	M
CLH (µm)	23,08		9,29			
TF (%)		40,25				

M= metacêntrico, SM = submetacêntrico

Não se observou nenhum par de cromossomos heteromórficos que pudessem indicar a existência de cromossomos sexuais na determinação do sexo nas plantas de *V. goudotiana*. Entretanto, nem sempre o sexo nas plantas dióicas é devido à presença de cromossomos e quando o é, o par de cromossomos pode ser homomórfico ou heteromórfico. Segundo Charlesworth (2004), muitas plantas dióicas como mamoeiro e kiwi não apresentam cromossomos heteromórficos; nessas espécies os genes que determinam o sexo das plantas parecem estar localizados em regiões de um cromossomo normal. Conclusões semelhantes a estas foram descritas por Costa *et al.* (2008), que utilizando a técnica de FISH em espécies de Caricáceas, não observaram nenhum par de cromossomo heteromórfico. Damasceno Junior (2008), estudando *Carica papaya L*, *J spinosa*, e *V. monóica*, também não relata presenças de pares ou de cromossomos sexuais heteromórficos.

Os resultados obtidos permitem concluir que a espécie *V. goudotiana* apresenta cromossomos pequenos, sendo cinco pares de cromossomos

metacêntricos e quatro pares de cromossomos submetacêntricos com cariótipo do tipo simétrico, apresentando assim uma fórmula cariotípica de $2n=18= 5M + 4SM$.

3.2.7. REFERÊNCIAS

- Bajpai, A.; Singh, A. K. (2006) Meiotic Behavior of *Carica papaya* L.; Spontaneous chromosome instability and elimination in important cvs. in North Indian conditions. *Cytologia*, 71(2): 131-136.
- Berlyn, G. P. and Miksche, J. P. (1976) Botanical microtechnique and cytochemistry. Iowa State University Press, Iowa-USA. 326 pp.
- Charlesworth, D. (2004) Plant evolution: modern sex chromosomes. *Current Biology* 14: 271-273.
- Costa, F. R., Pereira, T. N. S., Hodnett, G. L., Pereira, M. G., Stelly, D. M., (2007), Desenvolvimento de protocolo para obtenção de metáfase em mamoeiro (*Carica papaya* L.). Boletim Técnico da III Reunião de Pesquisa do Frutimamão. 241-242 p.
- Costa, F. R., Pereira, T. N. S., Hodnett, G. L., Pereira, M. G., Stelly, D. M. (2008). Fluorescent in situ hybridization of 18S and 5S rDNA in papaya (*Carica papaya* L.) and wild relatives. *Caryologia* (No Prelo).
- Damasceno Junior, P. C., Costa, F. R., Pereira, T. N. S., Freitas Neto, M., Pereira, M.(2008). Karyotype determination in three Caricaceae species emphasizing the cultivated form (*C. papaya* L.). *Caryologia* (No prelo).
- Damasceno Junior, P. C. (2008), Estudos citogenéticos, genéticos e moleculares, como ferramenta auxiliar no melhoramento genético do mamoeiro. (Tese

doutorado) – Campos do Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 151p

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

Dillon, S.; Ramage, C.; Ashmore, S.; Drew, R.A (2006). Development of a codominant CAPS marker linked to PRSV-P resistance in highland papaya. *Theoretical and Applied Genetics*, v.113, p.1159-1169.

Dillon, S.; Ramage, C.; Drew, R.; Ashmore, S. (2005). Genetic mapping of a PRSV-P resistance gene in “highland papaya” based on inheritance of RAF markers. *Euphytica*, v.145, p.11–23.

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

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

Guerra, M. (1988) *Introdução a Citogenética Geral*. 1 ed. Editora Guanabara, 1988.

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

Kumar, L. S. S., Abraham, (1942). A. Chromosome number in *Carica*. *Current Science* 11:58,.

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

Levin, D. A. & Funderberg, S. W. (1979). Genome size in angiosperms: temperate versus tropical species. *American Naturalist* 114: 784-795.

- Mayeda, L. C. (1997). Estudo citogenético em dez taxons do gênero *Passiflora* L. (*Passifloraceae*). *Dissertação* de mestrado. Escola Superior de Agriocultura Luiz de Queiroz. USP, Piracicaba. 89p.
- Media Cybernetics (2004). Image-Pro plus, version 5.1 for Windows. Media Cybernetics Inc, Maryland, USA.
- Mercado-Ruaro, P., Delgado-Salinas, A. (1998) Karyotypic studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae: phaseolinae). *American Journal of Botany* 85(1): 1-9.
- Reeves, A. and Tear, J. (2000). *Micromeasure. Version 3.3*. Free Program distributed by the authors over the internet from Department of Biology at Colorado State University.
- Schubert, I. (2007). Chromosome evolution. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 109-115.
- Singh, R. J. (1993). Plant cytogenetics. CRC Press, Florida, p.391
- 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.

3.3. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MEIÓTICO DA ESPÉCIE SILVESTRE *Vasconcella goudotiana*

3.3.1. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento meiótico, determinar o índice meiótico e a viabilidade polínica da espécie silvestre *V. goudotiana*. Para a análise meiótica, botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento foram fixados em solução de Farmer. As lâminas foram preparadas pelo método do esmagamento (squash), sendo as anteras maceradas em solução de carmim acético em 1% e posteriormente observadas sob microscópio ótico. Observou-se que a espécie apresenta dezoito cromossomos e é diplóide conforme registra a literatura para a família Caricaceae. A meiose foi normal com um índice de recombinação de 26,2, porém foram observadas várias anomalias como cromossomos pegajosos, cromossomos retardatários, falta de sincronia, e distúrbios nas fibras do fuso. Essas anomalias devem ter ocasionado a ocorrência de produtos pós-meióticos do tipo tríades, díades, mônades e políades que influenciaram para que o índice meiótico fosse de 85,27%. Para a viabilidade polínica os botões próximos da antese foram coletados em etanol 70%, as anteras foram maceradas em solução tripla de Alexander, e as lâminas foram observadas no microscópio ótico. Foi contado o número de grãos de pólen viáveis e inviáveis que computados originaram um percentual de viabilidade polínica de 67,93%, considerado um percentual baixo. Assim, conclui-se que *V.*

goudotiana apresenta meiose irregular devido provavelmente às condições ambientais como alta temperatura e a própria condição de ser uma espécie silvestre. Assim, recomenda-se cautela no uso dessa espécie em programas de melhoramento, visto que a mesma pode apresentar uma proporção de gametas desbalanceados e assim gerar progênies aneuplóides.

3.3.2. ABSTRACT

The objectives of this work were to evaluate the meiotic behavior, to determine the meiotic index and the pollen grain viability of *V. goudotiana*. Floral buds in different development stages were fixed in Farmer's solution. The slides were prepared by squashing; the anthers were macerated in 1% acetic carmine and the slides were observed under optical microscope. The species has 18 chromosomes and it is diploid, which is in agreement with the literature. The meiosis was normal, with a recombination index of 26.2. However, some abnormalities as sticky and delayed chromosomes, synchrony absence and fuse fibers disturbance were observed. Post-meiotic products as triads, dyads, monads and polyads would be resulted from these abnormalities and probably contribute to the meiotic index value of 85.27%. To analyze the pollen grain viability, floral buds close to the anthesis were collected in 70% ethanol. Their anthers were macerated in Alexander's triple solution and the slides were observed under optical microscope. The viable and non-viable pollen grains were counted, resulting in pollen viability of 67.93%, which can be considered a low percentage. The irregular meiosis is probably due to environment conditions, such as high temperatures, and the fact that *V. goudotiana* is a wild species. Thus, its use in genetic breeding programs should be cautious; its unbalanced gametes can generate aneuploid progenies.

3.3.3. INTRODUÇÃO

A espécie *C. papaya* L. é dentro da família Caricaceae a que mais se destaca economicamente, devido a seu valor comercial, e por apresentar diversas aplicações na indústria. Segundo dados da Secretária de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca (SEAG, 2007), o Brasil é o maior produtor e o terceiro maior exportador de mamão, e responde por 25% de toda produção mundial da cultura, com 1,6 milhões de toneladas por ano. O mamão é classificado como a sétima fruta *in natura* exportada pelo país, apresentando uma área cultivada de 30 mil hectares, sendo que estas estão concentradas nos estados do Espírito Santo e Bahia, estes juntos são responsáveis por 70% de toda a produção mundial da fruta (SEAG,ES, 2007).

O mamoeiro cultivado mesmo sendo uma cultura com alta representatividade econômica, ainda apresenta poucas pesquisas associadas a áreas de conhecimento básico, importantes em programas de melhoramento genético (Bajpai e Shing, 2006). Um dos principais problemas da cultura está associado a fatores como a suscetibilidade ao vírus, como no caso do vírus da mancha anelar, e a ação de patógenos como o fungo *Phytophthora Palmivora*, ressaltando ainda a necessidade do melhoramento de caracteres importantes como a espessura e consistência da polpa, além da textura da casca (Costa e Pacova, 2003).

Assim, é importante se destacar o gênero *Vasconcella*, como portador de importantes características agronomicas para programas de melhoramento do mamoeiro.

Hajjar & Hodgkin (2007) destacam a importância do uso de espécies silvestres no melhoramento genético das formas cultivadas, visando à introgressão de genes de interesse agrônomico que possam vir a melhorar a cultura. No caso do melhoramento da cultura do mamoeiro, a realização de estudos sobre o gênero *Vasconcella* é muito importante, considerando que algumas espécies do gênero apresentam características importantes para o melhoramento da cultura.

Considerando-se que a introgressão de genes se dá via hibridação interespecífica e considerando que para atingir o sucesso na introgressão a fertilidade dos grãos de pólen é um fator a ser considerado, é importante para o

melhorista conhecer a capacidade de fertilização das espécies que estão sendo intercruzadas, em especial a espécie silvestre. O desenvolvimento normal da meiose é que garante uma boa fertilidade dos grãos de pólen, já que é por meio dela que se dá a formação do gametófito masculino.

Durante a meiose é possível observar o pareamento dos cromossomos homólogos, a formação da estrutura do complexo sinaptonêmico, o evento de permuta ou *crossing over*, a formação de quiasmas, e também o processo de formação dos produtos haplóides. Diversos genes atuam sobre a pré-meiose da mesma forma que atuam sobre a pós-meiose (Kaul e Murthy, 1985), gerando assim grãos de pólen anormais ou até mesmo inviáveis (Horner e Palmer, 1995). Bajpai e Singh (2006) relatam que as pesquisas citogenéticas são poucas no mamoeiro, mesmo sendo esta uma importante cultura nas regiões tropicais e subtropicais. Em se tratando de espécies silvestres da família Caricaceae essas pesquisas são mais raras ainda. Damasceno Junior (2008) analisou a meiose da forma cultivada e das espécies *Vasconcella monoica* e *Jacaratiá spinosa*, confirmando que essas espécies são diplóides e que apresentam algumas anormalidades no decorrer da divisão celular; resultados esses concordantes com os observados por Bajpai e Singh (2006).

Dando continuidade às pesquisas citogenéticas em espécies da família Caricaceae, esta pesquisa teve por objetivos avaliar o comportamento meiótico da espécie silvestre de *V. goudotiana*, bem como a viabilidade polínica da mesma, a fim de se conhecer o comportamento da espécie para nortear futuros trabalhos de melhoramento genético da cultura do mamoeiro.

3.3.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.4.1. Material Genético

Plantas masculinas de *V. goudotiana* utilizadas foram cultivadas na casa de vegetação do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), localizada em Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

3.3.4.2. Metodologias

Análise da meiose

Para fazer a análise meiótica, dez botões florais/planta, em diferentes estádios de desenvolvimento, foram coletados ao acaso, e fixados em Solução de Farmer (Berlyn & Miksche, 1976) por 24h, com renovação da solução durante este período, e mantidos no freezer a -20°C até o momento do preparo da lâmina.

Para a preparação das lâminas os botões foram re-hidratados em água à temperatura ambiente. As lâminas foram preparadas por meio da técnica de esmagamento, e de cada botão floral foram retiradas quatro anteras grandes e quatro anteras pequenas, sendo que foram preparadas duas lâminas/botão, sendo uma lâmina com anteras grandes e a outra lâmina com anteras pequenas. As anteras foram esmagadas em solução de carmim acético em 1%, os debris foram retirados, e a lâmina foi selada para observação.

Observaram-se as diferentes fases meióticas, sendo dada principal atenção para a fase da prófase I e para possíveis irregularidades. À medida que as irregularidades, como cromossomos retardatários, cromossomos pegajosos, segregação precoce, dentre outras, foram sendo observadas às mesmas foram registradas. Foi também registrado os tipos de quiasmas, intersticial ou terminal, e foi calculado o índice de recombinação segundo Darlington (1958) citado por Damasceno Junior (2008):

$IR = n$ (número do conjunto haplóide da espécie) + o número total de quiasmas.

Índice meiótico

Para a determinação do índice meiótico (IM) botões florais na antese foram coletados em solução de etanol 70% e conservados na geladeira. A lâmina foi preparada utilizando a técnica de esmagamento (squash) onde anteras foram maceradas em solução do corante carmim acético 1%. Foram contabilizadas 500 células/lâmina, de produtos pós – meióticos (políades, tétrades, tríades, díades, mônades). O IM de 90 a 100% indica que a espécie em estudo é citologicamente estável, tendo facilidade na realização de cruzamentos, já em caso de IM menor que 90% a espécie avaliada é considerada instável citologicamente, o que

significa que a espécie pode apresentar gametas desbalanceados e conseqüentemente gerar progênies desbalanceadas e inférteis.

A avaliação do índice meiótico foi estimada conforme Love (1951), onde:

$$IM = \left(\frac{\text{Número total de tétrades normais}}{\text{Somatório dos produtos pós - meióticos}} \right) \times 100$$

Viabilidade Polínica

Botões florais próximos da abertura foram coletados em solução de etanol 70% e armazenados em geladeira até o momento de preparo da lâmina. Para a realização do estudo da viabilidade polínica da espécie foi utilizada a solução tripla de Alexander, sendo esta composta pelos corantes Laranja G, fucsina ácida e verde malaquita (Alexander, 1969). Foram coletados 10 botões florais por planta, sendo que foram preparadas duas lâminas por botão (repetição), e contados 500 grãos de pólen por lâmina, perfazendo um total de 50.000 grãos de pólen classificados em viáveis e inviáveis.

As anteras foram maceradas sobre a lâmina, sobre elas foi colocada uma gota do corante Alexander (1969), e delicadamente foram esmagadas para liberação dos grãos de pólen. Em seguida foram retirados os debris da lâmina e as mesmas foram observadas sob microscópio ótico, campo claro. Em cada lâmina os grãos de pólen foram classificados e contados o número de grãos de pólen viáveis e os inviáveis. Grãos de pólen viáveis apresentam coloração vermelho-púrpura e os grãos de pólen inviáveis apresentam coloração verde. Foram também considerados como inviáveis grãos de pólen que apresentaram o citoplasma plasmolizado.

Captura das imagens

Após o preparo das lâminas nas diferentes etapas da avaliação, as mesmas foram observadas sob microscópio ótico Olympus BX 60 e as imagens foram capturadas utilizando o programa Image Pro-Plus versão 5. 1 (Media Cybernetics).

Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos análise de variância a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico GENES (versão 2006) e foi aplicado as médias o teste Scott-Knott.

3.3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As observações realizadas nas plantas de *V. goudotiana*, nas diferentes fases meióticas, confirmaram que a espécie apresenta $2n=2x=18$ cromossomos e é diplóide (Figura 1A - 1G). Foi também observado que alguns cromossomos da espécie aqui estudada apresentam regiões cuja coloração se diferencia do resto do cromossomo; essas regiões podem indicar a presença de *knobs* (Figuras 1 A e B). Ming *et al* (2008), avaliando cromossomos de *Carica papaya*, na fase de paquíteno, também relatam a ocorrência de *knobs*, que são regiões que apresentam coloração diferenciada, com uma maior intensidade; tais regiões estão localizadas em alguns bivalentes, e correspondem a um total de 17% de todo o genoma da cultura.

Damasceno Junior (2008), trabalhando com *V. monóica*, *Jacaratia spinosa* e *Carica papaya*, observou que tais espécies também apresentam um conjunto cromossômico de $2n=2x=18$ cromossomos, e que em *C. papaya* e *V. monóica* foram observados um par de cromossomos associados ao nucléolo; segundo o autor tais cromossomos podem estar associados à região organizadora do nucléolo (RON). Pode-se observar na Figura 1B a presença de um par de cromossomos associado ao nucléolo, indicando que neste par pode estar localizado a RON da espécie. As RON são regiões sítios da seqüência repetitiva de DNA 45S (rDNA), responsáveis em grande parte pela constituição dos nucléolos. É considerado um marcador citológico, podendo estar na região terminal ou intersticial do cromossomo, gerando assim uma constrição secundária e no último caso gerando um satélite (Schubert, 2007).

Nesta pesquisa foi estimado o índice de recombinação, que no caso foi de 26,2. Tal índice é referente à taxa de permuta ou *crossing over* observada na

espécie avaliada. O índice de recombinação está associado à configuração cromossômica devido à formação dos quiasmas durante o evento da permuta. De acordo com Senda *et al.* (2005), a presença de cromossomos em bastão caracteriza a ocorrência de apenas uma permuta, já cromossomos em anel, caracterizam duas permutas. Damasceno Junior (2008), avaliando o comportamento meiótico de *C. papaya* e *V. monóica*, relata que o índice de recombinação das espécies estudadas é de 26,0 e de 25,8 respectivamente; o autor descreve ainda a ocorrência de um par de cromossomos em bastão e oito pares em anel, tal característica foi observada em ambas as espécies avaliadas. Neste trabalho não foram analisados os diferentes tipos de quiasmas para estabelecer o índice de recombinação, porém pode se observar na Figura 1C os cromossomos ainda associados pelos quiasmas e a segregação normal onde se observam os nove cromossomos nos pólos celulares (Figura 1D).

A segunda fase foi normal, sendo possível observar células com os quatro núcleos resultantes da divisão meiótica. A citocinese em angiospermas pode ser simultânea ou sucessiva (Ramanna & Jacobsen, 2003), e em mamoeiro é do tipo simultânea, onde a celularização ocorre após a telófase II (Figura 1H) dando origem as tétrades. Assim, pode-se concluir que a espécie após meiose gera gametas balanceados com nove cromossomos cada.

Foram observadas algumas anormalidades durante a divisão meiótica em *V. goudotiana*, como cromossomos retardatários, segregação precoce dos cromossomos, cromossomos pegajosos, e fibras dos fusos anormais. Algumas dessas anomalias foram também observadas em mamoeiro (Damasceno Junior, 2008; Bajpai e Singh, 2006), em *V. monoica*, *V. cundinamarcensis* (Damasceno Junior, 2008) e em *V. pubescens* (Zerpa, 1980).

Cromossomos retardatários foram observados tanto na metáfase I quanto na metáfase II (Figura 2 A e B), entretanto esta anomalia meiótica foi também registrada por Damasceno Junior (2008), que observou cromossomos retardatários em *V. monóica* e *C. papaya*, porém apenas *V. monóica* apresentou micronúcleos em políades. Corrêa *et al.* (2005), avaliando o comportamento meiótico em espécies da família *Araceae*, relatam a ocorrência de cromossomos dispostos fora da placa equatorial durante a fase de metáfase e cromossomos retardatários durante as fases de anáfase e telófase, tanto na meiose I como na II.

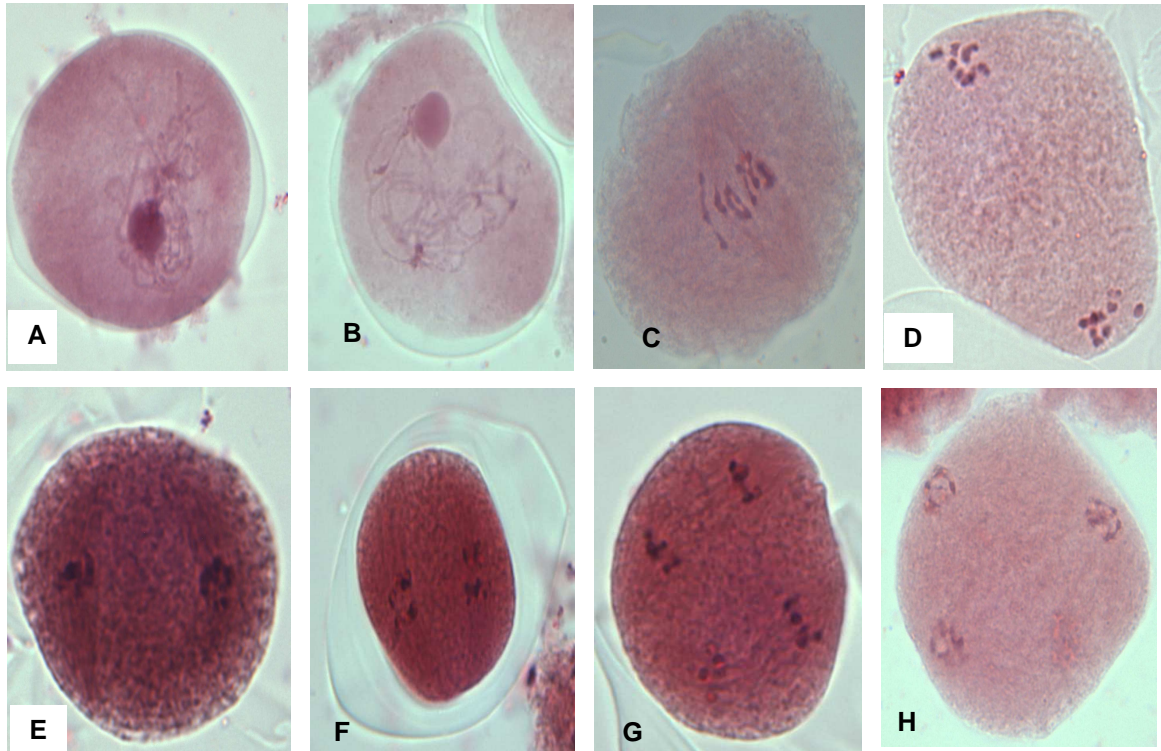


Figura 1. Diferentes fases da meiose em *Vasconcella goudotiana* – 1A - Prófase I subfase Zigóteno onde se observa os filamentos (cromossomos) e o nucléolo (N) - 1B. Prófase I subfase paquíteno onde se observa os cromossomos mais condensados e alguns apresentando regiões mais condensadas ou knobs (seta) - 1C. Metáfase I onde se observa os cromossomos ainda associados pelos quiasmas (seta) - 1D. Anáfase I onde se observa a segregação normal com 9 cromossomos nos pólos celulares - 1E a 1H. Metáfase II, Anáfase II e Telófase II onde se observa 4 núcleos resultantes da meiose.

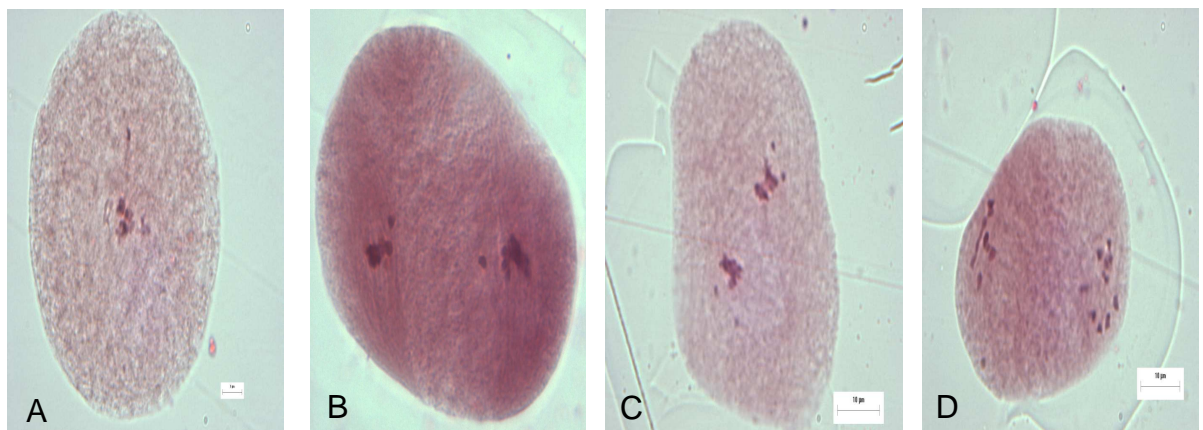


Figura 2: Anomalias observadas na meiose de *V. goudotiana* onde se observa cromossomos retardatários na metáfase I e metáfase II (2A e 2B), segregação precoce e cromossomos pegajosos (2C) e falta de sincronia na meiose I (2D).

A presença de cromossomos retardatários pode gerar gametas desbalanceados ou aneuplóides, já que os cromossomos retardatários podem ficar retidos no citoplasma, não acompanhando o conjunto de cromossomos que segue a divisão celular normalmente, e no final serem eliminados na forma de micronúcleos (Koduru & Rao, 1981).

Outra anomalia meiótica observada em *V. goudotiana* foi cromossomo pegajoso (sticky chromosome) (Figura 2A, B e C). Esta anomalia, que está sob controle genético e ambiental, é caracterizada pela aglomeração dos cromossomos na célula podendo ocorrer em diferentes fases da meiose. Vários genes mutantes são relatados como responsáveis por cromossomos pegajosos em espécies vegetais e usualmente esta anomalia é seguida por fragmentação cromossômica, anomalias nas fibras do fuso acromático, e meiose anormal. Dentre os fatores ambientais a temperatura e a aplicação de herbicidas podem ativar este tipo de anomalia (Koduru & Rao, 1981; Bajpai e Singh, 2006). Bajpai e Singh (2006) relatam que em variedades comerciais de *C. papaya* esta foi a anomalia de maior ocorrência e variou de 21.6% a 44% e Damasceno Junior (2008) observou cromossomos pegajosos em 12% e 28,8% das células analisadas em *C. papaya* e em *V. monoica*, respectivamente.

A falta de sincronismo na divisão celular e a segregação precoce foram também observadas durante a meiose em *V. goudotiana*. A falta de sincronismo é caracterizada quando duas fases distintas da divisão celular são observadas na mesma célula (Figura 2 D). Estudos realizados em células-mãe de grão de pólen em plantas de mamoeiro hermafrodita e masculino revelaram a presença de um par de cromossomos que apresenta uma separação precoce em relação aos demais. Alguns autores associam a segregação precoce de cromossomo em mamoeiro à existência de cromossomos sexuais, porém espécies com cromossomos pequenos podem apresentar problemas de segregação durante a meiose (Schubert, 2007) e este pode ser o caso das espécies Caricáceas, já que segregação precoce tem sido observada por outros autores (Storey, 1953; Bajpai e Singh, 2006, Damasceno Junior, 2008).

A desorganização das fibras do fuso acromático também foi observada em *V. goudotiana* (Figura 3). Durante a divisão celular o citoesqueleto sofre uma transformação de uma configuração em outra apropriada para as diferentes funções que apresenta durante a cariocinese e a citocinese (Shamina, 2005a). O

ciclo do citoesqueleto em células-mãe de grãos de pólen parece ocorrer em dois modos: com e sem a despolimerização na prófase. Neste último caso, na interfase o rearranjo do citoesqueleto ocorre em um sistema perinuclear semelhante a anel; após o desarranjo do envelope nuclear no início da prometáfase, o anel se desfaz e as fibras do fuso (micro-tubos) invadem o núcleo formando uma rede desorganizada. A formação das fibras do fuso bipolar, cinetócoros e central, ocorrem nesta fase de desorganização. As fibras bipolares desenvolvidas se orientam ao longo do futuro eixo de divisão e convergem para os pólos formando as fibras metafásicas no final da prometáfase (Shamina, 2005a). Dentre as anomalias da fibra observaram-se fibras em C e fibras múltiplas (Figura 3).

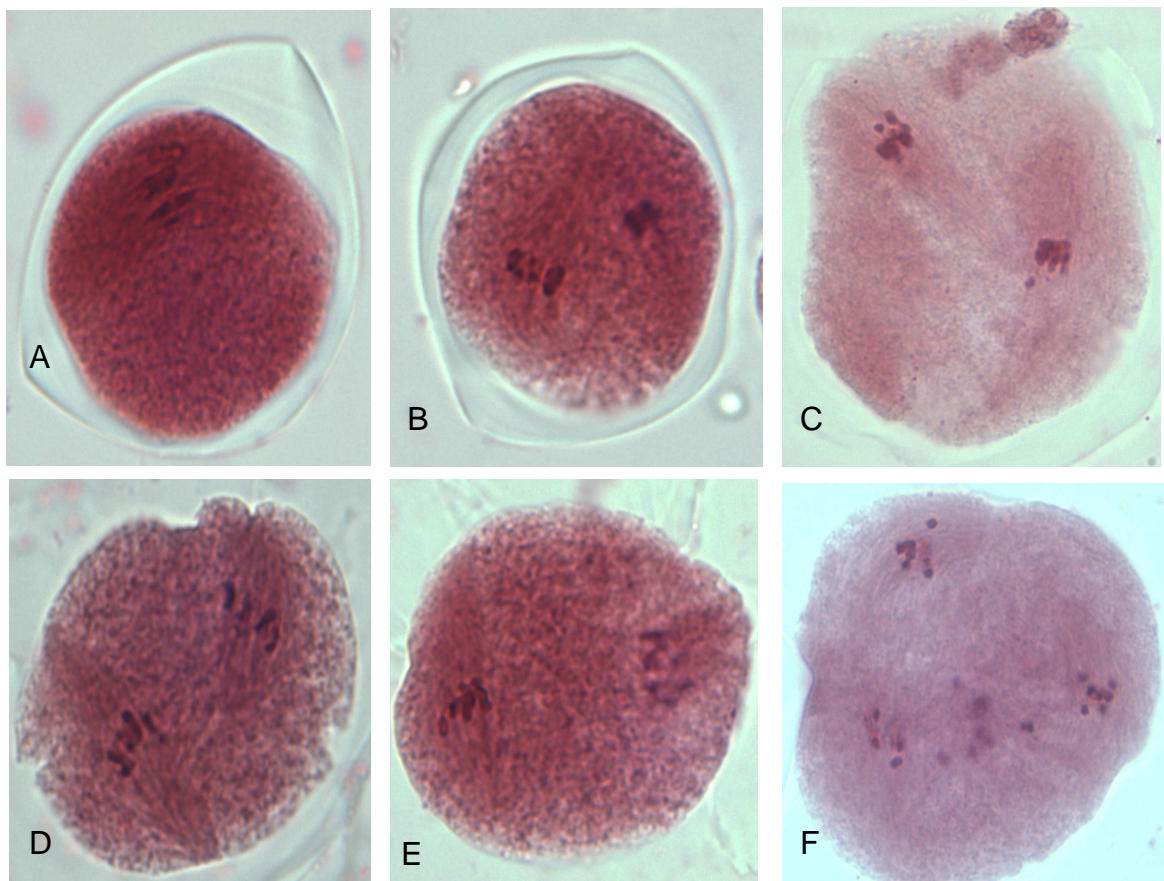


Figura 3. Anormalidades nas fibras do fuso observadas durante a metáfase I e II em *V. goudotiana*. A – Fibras do fuso em C. B – E. Fibras múltiplas tanto na metáfase I (B) quanto na metáfase II (C-E). F. célula com segregação anormal dos cromossomos em função do desarranjo das fibras do fuso.

As fibras em C ocorrem devido a anormalidades que ocasionam a curvatura dos feixes das fibras do fuso, enquanto que as fibras múltiplas ocorrem ao acaso e regra geral elas causam o surgimento de políades em vez de díades

na meiose I. Ambas as anomalias têm sido reportadas em outras espécies como milho e híbridos intergenéricos de cereais (Shamina, 2005b).

Todas essas anormalidades podem gerar gametas desbalanceados que podem configurar em gametas não reduzidos ($n=2n=18$ cromossomos) em vez de gametas reduzidos ($n=9$ cromossomos) e em gametas aneuplóides que podem se configurar com grãos de pólen inviáveis.

Índice Meiótico e Viabilidade Polínica

A análise de variância dos dados referentes ao índice meiótico (Tabela 1) foi significativa conforme pode ser verificado na Tabela 2. Apesar de a meiose ter apresentado algumas anormalidades (Tabela 1) houve uma grande formação de tétrades normais, o que indica uma formação de gametas balanceados na espécie. Observa-se também que a formação dos produtos pós-meióticos variou entre plantas bem como os índices meióticos, já que houve diferença entre as médias dos genótipos. Em termos médios, a espécie apresenta Índice Meiótico (IM) de 85,27% e segundo Love (1951), espécies que apresentam IM de 90 a 100% caracterizam espécies citologicamente estáveis, já espécies que apresentam IM menor que 90% são consideradas instáveis meioticamente; portanto, a espécie analisada pode ser considerada instável meioticamente, o que significa que a espécie pode vir a apresentar gametas desbalanceados e dificuldades para a obtenção de progênies.

Tabela 1. Produtos pós-meióticos observados em *Vasconcella goudotiana*.

Planta	Produtos Pós-meióticos					Total	IM (%)*
	Tétrades	Tríades	Díades	Monades	Políades		
1	8.302	1.081	03	01	19	9.880	88,82 a ¹
2	6.754	520	41	06	165	7.486	90,22 a
3	6.668	750	25	07	463	7.913	84,27 b
4	7.587	997	170	0	248	9.002	84,28 b
5	8.043	942	654	06	353	9.998	80,45 b
Total	37.354	4.290	893	20	1.248	43.805	85,27

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott e Knott, a 5% de probabilidade.

Como pode ser verificado foram observadas tríades, díades, políades que foram conseqüências das anormalidades observadas durante a meiose (Tabela

1). Díades e tríades podem gerar gametas não reduzidos do tipo $2n$, já as políades geram gametas desbalanceados devido à presença de micronúcleos que regra geral podem representar cromossomos retardatários (Figura 3). Entretanto, produtos pós-meióticos anômalos têm sido registrados em outras espécies como *V. pubescens*, cuja meiose também apresentou produtos pós-meióticos irregulares (Zerpa, 1980). Damasceno Junior (2008) estimou para *C. papaya* e *V. monóica*, índices meióticos de 94,84% e 77,57% respectivamente, assim pode-se inferir que *V. goudotiana* tem um índice meiótico mais alto do que *V. monoica*, que também é uma espécie silvestre do gênero *Vasconcella*.



Figura 4. Produtos pós-meióticos observados em *V. goudotiana*. A – Tétrade. B – Díade. C – Díade com micronúcleo (seta). D – Tríade com núcleos de tamanho desiguais. E – Políade onde se observa seis núcleos de tamanhos diferentes. F. Grãos de pólen sem a devida degeneração da calose.

A viabilidade polínica das plantas de *V. goudotiana* (Tabela 3 e Figura 5) variou de 48,50% a 85,05%, sendo que em média a viabilidade polínica da espécie está em torno de 67,93%, o que é considerado uma viabilidade polínica baixa a média. Entretanto, considerando as inúmeras irregularidades meióticas observadas nas plantas este índice já era esperado. Bajpai e Singh (2006) avaliando a viabilidade polínica de dez variedades de mamoeiro observaram que

este índice variou de 11,64% a 83,95%; Damasceno Junior (2008) observou valores de 96% e 70,93% para as espécies *C. papaya* e *V.*, respectivamente. Mendes (1994) relata que a presença de tétrades anormais é um fator indicativo de ocorrência de um processo meiótico irregular, que conseqüentemente leva ao desenvolvimento de grãos de pólen com a diminuição da taxa de viabilidade polínica.

Tabela 2. Resumo a análise da variância dos dados do Índice Meiótico em *Vasconcella goudotiana*

		Índice Meiótico	Viabilidade Polínica
FV	GL	QM	
Trat.	4	177,4140**	2109,7727**
Res.	45	30,4252	132,5824
Médias	85,508		68,294**
CV%	4,4837		20,5863

*Significativo em nível de 1% de probabilidade; ** Significativo em nível de 5% de probabilidade; CV% = Coeficiente de Variação Genético.

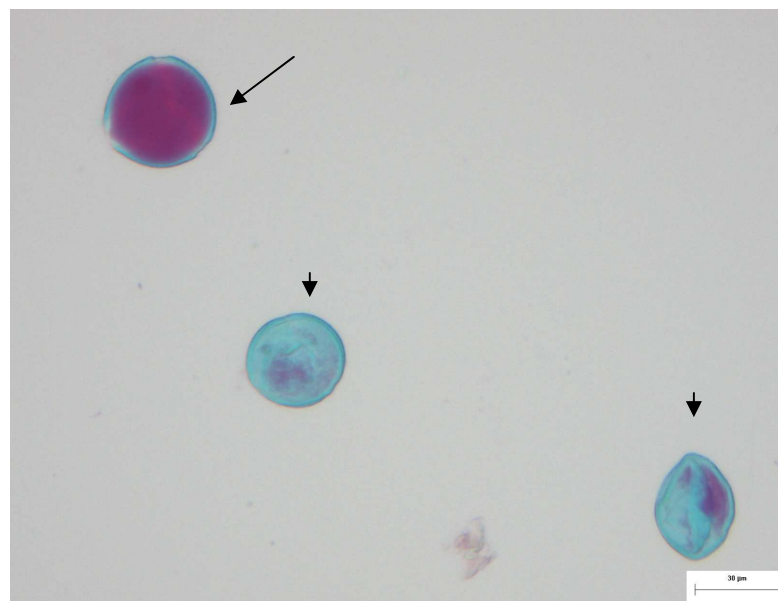


Figura 5. Viabilidade polínica em *V. goudotiana* onde se observa um grão de pólen viável (seta preta) e dois grãos de pólen inviáveis do tipo plasmolisados (seta curta). Barra = 5 μ m.

Tabela 3. Número de grãos de pólen viáveis (GPV), grãos de pólen inviáveis (GPI), grãos de pólen plasmolisados (GPP), total de grãos de pólen inviáveis (TGPI), total de grãos de pólen (TGP) e viabilidade polínica (VP) observados nas plantas de *V. goudotiana*.

Planta	GPV	Grãos de pólen inviáveis			TGP	VP (%)*
		GPI	GPI	GPP		
1	8.511	764	732	1.496	10.007	85,05 ¹ a
2	7.832	1.295	850	2.145	9.977	78,50 ab
3	6.297	2.473	1.260	3.733	10.030	62,78 b
4	4.881	3.898	1.285	5.183	10.064	48,50 c
5	6.522	2.730	808	3.538	10.060	64,83 b
Total	34.043	11.251	4.935	16.095	50.138	67,93

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Scott –Knott a 5% de probabilidade.

Segundo Corrêa *et al.*, (2005), as alterações ocorridas durante a meiose, teoricamente deverão, se refletir na viabilidade polínica dos grãos de pólen, já que o caráter de fertilidade do grão de pólen é totalmente dependente do sucesso durante o processo de meiose. A ocorrência de grãos de pólen inviáveis pode vir a ter uma maior relação com a segregação irregular dos cromossomos, do que os outros eventos irregulares observados como a citomixia e o atraso dos cromossomos detectados em anáfase I e II (Damasceno Junior 2008).

Com base nos dados observados neste trabalho conclui-se que a espécie *V. goudotiana* apresenta meiose irregular devido provavelmente às condições ambientais, já que esta espécie se desenvolve em regiões altas com temperaturas mais amenas. Conseqüentemente, essas irregularidades observadas na meiose ocasionaram o surgimento de produtos pós-meióticos anômalos e uma viabilidade polínica baixa. Assim, para que esta espécie seja utilizada em programas de melhoramento via hibridação é necessário que haja uma programação cuidadosa no número de cruzamento a serem realizados, já que a mesma apresenta uma baixa proporção de gametas viáveis.

3.3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, M. P. (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Techn*, 44: 117-122p.
- Bajpai, A.; Singh, A. K. (2006) Meiotic Behavior of *Carica papaya* L.; Spontaneous chromosome instability and elimination in important cvs. in North Indian conditions. *Cytologia*, 71(2): 131-136.
- Berlyn, G. P. and Miksche, J. P. (1976) Botanical microtechnique and cytochemistry. Iowa State University Presse, Iowa-USA. 326 pp.
- Corrêa, M.G.S.; Viegas, J.; Silva, J.B.da; Avila, P.F.V.de; Busato, G.C.; Lemes, J.S. (2005) Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. *Acta Botânica Brasileira*, 19(2):295-303.
- Costa, A. de F. S. da; Pacova, B. E. V. (2003) Caracterização de cultivares, estratégias e perspectivas do melhoramento genético do mamoeiro. In: Martins, D. dos S.; Costa, A. de F. S. da (eds.) *A cultura do mamoeiro – Tecnologia de Produção*, INCAPER, Vitória, ES, p. 59-102.
- Damasceno Junior, P. C. (2008) Estudos citogenéticos, genéticos e moleculares, como ferramenta auxiliar no melhoramento genético do mamoeiro. (Tese doutorado) – Campos do Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 151p.
- Hajjar R & Hodgkin T (2007) The use of wild relatives in crop improvement: a survey of development over the last 20 years. *Euphytica* 156: 1-13.
- Horner, H. T.; Palmer, R. G. (1995) Mechanisms of genic male sterility. *Crop Science*, 35(6): 1527-1535p.

- Kaul, M. L. H. & Murthy T. G. K. (1985) Mutant genes affecting higher plant meiosis. *Theoretical Applied Genetics* 70: 449-466.
- Kodoru, P. R. K.; Rao, M. K. (1981) Cytogenetics of synaptic mutants in higher plants. *Theor. Appl. Genet.*, 59: 197-214.
- Love, R. M. (1951) Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. *Agronomy Journal*, 43: 72-76.
- Media Cybernetics (2004) Image-Pro plus, version 5.1 for Windows. Media Cybernetics Inc, Maryland, USA.
- Mendes, M. da Silva. (1994) Viabilidade do grão de pólen de *Solanum ssp.* Dissertação(Tese de mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Ming, R.; Hou, S.; Feng, Y.; Yu, Q.; Dionne-Laporte, A.; Saw, J. H.; Senin, P.; Wang, W.; Ly, B. V.; Lewis, K. L. T.; Salzberg, S. L.; Feng, L.; Jones, M. R.; Skelton, R. L.; Murray, J. E.; Chen, C.; Qian, W.; Shen, J.; Du, P.; Eustice, M.; Tong, E.; Tang, H.; Lyons, E.; Paull, R. E.; Michael, T. P.; Wall, K.; Rice, D. W.; Albert, H.; Wang, M. L.; Zhu, Y. J.; Schatz, M.; Nagarajan, N.; Acob, R. A.; Guan, P.; Blas, A.; Wai, C. M.; Ackerman, C. M.; Ren, Y.; Liu, C.; Wang, J.; Wang, J.; Na, J. K.; Shakirov, E. V.; Haas, B.; Thimmapuram, J.; Nelson, D.; Wang, X.; Bowers, J. E.; Gschwend, A. R.; Delcher, A. L.; Singh, R.; Suzuki, J. Y.; Tripathi, S.; Neupane, K.; Wei, H.; Irikura, B.; Paidi, M.; Jiang, N.; Zhang, W.; Presting, G.; Windsor, A.; Navajas-Perez, R.; Torres, M. J.; Feltus, F. A.; Porter, B.; Li, Y.; Burroughs, A. M.; Luo, M. C.; Liu, L.; Christopher, D. A.; Mount, S. M.; Moore, P. H.; Sugimura, T.; Jiang, J.; Schuler, M. A.; Friedman, V.; Mitchell-Olds, T.; Shippen, E. E.; Pamphilis, C. W. de; Palmer, J. D.; Freeling, M.; Paterson, A. H.; Gonsalves, D.; Wang, L.; and Alam, M. (2008) The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, 452: 991-997.

- Ramanna M. S. & Jacobsen E (2003) Relevance of sexual polyploidization for crop improvement – a review. *Euphytica* 133: 3-18.
- Shamina, N. V (2005a) Formation of division spindles in higher plant meiosis. *Cell Biology International* 29: 307-318.
- Shamina, N. V (2005b) A catalogue of abnormalities in the division spindles of higher plants. *Cell Biology International* 29: 384-391.
- SEAG (Secretária da Agricultura, Abastecimento e aquicultura e Pesca). Disponível em: www.seag.es.gov.br. Acesso em: 10/09/2008.
- Senda, T.; Hiraoka, Y.; Tominaga, T. (2005) Cytological affinities and interfertilities between *Lolium temulentum* and *L. persicum* (Poaceae) accessions. *Hereditas*, 142: 45-50.
- Shubert, I (2007) Chromosome evolution. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 109-115.
- Storey, W.B., (1953) Genetics of the papaya. *J.Hered.* 44:70-78.
- Zerpa, D. M. (1980) Comportamento meiotico de la descendência hibrida producida al transferor el character bisexual de *C. pubescens* e *C. stipulata*. Ver. Fac. Agronomia, Maracay, Venezuela, 1-4: 5-47.

4. CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar citologicamente a espécie *Vasconcella goudotiana*, que pertence à família Caricaceae e apresenta características desejáveis podendo ser utilizada em programas de melhoramento genético do mamoeiro (*Carica papaya* L.). Para tal, sementes foram colocadas para germinar e plantas foram cultivadas em casa de vegetação. Considerando que esta espécie é originada das terras altas e baixas temperaturas, fez-se uma breve descrição botânica das plantas que foram cultivadas na casa de vegetação. A espécie é dióica e apresentam folhas palmipartidas de coloração verde. Nas plantas masculinas o tamanho das folhas apresentam, em média, comprimento de 25,98 cm e 31,20 cm de largura; as flores estão dispostas em inflorescências que apresentam, em média, 24,44 botões ou flores por inflorescência. Quanto às plantas femininas, as folhas apresentam comprimento médio de 22,71 cm e 27,9 cm de largura. As flores femininas são isoladas e surgem nas axilas foliares. O gineceu é gamocarpelar e o pistilo é pluricarpelar com seis carpelos. O ovário apresenta em média de 264 óvulos. As plantas masculinas floresceram antes das femininas e levaram em média oito meses para o florescimento. Uma diferença marcante entre plantas masculinas e femininas é o recorte das folhas que nas masculinas apresentam os folíolos mais estreitos do que as femininas; essa diferença permite identificar o sexo das plantas antes da floração. Além da descrição botânica foi determinado um cariótipo convencional, analisado a meiose e os produtos pós-meióticos, bem como a viabilidade polínica. Para o cariótipo

observou-se que a espécie apresenta 18 cromossomos, sendo cinco pares do tipo metacêntrico e quatro pares do tipo submetacêntrico ($2n=2x=18= 5II M + 4II SM$). O cariótipo é do tipo simétrico, indicando a similaridade no tamanho dos cromossomos e o comprimento do lote haplóide estimado para a espécie foi de 23,08 μm . O tamanho dos cromossomos da espécie variou de 3,06 μm (o maior par) a 2,03 μm (o menor par). Não foi observada nenhuma diferença entre os pares de cromossomos homólogos que pudesse indicar a presença de cromossomos associados ao sexo da espécie. Na análise meiótica que foi realizada em botões florais de diferentes estádios de desenvolvimento, observou-se células com a divisão normal, gerando no final produtos pós-meióticos balanceados e normais. Entretanto, várias anomalias foram observadas como cromossomos pegajosos, cromossomos retardatários, segregação precoce, falta de sincronia da divisão II e distúrbios nas fibras do fuso acromático tanto na divisão I quanto na II. Essas anomalias meióticas se reverteram em produtos pós-meióticos anormais; assim foram observados tríades, díades, nômades e políades além de tétrades, fazendo com que a espécie apresentasse um índice meiótico de 85,27% e uma viabilidade polínica de 67,93%. Com base nos resultados sugere-se que o cultivo dessa espécie é possível nas condições locais e em casa de vegetação, porém o uso da mesma em programas de hibridação interespecífica deve ser bem programado, já que em virtude das anomalias apresentadas que induziram a um baixo índice meiótico e a uma baixa viabilidade polínica e podem gerar progênies desbalanceadas (aneuplóides ou duplicadas) ou mesmo ter um baixo índice de fertilização ou vingamento das flores polinizadas e conseqüentemente baixa obtenção de frutos com sementes híbridas.

5. REFERÊNCIAS

- Alexander M.P. (1969) Differential staining of aborted and non aborted pollen. *Stain Tech.* 44:111-122.
- Alvizo, V.H.F., Rojkind, M.C. (1987) Resistencia al virus mancha anular del papaya en *Carica cauliflora*. *Rev. Mex. de Fitopat.* 5:61-62
- Aramuganathan, K & Earle, E. D. (1991) Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9: 229-233.
- Badillo, V. M. (1971) Monografía de la familia Caricaceae. Editorial Nuestra América C. A. Maracay, Venezuela, 221p.
- Badillo, V.M. (1993) Segundo Esquema Caricaceae. *Revista de La Facultad de Agronomía*. Maracay, Venezuela.
- Badillo, V.M. (2000) *Carica* L. VS. *Vasconcella* St.Hil. (Caricaceae) con la rehabilitacion de este ultimo. *Ernestia*. Maracay, Venezuela. 74-79p.
- Bajpai, A.; Singh, A. K. (2006) Meiotic Behavior of *Carica papaya* L.; Spontaneous chromosome instability and elimination in important cvs. in North Indian conditions. *Cytologia*, 71(2): 131-136.

- Caetano-Pereira, C. M., Defani-Scoarize, M. A., Pagliarini, M. S., Brazil, E. M. (1998) Syneytes, abnormal cytokinesis and spindle irregularities in maize microsporogenesis. *Maydica* 43: 235-252.
- Chen, M. H., Chen, C. C., Wang, D. N., Chen, F. C., (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Carica papaya* x *Carica Cauliflora* cultured in vitro. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, vol 69, n^o 9, p. 1913-1918,
- Coelho, L.G.M., Battistin, A.(1996) Estudo dos cariótipos em espécies de *Adesmia* DC. nativas no Rio Grande do Sul. In: 42 Congresso Nacional de Genética. Caxambu, Revista Brasileira de Genética (supplement), v. 19, n. 3, p. 130.
- Costa, F. R., Pereira, T. N. S., Hodnett, G. L., Pereira, M. G., Stelly, D. M. (2008) Fluorescent in situ hybridization of 18S and 5S rDNA in papaya (*Carica papaya* L.) and wild relatives. *Caryologia* (No Prelo).
- Consolaro, M. E. L., Pagliarini, M. S. and Chaves, L. J. (1996) Meiotic behavior, pollen fertility and seed production in Brazilian populations of *Centella asiatica* (L) Urban (Umbelliferae). *Cytologia* 61: 57–61.
- Dafni, A. (1992) Pollination ecology – a practical approach. New York: Oxford University Press Inc., 250p.
- Damasceno Junior, P. C. (2008) Estudos citogenéticos, genéticos e moleculares, como ferramenta auxiliar no melhoramento genético do mamoeiro. (Tese doutorado) – Campos do Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 151p.
- 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. Pp.309-349.
- Darlington, C.D., Ammal, E. J. K. (1945) Chromosome atlas of cultivated plants. George Allen and Unwin Ltd., London.

- Datta, P. C. (1971) Chromosomal byotypes of *Carica papaya* L. *Cytologia* 36:555-562.
- Defani-Scoarize, M.A., Pagliarini, M.S. and Aguiar, C.G. (1996) Meiotic behavior of inbred lines of maize (*Zea mays* L.). *Nucleus* 39: 10-18.
- Drew, R.A.; O'Brien, C.M.; Magdalita, P.M.; Drew, R.A. (1998) Development of *Carica* interspecific hybrids. *Acta Horticulture*, 461: 285-291.
- Fernández-Calvín, B.; Orellana, J.; Pignone, D. (1995) Genome analysis of triploids using mathematical models. I. Effects of translocations not detected by conventional staining techniques. *Hereditas*, 122: 41-45
- Ferreira, M.A.M.M., Aguiar-Perecin, M.L.R. (1996) Padrão de bandas C em *Capsicum baccatum*. *Brazilian Journal of Genetics* (Supplement) 19(3): 136.
- Guerra, M., (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética*, 4:741-743.
- Guerra, M. (1988) *Introdução a Citogenética Geral*. 1 ed. Editora Guanabara, 1988.
- Guerra, M. e Souza, M J. (2002) *Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal, e humana*. FUNPEC, Ribeirão Preto - SP. 131 pp.
- Gupta, P. K., and Priyadarshan P.M., (1987) Analysis of meiosis in triticale (*Triticosecale wittmack*) x rye (*Secale cereal* L.)F₁ hybrids at three ploidy levels. *Theoretical and Applied Genetics*, 73: 389-898.

- Heslop-Harrison J. & Heslop-Harrison Y (1970) Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescent: intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technology* 45: 115-120.
- Horner, H. T.; Palmer, R. G. (1995) Mechanisms of genic male sterility. *Crop Science*, 35(6): 1527-1535p.
- Huziwara Y (1962) Karyotype analysis in some genera of compositae. VIII. Further studies on the chromosome of aster. *American Journal of Botany* 49: 116-119.
- Johansen, A. D. (1940) *Plant Microtechnique*. McGraw Hill, New York. 523pp
- Jong, J. H. Wolters A. M. A., Kok J. M., Verhaar, H. and Van Eden J., (1993) Chromosome pairing and potential for intergeneric recombination in some Hypotetraploid somatic hybrids of *Lycopersicon esculentum* , *Solanum tuberosum*. *Genome*, 36: 1032-1041
- Kaul, M. L. H., and Murthy, T. G. K. (1985) Mutants genes affecting higher plant meiosis. *Theor. Appl. Genet.* 70: 449-466.
- Kodoru, P. R. K.; Rao, M. K. (1981) Cytogenetics of synaptic mutants in higher plants. *Theor. Appl. Genet.*, 59: 197-214.
- Kumar, L. S. S., Abraham, (1942) A chromosome number in *Carica*. *Current Science* 11:58.
- Kumar, L. S. S., Abraham, A., Srinivasan, V. K. (1945) the cytology of *Carica papaya*. *Indian Journal of Agriculture Science* 15: 242-253.
- Levan, A., Frediga, K., And Sandberg, A., (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.

- Liberato, J.R.; Vanetti, C.; Rodrigues, C.H.; Dias, V.P.(1993) Ocorrência de podridão de *Phytophthora* em mamoeiro (*Caricapapaya* L.) no estado do Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília 18: 324.
- Love, R. M. (1951) Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. *Agronomy Journal*, 43: 72-76.
- Maffei, E.M.D., Marin-Morales, M.A., Ruas, P.M., Ruas, C.F. (1996) Análise de assimetria cariotípica realizada em populações de *Mikania micrantha* HBK. (Asteraceae). *Brazilian Journal of Genetics* (Supplement), 19(3): 131.
- Magdalita, P. M.; Villegas, V. N.; Pimentel, R. B.; Bayot, R. G. (1988) Reaction of papaya (*Carica papaya*) and related species to ringspot virus. *J. Crop Sci.*,13:129-132
- Manshardt, R.M., Wenslaff, T.F. (1989) Interspecific hybridization of papaya with other species. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 114:689-694.
- Mayeda, L. C. (1997) Estudo citogenético em dez taxons do gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Dissertação* de mestrado. Escola Superior de Agriocultura Luiz de Queiroz. USP, Piracicaba. 89p
- Mercado-Ruaro, P., Delgado-Salinas, A. (1998) Karyotypic studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae: phaseolinae). *American Journal of Botany* 85(1): 1-9.
- Pagliarini, M. S.(2000) Meiotic behavior of economically important plant species: The relationship between fertility and male sterility. *Genet. Mol. Biol.* 23: 997-1002.
- Pagliarini M & Pozzobon M. T. (2004) II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais. EMBRAPA CENARGEN – DF.
- Sharma, A K & Sharma, A. (1994) *Chromosome Techniques: a manual*. Harwood Academic Press, Switzerland. 368 pp.

- Scheldeman, X., Romero, J., Damme, P.V., (2001) Highland papayas in souther. Ecuador: Need for conservation Vasconcella, actions proceedings of the International symposium on tropical and subtropical fruits Australia. *Acta Horticulturae*. Disponível em (<http://www.tropicallab.ugente.bee/vasconcellabiotope.htm>) Acessado em: 08/12/2007.
- Singh, R. J. (1993) *Plant cytogenetics*. United States: CRC Press. Inc., 391p.
- Shubert, I (2007) Chromosome evolution. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 109-115.
- Souza Júnior, M. T. (2000) Mamão transgênico: Uso da engenharia genética para obter resistência ao vírus da mancha anelar. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 2(13): 132-137.
- Souza, M. M., Pereira, T. N. S., Rodrigues, R., Dutra, G. A., Sudré, C. P. (2000) Irregularidade meiótica em pimenta. *Horticultura Brasileira* 18: 748-749 (Suplemento).
- Stace, C. A.(2000) Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20st and 21st centuries. *Taxon*,49, p. 451-476.
- Storey, W.B., (1941) The botany and sex relationship of the papaya. *Papaya production in the Hawai Agricultural Experiment Station* 87:5-22.
- Techio, V. H.; Davide, L. C.; Pereira, A. V. (2006) Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. *Genetics and Molecular Biology*, 29 (2): 353-362.

Techio, V. H. ; Davide, Lisete Chamma ; Nunes, J. D. ; Pereira, A. V.(2007) Variação cromossômica numérica em Pennisetum. Ciência e Agrotecnologia, Lavras-MG, v. 31, p. 398-405.

Tilquin, J.P., Brower K., and Horwat F., (1984) Unusual cytological patterns in microsporogenesis in a cultivar of Fuchsia. 1Multiple spindle . Theoretical and Applied Genetics, 67:413-417.