

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MICROPROPAGAÇÃO E USO DE MARCADORES
MOLECULARES NA DETERMINAÇÃO
DO SEXO DO MAMOEIRO**

Humberto Actis Zaidan

Engenheiro Agrônomo

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

2002

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MICROPROPAGAÇÃO E USO DE MARCADORES
MOLECULARES NA DETERMINAÇÃO
DO SEXO DO MAMOEIRO**

Humberto Actis Zaidan

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal - UNESP, para obtenção do Título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas.

Jaboticabal - SP

Julho - 2002

Zaidan, Humberto Actis
Z21m Micropropagação e uso de marcadores moleculares na
determinação do sexo do mamoeiro / Humberto Actis Zaidan. – –
Jaboticabal, 2002
xii, 154 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2002
Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos
Banca examinadora: Carlos Ruggiero, Maria Helena de Souza
Goldman, Luiz de Souza Corrêa, Walter José Siqueira

Bibliografia

1. Micropropagação-mamoeiro. 2. Marcadores moleculares-sexo.
3. *Carica papaya* L.-sexo. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 575:634.651

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

HUMBERTO ACTIS ZAIDAN - nascido em 15 de julho de 1969, no município de Ilhéus, Estado da Bahia, é Engenheiro Agrônomo formado pela Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Câmpus de Cruz das Almas, em abril de 1993. Em fevereiro de 1998, obteve título de Mestre em Ciências, Área de Concentração em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP), Câmpus de Piracicaba.

O amor é paciente, é benigno. O amor não inveja,
não se vangloria, não se ensoberbece.

Não se porta inconvenientemente, não busca os seus
próprios interesses, não se irrita, não suspeita mal.

O amor não se alegra com a injustiça, mas se regozija com a
verdade. Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

O amor nunca falha. Mas havendo profecias, cessarão; havendo
línguas, desaparecerão; havendo ciência, passará.

Agora permanecem estes três: a fé, a esperança, e o amor, mas o
maior destes é o amor.

(1 Coríntios 13:4-8,13)

A Deus,

Aos meus pais Alvaro Zaidan e Lícia M^a Actis Zaidan,

Aos meus irmãos Virgínia e Ricardo,

E à minha amiga Maria Helena Gerbasi,

Por terem me dado forças para seguir em frente.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo privilégio da vida.

Aos meus pais e irmãos, por terem acreditado nos meus potenciais.

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, pela orientação, e pela confiança em mim depositada.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), por ter concedido a bolsa de doutorado, possibilitando o desenvolvimento desta Tese (Processo 98/14735-0).

Aos Profs. Drs. Carlos Ferreira Damião Filho, Janete Aparecida Desidério Sena, Jesus Aparecido Ferro, e João Carlos de Oliveira, pelas importantes sugestões no Exame de Qualificação, as quais contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos professores da FCAV - UNESP, e da USP de Ribeirão Preto, com quem tive aulas, tendo aprimorado meu aprendizado.

A todos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, onde pude crescer pessoal e profissionalmente.

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

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Genética e melhoramento do mamoeiro.....	4
2.2. Cultivo <i>in vitro</i>.....	22
2.3. Aclimação em casa de vegetação das plantas cultivadas <i>in vitro</i>.....	28
2.4. Plantio no campo das plantas aclimatadas em casa de vegetação.....	32
2.5. Determinação sexual.....	33
2.6. Marcadores moleculares.....	39
2.6.1. RAPD.....	41
2.6.2. SCAR.....	48
2.6.3. fAFLP.....	49
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.1. Cultivo no campo.....	54
3.2. Cultivo <i>in vitro</i>.....	58
3.2.1 Análise estatística dos experimentos de enraizamento.....	68
3.3. Aclimação em casa de vegetação das plantas cultivadas <i>in vitro</i>.....	69
3.4. Plantio no campo das plantas aclimatadas em casa de vegetação.....	70
3.5. Marcadores moleculares.....	71
3.5.1. Extração de DNA.....	71
3.5.2. RAPD.....	74
3.5.3. SCAR.....	75
3.5.4. fAFLP.....	78

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
4.1. Cultivo no campo	86
4.2. Cultivo <i>in vitro</i>	94
4.3. Aclimação em casa de vegetação das plantas cultivadas <i>in vitro</i>	117
4.4. Plantio no campo das plantas aclimatadas em casa de vegetação	119
4.5. Marcadores moleculares	123
4.5.1. RAPD	123
4.5.2. SCAR	125
4.5.3. fAFLP	129
5. CONCLUSÕES	136
6. REFERÊNCIAS	137

MICROPROPAGAÇÃO E USO DE MARCADORES MOLECULARES NA DETERMINAÇÃO DO SEXO DO MAMOEIRO

RESUMO - O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma planta normalmente propagada por sementes. Um dos seus principais cultivares é o Sunrise Solo, que em plantios comerciais, apresenta plantas hermafroditas e femininas em proporção 2:1, sendo que o sexo dessas plantas só pode ser identificado de 3 a 4 meses após o plantio, quando surgem os primeiros botões florais. Por outro lado, o cv. Cariflora, que é dióico, apresenta plantas masculinas e femininas, em proporção 1:1, e tem a vantagem de ser tolerante ao vírus do mosaico do mamoeiro. Um dos objetivos deste trabalho, foi desenvolver um protocolo de micropropagação, a partir de plantas matrizes do cv. Sunrise Solo que apresentassem características desejáveis como sexo hermafrodita bem definido. A imersão dos explantes em solução contendo rifampicina (300 mg.L^{-1}), foi imprescindível para a obtenção de ápices caulinares provenientes do campo livres de contaminação por bactérias endógenas. Carvão ativado (1 g.L^{-1}) inibiu totalmente o enraizamento *in vitro* do mamoeiro e proporcionou um maior desenvolvimento da parte aérea, em comparação com os meios sem carvão. O maior número de plântulas com rizogênese foi obtido com o uso de $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB (Ácido 3-Indolbutírico), em meio MS (Murashige e Skoog) modificado, contendo a metade da concentração dos macronutrientes. Os mamoeiros clonados, crescendo em condições de campo, apresentaram características morfológicas e sexo das flores compatíveis com as plantas matrizes que as originaram, e apresentaram menor altura de inserção de flores no caule, quando comparados às plantas matrizes. Foram encontrados marcadores moleculares RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), SCAR (Região amplificada de sequência caracterizada) e fAFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados, com marcação fluorescente) capazes de identificar precocemente o sexo das mudas propagadas por sementes. O marcador RAPD UBC210₄₃₈ mostrou-se eficiente na determinação precoce do sexo das plantas clonadas e da progênie S1 do cv. Sunrise Solo, e também mostrou-se eficiente na diferenciação

dos sexos masculino e feminino das plantas do cv. Cariflora. O primer SCAR foi eficiente em diferenciar precocemente o sexo entre plantas hermafroditas e femininas do cv. Sunrise Solo. O primer fAFLP AAG-CAT (Joe) foi eficiente em diferenciar os sexos das plantas nos cultivares Sunrise Solo e Cariflora, através de uma banda de 155,3 pb presente apenas nas plantas hermafroditas e masculinas, e ausente nas plantas femininas de ambos os cultivares. Este primer fAFLP também conseguiu diferenciar os cultivares Sunrise Solo e Cariflora, independentemente do sexo das plantas, apresentando uma banda de 256,9 pb exclusiva ao cv. Sunrise Solo, e uma banda de 345,39 pb exclusiva ao cv. Cariflora.

Palavras-Chave: *Carica papaya* L., cultura de tecidos, fAFLP, identificação sexual, RAPD, SCAR

MICROPROPAGATION AND MOLECULAR MARKERS FOR SEX DETERMINATION IN PAPAYA

ABSTRACT - Papaya (*Carica papaya* L.) is usually propagated from seeds. One of the principal papaya cultivars is Sunrise Solo, which when planted commercially presents hermaphrodite and feminine plants at a ratio of 2:1, although these plants can only be sexed three or four months after planting, when the first floral buds emerge. The cultivar Cariflora is dioecious, presenting equal numbers of male and female plants, and is tolerant to the papaya ringspot virus (PRV). One of the objectives of the work presented in this thesis was to develop a micropropagation protocol for cv Sunrise Solo plants presenting desirable characteristics such as well-defined hermaphroditism. To produce shoot apices free from endogenous bacterial contamination the explants collected in the field were immersed in a solution containing 300 mg.L⁻¹ rifampicin. Activated carbon added to the culture medium at 1 g.L⁻¹ totally inhibited *in vitro* rooting and allowed greater development of the aerial parts of the plantlets than that which occurred on culture medium without activated carbon. The greatest number of plants with rhizogenesis was obtained in modified MS (Murashige and Skoog) medium containing half-strength of macronutrients supplemented with 0.8 mg.L⁻¹ IBA (Indole-3-butyric acid). When grown in the field, the cloned papaya presented morphological and sexual characteristics typical of the plants from which they had been obtained. Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Sequence Characterized Amplified Region (SCAR), and fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism (fAFLP) markers were found which were capable of the early sexing of seedlings. The UBC210₄₃₈ RAPD marker was efficient at precociously sexing both cloned plants and the S1 progeny of cv. Sunrise Solo, as well as differentiating between male and female plants of cv Cariflora. The SCAR primer was able to distinguishing between hermaphrodite and female plants of cv Sunrise Solo at an early stage in the development of seedlings and cloned plants. The fAFLP primer AAG-CAT (Joe) was efficient at detecting the sex of plants of cv Sunrise Solo and Cariflora, based on a 155.3 bp band which was present only in hermaphrodite and

male plants but absent from female plants of both cultivars. This primer was also efficient at differentiating between cultivars Sunrise Solo and Cariflora independently of the sex of the plants, a 256.9 bp band being exclusively present in cv Sunrise Solo and a 345.39 bp band in cv Cariflora.

Keywords: *Carica papaya* L., tissue culture, fAFLP, sex identification, RAPD, SCAR

1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma planta cujo fruto tem grande importância econômica, alimentícia e social, sendo cultivado principalmente nos países tropicais, e possui ótima aceitação no mercado internacional. De acordo com a FAO (2001) a sua produção mundial no ano de 1999 foi ao redor de 5,3 milhões de toneladas, sendo o Brasil atualmente o maior produtor do mundo, chegando a produzir no mesmo ano cerca de 1,7 milhões de toneladas, o que representa cerca de 31% da produção mundial, vindo a seguir a Nigéria (14%), México (10%), Indonésia (9%) e Índia (8%). No ano de 1998, o Brasil foi o terceiro maior exportador mundial de mamão, ficando atrás apenas do México e Malásia; no mesmo ano, os maiores importadores mundiais de mamão foram os Estados Unidos, Cingapura e Hong Kong. O mercado interno absorve mais de 99% da produção brasileira, e no ano de 1999 os principais países importadores do mamão brasileiro foram os Estados Unidos, Reino Unido, Países Baixos, Alemanha, Portugal, França e Canadá. No ano de 2001, o Brasil exportou cerca de 22.000 ton de mamão, o equivalente a US\$ 18,503 milhões.

Os mamoeiros do grupo Solo em plantios comerciais são ginodióicos, ou seja, apresentam plantas hermafroditas e femininas em proporção 2:1. Nas plantas femininas, a fecundação é efetuada pelo pólen de flores hermafroditas, ocorrendo a formação de frutos normalmente arredondados ou ligeiramente ovalados, com grande cavidade interna em relação à espessura da polpa, com menor valor comercial. Já as plantas hermafroditas, são capazes de se autofecundar, produzindo frutos geralmente alongados, com formato piriforme e cavidade interna menor do que os produzidos por plantas femininas, apresentando maior valor comercial por terem maior espessura de polpa (MARIN e GOMES, 1985).

Nos plantios comerciais, o mamoeiro é normalmente propagado por sementes. Os produtores selecionam plantas hermafroditas com características desejáveis, e geralmente usam as sementes obtidas de frutos onde ocorreu a autofecundação. Essas sementes em geral produzem progênes uniformes, porém, devido à segregação originam plantas hermafroditas e femininas em proporção 2:1. A falta de conhecimento com relação ao sexo das mudas, obriga os produtores a plantarem três mudas por cova, para após 3 a 4 meses do plantio, quando então é possível identificar o sexo das plantas através dos botões florais, ser realizado o desbaste das plantas femininas, deixando-se apenas as hermafroditas, que produzem os frutos de maior valor comercial. Mesmo após o desbaste, ainda restam cerca de 3 a 7% de plantas femininas no plantio, pois algumas vezes as três mudas plantadas por cova pertencem ao sexo feminino. Esse processo aumenta os custos de produção e consequentemente torna o produto final mais caro para o consumidor, e o prejuízo ao produtor será tanto maior quanto maior for a área cultivada e o tempo em que esses mamoeiros permanecerem competindo com os demais em água, luz e nutrientes, demandando tratos culturais (MARIN e GOMES, 1985).

De acordo com os dados publicados no AGRIANUAL (2001), o custo de produção, somente com pagamento de mão de obra para a realização da sexagem do mamoeiro do grupo Solo no Brasil no ano de 2000, foi de cerca de US\$ 17.73 por hectare, demonstrando a importância do conhecimento prévio do sexo das mudas, ainda na fase de viveiro, antes que sejam plantadas no campo. Ocorrem também gastos significativos com a compra das sementes, visto que 1 kg de sementes do mamão grupo Formosa custa cerca de US\$ 3,000 e 1 kg de sementes do mamão grupo Solo custa cerca de US\$ 300.

LEMOS et al. (2002) usando a técnica de RAPD, e trabalhando com "seedlings" de mamoeiros pertencentes a três cultivares comerciais do grupo Solo, ainda na fase de viveiro, identificaram um marcador molecular (UBC210₄₃₈) presente apenas nas mudas hermafroditas e ausente nas femininas, sendo portanto capazes de determinar precocemente e com 100% de acerto, o sexo das mudas antes que as mesmas fossem plantadas no campo. Uma outra opção para

solucionar esse problema, seria o plantio de mudas produzidas através de cultivo *in vitro*, clonadas a partir de plantas matrizes hermafroditas adultas e altamente produtivas.

Este trabalho teve por objetivos a produção de mudas de mamão clonadas a partir de plantas matrizes hermafroditas selecionadas, através da multiplicação *in vitro* do cv. Sunrise Solo, bem como encontrar marcadores RAPD, SCAR e AFLP ligados ao sexo das plantas dos cultivares Sunrise Solo e Cariflora.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Genética e melhoramento do mamoeiro

Na genética da herança do sexo em mamoeiro destacam-se os trabalhos de HOFMEYR (1938, 1941, 1967), STOREY (1938 a b, 1941, 1953, 1967, 1976) , HOROVITZ et al. (1953) e HOROVITZ (1954).

STOREY (1941) agrupou as flores do mamoeiro em 6 tipos bem diferenciados segundo os principais tipos de flores e de frutos derivados em cada caso, da seguinte maneira: (Tipo I) - flor pistilada ou feminina típica, com ovário grande funcional, cinco estigmas sésseis, e ausência total de estames, não é afetada por nenhum tipo de mudança climática, ou seja, é estável; (Tipo II) - flor hermafrodita pentandra, com ovário e 5 estames funcionais, produz um fruto arredondado profundamente 5-lobulado; (Tipo III) - flor hermafrodita intermedia, com ovário funcional e 2 a 10 estames, produz frutos malformados, com carpeloidia, também conhecidos como “cara de gato”; (Tipo IV) - flor hermafrodita alongata, perfeita normal, com ovário e 10 estames funcionais, produz fruto de maior valor comercial, com forma alongada e subcilíndrico (piriforme), em contraste com a forma mais arredonda do tipo I feminino; (Tipo IV+) - flor hermafrodita “estéril de verão”, não desenvolve o ovário nos meses mais quentes do ano, as plantas que produzem estas flores são denominadas “andróicas lábeis”; (Tipo V) - flor estaminada ou masculina típica, com 10 estames funcionais e pistilo rudimentar, sem estigma, consequentemente não pode produzir frutos. Se os mamoeiros machos, podem produzir somente flores estaminadas durante todo o ano, podem ser contudo férteis em determinadas épocas do ano, quando produzem de algumas a muitas flores hermafroditas, geralmente hermafrodita alongata ou tipo IV, que se desenvolvem em frutos, dando assim os chamados

mamões-de-cabo, mamões-de-corda ou mamões-macho. Os tipos de flores de I a V constituem graus de uma dupla escala de masculinidade crescente e de feminilidade decrescente.

STOREY (1941), distinguiu, para fins práticos, quatro tipos distintos de mamoeiros, com base em seus tipos florais, a saber: (Grupo A) - planta pistilada, feminina ou ginóica, é a única forma invariável, e produz flores do tipo I; (Grupo B) - planta hermafrodita ou perfeita bissexual, composto por plantas continuamente férteis, pode produzir flores dos tipos II, III, IV ou V, mas principalmente do tipo IV no verão, tipo II no inverno, tipo III durante os períodos de transição e raras vezes do tipo V, sendo as do tipo IV+ sempre raras ou ausentes; (Grupo C) - planta hermafrodita estéril de verão, produz flores do tipo IV no inverno e flores do tipo IV+ no verão, ocorrendo também flores do tipo III, porém são menos numerosas que na forma B hermafrodita; (Grupo D) - planta estaminada, masculina ou andróica, produz geralmente flores masculinas típicas tipo V, mas ocasionalmente por mudanças de estação pode produzir flores do tipo IV hermafrodita elongata.

De acordo com HOROVITZ et al. (1953), segundo os tipos de flores que *C. papaya* seja capaz de produzir, encontram-se as seguintes formas sexuais: Ginóica - forma sexual A de Storey, constituída de mamoeiros que têm flores exclusivamente femininas; Andróica - forma sexual D de Storey, constituída de mamoeiros que têm flores exclusivamente masculinas; Andromonóica - formas sexuais B e C de Storey e inversões ocasionais à forma D, constituída de mamoeiros que têm em suas inflorescências uma mistura de flores masculinas e hermafroditas.

STOREY (1958) resumizou e simplificou a classificação dos tipos de flores em oito categorias aceitas pelos melhoristas de mamão. Para fins práticos, os oito tipos de flores são classificadas em três grupos primários: macho (M), hermafrodita (H) e fêmea (F). As diversas variações nos tipos de sexo são encontradas em plantas hermafroditas e machos, enquanto as plantas femininas são constantes. Os tipos de flores do mamoeiro encontram-se resumidamente descritos a seguir.

Tipos de flores do mamoeiro, M (masculina), F (feminina), H (Hermafrodita).

Tipos	Planta	Flor	Descrição
Estaminada	M	M	Típica flor unisexual masculina em longos pedúnculos, tem 10 estames distribuídos em duas séries de 5. Tipo V de Storey
Estaminada teratologica	M	M	Encontrada em plantas masculinas com reversão sexual, tendo algum grau de iniciação e desenvolvimento de carpelos vestigiais. Tipo IV+ de Storey, sugerindo que poderia ser uma forma transacional entre o tipo IV (elongada) e tipo V (estaminada).
Elongada reduzida	H	M	Flor elongada normal modificada, difere das flores estaminadas, tendo um tubo de corola espesso e rígido, aborto de pistilos, reduzido tamanho de ovário e reduzido número de carpelos. Ocorrem mais frequentemente durante os períodos quentes, e podem surgir em um período de 1-2 semanas até 6 meses, dependendo do cultivar e da temperatura
Elongada (tipo normal)	H	H	Elongada refere-se à forma do pistilo terminando em estigmas com lóbulos finos; desenvolve fruto cilíndrico ou piriforme, com cinco carpelos laterais fundidos. Pétalas fundidas em dois terços do seu comprimento. Tipo IV de Storey
Elongada carpelóide	H	F	Transformação de series internas de estames em estruturas semelhantes a carpelos. Há vários tipos, com diferentes números de estames, tornando-se carpelóides ou com vários graus de carpeloidia, tendo desde insignificantes até desenvolvidos lóculos com estigma funcional. Frutos com vários graus de deformações. Tipo III de Storey
Pentandria	H	F	Tipo hermafrodita normal, flor unisexual pistilada modificada, através da transformação parcial dos estames em carpelos, com perda dos carpelos originais. Tubo de corola curto, apenas cinco estames de verticílios externos em longos filamentos globosos e pistilo sulcado. Tem de cinco a dez carpelos. Tipo II de Storey
Pentandria carpelóide	H	F	Os estames dos verticílios externos tornam-se carpelóides. Formas carpelóides em vários estágios, especialmente sob condições de frio. Todos os cinco estames são inteiramente carpelóides e fundidos lateralmente, com aborto dos carpelos originais, flores semelhantes às flores pistiladas (pseudo-pistiladas).
Pistilada	F	F	Flores unisexuais femininas maiores que as flores hermafroditas, sem estames. Forma estável, não é afetada pelo ambiente. Tipo I de Storey

A diferenciação dos estames inicia 50-56 dias antes da antese e é completada cerca de 35 dias antes da antese. A diferenciação dos ovários inicia 42-50 dias antes da antese e é completada dentro de 28 dias antes da antese. O início do surgimento do primórdio floral até a antese ocorre em um prazo de 46 dias no Havaí e 80 dias na Índia, com essa grande discrepância sendo devido à temperatura (NAKASONE e PAULL, 1998).

NAKASONE e LAMOUREUX (1982) estudando formas transicionais de flores hermafroditas do mamoeiro, relataram a existência de um tipo de fruto hermafrodita que ainda não havia sido descrito por STOREY, e esse fruto seria alongado e cilíndrico, semelhante a um pepino, mas apresentando uma curvatura resultante de um restrito desenvolvimento de 1 ou 2 carpelos.

A genética da carpeloidia dos estames e da esterilidade feminina é extremamente complexa e STOREY (1953) postulou dois conjuntos independentes de fatores que podem modificar a expressão do sexo em plantas masculinas e hermafroditas sob certas condições ambientais. Um conjunto de fatores induzem mudanças sazonais de fêmeas férteis para estéreis, e que voltam a ser férteis. O outro conjunto causa estames carpelóides, usualmente com fusão do pistilo. Ambos fatores são limitados a plantas masculinas e hermafroditas, sendo as femininas fenotipicamente estáveis, ou seja, não são afetadas por nenhum tipo de mudança climática.

HOROVITZ (1954) expõe sua própria hipótese sobre a herança do sexo do mamoeiro, indicando que as hipóteses anteriores não explicam a existência das formas sexuais masculinas que periodicamente produzem frutos, como a forma C de Storey, e menciona que a esterilidade e a fertilidade feminina nestas duas formas sexuais são duas faces do mesmo fenômeno. Portanto, postula a existência de quatro alelos, (F^H) de tendência hermafrodita, (f') e f que dão tendência feminina e (F) que é o único de tendência masculina. O alelo (f) pertence ao cromossomo m , que na forma homozigota mm , determina planta feminina. O alelo (F) pertence ao cromossomo (M_1) que, na forma heterozigota (M_1m), determina a planta masculina. Um terceiro alelo (F^H), de tendência hermafrodita, ocupa um locus composto, por duplicação dos loci (f) mais (F) e

caracteriza o cromossomo (M_2) que na forma heterozigota (M_2m) determina as plantas hermafroditas.

HOROVITZ (1954) postulou também a existência de substâncias florígenas específicas para machos e fêmeas, que são geralmente controladas por um único gene com dois alelos. O alelo dominante promove estrutura masculina, e o alelo recessivo promove estrutura feminina nas flores. Eles fazem isso através da produção de enzimas que catalizam compostos promotores de masculinidade e feminilidade respectivamente. O grau de sexualidade de uma flor depende da proporção de substâncias responsáveis pela masculinidade e feminilidade presentes no primórdio inicial. Dentro de um determinado genótipo, a temperatura é o fator decisivo na produção de um particular tipo de flor em uma determinada época. LANGE (1961) observou que temperaturas mínimas, ou uma grande diferença entre as temperaturas diurnas e noturnas, produziam mais flores femininas do que o normal no mamoeiro.

Em *Carica papaya* persistem as formas dióicas primitivas, e a hermafrodita (monóica) que em cultivo é conservada por seleção constante feita pelo homem. Em populações espontâneas de *C. papaya*, que voltam ao estado silvestre, a forma hermafrodita é eliminada em poucas gerações pela masculina, dando lugar a populações estritamente dióicas (HOROVITZ et al., 1953). STOREY (1953) cita que uma população dióica (macho e fêmea) pode ser convertida em ginodióica (fêmea e hermafrodita), pela completa eliminação do macho. Isso pode ser acompanhado por uma primeira polinização da flor feminina com pólen de plantas hermafroditas. A seguir faz-se o retrocruzamento, até que o cultivar obtenha as características desejadas.

De acordo com HOROVITZ et al. (1953), quanto ao sexo, o mamoeiro é classificado basicamente em três tipos de populações: dióicas, ginóico-andromonóicas (ginodióicas) e andromonóico-trióicas. As dióicas são originárias do cruzamento de plantas do sexo masculino com plantas do sexo feminino. As sementes coletadas dos frutos desses mamoeiros deverão produzir plantas dos dois sexos em igual proporção, caso o pólen da flor masculina fecunde a feminina. Nesse tipo estão os mamoeiros conhecidos como “comum”, “de derrubada”,

“mamão de quintal” e “mamão de passarinho”. As ginóico-andromonóicas ou ginodióicas são originários do cruzamento entre plantas hermafroditas, que são capazes de se autofecundar porque apresentam os órgãos masculino e feminino na mesma flor, ou seja, não necessitam do pólen de outras plantas ou flores para produzir frutos e sementes. As sementes desses mamoeiros segregam para o sexo, produzindo duas plantas hermafroditas para cada planta feminina. Nesse tipo são encontrados os cultivares do grupo Solo ou Mamão Havaí, Tainung ou Mamão Formosa, Tailândia, etc., normalmente de maior valor comercial e de importância relevante para o mercado interno e externo. As populações andromonóico-trióicas são constituídas por indivíduos ginóicos (femininos), andróicos (masculinos) e andromonóicos (hermafroditas).

HOFMEYR (1967) propôs a hipótese do balanço gênico, para a determinação sexual em *C. papaya*, relatando que os símbolos (M_1) e (M_2), representam regiões inertes ou inativadas, de comprimentos ligeiramente diferentes, nos cromossomos sexuais, que são inertes ou apresentam a ausência de genes importantes. Isso explicaria a letalidade zigótica nos genótipos homozigotos (M_1M_1 , M_2M_2 e M_1M_2). A região homóloga (m) é normal. Os genótipos viáveis são M_1m (macho), M_2m (hermafrodita), mm (fêmea). Baseado na maior frequência de ocorrência de reversão sexual em plantas hermafroditas e machos, do que em fêmeas, propõe que uma maior concentração de genes afetando a feminilidade estão nos cromossomos sexuais, enquanto a maior concentração dos genes afetando a masculinidade estão nos cromossomos autossômicos, concluindo que a interação entre esses fatores determina o sexo da planta. Então, o genótipo mm é feminino e sua homozigosidade confere estabilidade fenotípica. Como M_1 é a maior das regiões inertes, é expressada fenotipicamente como masculina, por causa da maior influência dos fatores autossômicos. A região M_2 é menor e menos influenciada pelos genes autossômicos, logo o genótipo M_2m é expresso fenotipicamente como hermafrodita. A heterozigosidade de M_1m e M_2m torna-os suscetíveis a alterações na expressão fenotípica devido a influências externas, principalmente temperatura.

De acordo com STOREY (1976) com exceção de três espécies de *Carica*, todos os membros de *Caricaceae* são dióicos. As três exceções são *Carica monoica*, *Carica pubescens* e *Carica papaya*. Elas têm formas sexualmente ambivalentes que passam por reversões sexuais em resposta a mudanças climáticas e/ou fotoperiódicas durante o ano. *Carica monoica* é estritamente monóica, mas em certas épocas do ano pode não ter flores pistiladas (femininas). Existem plantas de *C. pubescens* em três formas sexuais básicas: pistiladas (femininas), estaminadas (masculinas) e andromonóicas (hermafroditas). As plantas pistiladas e estaminadas não respondem às mudanças climáticas sazonais. As plantas andromonóicas são sexualmente ambivalentes, produzindo flores estaminadas, andromonóicas perfeitas e pistiladas em várias proporções em diferentes épocas do ano. As plantas de *C. papaya* existem nas mesmas três formas sexuais básicas de *C. pubescens*. A planta pistilada é estável. Plantas estaminadas e andromonóicas podem ser: (1) fenotipicamente estáveis, ou (2) fenotipicamente ambivalentes, passando por reversões sexuais sazonais, durante a qual elas produzem várias proporções de flores estaminadas, andromonóicas perfeitas e pistiladas. Devido a estresses de causas ambientais, a planta masculina pode produzir frutos, popularmente conhecidos como "mamão de corda", que não tem valor comercial.

STOREY (1958) classificou plantas de *C. papaya* em 31 fenótipos herdáveis com base no comprimento e ramificação de pedúnculo, e respostas sexuais sazonais. Quinze dessas são variações dentre as plantas estaminadas, e outras quinze são variações dentre as plantas andromonóicas. O fenótipo restante é a planta pistilada, que é estável.

STOREY (1938b) e HOFMEYR (1938) obtiveram iguais proporções das formas sexuais nos segregantes de cruzamentos efetuados artificialmente e concluíram baseados nessas segregações, que o sexo em *C. papaya* está determinado por um gene simples com três alelos múltiplos. Trabalhando independentemente, estabeleceram hipóteses semelhantes sobre a determinação do sexo em *C. papaya*. Segundo estas, através de estudos genéticos e exame de sementes a partir de frutos masculinos e hermafroditas, os fatores Mendelianos

(m), (M_1) e (M_2) são alelomórficos, tendo sido esses símbolos atribuídos por HOFMEYR (1938). O gameta relacionado ao hermafroditismo é representado por (M_2), o de masculinidade por M_1 e o de feminilidade por (m), podendo ocorrer as seguintes combinações: plantas masculinas, estaminadas ou andróicas (M_1m) correspondentes ao grupo D de Storey, plantas hermafroditas ou andromonóicas (M_2m) correspondentes aos grupos B e C de Storey, e plantas femininas, pistiladas ou ginóicas (mm) correspondentes ao grupo A de STOREY. Segundo STOREY (1939) a condição de homozigose envolvendo ambos os alelos dominantes é letal, ou seja, as combinações (M_1M_1), (M_1M_2) e (M_2M_2) não ocorrem porque são letais no zigoto. As plantas masculinas e hermafroditas são heterozigotas, e seus frutos apresentam 25% de sementes inviáveis. As plantas femininas são homozigotas para o alelo recessivo. Portanto, plantas masculinas somente produzem pólen de constituição m e M_1 , e as plantas hermafroditas produzem duas classes de pólen, m e M_2 e duas classes de óvulos, m e M_2 .

De acordo com STOREY (1938b) e HOFMEYR (1938), quando realiza-se cruzamentos com o mamoeiro, obtém-se as proporções esperadas de plantas masculinas, femininas e hermafroditas que aparecem descritas a seguir. Um cruzamento entre fêmea e macho (mm x M_1m) produz fêmeas e machos com uma proporção de 1:1. O autocruzamento de uma hermafrodita ou cruzando duas hermafroditas (M_2m) produz femininas e hermafroditas com uma proporção 1:2. O cruzamento entre fêmea e hermafrodita (mm x M_2m) produz fêmeas e hermafroditas com uma proporção 1:1. Uma hermafrodita (M_2m) cruzada com um macho (M_1m) produz 1mm:1 M_2m :1 M_1m . Ocasionalmente, quando uma planta masculina produz flores hermafroditas, essas podem vir a ser autopolinizadas, resultando em uma fêmea (mm) e dois machos (M_1m).

Combinações de polinização e proporções resultantes de segregação em progêies de *Carica papaya* (STOREY ,1938b; HOFMEYR, 1938).

Cruzamentos	Proporção da Segregação de Plantas Esperadas			
	<u>Feminina</u>	<u>Masculina</u>	<u>Hermafrodita</u>	<u>Nao Viável</u>
	mm	M ₁ m	M ₂ m	M ₁ M ₂ M ₁ M ₁ M ₂ M ₂
1. Masculina x Feminina M ₁ m x mm	1	1	0	0
2. Hermafrodita x Feminina M ₂ m x mm	1	0	1	0
3. Masculina x Masculina M ₁ m x M ₁ m (autopolinização)	1	2	0	1 M ₁ M ₁
4. Masculina x Masculina M ₁ m x M ₁ m	1	2	0	1 M ₁ M ₁
5. Hermafrodita x Hermafrodita M ₂ m x M ₂ m (autopolinização)	1	0	2	1 M ₂ M ₂
6. Hermafrodita x Hermafrodita M ₂ m x M ₂ m	1	0	2	1 M ₂ M ₂
7. Masculina x Hermafrodita M ₁ m x M ₂ m	1	1	1	1 M ₁ M ₂

HOFMEYR (1941) formulou uma hipótese quantitativa para *Carica papaya*, de certo modo análoga à do balanço gênico de BRIDGES (1932), na qual supõe que o conjunto dos autossomos possui tendência masculina, e todos os cromossomos sexuais, ou seja, a maior concentração dos genes para a feminilidade está nos cromossomos sexuais, e a maior concentração de genes para a masculinidade está nos autossomos. Então, o genótipo (mm) é pistilado e sua homozigidade confere estabilidade fenotípica. Já que a região inerte de (M₁) é maior, se expressa fenotipicamente como estaminada, por causa da maior influência dos fatores autossômicos. A região inerte de (M₂) é menor e está menos influenciada pelos genes autossômicos, desta forma o genótipo (M₂m) é expressado fenotipicamente como andromônica. A heterozigidade de (M₁m) e

(M₂m) causa suscetibilidade a alteração na expressão fenotípica, devido a influências externas.

De acordo com STOREY (1953) esses dados indicam um complexo de genes intimamente ligados em diferentes segmentos, localizados em regiões idênticas nos cromossomos sexuais, que codificam para características secundárias, como comprimento de pedúnculo e número de flores por nó. Os segmentos determinantes do sexo comportam-se hereditariamente como se fossem fatores unitários. Pedúnculos (p) longos são exclusivos dos machos (Mp) e os pedúnculos curtos são comuns a fêmeas (mp) e hermafroditas (mp). O gene letal ao zigoto (l) é comum a machos e hermafroditas, e é o fator que força a heterozigiosidade nessas formas sexuais, não ocorrendo “crossing over” entre o gene (l) e outros genes da região de determinação sexual. O gene (C) é um fator hipotético para supressão de “crossing over” na região de diferenciação sexual. O gene supressor do androceu (sa) suprime completamente o desenvolvimento do androceu quando homozigoto, como na fêmea, ele aparentemente não é completamente recessivo para o seu alelo normal, mas pode exercer alguma influência na supressão do androceu em machos e hermafroditas sob certas condições ambientais, possivelmente através da interação com fatores modificadores do sexo. Outro gene é o supressor do gineceu (sg), que quando homozigoto, exerce completa supressão do desenvolvimento do gineceu, como nos machos fêmea-estéreis; muitos hermafroditas e machos parecem ser heterozigotos para esse gene, e sua expressão sexual tende a ser forçada na direção da masculinidade nos meses mais quentes do ano. Os hipotéticos genótipos sexuais são mostrados a seguir:

Macho	Hermafrodita	Fêmea
$\frac{M1 = Mp \ l \ C \ + \ sg}{m \ + \ + \ + \ sa \ +}$	$\frac{M2 = \ + \ l \ C \ + \ sg}{m \ + \ + \ + \ sa \ +}$	$\frac{m = \ + \ + \ + \ sa \ +}{m \ + \ + \ + \ sa \ +}$

De acordo com a hipótese revisada de STOREY (1976) o símbolo (SA) representa a soma dos fatores envolvidos na transmutação do androceu ancestral no presente gineceu; (sa) representa o desenvolvimento normal do androceu; (SG) representa o fator ou fatores responsáveis pela supressão do gineceu em flor

estaminada; (sg) permite que os fatores (SA) funcionem ontogeneticamente no desenvolvimento do restabelecimento do gineceu. O símbolo (l) representa o fator recessivo ligado ao sexo letal ao zigótico que força a heterozigosidade em plantas estaminadas e andromonóicas; e (C) representa o fator que previne o “crossing-over” entre os fatores de determinação sexual e o fator letal, considerando que não existem plantas pistiladas portadoras do do fator (l). Como em outras hipóteses, a heterozigosidade permite a ambissexualidade. A determinação sexual dos genótipos são expressadas como a seguir:

Estaminada e Andromonóica	Pistilada
$\frac{M_1 \text{ e } M_2 = (sa) \text{ l } C (SG)}{m \text{ m } (SA) + + (sg)}$	$\frac{m = (SA) + + (sg)}{m (SA) + + (sg)}$

De acordo com STOREY (1976) o comprimento e ramificação das inflorescências são caracteres sexuais secundários. Os alelos que transmitem a expressão desses caracteres estão nos cromossomos sexuais, mas a ligação com os fatores de determinação sexual não é absoluta. Com efeito, todas as formas estaminadas e andromonóicas são idênticas, entretanto, a classificação das plantas como uma ou outra forma depende da natureza da inflorescência.

De acordo com HOROVITZ e JIMENEZ (1967), o hermafroditismo em *Carica* se constitui em um desenvolvimento recente, produto de uma evolução secundária, que tem sido observado em apenas três espécies de *Carica*, a saber *C. papaya*, *C. monoica* e *C. pubescens*. Em cada uma das três espécies o aparato hermafrodita está regido por um sistema genético diferente, porém em todos os casos tem se derivado da condição dióica. Em *Carica papaya*, o mecanismo determinante do hermafroditismo se estabeleceu a partir do cromossomo Y, diferenciando-se no novo cromossomo Y₂, sem nenhuma alteração no cromossomo X, sendo as plantas femininas (XX), masculinas (XY₁) e hermafroditas (XY₂). As combinações Y₁Y₁, Y₁Y₂, Y₂Y₂ são letais, o que prova que a região letal do cromossomo Y₁ da forma dióica, foi preservada no novo cromossomo Y₂ da forma hermafrodita. Em *C. monoica* o cromossomo Z originado a partir do X, resulta na forma bissexual homogamética ZZ. Em *C. pubescens* o sistema bissexual monóico resulta da interação complementar de um cromossomo

Y específico (Y^{pm}), com um citoplasma específico [pm], sendo indiferente o cromossomo X que intervenha, mesmo que pertença a uma espécie distinta. A planta bissexual monóica de *C. pubescens* é um indivíduo de genótipo XY, modificado em sua expressão pelo citoplasma [pm = pubescens monóica]. Seu genótipo completo é [pm]. XY^{pm} . Estas plantas monóicas, quando são autofecundadas segregam em sua descendência 2 plantas bissexuais monóicas [pm]. XY^{pm} para 1 planta feminina [pm].XX. Esse genótipo bissexual monóico tem uma expressão variável quanto à proporção de flores masculinas e femininas. Uma mesma planta pode passar por períodos de alta feminilidade e períodos de alta masculinidade.

A genética da carpeloidia dos estames e da esterilidade feminina é extremamente complexa e STOREY (1953) postulou dois conjuntos independentes de fatores que podem modificar a expressão do sexo em plantas masculinas e hermafroditas sob certas condições ambientais. Um conjunto de fatores induzem mudanças sazonais de fêmeas férteis para estéreis, e que voltam a ser férteis. O outro conjunto causa estames carpelóides, usualmente com fusão do pistilo. Ambos fatores são limitados a machos e hermafroditas, mas as fêmeas podem ser influenciadas por esses fatores. Um mapa genético inicial do mamoeiro indica um único locus para o sexo.

Estudos posteriores de ARKLE (1973) forneceram alguma evidência genética para sustentar essa teoria. Um conjunto de fatores modificantes faz com que os estames se tornem semelhantes a carpelos e se fundam com o pistilo, em baixas temperaturas. O outro conjunto de fatores causa abortamento do ovário, produzindo essencialmente flores masculinas à temperaturas elevadas. Parece, entretanto, que os dois conjuntos de fatores modificantes são, por sua vez, compostos de vários genes. O mesmo autor apresenta um modelo tri-híbrido que representa o número mínimo de fatores possíveis de se combinarem com os complexos dados de campo. O modelo apresenta um número par de genes envolvendo 3 loci, 2 para carpeloidia (c/c, c/c) e 1 para esterilidade (s/s). Esses fatores agem independentemente. Seus alelos normais (+) são parcialmente ou completamente dominantes. A combinação (s/+) é normal. Em (c/+), o + é parcialmente dominante sobre (c), havendo assim algum grau de carpeloidia. O

fator (s), em homozigose ou não (s/-), é epistático sobre o alelo c quando os fatores de carpeloidia são heterozigotos. O fenótipo seria normal, mas instável, dependendo das condições ambientais. Se algum dos fatores (c) é homozigoto (c/c), a força combinada dos dois alelos em um locus pode reverter a epistase e a carpeloidia se manifestará. O mesmo autor fornece 27 combinações genotípicas dos loci (c) e (s), junto com suas expressões fenotípicas. De acordo com CHAN (1985), a alta herdabilidade para carpeloidia de estames não se presta para a seleção fenotípica, devido a interação entre genótipo, idade da planta e o ambiente

De acordo com NAKASONE e PAULL (1998) um fato que não tem sido satisfatoriamente explicado é a produção de uma linhagem hermafrodita altamente uniforme com o mínimo de carpeloidia e esterilidade através de contínua seleção e melhoramento. Quando sementes de uma linhagem uniforme são plantadas em outro ambiente com maior ou menor ou uma grande faixa de temperaturas, carpeloidia e/ou esterilidade podem ser fortemente expressadas de novo. Esses fatores modificantes são além disso influenciados por outros genes associados com adaptações a mudanças fisiológicas específicas, induzidas por mudanças na temperatura, o que ainda não está claro. Parece que existem muitos e independentes conjuntos de fatores, com interações entre eles e que são fortemente influenciados pelas condições ambientais.

Estudos de genes mutantes em *C. papaya* não têm obtido muito sucesso, na tentativa de encontrar caracteres vegetativos ligados ao sexo, que pudessem diferenciar o sexo na fase de muda. Cor amarela de flor (Y) é dominante à branca (y), cor roxa de caule e pecíolo (P) é dominante à verde (p) e sementes de cor cinza (B) são dominantes em relação às pretas (b), sendo todos esses caracteres ligados ao sexo (HOFMEYR, 1938). Cor roxa de caule e pecíolo está fracamente ligada ao sexo, com aproximadamente 41% do valor da recombinação, valor muito próximo de 50%, e por isso não oferece nenhuma vantagem na seleção dos tipos sexuais. O valor da recombinação é cerca de 32% entre o sexo e a cor da sarcotesta da semente, e o plantio de sementes de sarcotesta cor cinza, resultaria,

portanto, em um aumento no número de plantas femininas, porém essa cor de semente não tem sido observada no grupo Solo.

Entre os genes não ligados ao sexo estão incluídos polpa amarela dominante sobre polpa vermelha e cor de casca de fruto amarela recessiva à verde normal. Um forte fator ligado ao sexo é a flor de cor púrpura tingida, descoberta em uma raça do cv. Kapoho Solo, pois essa cor é encontrada somente em plantas hermafroditas, enquanto as flores de plantas femininas são brancas, novamente essa característica não apresenta nenhum valor prático no selecionamento prévio de hermafroditas na fase precoce de plântula (NAKASONE, 1980). Os genes mutantes do mamoeiro encontram-se resumidamente descritos a seguir.

Genes mutantes do mamoeiro (HOFMEYR, 1938; NAKASONE, 1980).

Símbolo	Descrição
a	Planta albina recessiva à planta verdes
d	Nanismo recessivo à alta; excessiva ramificação na fase juvenil
dp	Planta pequena recessiva à planta grande; tronco e pecíolos curtos e finos, folhas, flores e frutos pequenos
cp	Folhas deformadas recessivas às folhas normais; sintomas semelhantes ao PRSV (papaya ringspot vírus)
rg	Folha rugosa recessiva à folha lisa; enrugamento da folha; pecíolos curtos, obliquamente verticais
w	Folha ondulada recessiva à folha normal
r	Polpa vermelha recessiva à amarela
Y	Flor de cor amarela dominante à branca
P	Caule e pecíolo roxos dominantes aos verdes; intensidade da cor pode ser afetada por genes modificantes
B	Semente cor cinza dominante em relação à preta

De acordo STOREY (1976) alguns dos problemas da cultura do mamoeiro que necessitam ser solucionados para aumentar a probabilidade de incremento da produção de fruto e latex são desenvolvimento de cultivares resistentes a vírus;

eliminação de formas andromonóicas ambissexuais que tendem a ser fêmea estéreis em certas épocas do ano ou mostram uma tendência para a carpeloidia de estame; desenvolvimento de formas andromonóicas homozigotas pela possível eliminação do fator letal ao zigoto ou pela cultura *in vitro* de embriões; indução de um caractere vegetativo ligado ao sexo para eliminação das formas indesejáveis precocemente na fase de “seedling”; plantas de porte pequeno; seleção para inflorescências de comprimento moderado (cerca de 7,5-10,0 cm) tendo frutos individuais, para evitar amontoamento com resultante deformação dos frutos; seleção para uma cavidade ovariana circular em seção transversa e com uma placenta facilmente separável; melhoramento de cultivares dióicos para locais em que os tipos andromonóicos são excessivamente sexualmente ambivalentes; melhoramento para expandir regiões de produção pela hibridização com espécies que sejam mais tolerantes ao frio (p. ex. *C. pubescens*); e melhoramento para aumentar a produção de latex.

Segundo NAKASONE e PAULL (1998), alguns objetivos do melhoramento no mamoeiro são comuns a todas as regiões, com objetivos específicos em diferentes localidades devido a diferenças climáticas, preferências do consumidor, tipos de sexo desejado e mercados de exportação. Esses objetivos têm mudado pouco nos últimos 80 anos. Características desejáveis para as plantas são: vigor, frutificação precoce e com localização baixa no caule, expressão mínima de carpeloidia e esterilidade feminina, resistência a doenças e pragas, e alta produtividade. Universalmente as características desejáveis de frutos são casca lisa, livre de manchas, fruto firme com polpa espessa, cavidade interna arredondada, ausência de protuberâncias internas e longa vida de prateleira. O tamanho desejado de fruto, forma e cor de polpa variam com as diferentes regiões produtoras do mundo. A preferência por frutos pequenos (450-650 g) cv. Solo é crescente em países tropicais, quando a exportação é considerada. Requerimentos para cultivares destinados ao processamento são as mesmas, no entanto frutos grandes podem ser mais desejáveis, tamanho e padrão uniformes. A altura total das plantas não é um bom critério para avaliar o vigor das mesmas, sendo o diâmetro de caule uma medida mais verdadeira.

O papaya ringspot virus (PRSV) ou vírus do mosaico do mamoeiro é transmitido por afídeos e frequentemente limita a produção comercial na maioria das áreas onde o mamoeiro é plantado. Linhagens tolerantes têm sido selecionadas, e o cv. Cariflora, desenvolvido no sul da Flórida, é dióico, apresenta alta tolerância ao PRSV, e produz frutos de boa qualidade, com formato arredondado, tamanho pequeno, tendo polpa doce de cor amarelada e aroma agradável (CONOVER et al., 1986). Usando esse material, muitas seleções altamente tolerantes do grupo Solo hermafrodita têm sido feitas no Havaí (ZEE, 1985). Uma tolerância mais rápida é obtida com o uso das técnicas de biologia molecular e a transformação de papaya com a capa proteica de uma linhagem fraca do vírus, que confere resistência. Foram obtidas no Havaí duas linhagens do grupo Solo resistentes ao vírus, uma com polpa amarela cv. Rainbow, e outra com polpa vermelha cv. Sunup (NAKASONE e PAULL, 1998).

O mamoeiro hermafrodita é naturalmente autopolinizado, e não tem mostrado depressão devido a essa contínua autopolinização. Também, híbridos F_1 entre cultivares do grupo Solo não têm mostrado vigor híbrido, provavelmente devido à estreita relação genética, havendo muitos genes em comum (HAMILTON, 1954). Essa proximidade no germoplasma foi confirmada para dez cultivares do Havaí e três cultivares não Havaianos, pela análise do DNA, tendo apresentado 80% de similaridade. Heterose foi observada na F_1 de cruzamentos entre o grupo Solo e muitos diferentes acessos de papaya e entre cruzamentos interespecíficos envolvendo *Carica cauliflora* Jacq x *C. monoica* e *C. goudotiana* Trien et Planchon x *C. monoica* (MEKAKO e NAKASONE, 1975).

Nas áreas onde são plantadas cultivares hermafroditas, a carpeloidia e a esterilidade feminina podem ser grandes problemas, afetando a produção. O mamoeiro hermafrodita é muito sensível a modificações mínimas no ambiente e, portanto o cv. Solo havaiano não se estabeleceu satisfatoriamente em todos os locais, embora suas sementes se tenham distribuído através dos trópicos (NAKASONE, 1980).

AWADA (1953) verificou que condições de alta umidade favoreciam a produção de frutos carpelóides. Durante os meses de seca, as plantas adquirem

esterilidade feminina. Altos teores de nitrogênio tendem a mudar o sexo das flores hermafroditas normais para feminino, produzindo assim frutos deformados. Excesso de N e umidade também favorece a carpeloidia, enquanto plantas estressadas, com deficiência de N e estresse hídrico, tendem a ter esterilidade feminina (AWADA e IKEDA, 1957). Baixas temperaturas causam mudança para flores carpelóides (AWADA, 1958). A incidência de carpeloidia também declina com o aumento da idade da planta e pode estar relacionada ao comprimento do internó (CHAN, 1984).

De todos os fatores que afetam as mudanças de sexo, a temperatura é, talvez, o mais importante fator isolado. De acordo com SIQUEIRA e BOTREL (1986), durante o inverno, observa-se que as plantas hermafroditas produzem flores femininas estéreis, sendo que a fertilidade destas flores aumenta quando as temperaturas são elevadas e a umidade é baixa. ALLAN et al. (1987) estudaram os efeitos de seis diferentes condições ambientais sobre plantas clonadas de *C. papaya* fêmeas e machos, e concluíram que temperaturas noturnas ao redor de 12°C, em conjunção com comprimentos de dia intermediários (11h), são responsáveis pela reversão sexual na produção de flores estaminadas para hermafroditas tipo alongatas. Segundo MANICA (1996), quando sementes de mamão após a sua germinação, foram expostas durante 20 dias a 16 horas diárias de luz antes do plantio das mudas no campo, elas mostraram tendência a aumentar o número de plantas do sexo feminino.

De acordo com NAKASONE e PAULL (1998) a temperatura ótima para o crescimento de papaya esta entre 21 e 33 °C, sendo extremamente sensível ao frio e, se a temperatura cair abaixo de 12-14 °C por muitas horas à noite, o crescimento e a produção são severamente afetadas. Cultivares dióicas são mais adaptadas a baixas temperaturas (<20°C), pois plantas femininas não apresentam mudanças de sexo, o que mostra a maior sensibilidade dos cultivares bissexuais (hermafroditas) à carpeloidia. Cultivares hermafroditas (tipo Solo), crescendo com temperaturas mínimas menores que 17°C, podem ter 100% de flores carpelóides. Em temperaturas altas (>35°C), existe uma tendência nos cultivares bissexuais para formar flores masculinas funcionais pouco desenvolvidas e partes femininas

não funcionais. Essa tendência varia com os cultivares e dentro dos cultivares. A taxa fotossintética líquida também declina rapidamente acima de 30°C.

NAKASONE (1980) questionou se as mudanças de temperatura poderiam influenciar genes associados com adaptação para mudanças fisiológicas hormonais específicas no mamoeiro. Esse questionamento pode ser relacionado com a pesquisa feita por HASDISEVE et al. (1989), que trabalhando com plantas femininas, masculinas e hermafroditas de *C. papaya* cv. Fang, através de cromatografia líquida, observaram diferenças na concentração endógena de auxina até os 60 dias após a semeadura, o mesmo não ocorrendo com a concentração endógena de giberelina. Ambas as substâncias aumentaram nas plantas masculinas com o tempo. Nas femininas e hermafroditas, o nível de auxina endógena sofreu incremento até 100 dias após a semeadura, quando houve um decréscimo, em contraste com o conteúdo de giberelina, que sofreu incremento progressivamente com a idade da planta.

GHOSH e SEN (1975) aplicaram reguladores de crescimento em plântulas de *C. papaya* e observaram que houve uma maior proporção de plantas fêmeas em relação a machos quando foram aplicados NAA (ácido naftalenoacético) e CCC (2-cloroetil trimetilamônio), por outro lado MH (hidrazida maléica), GA₃ (ácido giberélico) e propionato de testosterona aumentaram a proporção de plantas masculinas. Estes mesmos autores também aplicaram seis diferentes doses de N (5 a 60 g por planta) em plântulas de mamoeiro com 2,5 meses de idade, e observaram que na dose correspondente a 30 g de N havia significativamente mais plantas femininas (85%) do que nos demais tratamentos como 5 g de N (37,5%), incluindo o controle (50%) onde não havia sido aplicado o N, concluindo que a aplicação de fertilizantes nitrogenados em plântulas jovens de mamão modifica a sua proporção sexual.

2.2. Cultivo *in vitro*

Um dos principais fatores limitantes na micropropagação do mamoeiro cultivado em condições de campo, é a dificuldade de obtenção de explantes livres de contaminações causadas por microrganismos endofíticos. LITZ et al. (1981), trabalhando com a micropropagação do mamoeiro, observaram que a contaminação bacteriana foi um problema severo, impossível de ser totalmente eliminado, e após realizarem o seu isolamento, concluíram que a bactéria contaminante mais comumente encontrada era a *Pseudomonas* sp. REUVENI et al. (1990), trabalhando com a micropropagação de três clones de mamoeiro dióico de polinização aberta, crescidos em casa de vegetação e em condições de campo, concluíram que a imersão dos ápices caulinares em solução contendo o antibiótico rifampicina (300 mg.L^{-1}), durante 24 horas, sob agitação constante a 100 rpm, seguida da imersão em hipoclorito de sódio (0,6%) contendo Tween 20 (0,1%) por 10 min, foi o tratamento mais eficiente na redução da contaminação dos ápices obtidos a partir das plantas crescidas em casa de vegetação, chegando a obter cerca de 90% de sucesso, mas também concluíram que este protocolo não foi eficiente na desinfestação dos ápices obtidos a partir de plantas crescidas em condições de campo.

Por outro lado, VIANNA et al. (1997) trabalhando com o cv. Formosa crescido em condições de campo, e usando o mesmo protocolo proposto por REUVENI et al. (1990), obtiveram um sucesso de 70% na desinfestação dos ápices caulinares, indicando que o uso deste protocolo poderia ser eficiente também para plantas crescidas no campo. Ambos autores concluíram que a rifampicina (50 mg.L^{-1}) adicionada ao meio de cultura também foi eficiente no controle da contaminação bacteriana.

O antibiótico rifampicina, pertence ao grupo das rifamidas, é indicado no controle de bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo considerado eficiente no controle ou eliminação da contaminação endofítica em cultura de tecidos de várias espécies de plantas (POLLOCK et al., 1983; YOUNG et al., 1984; HALDEMAN et al., 1987; PHILLIPS et al., 1981).

Outra etapa limitante na micropropagação do mamoeiro é o enraizamento *in vitro* dos brotos. A fase de enraizamento de brotos no processo de micropropagação foi conceituada por MURASHIGE (1974) como estágio III, sucedendo-se aos estádios I e II, que estão relacionados à introdução e multiplicação, respectivamente, dos explantes *in vitro*.

A qualidade das partes aéreas provenientes da fase de multiplicação determina, em geral, o sucesso do enraizamento. Partes aéreas pequenas não enraizam bem e necessitam de uma fase intermediária de alongamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

O enraizamento é uma etapa que pode ser realizada *in vitro* ou *in vivo*. No primeiro sistema, as raízes são regeneradas em condições assépticas e a planta é transplantada para substrato. No segundo sistema, as partes aéreas são manipuladas como microestacas e todo o processo de enraizamento se dá em substrato. A opção por um dos sistemas depende da qualidade das partes aéreas obtidas na multiplicação, da espécie, do genótipo e da disponibilidade de infraestrutura adequada em casa de vegetação. Outra alternativa é induzir o enraizamento *in vitro* e transplantar as partes aéreas para o substrato antes de as raízes aparecerem. Com o aperfeiçoamento de sistemas de manutenção de umidade em casas de vegetação, evoluiu-se hoje para o enraizamento *in vivo* (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A rizogênese ocorre de uma a três semanas e pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento de raízes. Enquanto as duas primeiras fases (às vezes consideradas como uma só respondem ou dependem de auxina, o crescimento das raízes é inibido pela presença de auxina. A dificuldade num sistema de micropropagação está em determinar uma condição *in vitro* na qual todas essas fases possam ocorrer normalmente e, de preferência, sem demandar manipulação adicional de uma fase para outra (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

CARRER (1988), trabalhando com o cv. Improved Sunrise Solo 72/12, obteve melhor formação *in vitro* de raízes normais quando usou 0,2 mg.L⁻¹ de AIB (Ácido 3-Indolbutírico), em meio MS completo (MURASHIGE e SKOOG, 1962),

solidificado com 8 g.L^{-1} agar, e acrescido de 30 g.L^{-1} de sacarose, não informando qual foi a porcentagem de plantas enraizadas.

SCHMILDT (1994) trabalhando com o mamoeiro do grupo Formosa, também concluiu que a melhor concentração de AIB para o enraizamento *in vitro*, corresponde a $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ por um período de 30 dias, em meio MS completo, solidificado com 5 g.L^{-1} de agar, acrescido de 30 g.L^{-1} de sacarose, tendo obtido 45% de plantas enraizadas *in vitro* e 44,4% de sobrevivência após a aclimação. Por outro lado, obteve 60% de plantas enraizadas *in vitro* e 41,67% de sobrevivência após a aclimação, quando usou dois meios sequenciais, onde primeiro as plantas permaneceram 5 dias em meio MS completo contendo $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB e depois foram transferidas para outro meio MS completo sem AIB. Obteve 50% de plantas enraizadas e 100% de sobrevivência após aclimação em casa de vegetação, quando as plantas permaneceram por 5 dias em meio MS completo contendo $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB e a seguir foram transferidas para tubetes contendo vermiculita diretamente para a casa de vegetação. Observou que quando as plântulas eram seccionadas logo abaixo de um nó, a resposta rizogênica era mais elevada.

Segundo DREW (1987), embora o AIB seja essencial para a iniciação radicular de plântulas de mamoeiro *in vitro*, a exposição prolongada das mesmas ao AIB pode retardar ou mesmo inibir o enraizamento, ocorrendo a formação de calo na base dos explantes. Por isso muitas vezes é recomendado o uso de meios sequenciais ou de alguma substância como a riboflavina, que quando adicionada ao meio de cultura, foto oxida o AIB em presença de luz, não sendo portanto necessário o uso de meios sequenciais para que ocorra o enraizamento no mamoeiro (DREW et al., 1993).

A redução dos macronutrientes, geralmente permite o aumento do enraizamento, provavelmente pela redução do nitrogênio total (GEORGE e SHERRINGTON, 1984). DREW (1987) observou que houve antecipação na formação de raízes pela supressão do nitrogênio amoniacal do meio M de DeFOSSARD et al. (1974).

VIANNA (1996) trabalhando *in vitro* com mamoeiro pertencente ao grupo Formosa, obteve 100% de plantas enraizadas, quando usou dois meios sequenciais sendo o primeiro $\frac{1}{2}$ MS (metade da concentração dos sais e vitaminas do MS) acrescido de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB por 5 dias, e o segundo $\frac{1}{2}$ MS sem AIB por 30 dias, ambos solidificados com 5 g.L^{-1} de agar e acrescidos de 30 g.L^{-1} de sacarose. Observou que, com o incremento dos níveis de AIB (0,25 - 0,5 - 1,0 - 2,0 e $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$), houve aumento na porcentagem de enraizamento, até a concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, notando que em concentrações superiores, os brotos passaram a apresentar grande quantidade de raízes grossas anormais, com geotropismo negativo e formadas a partir de calo. Observou também que nos brotos que permaneceram por 30 dias em meio contendo AIB, ocorreu a formação de calo na base dos explantes, com raízes crescendo a partir desses, portanto, aparentemente sem conexão.

DREW (1988) trabalhando com o enraizamento *in vitro* do mamoeiro, usou o meio DeFOSSARD et al. (1974) acrescido de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, 20 g.L^{-1} de sacarose, solidificado com 8 g.L^{-1} de agar, com fotoperíodo de 12 h, e temperatura ao redor de 27°C , obtendo 95% de plântulas enraizadas em um prazo de 21 dias. Observou que após o início da indução do enraizamento, o desenvolvimento ótimo da parte aérea e raízes das plantas ocorreu no meio de DREW e SMITH (1986), sem reguladores de crescimento, mas acrescido de 1 g.L^{-1} de carvão ativado. Observou que o uso de brotos com crescimento ativo e a remoção de 2 mm da base do caule foi importante para uma ótima iniciação do enraizamento, e também que a exclusão da luz na parte inferior do tubo de ensaio, pela aplicação de tinta preta na superfície externa inferior, melhorou a iniciação do enraizamento dos brotos. DREW (1988) observou que após o início do enraizamento *in vitro* do mamoeiro em meio contendo 2 mg.L^{-1} AIB, sem carvão ativado, ocorreu um ótimo desenvolvimento da parte aérea e raízes em meio sem AIB, acrescido de 1 g.L^{-1} de carvão ativado.

MONDAL et al. (1990), trabalhando com a micropropagação do mamoeiro var. Honey Dew, concluíram que o uso do meio MS acrescido de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, solidificado com 8 g.L^{-1} de agar, e acrescido de 30 g.L^{-1} de sacarose, resultou em

55% de brotos enraizados, e que a concentração de $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB tornou as raízes mais escuras, ocorrendo a formação de calo, suprimindo o crescimento da parte aérea.

REUVENI et al. (1990) trabalhando com mamoeiros dióicos de polinização aberta, obtiveram cerca de 90% de enraizamento usando 1 mg.L^{-1} AIB, com o meio MS modificado, contendo a metade da concentração dos macronutrientes, e a concentração total dos micronutrientes e vitaminas, em um curto período entre 10 e 18 dias. As plantas foram mantidas à 28°C e iluminadas exclusivamente com lâmpadas Grolux, 1000 lux (Sylvania), com fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro. Observaram que o melhor enraizamento foi obtido com brotos alongados (5-10 mm) com 3 a 5 folhas, e também que brotos com folhas velhas quase sempre não enraizavam. Consideraram como enraizamento ótimo, a presença de pelo menos 4 raízes por planta, com comprimento de 1 cm. Notaram que brotos com raízes muito curtas ou com um menor número de raízes não se desenvolviam bem e por fim deterioravam.

WINNAAR (1988) trabalhando com o cv. Sunrise Solo, obteve 35%, 39% e 57% de plantas enraizadas *in vitro* com o uso de 1, 2 e 4 mg.L^{-1} de AIB, respectivamente, usando o meio MT (MURASHIGE e TUCKER, 1969), acrescido de 30 g.L^{-1} de sacarose, e solidificado com 8 g.L^{-1} de agar. Transferiu as plantas enraizadas para o solo, mas nenhuma sobreviveu devido ao murchamento.

De acordo com CALDAS et al. (1998) o carvão ativado é utilizado em meios nutritivos na concentração de 1 g.L^{-1} para estimular o enraizamento, e uma possível explicação para a sua ação é a adsorção de substâncias tóxicas presentes no meio. Segundo GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998) o carvão ativado fisicamente estimula a condição de escuro no qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor, e quimicamente tem efeito diluidor, retendo parte de todos os elementos que compõem o meio, fixando citocininas (6-Benzilaminopurina - BAP) e auxinas (AIB) residuais trazidas nos tecidos das plantas e absorvendo compostos tóxicos inibidores do enraizamento. A fixação das auxinas pelo carvão tem, em geral, uma ação benéfica no alongamento das raízes, que crescem rapidamente, ramificando-se bastante e mantendo uma cor

mais clara do que quando expostas à luz. Com a inclusão de carvão ativado no meio de indução há uma menor disponibilidade de auxina livre, sendo que um aumento na concentração da auxina muitas vezes se faz necessário.

TEO e CHAN (1994) obtiveram 68% de sucesso no enraizamento *in vitro* do mamoeiro, mergulhando a base dos brotos em solução contendo $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de AIB, e a seguir inoculando-os em meio sem regulador de crescimento, e sem sais minerais ou vitaminas, contendo apenas água destilada, solidificado com 10 g.L^{-1} de ágar. Concluíram que não é necessário usar nenhum mineral no meio de enraizamento, e que a quantidade de ágar usada no meio também é muito importante no enraizamento, pois quando usaram 7 g.L^{-1} de ágar ocorreu uma maior formação de calo na base dos explantes, devido à uma maior disponibilidade de água no meio.

De acordo com Assis e Teixeira (1998), uma das propriedades atribuídas ao carvão ativado, como sendo benéfica no processo de enraizamento, diz respeito à redução da intensidade de luz na região de formação de raízes. Concentrações muito altas de carvão ativado podem até mesmo impedir o enraizamento. Em *E. gunnii* X *E. dalrymplena*, $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado aumentou o enraizamento e $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ inibiu o enraizamento (BOULAY, 1985).

No crescimento e desenvolvimento de plantas, a luz influi na regulação da morfogênese e atua como fonte de energia para a realização de fotossíntese (HARTMANN e KESTER, 1983). No enraizamento, embora a fotossíntese realizada por explantes *in vitro* seja relativamente baixa, produtos fotoassimilados são importantes para a iniciação e crescimento radicular. Na rizogênese, as variáveis importantes são a intensidade luminosa, o fotoperíodo e a qualidade de luz (ECONOMOU e READ, 1987).

A intensidade ótima de energia luminosa, requerida durante o enraizamento, varia de acordo com o estágio do explante, bem como com a espécie em questão. De maneira geral, pouca luz é necessária durante os estádios iniciais, já que pode inibir o enraizamento, pelo menos na fase indutiva do processo (VIEITEZ e BALLESTER, 1988). Entretanto, após este período, a luz é importante, principalmente, para o crescimento de partes aéreas e alongamento

de raízes, além de dotar a planta de maior resistência ao transplântio. ANDERSEN (1986) mostrou que a alta luminosidade propicia maior produção, transporte e acúmulo de auxinas e carboidratos. Entretanto, há também maior produção de ABA e substâncias fenólicas inibidoras do enraizamento. Não se sabe ainda por que o enraizamento é aumentado com a redução da intensidade luminosa.

A luz branca resulta da combinação de radiações de diversas cores: violeta, anil, azul, verde, amarelo, laranja e vermelho. Mas nem todas essas radiações têm o mesmo efeito sobre a clorofila, portanto, nem todas agem igualmente estimulando a fotossíntese. A absorção da luz pela clorofila se faz com intensidade máxima nas faixas de comprimento de onda ao redor de 450 nm, que corresponde a cor azul, e ao redor de 700 nm, que corresponde a cor vermelha. A absorção da cor verde é quase nula, a clorofila reflete-a quase que integralmente.

O espectro de absorção de luz feito pelas clorofilas a e b, é muito semelhante ao espectro de emissão de luz da lâmpada fluorescente Grolux, que tem picos de emissão de luz nos espectros azul e vermelho, e difere mais do espectro de emissão de luz da lâmpada fluorescente branca, cujos picos estão mais próximos do azul, verde e amarelo. Por isso, a Grolux simula melhor os comprimentos de onda necessários para a fotossíntese das plantas, cujo espectro é semelhante ao da luz solar, favorecendo o processo da fotossíntese, e o melhor desenvolvimento de plantas iluminadas artificialmente (www.sylvania.com.br).

2.3. Aclimação em casa de vegetação das plantas cultivadas *in vitro*

De acordo com GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998), a etapa de transplântio envolve a transferência da planta da condição *in vitro* para casa de vegetação, onde é submetida a uma fase de aclimação e endurecimento. Esta passagem é crítica e representa, em alguns casos, um fator limitante do processo de micropropagação. Isto se deve basicamente aos seguintes fatores: (1) a planta passa de uma situação de reduzido fluxo transpiratório, devido à baixa intensidade de luz e à elevada umidade relativa, para um ambiente que demanda um incremento na taxa de transpiração, ficando muito susceptível ao estresse hídrico;

(2) a planta passa de uma existência heterotrófica, na qual depende de um suprimento externo de energia (sacarose no meio), para um estado autotrófico, no qual precisa realizar fotossíntese para sobreviver; (3) a planta passa de uma condição de alta disponibilidade de nutrientes no meio para outra onde precisa rapidamente incrementar a absorção de sais; e (4) a planta passa de um ambiente asséptico para outro onde está sujeita ao ataque de microrganismos saprofíticos e, eventualmente, patogênicos.

O tipo de sistema radicular obtido no enraizamento *in vitro* também determina o sucesso de transplântio. Raízes ainda curtas são mais desejáveis, pois facilitam a lavagem e retirada do meio de cultura aderido, bem como a introdução da planta no substrato. Além disso, raízes curtas ou ainda na forma de primórdios radiculares estão numa fase de crescimento ativo, o qual acelera o pegamento da planta e evita o enovelamento. Durante a toaleta das mudas, as raízes longas ou muito ramificadas devem ser podadas. Entretanto, podando as extremidades das raízes, retira-se justamente o meristema, prejudicando o seu crescimento. Com uma parte aérea transpirando numa taxa muito acima da capacidade de absorção do sistema radicular, a planta pode murchar e morrer (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Fato semelhante ocorre ao transplantar plantas com uma parte aérea muito grande, resultado de uma permanência excessiva em meio de cultura aguardando o transplântio. Devido a uma razão alta entre parte aérea/raiz, essas mudas tendem a apresentar problemas de sobrevivência. Para máxima eficiência da operação de transplântio, é imperativo que esta seja perfeitamente sincronizada com a fase de enraizamento, de modo que, aos primeiros sinais de emergência de raízes *in vitro*, as plantas sejam imediatamente transplantadas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

No transplântio, o estresse hídrico das plantas é geralmente o maior problema. Mesmo uma planta aparentemente perfeita *in vitro* apresenta uma série de deficiências anatômicas que dificulta o controle da transpiração, permitindo uma rápida perda de água. Os estômatos não são funcionais e respondem muito lentamente ao estresse hídrico; a camada de cera protetora sobre as folhas é

mínima ou inexistente; a conexão entre o sistema vascular do caule e das raízes adventícias ainda é precário para permitir um fluxo transpiratório adequado (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A manutenção de uma umidade relativa alta desde a retirada das plantas do meio de cultura até se verificar a retomada do crescimento da planta é um fator-chave para sua sobrevivência inicial. A planta passa a realizar fotossíntese em níveis suficientes para estimular o desenvolvimento de novas raízes funcionais, um passo importante, pois as raízes formadas *in vitro* são pouco ramificadas e não conseguem absorver água e sais minerais prontamente do substrato de transplântio. Com a normalização do processo de absorção de sais e água, reinicia o crescimento da parte aérea, preparando a planta para o transplântio final em campo (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Sistemas de nebulização intermitente são utilizados para manter alta umidade relativa. Os melhores controles automáticos são aqueles que respondem diretamente às condições de umidade do ambiente de transplântio, aumentando ou diminuindo os períodos de nebulização e os intervalos entre eles de acordo com a necessidade (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

O substrato de transplântio deve ter uma boa capacidade de retenção de umidade e não compactar excessivamente, comprometendo a drenagem e a aeração do sistema radicular. Quimicamente ele deve ser de preferência inerte, para permitir a manipulação dos conteúdos de nutrientes de acordo com a necessidade da espécie. Os substratos comumente utilizados incluem vermiculita, perlita, areia, turfa, casca curtida de eucalipto ou *Pinus*, palha de arroz carbonizada e pó de carvão. Dependendo do período necessário para completar o crescimento, adubações são feitas com soluções nutritivas em cobertura, via irrigação ou por aplicações foliares (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

DREW (1988) trabalhando com mamoeiros dióicos de polinização aberta, obteve 99% de sucesso no estabelecimento de brotos enraizados usando o substrato de turfa/perlita/poliestireno em flocos (1:1:1), com 40% de luz natural, e cerca de 90% de umidade relativa.

REUVENI et al. (1990), transferiram plântulas de mamão, que haviam sido enraizadas *in vitro*, para substrato contendo turfa e poliestireno em flocos (1:1), permanecendo por 2-3 semanas em câmara úmida, tendo obtido cerca de 85% de sobrevivência de centenas de plantas durante a aclimação. As plantas foram transferidas para casa de vegetação, e a seguir plantadas no campo.

Na busca da otimização do processo de micropropagação, a eliminação da etapa de enraizamento *in vitro* é desejável do ponto de vista econômico, além de melhorar a qualidade do sistema radicular formado na planta. Enraizamento *ex vitro* é sinônimo de microestaquia. Os tufos de plantas em meio de multiplicação são retirados do frasco e, após lavar o meio aderido, as várias partes aéreas são manipuladas como diminutas estacas. Do ponto de vista econômico, isso representa uma considerável redução de custos de mão-de-obra e infra-estrutura, pois uma repicagem é eliminada e há economia de espaço na sala de crescimento, energia elétrica e meio de cultura. Em termos de qualidade, a regeneração de raízes diretamente no substrato tende a produzir um sistema radicular mais completo e funcional, com maior número de raízes secundárias, sem a formação intermediária de calo, que dificulta a conexão do sistema vascular entre caule e raiz. Além disso, evita-se a manipulação de plantas de raiz nua, ou a poda de raízes, práticas que muitas vezes resultam em má qualidade de transplante e até na morte das plantas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A obtenção de enraizamento *ex vitro* é fácil com espécies herbáceas ou mesmo lenhosas que apresentam grande capacidade de enraizamento na estaquia. Uma vez que a planta passa de um estado de alta disponibilidade nutricional para uma condição autotrófica, ela deve ser capaz de emitir raízes rapidamente, para absorver os nutrientes necessários. A nebulização intermitente agrava a situação, lixiviando nutrientes da planta. Em espécies que demoram para emitir raízes, as partes aéreas apresentam uma clorose intensa e morrem, não suportando esse processo. Para acelerar a emissão de raízes, as bases das microestacas podem ser tratadas com soluções de auxinas em talco ou água ou, ainda, pré-tratadas em soluções de sacarose (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

SCHMILDT et al. (1997), trabalhando com o mamoeiro cv. Formosa, obtiveram cerca de 50% de mudas enraizadas, com o cultivo de ramos *ex vitro* diretamente em casa de vegetação, após indução de enraizamento *in vitro* por 5 dias em meio MS acrescido de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, tendo obtido 100% de sobrevivência após a aclimação. Produziram cerca de 45% de mudas enraizadas, com o cultivo de ramos *in vitro* usando o meio MS de indução de enraizamento acrescido de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, com 44% de sobrevivência após a aclimação. Conseguiram 60% de mudas enraizadas quando os ramos permaneceram 5 dias no meio MS acrescido de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, e a seguir foram transferidos para o meio MS sem AIB, obtendo cerca de 41% de sobrevivência após a aclimação. SCHMILDT (1994), teve o cuidado de abrir as tampas dos tubos de ensaio, contendo os ramos de mamão enraizados *in vitro*, três dias antes do transplante para a casa de vegetação, e usaram como substrato a vermiculita.

2.4. Plantio no campo das plantas aclimatadas em casa de vegetação

Com relação ao desenvolvimento no campo de mamoeiros micropropagados, na página da internet do Depto. de Horticultura da Universidade do Havaí em Manoa (<http://www2.ctahr.hawaii.edu/tpss/bookshelf/papaya/papaya.htm>), existe uma observação de que foram notadas algumas mudanças no sexo dos mamoeiros micropropagados pela Hawaii Sugar Planter's Association.

DREW (1988) trabalhando com mamoeiros dióicos de polinização aberta, observou que quando micropropagados e plantados em condições de campo, mostravam excessiva vegetação, menores espaços internós, reduzido estágio juvenil, e produção de frutos próximo ao solo. As plantas jovens apresentavam crescimento vigoroso, e conjunto de flores e frutos 30 a 40 cm acima do nível do solo. Por outro lado, mamoeiros dióicos de polinização aberta, plantados no campo a partir de sementes, tinham 1,5 a 2,0 m de fase juvenil antes de iniciar o florescimento.

REUVENI et al. (1990), levaram a campo centenas de mudas de mamão enraizados *in vitro* e aclimatados em casa de vegetação, tendo observado que as

plantas floresceram em altura menor do que as produzidas por semente, e não detectaram a presença de variação somaclonal.

2.5. Determinação sexual

HEILBORN (1921) foi o primeiro a relatar o número de cromossomos gaméticos do gênero *Carica* como sendo $n=9$ e na forma somática $2n=18$. Esse número tem sido subsequentemente confirmado por diversos pesquisadores, mostrando que a meiose é usualmente normal em todas as espécies nos três tipos de sexo (STOREY, 1941; ZERPA, 1959; SUBRAMANYAM e IYER, 1982; MAGDALITA et al., 1997).

SUBRAMANYAM e IYER (1982) observaram o comportamento citológico de quatro espécies *Carica*, dois híbridos interespecíficos (*C. monoica* x *C. cauliflora*, e *C. cauliflora* x *C. papaya*), e de alguns importantes cultivares de *C. papaya*, e concluíram que todas as espécies *Carica*, com exceção de *C. quercifolia* apresentavam meiose normal. Estudos citológicos em *C. monoica* x *C. cauliflora* mostraram várias anormalidades como a presença de univalentes, trivalentes e quadrivalentes em diacinese e atrasos durante a anáfase. Entretanto, a meiose em *C. cauliflora* x *C. papaya* foi normal, indicando que embora sejam morfológicamente divergentes, a diferenciação citológica entre essas duas espécies é apenas em nível estrutural, possivelmente gênico, e que elas têm estreita relação, apesar da natureza unidirecional dos cruzamentos. Todos os cultivares de *C. papaya*, exceto o cv. Pink Flesh Sweet, apresentaram meiose normal. Neste cultivar a meiose indicou a existência de rearranjos estruturais como translocações recíprocas de pares homólogos.

Estudos citológicos no mamoeiro não têm tido sucesso em mostrar a presença de um par heteromórfico de cromossomos sexuais, o que foi observado em algumas outras espécies vegetais, que têm distintas formas sexuais. Entretanto, KUMAR et al. (1945) relataram que um par de cromossomos separa-se precocemente na Anáfase I da meiose em machos e hermafroditas de mamoeiro, não tendo sido observado em fêmeas. Eles notaram também que não

foi possível detectar diferenças morfológicas entre os cromossomos, concluindo que a variação na expressão sexual do mamoeiro não pode ser associada com alguma diferença morfológica visível entre autosomos e o par que se separa precocemente, que poderiam ser os cromossomos sexuais. Subsequentemente, STOREY (1953) examinou várias células mães de pólen de plantas masculinas e hermafroditas, observando que a separação anafásica precoce ocorria com alta frequência, embora ela não tenha sido observada em todas as células em Anáfase. A separação anafásica precoce pode realmente ser uma característica que sirva para distinguir os cromossomos sexuais separadamente dos autosomos.

MAGDALITA et al. (1997) trabalharam com 120 híbridos interespecíficos de *C. papaya* e *C. cauliflora*, concluindo que apresentavam um número de cromossomos somáticos $2n=16-18$, e as análises citológicas revelaram que 7-48% das células em muitos dos híbridos interespecíficos eram aneuplóides, sugerindo que havia ocorrido eliminação de cromossomo. Observaram também que a frequência de células aneuplóides estava negativamente associada ($r=0,88$) com o número de bandas RAPD obtidas a partir do parental masculino *C. cauliflora*, amplificadas nos híbridos interespecíficos, o que sugere que a eliminação de cromossomo explica algumas das perdas de bandas RAPD. Além disso, a baixa fertilidade do pólen de 5 híbridos interespecíficos que floresceram e o não florescimento de muitos híbridos, indica que isso pode ser devido a um desbalanceamento cromossômico causado por barreiras de incompatibilidade entre as duas espécies estudadas.

De acordo com PARKER et al. (1990), os organismos diplóides têm duas cópias de cada região genética (locus), em pares de cromossomos homólogos. Essas duas cópias são chamadas alelos, apesar de representarem tanto as regiões codificadoras como as não codificadoras do genoma. As regiões codificadoras (exons) são frequentemente intercaladas com as mais variáveis regiões não codificadoras (introns ou regiões intergênicas).

A descoberta de cromossomos sexuais em plantas superiores data de 1923 quando vários pesquisadores independentemente relataram a ocorrência de bivalentes heteromórficos em *Melandrium album*, *Rumex acetosa* e *Humulus* spp.

(BLACKBURN, 1923; WESTERGAARD, 1958). A existência de cromossomos sexuais heteromórficos é questionável ou insuficientemente estabelecido em algumas espécies (*Urtica dioica*, *Salix* spp., *Ilex serrata*), já em outras espécies tem sido bem estabelecido, a partir de evidências citológicas e genéticas como *Cannabis sativa* (fêmea XX e macho XY), *Humulus lupulus* (fêmea XX e macho XY), *Asparagus officinalis* (fêmea XX e machos XY ou YY), *Rumex acetosa* (fêmea XX e macho XY_1Y_2) , enquanto em algumas outras espécies os cromossomos sexuais heteromórficos não foram encontrados (*Carica papaya*, *Vitis vinifera*, *Sedum rosea*). A forma heterogamética é a masculina em todos os casos bem estabelecidos (WESTERGAARD, 1958; WILLIAMS, 1964).

A ocorrência de cromossomos sexuais heteromórficos não necessariamente indica que todos os genes que decidem o sexo estão localizados neles. A análise de mecanismos de determinação sexual tem mostrado claramente a existência de no mínimo dois mecanismos de disparo. No primeiro tipo, como ocorre em *Rumex acetosella* e *Melandrium album*, o sexo dos indivíduos é decidido inteiramente pela presença ou ausência do cromossomo Y. No outro tipo, exemplificado por *Rumex acetosa*, o fator determinante do sexo é a proporção entre cromossomos X e autosomos, sendo o cromossomo Y inativo. A existência de um mecanismo XO em plantas não é conhecido com certeza (WESTERGAARD, 1958).

DARLINGTON (1958) relatou que um controle eficiente do dioicismo depende da ausência de de “crossing over” entre os blocos de genes de determinação sexual, e isso ocorre em algumas plantas, para o desenvolvimento dos cromossomos sexuais heteromórficos com os genes de determinação sexual restritos aos segmentos diferenciais. O segmento diferencial do cromossomo Y é totalmente excluído pelo “crossing over” e porque a perda resulta em eficiência adaptativa o trabalho do cromossomo Y é frequentemente feito pelos autosomos.

Segundo LIONAKIS (1985), uma espécie é chamada bissexual se as flores masculinas e femininas ocorrem na mesma planta. As plantas bissexuais podem ser hermafroditas quando os dois sexos são encontrados na mesma flor, ou monóicas quando os sexos estão restritos a flores separadas na mesma planta.

Por outro lado, as espécies são dióicas ou unisexuais quando as flores masculinas (estaminadas) e femininas (carpeladas ou pistiladas) ocorrem separadamente em plantas individuais. O passo do dioicismo para a bissexualidade é frequentemente curto e em muitos casos o dioicismo não está esclarecido. Em muitas espécies dióicas são encontradas na natureza tipos bissexuais, muitas vezes com alta frequência. Uma espécie dióica em que algumas plantas bissexuais (hermafroditas ou monóicas) ocorrem regularmente na natureza, é denominada subdióica. A separação dos sexos em plantas diferentes é encontrada em muitas plantas cultivadas importantes, incluindo *Carica papaya*, *Cannabis sativa*, *Vitis vinifera*, *Asparagus officinalis*, *Humulus lupulus* e *Actinidia chinensis*.

Segundo LIONAKIS (1985), a fisiologia da determinação sexual ainda não está claramente entendida, entretanto, é geralmente aceito que todas as plantas têm potencial para desenvolver órgãos sexuais de ambos os sexos, existindo um conjunto de mecanismos determinadores para uma ou outra das duas possíveis cadeias de eventos, uma levando ao desenvolvimento de órgãos sexuais femininos e a outra de masculinos.

É provável que não exista um caso bem estabelecido onde a determinação sexual em espécies de plantas estritamente dióicas seja uma função da interação entre genes nucleares e o citoplasma. Entretanto, nas espécies ginodióicas, que apresentam plantas femininas e hermafroditas, um mecanismo de macho esterilidade tem sido observado em muitas espécies, o qual depende da interação citoplasmática/gênica (LEWIS, 1941).

Segundo PARKER (1990) a maioria das plantas que florescem são hermafroditas, entretanto, o número das dióicas não é insignificante, com aproximadamente 1500 espécies em 1300 gêneros e 60 famílias mostrando separação dos sexos. De acordo com IRISH e NELSON (1989) a determinação sexual em espécies de plantas dióicas pode ser genética ou ambiental. A determinação sexual genética pode estar controlada por um único locus em um autossomo, múltiplos loci em autossomos, ou genes em cromossomos heteromórficos.

Recentes estudos sugerem que todas as espécies de plantas possuem os genes necessários para desenvolver flores perfeitas (genes homeóticos - “MADS box genes”; COEN e MEYEROWITZ, 1991) e aqueles genes de determinação sexual, agindo juntamente ou independentemente dos genes homeóticos, interrompem o desenvolvimento do estame ou carpelo em várias fases, levando à diversidade de tipos florais e de sexos observados dentre as plantas que florescem (DELLAPORTA e CALDERON-URREA, 1993; HARDENACK et al., 1994).

A base genética da determinação sexual em plantas dióicas pode ser extremamente diversa. Algumas espécies dióicas têm cromossomos sexuais heteromórficos (p. ex., *Silene latifolia* Poiret), enquanto em outras espécies o sexo é determinado por um ou vários loci nucleares autossômicos, possivelmente influenciados por genes citoplasmáticos (DURAND e DURAND, 1991). Similarmente, a regulação hormonal não parece seguir um padrão bem estabelecido. Em *Mercurialis*, as citocininas causam a conversão de macho para fêmea (LOUIS, 1989), enquanto em *Asparagus officinalis*, um efeito oposto tem sido observado (BRACALE et al., 1991). Além disso, YIN e QUINN (1995) recentemente propuseram um modelo hormonal para determinação sexual que inclui o controle genético de receptores hormonais, bem como das concentrações dos hormônios endógenos.

O controle genético do sexo em populações ginodióicas, compostas por plantas fêmeas e hermafroditas, tem também sido estudado em detalhe, e é bastante diferente daquele das populações dióicas, compostas por plantas machos e fêmeas. Três mecanismos têm sido identificados: macho esterilidade citoplasmática (CMS - “Cytoplasmic Male Sterility”), interações citonucleares, e simples herança nuclear. O controle citonuclear é provavelmente a forma mais comum de determinação sexual em populações de plantas ginodióicas (FRANK, 1989). Às vezes existem vários e diferentes genes citoplasma macho estéreis, juntamente com vários genes macho restauradores nucleares (VAN DAMME e VAN DELTEN, 1982; VAN DAMME, 1983).

Os mecanismos de determinação sexual em plantas que florescem são extremamente diversos, variando desde de uma simples determinação cromossomal até determinação citoplasmática e polifatorial. Em populações de plantas dióicas, por exemplo, a determinação sexual pode ser devido a presença de cromossomos sexuais heterocromáticos ou não heterocromáticos (WESTERGAARD, 1958), devido a proporção de cromossomos sexuais (PARKER e CLARK, 1991), ou devido a muitos loci autossômicos distintos (LOUIS, 1989). Entretanto, a presença de um único locus ou cromossomo de determinação sexual, parece ser a forma predominante de determinação sexual em plantas dióicas (WESTERGAARD, 1958; RICHARDS, 1986).

O conhecimento dos mecanismos de determinação sexual pode ser extremamente útil em programas de melhoramento genético. Em espécies dióicas é frequentemente benéfica a seleção de um determinado sexo, por exemplo, em *Asparagus*, os clones masculinos são preferidos em relação aos clones femininos, e em *Carica papaya* as plantas hermafroditas são preferidas em relação às femininas e masculinas, em plantios comerciais. Então a melhor caracterização da determinação sexual através da identificação de marcas ligadas ou o isolamento de sequências de DNA expressados, traria um grande avanço nos programas de melhoramento de plantas (ALSTROM-RAPAPORT, 1998).

De acordo com HESLOP-HARRISON (1972), Tournois em 1912 relatou que o fotoperiodismo estava ligado à expressão sexual em duas plantas dióicas, *Cannabis sativa* e *Humulus japonicus*, observando que os dias curtos não apenas aceleravam o florescimento de *Humulus japonicus* mas também afetavam o sexo das plantas, e apareceram expressões sexuais anômalas em plantas geneticamente masculinas, muitas mostrando inversão sexual ou intersexualidade estrutural. Este experimento com lúpulo é de interesse histórico por ser o primeiro experimento fotoperiódico. Em plantas masculinas de *Cannabis sativa* crescidas sob dias curtos, Tournois observou uma incidência de intersexualidade excedendo 85%.

A conversão de plantas geneticamente masculinas de *Vitis vinifera* dióicas para hermafroditas funcionais pela aplicação de citocininas foi relatada por NEGI e

OLMO (1966, 1971) e MOORE (1970). HESLOP-HARRISON (1956) tratou sisal com ANA (ácido naftalenoacético) e induziu flores femininas em plantas geneticamente masculinas, sugerindo que as auxinas controlam o sexo de acordo com uma curva ótima, sendo esse ótimo menor para o desenvolvimento de plantas masculinas do que para as femininas. BAKER (1947) observou que a infecção de espécies de *Malandrium* geneticamente femininas, pelo fungo *Ustilago violacea*, causa completa inversão sexual nas partes mais infectadas, com supressão do desenvolvimento do ovário e desenvolvimento de estames. GOLDSCHMIDT (1955) sugeriu que essa infecção estaria modificando o metabolismo auxínico no primórdio floral em diferenciação. OSTAPEMKO (1960) observou que os conteúdos de polifenoloxidase e peroxidase nas folhas de *Cannabis sativa*, *Asparagus officinalis*, *Actinidia kolomkta*, *Hippophae thannoides* e *Ribes alpinum* diferiam muito, mas eram sempre maiores em plantas masculinas do que nas femininas.

SANTOS (2001) trabalhando com *Carica papaya* L. cv. Sunrise Solo, obteve diferentes perfis protéicos em gel bidimensional entre amostras de plantas hermafroditas e femininas.

2.6. Marcadores moleculares

De acordo com FERREIRA e GRATTAPAGLIA (1995), marcadores moleculares de DNA também têm sido usados com o objetivo de avaliar relações genéticas entre cultivares, espécies e seus híbridos intra e interespecíficos, além da construção de mapas genéticos. Outro importante objetivo é a identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência a doenças e pragas, e também genes ligados a determinação sexual e produtividade, facilitando assim a introgressão desses genes em espécies e cultivares de interesse comercial, através de programas de melhoramento vegetal. Essas marcas moleculares podem estar associadas a loci de características qualitativas ou quantitativas (QTLs - “Qualitative or Quantitative Trait Loci”).

De acordo com KARP et al. (1996), dentre os marcadores moleculares de DNA mais usados atualmente pode-se destacar, polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP - "Restriction Fragment Length Polymorphisms"), DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD - "Random Amplified Polymorphic DNA"), polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP - "Amplified Fragment Length Polymorphism"), minisatélites também conhecidos como número variável de sequências repetidas umas após as outras (VNTR - "Variable Number of Tandem Repeats"), microsátélites também conhecidos como sequências simples repetidas (SSR - "Simple Sequence Repeats") ou sequências curtas repetidas umas após as outras (STR - "Short Tandem Repeats"), região amplificada de sequência caracterizada (SCAR - "Sequence Characterized Amplified Region"), e "differential display" de mRNA reversamente transcrito PCR (DDRT-PCR - "Differential Display Reverse Transcription mRNA PCR").

Várias dessas técnicas moleculares são acompanhadas de uma outra técnica conhecida como reação em cadeia da polimerase (PCR - "Polymerase Chain Reaction"). A técnica do PCR baseia-se na amplificação de um segmento específico de DNA, na qual uma sequência de oligonucleotídeos iniciadores ("primers") se hibridizam à sequência de DNA a ser amplificada. Repetidas desnaturações térmicas da fita de DNA permitem o pareamento dos primers à sequência complementar do DNA molde e consequente extensão desses pela DNA polimerase. Os produtos da amplificação podem também se hibridizar com os primers a cada ciclo de desnaturação e pareamento, duplicando exponencialmente o fragmento alvo (SAIKI et al, 1985). Os primers são oligonucleotídeos de até 20 ou 25 pb que servem de iniciação para a síntese de DNA pela enzima Taq polimerase. O PCR permite a amplificação do DNA em forma de fita dupla ou simples, e com a transcrição reversa do RNA em cDNA, o RNA pode ser também utilizado (ERLICH et al., 1991).

2.6.1. RAPD

WILLIAMS et al. (1990), desenvolveram uma técnica baseada no PCR, denominada RAPD, onde uma sequência aleatória de um único oligonucleotídeo composto geralmente por 10 nucleotídeos é usada como primer, não sendo necessário o conhecimento prévio da sequência de DNA a ser analisada. O polimorfismo é identificado pela ausência ou presença de bandas específicas de DNA que são separadas por eletroforese em gel de agarose e visualizadas sob luz ultravioleta. Segundo WAUGH e POWELL (1992), o polimorfismo pode ser ocasionado por diferenças ocorridas entre ou no sítio de ligação do primer em razão de mutações de ponto, deleções e inserções, ou à inexistência de tal sítio

O RAPD, portanto, é uma variação do PCR, que gera DNA ‘fingerprints’ com um único oligonucleotídeo sintético (“primer”), e como o oligonucleotídeo apresenta sequência nucleotídica arbitrária, o RAPD não requer, para o desenho dos oligonucleotídeos, nenhuma informação sobre a sequência do DNA a ser amplificada. Sendo uma variação do PCR, o RAPD apresenta as vantagens em relação ao RFLP, ou seja, é menos dispendioso, mais rápido, requer uma menor quantidade de DNA (0,5-50 ng), não envolve o uso de radioisótopos, e requer menos experiência na execução (DEMEKE e ADAMS, 1994).

O marcador RAPD é geralmente dominante, não distinguindo entre locus homozigoto e heterozigoto. A polimerase amplifica a partir do pareamento do primer nos alelos do locus. O polimorfismo pode ser causado por diferenças na sequência dos nucleotídeos nos sítios de pareamento ou por rearranjos dentro da sequência amplificada, originando a presença ou a ausência de banda (TAYLOR, 1993).

SONDUR et al. (1996) construíram um mapa genético de ligação primário do mamoeiro, com ajuda do software MAPMAKER (versão 3.0), usando 61 marcas RAPD (60 dominantes e 1 codominante), e 1 locus morfológico codominante (SEX1). Trabalharam com uma população F_2 , derivada do cruzamento de uma linhagem melhorada na Universidade do Havaí (UH 356) com o cv. Sunrise, ou seja (UH356 x ‘Sunrise’). Um total de 596 primers decâmeros

foram usados para a amplificação por PCR, e desses, 60 primers detectaram um total de 96 marcas RAPD polimórficas na população F2, entre os parentais UH356 e 'Sunrise'. Sessenta e duas dessas marcas RAPD foram mapeadas e agrupadas no LOD 4.0, com 11 grupos de ligação, e uma distância total mapeada de 999,3 cM, sendo que existe a expectativa de que o genoma total de *C. papaya* tenha ao redor de 1350 cM. Cerca de 80% das marcas ajustaram-se às taxas de segregação Mendeliana esperadas. Apenas uma das 96 marcas polimórficas (OPM6) foi herdada em codominância. Das marcas polimórficas, 60% geraram um único polimorfismo por primer, 37% geraram 2 polimorfismos, e 3% geraram 3 polimorfismos. Três marcas polimórficas não segregaram na população F2, isto é estavam presentes em todas as plantas F2. Duas dessas marcas (OPA4 e UHE5) foram dominantes no parental materno (UH356), e uma (OPL8) foi dominante no parental paterno 'Sunrise'. A falta de segregação para os dois polimorfismos tendo marcas dominantes em UH356, pode ser atribuída a uma ligação muito estreita ao alelo (sex1-f) ou à herança maternal de plastídios. A herança do sexo e 48 marcas RAPD mostraram a segregação Mendeliana esperada na população F2.

De acordo com SONDUR et al. (1996), o locus que determina o sexo da flor em *C. papaya* (locus SEX1), está incluso no grupo de ligação 1, composto por 9 loci. As marcas (OPT12) do locus T12 e (OPT1C) do locus T1C, que flanqueiam o locus (SEX1), são herdadas de forma dominante, e parecem segregar em uma proporção normal (3:1), enquanto o locus sexual (SEX1) segrega em uma proporção (2:1), com duas plantas hermafroditas para uma fêmea, devido à letalidade da classe dominante homozigota (SEX1-H/SEX1-H). As marcas (OPT12) e (OPT1C) estão localizadas em lados opostos do locus (SEX1), com uma distância de 7 cM para cada marca, ou seja, o locus (SEX1) está em uma região de 14 cM, flanqueada pelas marcas (OPT12) e (OPT1C). Os resultados demonstraram a utilidade do marcador RAPD para o desenvolvimento de um mapa genético de ligação básico em *C. papaya*. Até o presente momento, não foi possível designar nenhum grupo de ligação a um cromossomo, porque os cromossomos não foram caracterizados morfológicamente.

SONDUR et al. (1996) com base nos atuais conhecimentos da regulação do desenvolvimento floral, e de seu controle através de proteínas reguladoras (GASSER, 1991), concluíram que é razoável a hipótese de que o alelo (SEX1-M) codifica um fator regulador, que induz a formação da parte floral masculina, enquanto inibe o desenvolvimento do carpelo feminino. O alelo dominante (SEX1-H) é intermediário, tendo habilidade para induzir as estruturas florais masculinas, mas apenas de reduzir o tamanho do carpelo feminino, e por isso os carpelos permanecem funcionais em plantas hermafroditas (SEX1-H/sex1-f). O alelo (sex1-f) é incapaz de induzir estruturas florais masculinas e pode ser um alelo nulo. A letalidade do zigoto, ausente em no mínimo uma cópia do alelo (sex1-f), pode resultar de uma função adicional requerida pelo locus (SEX1), estando presente no alelo (sex1-f), mas ausente nos alelos SEX1-M e SEX1-H. Alternativamente, uma aberração cromossômica, talvez uma deleção, que inativa uma requerida função de gene, pode estar estreitamente ligada aos alelos SEX1-M e SEX1-H.

SONDUR et al. (1996) fizeram um breve histórico da determinação sexual em *C. papaya*, como relatado a seguir. O sexo em *C. papaya* é determinado por um único gene com alelos múltiplos (STOREY, 1938, HOFMEYR, 1938). Os alelos para o macho (SEX1-M) e hermafrodita (SEX1-H) são dominantes sobre o alelo da fêmea (sex1-f). Foi também hipotetizado que este locus simples de herança, de fato, representa um complexo de genes muito estreitamente ligados afetando características sexuais secundárias (número de flores, comprimento do pedúnculo), supressão de “crossing-over” (gene C) e letalidade (gene L) (STOREY, 1953). O fator de letalidade ao zigoto (gene L) é responsável pela morte dos tipos homozigotos dominantes (SEX1-M/SEX1-M, SEX1-M/SEX1-H, SEX1-H/SEX1-H) durante o início do desenvolvimento da semente. Estes geram uma segregação 2:1 para o tipo de sexo, ao contrário da proporção mendeliana normal 3:1 para um único gene dominante autossômico. Alternativamente, HOFMEYR (1967) lança a teoria do balanço gênico para a determinação sexual de *C. papaya*, propondo que as regiões cromossômicas do macho e hermafrodita são inertes, o que explica a letalidade zigótica na condição de homozigose.

Baseado na maior frequência de ocorrência de reversão sexual em plantas hermafroditas e machos do que em fêmeas, propõe que uma maior concentração de genes afetando a feminilidade estão concentrados nos cromossomos sexuais, enquanto aqueles afetando a masculinidade estão distribuídos em todos os cromossomos autossômicos, concluindo que a interação entre esses fatores determina o sexo da planta.

STILES et al. (1993) aplicaram a técnica RAPD para a análise da relação genética existente entre dez cultivares de *Carica papaya*, e através da construção de um dendrograma, concluíram que dos dez cultivares, sete eram do tipo Havaí, e todos foram agrupados a um ramo da árvore. Três cultivares não Havaianos também foram analisados. O mínimo de similaridade detectada foi 0,7 sugerindo que o germoplasma do mamoeiro domesticado é muito limitado. Relatou também que os seus resultados mostraram que a tecnologia RAPD é uma técnica rápida, precisa e sensível para a análise genômica.

MAGDALITA et al. (1997), trabalhando com *C. papaya* (domesticado) e *C. cauliflora* (tipo selvagem), e com 120 híbridos interespecíficos obtidos do cruzamento entre essas duas espécies, relataram que os marcadores moleculares, usando 72 primers RAPD de 10-mer, revelaram um alto nível de polimorfismo (64%) entre *C. papaya* e *C. cauliflora*, confirmando que essas duas espécies são geneticamente distantes. Dezesete desses primers (24%) produziram padrões de bandas polimórficas confiáveis e facilmente contáveis, que foram posteriormente triadas para identificar os híbridos. Uma faixa de 1-5 primers RAPD confirmaram consistentemente que todas as 120 plantas eram híbridos genéticos, com todas elas contendo no mínimo uma banda do parental masculino. Visto que uma banda de cada parental era consistentemente amplificada no híbrido, isso implica no híbrido a presença de dois conjuntos de cromossomos, sendo um conjunto de cada parental. A variação no número de híbridos tendo as bandas RAPD do parental masculino, sugere perda de cromossomo paterno.

De acordo com ALSTROM-RAPAPORT et al. (1998), em muitas plantas dióicas, o sexo influencia o valor econômico, programas de melhoramento e oportunidades para o uso comercial de materiais geneticamente transformados, e

por isso o mapeamento genético localizado (BSA - “Bulk Segregant Analysis”) envolvendo produtos RAPD tem sido usado com sucesso para identificar marcas moleculares ligadas à determinação sexual em diversas espécies de plantas dióicas.

ANDREANI Jr.(1998) trabalhando com o mamoeiro, concluiu que a técnica RAPD mostrou-se útil na determinação da forma hermafrodita em plantas de mamoeiro de caráter genotípico não determinado, através dos primers UBC13 e UBC77, e também que o sistema peroxidase caracterizou a forma masculina sem controle de polinização e a microscopia eletrônica de varredura não se mostrou eficiente em diferenciar as formas sexuais do mamoeiro. Além disso, observou que nenhuma das técnicas biomoleculares utilizadas em seu trabalho foram capazes de determinar as diferentes formas sexuais no cv. Baixinho de Santa Amália, afirmando ainda que novos testes são necessários, utilizando-se essas e outras técnicas moleculares, para se afirmar se existe um marcador ligado ao locus controlador do sexo no mamoeiro.

De acordo com RUAS et al. (1998) o mecanismo de determinação sexual em espécies dióicas do gênero *Atriplex* (*Chenopodiaceae*) não foi ainda determinado, e relataram a descoberta de um fragmento de DNA específico ao macho na espécie dióica diplóide de *Atriplex garrettii*. Extraíram amostras de DNA individualmente de dez plantas masculinas e dez femininas, e testaram um total de 158 primers RAPD. Identificaram um fragmento de DNA específico ao macho com 2075 pb gerado com o primer OPAF-14. O fragmento foi clonado e parcialmente sequenciado, tendo sido construídos primers de 24-mer, que amplificaram exclusivamente esse fragmento. Quando 124 plantas masculinas, 126 plantas femininas, e uma planta hermafrodita foram individualmente testadas, o fragmento de DNA de 2075-pb específico ao macho estava também presente nas plantas hermafroditas, e em todas as plantas masculinas, mas estava ausente em todas as plantas femininas.

Segundo RUAS et al. (1998) análises citogenéticas em *A. garreti* não revelaram cromossomos sexuais heteromórficos aparentes, sendo os cariótipos simétricos nos machos e fêmeas, com nove pares de cromossomos metacêntricos

($2n = 2x = 18 = 16m + 2m\text{-sat}$) e um par de satélites (sat) localizados na mesma posição (par 4) em ambos cariótipos. A falta de diferenças entre os cariótipos macho e fêmea sugerem, mas não confirmam, que a determinação sexual em *A. garreti* é genética, não havendo evidência de cromossomos heteromórficos. De um total de 158 primers decâmeros testados, apenas um fragmento de DNA específico ao macho foi detectado. Como os marcadores RAPD são amplificados a partir de locais ao acaso dentro do genoma, se o sexo fosse determinado por cromossomos heteromórficos, um maior número de fragmentos específicos ao macho deveriam ter aparecido. Essas observações coletivamente sugerem que uma única região determinante do sexo em um par de cromossomos homólogos é responsável pela determinação do sexo em *A. garrettii*.

ALSTROM-RAPAPORT et al. (1998) com o objetivo de identificar marcas moleculares ligadas aos loci determinantes do sexo em salgueiro (*Salix viminalis* L.), utilizaram 380 primers decâmeros para gerar produtos RAPD, realizando uma BSA, concluíram que de 1080 bandas RAPD examinadas, apenas uma única banda de 560 pb estava ligada ao locus de determinação sexual. Esta marca (UBC354₅₆₀) é biparentalmente herdada, está associada com a feminilidade em certas condições genéticas, e está ligada ao alelo A1 no modelo genético epistático com dois loci proposto para a determinação sexual em *S. viminalis*. “Southern blots” confirmaram a homologia da marca na progênie e nos parentais usados.

De acordo com POLLEY et al. (1997) a rápida identificação do sexo em populações dióicas de lúpulo (*Humulus lupulus*) é importante para o melhoramento dessa planta cultivada, porque apenas as flores não fertilizadas de plantas femininas são usadas como ingredientes na produção de cerveja. O lúpulo é uma planta dióica, diplóide, com $2n=20$ cromossomos, dos quais 9 pares são autossomos bivalentes. Acredita-se que um mecanismo de cromossomo sexual controla o desenvolvimento de plantas masculinas (XY) e femininas (XX). Tem sido sugerido que a expressão do sexo masculino é determinado por uma proporção X:autossomo, embora o cromossomo Y seja indispensável para a completa expressão do fenótipo masculino. POLLEY et al. (1997) compararam

conjuntos de plantas masculinas e femininas derivadas de um cruzamento de lúpulo para identificar marcas moleculares associadas com o cromossomo Y (específico ao macho). De 900 primers RAPD testados, 32 revelaram fragmentos específicos para plantas masculinas, que estavam ausentes nas plantas femininas deste cruzamento. Subsequentemente, os 32 primers positivos foram testados em plantas masculinas e femininas não aparentadas. Três desses 32 primers foram específicos para o cromossomo Y em todas as linhagens. O produto específico ao Y derivado de um desses primers (OPJ9) foi de baixa cópia em experimentos de hibridização e predominantemente presente em plantas masculinas. Primers desenvolvidos a partir da sequência de DNA deste produto proporcionou uma marca para rápida identificação sexual em cruzamentos de lúpulo.

WOLF et al. (1997) conduziram uma série de cruzamentos experimentais para determinar a base genética da determinação sexual em *Datisca glomerata* (Datiscaceae), uma espécie de planta androdíica, cuja população contém dois sexos, machos e hermafroditas. A determinação do sexo em *D. glomerata* parece ser controlada por no mínimo dois loci. Os machos são homozigotos recessivos em ambos loci, enquanto as hermafroditas têm no mínimo um alelo dominante em um dos dois locus. Entretanto, o problema da determinação sexual não foi inteiramente resolvido, como parecem existir duas diferentes distâncias de ligação (em “centiMorgan”- cM) entre os dois loci de determinação sexual ($36 \pm 4,5$ cM e $6,7 \pm 1,5$ cM). Isto foi inesperado, e muitos estudos serão conduzidos para determinar a natureza desta anomalia. Este é o primeiro relato de genética de determinação sexual em uma planta androdíica.

MULCAHY et al. (1992) identificaram quatro primers que produziram marcas associadas com o sexo em *Silene latifolia*, uma espécie dióica possuindo cromossomos sexuais heteromórficos; HORMAZA et al. (1994) detectaram uma única marca associada a fêmeas e ausente em machos de *Pistacia vera*; e Sakamoto et al. (1995) recentemente relataram uma marca RAPD de 730 pb que estava associada com o macho de *Canabis sativa*.

FOISSET et al. (1996) empreenderam a construção de um mapa genético de *Brassica nabus* com marcadores isoenzimáticos (4%), RFLP (26,5%) e RAPD

(68%), em 152 linhagens de uma população duplo-haplóide. O mapa cobriu 1765 cM e compreendeu 254 marcas incluindo três marcas PCR específicas e um marcador morfológico. Eles estão reunidos em 19 grupos articulados, cobrindo aproximadamente 71% do genoma de colza.

2.6.2. SCAR

Os marcadores SCAR são algumas vezes vantajosos sobre os marcadores RAPD porque eles detectam apenas um único locus e sua amplificação é menos sensível às condições de reação. Desde que apenas um produto PCR é gerado, a eletroforese pós-amplificação poderia ser eliminada porque o DNA amplificado pode ser visualizado tanto pela coloração com brometo de etídeo como pela medida da concentração de DNA na mistura de reação, usando uma leitura ELISA ou outro dispositivo de leitura capaz de medir absorbância a 260 nm (WEEDEN, 1994).

JIANG e SINK (1997) usaram os métodos de BSA, RAPD, e SCAR para mapear marcas moleculares para o locus sexual M (macho) em aspargo. As plantas masculinas são preferidas por terem maior produtividade e vigor do que as plantas femininas. Foram usados para o estudo dois parentais, A19 (macho, Mm) e MW25 (fêmea, mm), e 63 progênies. Um total de 760 primers RAPD decâmeros foram testados. O primer OPC15 produziu duas marcas RAPD, OPC15₉₈ e OPC15₃₀, ambos ligados ao locus M (fenótipo masculino) em uma distância de 1,6 cM. Subsequentemente, o fragmento RAPD amplificado OPC15₉₈ foi clonado e sequenciado. A sequência foi então usada para construir os primers SCAR flanqueantes de 24-mer, SCC15-1 e SCC15-2. Os primers SCAR amplificaram um único fragmento de 980 pb em indivíduos masculinos mas não nos femininos; do mesmo tamanho do fragmento RAPD clonado. Entretanto, a marca SCAR foi dominante, como foi a banda original OPC15₉₈ da qual ela foi derivada. Essas marcas RAPD e SCAR poderiam ser usadas para identificar machos e fêmeas da progênie da população mapeada, mas não foram aplicáveis para outros germoplasmas de aspargo estudados.

PARASNIS et al. (2000) trabalhando com 11 cultivares dióicos de *Carica papaya* e com *Carica cauliflora* (espécie selvagem dióica), testaram 80 primers RAPD, e observaram que o primer OPF2 amplificou uma banda de 831 pb presente apenas nas plantas de sexo masculino e ausente nas plantas femininas de três dos cultivares de *C. papaya* testados e em *C. Cauliflora*. Converteram o marcador RAPD (OPF2₈₃₁) em um marcador SCAR, obtendo a amplificação de um único produto com 831 pb presente apenas nas plantas masculinas.

2.6.3. fAFLP

Mais recentemente, foi desenvolvida uma nova e poderosa técnica baseada no PCR, chamada AFLP (VOS et al., 1995), que é essencialmente intermediária entre RFLP e PCR. Este método foi desenvolvido por ZABEU e VOS (1993, 1995). O marcador AFLP analisa a presença ou ausência de sítios de enzimas de restrição e as sequências polimórficas adjacentes a esses sítios. Brevemente, três passos cruciais são seguidos para obter marcadores AFLP: (i) digestão do DNA genômico com duas diferentes enzimas, como MseI (enzima de corte frequente) e EcoRI (enzima de corte raro); (ii) ligação de oligonucleotídeos adaptados à extremidade da restrição; (iii) seleção de fragmentos por duas amplificações sucessivas de PCR, usando primers complementares aos oligonucleotídeos adaptados, com 1 a 3 nucleotídeos seletivos adicionais.

De acordo com VOS et al. (1995), o AFLP tem muitas vantagens sobre o RAPD. Primeiro, um maior número de loci pode ser analisado por experimento; são obtidas por análise, um número de marcas informativas, aproximadamente 10 vezes maior. Segundo, os marcadores AFLP são codominantes; usando o equipamento apropriado e o “software” para analisar os géis, é possível identificar um alelo quer ele seja homozigoto ou heterozigoto. Por isso, essa técnica gera mais informação do que os marcadores dominantes como RAPD. Terceiro, o AFLP gera padrões de bandamento altamente reprodutíveis, devido a um anelamento altamente específico dos primers aos nucleotídeos adaptadores complementares. Por outro lado, a tecnologia RAPD, pode apresentar uma falta

de reprodutibilidade, que é causada por um anelamento desigual dos primers aleatórios. Os AFLPs parecem ser tão reprodutíveis quanto os RFLPs, mas eles são tecnicamente mais exigentes e requerem mais DNA (1 µg por reação) do que os RAPDs. Devido à sua grande cobertura genômica (em média eles geram 100 bandas por gel comparado com 20 dos RAPDs), os AFLPs são particularmente bons para mapeamento e “fingerprinting”, e podem ser usados para calcular distâncias genéticas entre genótipos. A identidade e distribuição das bandas de AFLP no genoma está claramente relatado para os primers selecionados que estão sendo usados, mas dados recentes indicam, por exemplo, que bandas de AFLP podem agrupar-se em torno dos centrômeros nos mapas genéticos.

De acordo com CERVERA et al. (1996) as tecnologias de marcadores moleculares têm facilitado e potencializado a análise genética de plantas e têm tornado-se uma ferramenta extremamente útil no melhoramento de árvores florestais. As informações geradas pelos marcadores moleculares tem tornado possível adquirir conhecimentos adicionais sobre a estrutura e organização do genoma das plantas, como também sobre a evolução desses genomas vegetais através de análise filogenética. Esses pesquisadores, usando *Populus* spp. como árvore modelo, relataram as possíveis aplicações do AFLP, que é um marcador de DNA de alta densidade, tendo sido essa tecnologia desenvolvida por Keygene N.V. (Wageningen, The Netherlands). Pesquisaram as aplicações de marcadores moleculares baseados no AFLP para o melhoramento de *Populus* spp., e essas aplicações incluem: (i) Análise por AFLP de resistência à doença *Melampsora larici-populina* usando análise segregante em “bulk” (BSA - “Bulked Segregant Analysis”), (ii) AFLP “fingerprinting” para identificação e análise taxonômica de árvores individuais, e (iii) Estratégias de mapeamento de *Populus* baseadas em AFLP.

CERVERA et al. (1996) usaram 144 combinações de primers, e identificaram três diferentes marcas AFLP presentes no parental resistente a *Melampsora* e o “bulk” resistente, mas ausentes no parental suscetível e o “bulk” suscetível. A ligação dessas marcas ao gene de resistência foi confirmada pela análise de AFLP de cada DNA individual a partir da progênie F1 da família 87001.

Concluíram também que devido ao alto nível de polimorfismo genético entre espécies de *Populus* e as vantagens oferecidas pela análise de AFLP, estudos sobre a diversidade entre espécies de *Populus* usando AFLP provavelmente resultarão em uma classificação altamente confiável. Observaram que usando AFLP, aproximadamente 60 a 100 marcas (bandas por linha) podem ser obtidas por combinação de primer e, em média, 60% dessas bandas são polimórficas entre as diferentes espécies (*P. deltoides* e *P. nigra*) e 15-25% entre dois irmãos inteiros ao acaso, derivados de um cruzamento interespecífico (*P. deltoides* x *P. nigra*).

Segundo HILLEL et al. (1990) os marcadores moleculares facilitam a introgressão de características desejáveis. O objetivo de diferentes programas de melhoramento é introgridir um gene, ou genes, de interesse, a partir de uma planta matriz doadora pertencente a uma elite de matrizes, geralmente através de retrocruzamentos. Os marcadores moleculares são usados para monitorar a presença ou ausência do locus introgridido na população segregante, e também facilita a seleção daqueles retrocruzamentos que sejam geneticamente os mais similares ao parental recorrente. De acordo com TANKSLEY et al. (1995) a geração de mapas moleculares de alta densidade, permite a identificação de marcadores moleculares firmemente ligados a um locus de interesse, o que pode levar à clonagem de genes de interesse pelo mapeamento do cromossomo.

MACKILL et al. (1996) afirmam que o AFLP é uma valiosa ferramenta para o mapeamento genético em espécies vegetais. Os mesmos autores compararam os níveis de polimorfismo para marcadores AFLP, RAPD, e microsatélite em 12 cultivares de arroz japonica e 2 cultivares de arroz indica. Para o AFLP, testaram 7 primers *EcoRI* e 7 primers *MseI*, que usados em 18 combinações geraram um total de 529 bandas, das quais 147 foram claramente polimórficas entre os acessos. Os 21 primers RAPD produziram 103 bandas das quais 43 foram polimórficas. Para os marcadores microsatélite o número de alelos por locus variou de um (1 locus) a seis. Todos os tipos de marcadores deram a mesma classificação para os acessos de arroz dentro das subespécies. Dentro dos cultivares japonica, o polimorfismo percentual médio entre alguns dos dois

acessos foi 22% para o AFLP, 24% para o RAPD, e 36% para os marcadores microsatélite (bandas monomórficas excluídas). A média percentual de polimorfismo entre acessos de indica e japonica foi 65, 35, e 76%, para marcadores AFLP, RAPD e microsatélite, respectivamente. O número total de bandas polimórficas foi muito maior para o AFLP, dando em média acima de 8 por gel. Sete combinações de primers AFLP foram testados em 80 plantas F2 de um cruzamento indica x japonica previamente mapeado por marcadores RFLP. Das 54 bandas AFLP obtidas, 50 puderam ser mapeadas em cromossomos específicos, e estes parecem estar distribuídos por todo o genoma do arroz. Os autores concluíram que o AFLP é um marcador promissor para o mapeamento de importantes genes em arroz.

ZHANG et al. (1999), trabalhando com 27 genótipos da forrageira (*Cynodon* spp.), concluíram que a técnica AFLP produziu suficiente polimorfismo para diferenciar todos os 27 genótipos da forrageira. Uma média de 48-74 bandas em uma faixa de 30 a 600 pb foram detectadas por esse método. Os resultados indicaram que a maioria das 14 combinações de primers testados poderiam ser usados para distinguir os genótipos da forrageira, e que alguns pares de primers poderiam diferenciar todos os 27 genótipos. Para testar a confiança e reprodutibilidade do AFLP, três DNAs (repetições) dos 27 genótipos da forrageira foram testados usando cinco pares de primers. Concluíram que apenas 0,6% das bandas foram avaliadas diferentemente entre as três repetições.

DEBENER e MATTIESCH (1999) usaram uma população segregante de rosas híbridas diplóides ($2n = 2x = 14$) para construir o primeiro mapa de ligação do genoma da roseira. Um total de 305 marcadores RAPD e AFLP foram analisados em uma população de 60 plantas F1. Desses marcadores, 278 puderam ser localizados nos 14 grupos de ligação dos dois mapas, cobrindo distâncias totais nos mapas de 326 e 360 cM, respectivamente. Concluíram que os mapas forneceram uma ferramenta para adiantar a análise genética de genes horticulturalmente importantes como, por exemplo, genes de resistência e um ponto inicial para o melhoramento marcador-assistido em rosas.

KOELEMAN et al., (1998) estudaram 31 estirpes de espécies de *Acinetobacter*. Para isso, empregaram as seguintes técnicas de “fingerprinting”: ARDRA, RAPD e AFLP com marcação radioativa e fluorescente. Esses autores concluíram que, das três técnicas empregadas, apenas o AFLP mostrou alto poder para identificação das 31 estirpes. Observaram também que comparado ao AFLP radioativo, o AFLP fluorescente (fAFLP) foi tecnicamente mais rápido e simples de executar, além de permitir a análise com um sequenciador automático de DNA.

CLERC et al. (1998) avaliaram a diversidade genética de 23 estirpes de *Pseudomonas syringae* usando as técnicas de RAPD e AFLP. Concluíram que ambas as técnicas usadas têm alto poder discriminador porque estirpes de *P. syringae* pv. *tomato* e *P. syringae* pv. *maculicola* que são indistinguíveis por outras técnicas, incluindo testes de patogenicidade em tomate, foram separadas em dois grupos por RAPD e AFLP. Porém, a análise dos dados mostrou que o método AFLP foi mais eficiente em avaliar a diversidade intrapatógeno do que o RAPD e deixou claro o delineamento entre as distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas.

RESTREPO et al. (1999) estudaram a diversidade genética de 47 estirpes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) originárias de diferentes ecozonas da Colômbia. Esses autores, utilizando as técnicas de RFLP e AFLP, concluíram que os resultados obtidos com AFLP foram concordantes com aqueles obtidos com RFLP, usando o DNA plasmidial como sonda. Observaram também que algumas combinações de primers AFLP diferenciaram estirpes Xam que não haviam sido distinguíveis pela técnica de RFLP. Logo, a técnica de AFLP “fingerprinting” permitiu uma melhor definição das relações genéticas entre as estirpes Xam.

DOIGNON-BOURCIER et al. (2000) examinaram a diversidade genotípica de 64 estirpes de *Bradyrhizobium*, isolados a partir de nódulos de 27 espécies de leguminosas nativas do Senegal (oeste da África). Para caracterizar as estirpes usaram as técnicas de PCR do espaço intergênico (entre 16S e 23S do rRNA), RFLP (IGSPCR-RFLP) e AFLP. Observaram que as estirpes eram diversas e formaram 27 grupos pelo AFLP e 16 grupos pelo IGS PCR-RFLP. Concluíram que para o estudo do genoma inteiro, o AFLP foi a técnica mais discriminativa, sendo portanto de particular interesse em futuros estudos taxonômicos em *Bradyrhizobium*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo.

3.1. Cultivo no campo

As plantas matrizes parentais hermafroditas do cv. Sunrise Solo, e as plantas masculinas e femininas do cv. Cariflora, usadas neste trabalho, estavam previamente plantadas no campo e pertenciam a um experimento anterior, já estando em fase adulta, aproximadamente com 1 ano e meio de plantio no campo, em fase de frutificação plena e com o sexo bem definido e identificado. Em janeiro e fevereiro de 1999, foram escolhidas 10 plantas matrizes do cv. Sunrise Solo, com sexo hermafrodita bem definido, sendo algumas de suas flores ainda fechadas protegidas por saco de papel, forçando a autofecundação das mesmas. Na mesma época foram coletadas folhas das 10 plantas matrizes hermafroditas e também de 10 plantas femininas do cv. Sunrise Solo, e foram coletadas folhas de 10 plantas masculinas e de 10 plantas femininas do cv. Cariflora, do mesmo plantio, sendo acondicionadas em sacos plásticos com identificação, guardadas em freezer e moídas em almofariz com nitrogênio líquido, para posteriormente ser feita a extração do DNA a ser usado nas análises por RAPD, SCAR e fAFLP.

Aproximadamente 6 meses após a autofecundação, foram colhidos os frutos e retiradas as sementes com a devida identificação das plantas matrizes hermafroditas. No princípio de agosto de 1999, as sementes oriundas das 10 plantas matrizes hermafroditas foram plantadas no ripado da FCAV - UNESP Câmpus de Jaboticabal, em sacos plásticos contendo 3 partes de terra, 1 de

esterco, 1 de areia e 300g de Superfosfato Simples. Foram utilizados 20 sacos de cada planta matriz, num total de 200 sacos, que foram identificados com plaquinhas apropriadas numeradas de 1 a 200 e contendo o código das 10 plantas matrizes hermafroditas produtoras das sementes. O código tem duas letras seguidas de um número, por exemplo SH12 significa uma planta matriz Sunrise Solo Hermafrodita número de identificação no campo 12 e na mesma plaquinha tem também o número de identificação das plantas da progênie S1 (self), conforme mostrado na Tabela 1. Foi usada a terminologia S1 e não F1, porque a progênie S1 foi originada a partir da autofecundação de plantas matrizes parentais hermafroditas, e não do cruzamento entre dois parentais.

Tabela 1. Código usado para identificar as plantas matrizes e as plantas S1.

Planta Parental	Plantas S1 nº
SH12	1 - 20
SH9	21 - 40
SH22	41 - 60
SH6	61 - 80
SH19	81 - 100
SH7	101 - 120
SH11	121 - 140
SH3	141 - 160
SH14	161 - 180
SH8	181 - 200

Aproximadamente três meses após a semeadura (final de outubro de 1999), as mudas da progênie S1 foram transplantadas para o campo, plantadas de forma inteiramente casualizada, e identificadas com as mesmas plaquinhas, que estavam numeradas de 1 a 200 e continham também o código de cada planta matriz. O terreno no campo foi preparado para o plantio com aragem, gradeamento e calagem ($0,4 \text{ ton.ha}^{-1}$ de calcário dolomítico). Foram plantadas de acordo com um croqui montado através de um sorteio inteiramente casualizado dos números de identificação das plantas S1, distribuídas em 8 fileiras identificadas no croqui com as letras de A – H, tendo sido plantadas de 26 a 28

mudas por fileira, com exceção da fileira A com 7 plantas, em espaçamento 3x2, ou seja 3m entre fileiras e 2m entre as plantas dentro das fileiras, estando as linhas no croqui numeradas de 1 a 28. Por falta de espaço na área, algumas plantas que não couberam nas fileiras B a H precisaram ser remanejadas para a fileira A (Tabela 2).

Tabela 2. Croqui mostrando a disposição do plantio das plantas S1 no campo.

Linhas	Fileiras							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1		144	136	91	25	142	170	14
2		27	61	185	118	176	20	112
3		29	28	131	160	31	151	8
4		53	50	133	98	171	113	156
5	46	173	108	12	48	56	9	82
6	72	199	186	99	60	155	69	180
7	162	17	126	19	150	195	141	89
8	35	78	40	184	130	26	55	81
9	44	95	75	62	169	125	158	65
10	110	100	2	70	121	120	147	41
11	114	74	182	63	7	21	187	128
12		117	94	193	87	196	179	140
13		43	115	52	37	129	3	49
14		103	152	197	22	77	122	18
15		174	194	54	73	105	59	190
16		111	163	101	124	16	90	153
17		154	132	148	191	47	6	11
18		79	127	172	119	178	97	66
19		34	36	188	58	4	159	164
20		13	30	157	68	183	175	32
21		167	67	116	165	145	83	1
22		92	139	181	104	51	166	64
23		177	149	138	134	80	24	168
24		200	76	71	109	198	102	10
25		143	189	23	39	33	192	42
26		106	4545	85	88	84	123	107
27			86	93	96	38	15	146
28				161	135	57	137	5

Durante o plantio das mudas S1 no campo, foi feita uma adubação na cova com Superfosfato Simples. Como foram plantadas 3 sementes por saco, duas semanas após o plantio das mudas no campo, foi feito o desbaste, deixando-se

apenas uma planta mais vigorosa por cova. Nessa mesma ocasião, foram coletadas 2 folhas de cada planta S1, sendo imediatamente acondicionadas em sacos plásticos com a devida identificação, guardadas em freezer e moídas com nitrogênio líquido, para posteriormente ser feita a extração do DNA usado na análise por RAPD, SCAR e fAFLP.

Logo após o plantio das mudas no campo foi necessário aplicar formicida para conter o ataque de formigas, tendo logo sido resolvido esse problema. No início de março de 2000, devido às chuvas frequentes e ao clima quente da região de Jaboticabal nessa época, ocorreu um surto generalizado de varíola nas plantas, também conhecida como pinta-preta, cujo agente etiológico é o fungo *Asperisporium caricae*, causando manchas necrosadas na parte inferior das folhas mais velhas das plantas, debilitando as mesmas. Para conter o avanço dessa doença, foram retiradas e queimadas as folhas infectadas, e no mesmo dia foi aplicado o fungicida Cerconil (Chlorotalonil Thiofanato Metílico) na concentração de 200 g. por 100 L de água. O Cerconil foi reaplicado inicialmente a cada 7 dias, e depois a cada 14 dias, quando a doença encontrava-se totalmente controlada. Não foi preciso aplicar o Cerconil durante o inverno, que por ser uma época mais seca e fria, não favorece o desenvolvimento desse fungo. Não foram observados ataques de outras pragas nem doenças.

Sempre que necessário, foi feita também a irrigação do plantio com carro pipa puxado por trator. Foram realizadas adubações mensais com 100 g por planta da mistura de Sulfato de Amônio, Super Simples e Cloreto de Potássio na proporção 2:2:1. O terreno foi mantido constantemente limpo, sendo feita a capina manual dentro das fileiras e passada a roçadeira entre as fileiras.

Durante as geadas ocorridas na segunda quinzena do mês de julho de 2000, os mamoeiros foram irrigados no período da manhã, molhando as suas folhas para amenizar os efeitos das geadas. Com o mesmo objetivo, foram acesas várias fogueiras em tambores metálicos espalhados no plantio.

Os dados da temperatura mínima de relva, referentes ao período de 17 a 21 de julho de 2000, foram fornecidos pela Estação Agroclimatológica, Depto. de Ciências Exatas da FCAV/UNESP - Câmpus de Jaboticabal, latitude 21°15'22" S,

longitude 48°18'58" W, altitude 595 m. Os elementos meteorológicos, utilizados neste trabalho, foram extraídos de um conjunto de dados pertencentes ao acervo da área de Agrometeorologia do Depto. de Ciências Exatas. As observações feitas na Estação Agroclimatológica do Câmpus de Jaboticabal foram cotadas, digitadas em formato padronizado, realizada a consistência e controle de qualidade. Em seguida foram obtidas as médias diárias, mensais e anuais que são repassadas aos usuários.

Para combater o ataque de ácaros brancos, ocorrido logo após as geadas, o plantio foi pulverizado com o acaricida Vertimec com óleo mineral na seguinte proporção: 30 mL de Vertimec e 250 mL de óleo mineral, para cada 100 L de água. Sempre que chovia por vários dias, ocorria o ataque de varíola, que foi combatida com a aplicação do fungicida Cerconil.

O número médio por planta de frutos normais, carpelóides, com pentandria, e alongados cilíndricos com curvatura, foi obtido pela contagem de cada tipo de fruto, dividindo-se pelo número de plantas amostradas.

3.2. Cultivo *in vitro*

As plantas usadas como fonte de explante para o cultivo *in vitro* foram as da progênie S1, tendo sido escolhidas 20 plantas S1 para serem decepadas, aproximadamente 4 meses após o plantio no campo, em março de 2000, quando os sexos já estavam bem definidos. Dessas 20 plantas S1 decepadas, 10 eram de sexo hermafrodita e 10 de sexo feminino, tomando-se o cuidado de escolher uma planta S1 hermafrodita e uma planta S1 feminina, oriundas de cada uma das 10 plantas matrizes parentais hermafroditas, como pode ser visto na Tabela 3.

As plantas S1 foram decepadas a aproximadamente 1,5 m de altura do chão, sendo retiradas todas as folhas, flores e frutos remanescentes, forçando o desenvolvimento das gemas foliares laterais, obtendo-se assim uma boa fonte de ápices caulinares. A decepagem foi feita no mesmo dia em que foi aplicado o fungicida Cerconil, usado no controle da varíola, mas que também parece ter

ajudado na cicatrização dos cortes feitos nos caules das plantas, impedindo o desenvolvimento de fungos oportunistas.

Tabela 3. Plantas S1 que foram decepadas e as plantas matrizes que as produziram.

Plantas Matrizes	Plantas S1 decepadas	
	Hermafroditas	Femininas
SH12	20H	9F
SH9	32H	26F
SH22	52H	46F
SH6	80H	73F
SH19	92H	94F
SH7	120H	105F
SH11	140H	132F
SH3	155H	154F
SH14	170H	165F
SH8	198H	197F

Foi usado o meio MS da Sigma contendo a mesma composição e concentração do meio original de MURASHIGE e SKOOG (1962).

Durante todo o mês de abril e início de maio de 2000, foram montados quatro experimentos relacionados à desinfestação de explantes do mamoeiro, tendo sido inoculados um total de 650 ápices caulinares. Em todos os quatro experimentos, os meios de cultura MS sempre foram acrescidos de sacarose (30 g.L⁻¹), solidificados com agar (7 g.L⁻¹), e tiveram o pH ajustado para 5,8.

No **1º Experimento de Desinfestação** foram inoculados 240 ápices caulinares com 10 mm de altura, individualmente em tubos de ensaio, sendo que 120 ápices foram inoculados no meio MS de estabelecimento contendo 0,5 mg.L⁻¹ de BAP para estimular a organogênese e os outros 120 ápices no meio MS de estabelecimento contendo 1,22 mg.L⁻¹ de 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxyacético) para estimular a embriogênese somática. Os ápices inoculados no meio com BAP foram mantidos em fotoperíodo de 16h/8h de luz/escuro, enquanto os inoculados no meio com 2,4-D foram mantidos no escuro. Os ápices foram desinfestados conforme o protocolo descrito abaixo.

1- Coleta no campo de ápices caulinares com aproximadamente 3 cm de altura

- 2- Ápices coletados são imediatamente imersos em água destilada ainda no campo
- 3- Em fluxo laminar imersos em álcool 70% por 1min
- 4- Lavados 3x com água destilada autoclavada (d.a.)
- 5- Imersos em hipoclorito de sódio a 1% (20% v/v do alvejante comercial Brilhante) com Tween 20 (1gota/100 mL) por 20 min
- 6- Lavados 3x com água d.a.
- 7- Imersos em solução microfiltrada de rifampicina (300 mg.L^{-1}) por 24 h e agitados a 80 rpm
- 8- Lavados 3x com água d.a.
- 9- Imersos em solução microfiltrada do acaricida Vertimec 18 CE ($0,3 \text{ mL.L}^{-1}$)
- 10-Lavados 3x com água d.a.
- 11-Imersos em álcool 70% por 1min
- 12-Lavados 1x com água d.a.
- 13-Imersos em hipoclorito de sódio a 1% (20% v/v do alvejante comercial Brilhante) com Tween 20 (1gota/100 mL) por 10 min
- 14-Lavados 3x com água d.a.
- 15-Ápices reduzidos a 5 mm de altura e inoculados individualmente em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 mL do meio MS completo adicionado de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP ou de $1,22 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D.

O **2º Experimento de Desinfestação** foi montado nos dias 14 e 15/04/2000, tendo sido inoculados individualmente 180 ápices com 5 mm de altura, em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio MS de estabelecimento com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, para estimular a organogênese. Utilizou-se o protocolo como descrito a seguir:

- 1- Coleta no campo de ápices caulinares com aproximadamente 3 cm de altura
- 2- Ápices coletados são imediatamente imersos em água destilada ainda no campo
- 3- Em fluxo laminar são lavados 2x com água d.a.
- 4- Imersos em álcool 70% por 1min

- 5- Lavados 2x com água d.a.
- 6- Imersos em hipoclorito de sódio a 1% (20% v/v do alvejante Brilhante) por 15 min
- 7- Lavados 3x com água d.a.
- 8- Imersos em solução de rifampicina (300 mg.L^{-1}) durante 24 h e agitados a 80 rpm
- 9- Lavados 2x com água d.a.
- 10- Ápices reduzidos a 5 mm de altura e inoculados individualmente em tubos de ensaio

O **3º Experimento de Desinfestação** foi montado nos dias 24 e 25/04/2000, tendo sido inoculados 35 ápices caulinares, distribuídos em 7 diferentes tratamentos, com 5 ápices caulinares para cada tratamento. Os protocolos utilizados encontram-se descritos a seguir:

- Tratamentos 1, 2, 3 e 4:

- 1- Coleta no campo de ápices caulinares com aproximadamente 3 cm de altura
- 2- Ápices coletados são imediatamente imersos em água d.a. ainda no campo
- 3- Em fluxo laminar são lavados 2x com água d.a.
- 4- Lavados 1x com água d.a. contendo o detergente Tween 20 (1 gota/100 mL) por 2 min
- 5- Lavados 3x com água d.a.
- 6- Imersos em álcool 70% por 30 seg
- 7- Imersos em hipoclorito de sódio contendo Tween 20 (1 gota/100 mL) em 4 diferentes concentrações e tempos:
 - Trat.1:** Hipoclorito de sódio a 5% (Q-bonita 100% v/v) por 10 min
 - Trat.2:** Hipoclorito de sódio a 2,5% (Q-bonita 50% v/v) por 10 min
 - Trat.3:** Hipoclorito de sódio a 1% (Q-bonita 20% v/v) por 15 min
 - Trat.4:** Hipoclorito de sódio a 0,25% (Q-bonita 5% v/v) por 15 min
- 8- Lavados 6x com água d.a.

- 9- Ápices reduzidos a 5 mm de altura e inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo a metade da concentração dos sais e vitaminas do MS (1/2 MS) e sem regulador de crescimento.

- Tratamentos 5 e 6:

- 1- Coleta no campo de ápices caulinares com aproximadamente 3 cm de altura
- 2- Ápices coletados são imediatamente imersos em água d.a. ainda no campo
- 3- Em fluxo laminar são lavados 2x com água d.a.
- 4- Lavados 1x com água d.a. contendo o detergente Tween 20 (1gota/100 mL) por 2 min
- 5- Lavados 3x com água d.a.
- 6- Imersos em rifampicina (300 mg/L) mais 1/4 MS, pH 5.8, sob agitação a 100 rpm por 20 h
- 7- Lavados 3x com água d.a.
- 8- Imersos em álcool 70% por 30 seg
- 9- Imersos em hipoclorito de sódio 0,6% (Q-bona 12% v/v) contendo Tween 20 (1gota/100mL) por 10 min
- 10- Lavados 6x com água d.a.
- 11- Ápices reduzidos a 5 mm de altura

Trat. 5: E inoculados em meio contendo 1/2 MS e sem regulador de crescimento

Trat.6: E inoculados em meio contendo o MS inteiro e com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP

- Tratamento 7:

- 1- Coleta no campo de ápices caulinares com aproximadamente 3 cm de altura
- 3- Ápices coletados são imediatamente imersos em água d.a. ainda no campo
- 12- Em fluxo laminar são lavados 2x com água d.a.
- 13- Lavados 1x com água d.a. contendo o detergente Tween 20 (1gota/100 mL) por 2 min
- 14- Lavados 3x com água d.a.
- 15- Imersos em álcool 70% por 30 seg

- 16-Imersos em hipoclorito de sódio 1% (Q-boua 20% v/v) contendo Tween 20 (1gota/100 mL) por 15 min
- 17-Lavados 6x com água d.a.
- 18-Ápices reduzidos a 5 mm de altura e inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo $\frac{1}{2}$ MS, sem regulador de crescimento, e acrescido de rifampicina (50 mg.L^{-1}).

O **4º Experimento de Desinfestação** foi montado nos dias 1 a 3/05/2000, quando foram inoculados 195 ápices. Foi adotado como padrão o protocolo de desinfestação testado no Tratamento 6 do **3º Experimento de Desinfestação** (imersão em solução de 300 mg.L^{-1} de rifampicina adicionada de $\frac{1}{4}$ do MS com pH 5,8, agitação à 100 rpm por 20h, seguida de imersão em Q-boua 12% v/v por 10 min), sendo os ápices inoculados com 5 mm de altura em meio MS completo, contendo $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP.

Os explantes vivos que não contaminaram, foram mantidos em tubos de ensaio contendo o meio MS acrescido de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP, por mais 4 meses, sendo mensalmente passados para tubos contendo meios novos, ocasião em que por já haverem brotações em tufos, passaram por uma limpeza, onde as partes ressecadas ou amareladas foram retiradas com o auxílio de bisturi. Após esses 4 meses, em outubro de 2000, os brotos já diferenciados, foram individualizados e inoculados no meio de enraizamento. Neste **1º Experimento de Enraizamento**, foram usados 120 tubos de ensaio, contendo 15 mL de meio MS completo, suplementado com 30 g.L^{-1} de sacarose, solidificado com 7 g.L^{-1} de ágar, com pH ajustado para 5,7.

Os explantes que deram origem aos brotos foram retornados para o meio MS de proliferação, suplementado com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, não mais em tubos de ensaio, e sim em magentas GA7 contendo 40 mL de meio de proliferação, pois devido ao aumento da massa vegetal, os tubos de ensaio haviam se tornado pequenos. O meio MS de proliferação foi acrescido de 30 g.L^{-1} de sacarose, solidificado com $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar, com pH ajustado para 5,7. As condições da sala

de cultura de tecidos foram mantidas constantes com fotoperíodo de 16h e temperatura de 27°C.

Devido a problemas com a importação do AIB (ácido indol butírico) da Sigma, o que levou a um atraso de aproximadamente 6 meses na entrega do produto, no começo não foi possível testar o AIB nos meios de enraizamento, o que só veio a ocorrer a partir de dezembro de 2000 quando o produto foi entregue.

Em dezembro de 2000, de acordo com os trabalhos de CARRER (1988) e SCHMILDT (1994), foi montado o **2º Experimento de Enraizamento**, também com 120 tubos de ensaio, sendo inoculada uma plântula em cada tubo de ensaio. Foi usado ½ MS (MS com a metade da concentração dos sais e vitaminas), acrescido de 0,2 mg.L⁻¹ de AIB, suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar, com pH ajustado para 5,7, tendo sido distribuídos 15 mL de meio por tubo. As condições da sala de cultura de tecidos foram mantidas constantes com fotoperíodo de 16h e temperatura de 27°C.

Em fevereiro de 2001, de acordo com os trabalhos de DREW (1987), DREW (1988) e DREW et al. (1993), foi montado o **3º Experimento de Enraizamento**, onde foram testados seis tipos de tratamentos, num total de 240 tubos de ensaio, tendo sido distribuídos 10 mL de meio por tubo. Foram usadas 40 repetições por tratamento, sendo uma repetição igual a um tubo de ensaio, contendo uma plântula por tubo. Os tratamentos consistiram de duas concentrações de AIB (1 ou 2 mg.L⁻¹), ausência ou presença de riboflavina (0 ou 31 µM), e o não uso de meios sequenciais ou o uso de meios sequenciais onde as plantas inoculadas permaneceram por 5 dias nos meios com 1 ou 2 mg.L⁻¹ de AIB sem riboflavina antes de serem transferidas para o meio sem AIB. Nos tratamentos com riboflavina as plantas permaneceram 2 dias no escuro e depois foram expostas à luz (Tabela 4). Foi usado o meio MS contendo a metade dos macroelementos, e o total dos microelementos e vitaminas do MS, suplementado com 20 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar, pH ajustado para 5,7. As condições da sala de cultura de tecidos foram mantidas constantes com fotoperíodo de 16 h e temperatura de 27°C.

Tabela 4. Tratamentos aplicados no 3º Experimento de Enraizamento.

Tratamento	AIB (mg.L ⁻¹)	Riboflavina (µM)	Observação
1	1	0	Plantas permaneceram nesse meio por 5 dias expostas à luz antes de serem transferidas para meio sem AIB onde permaneceram por 45 dias expostas à luz
2	2	0	Plantas permaneceram nesse meio por 5 dias expostas à luz antes de serem transferidas para meio sem AIB onde permaneceram por 45 dias expostas à luz
3	1	31	Plantas permaneceram 2 dias no escuro antes de serem expostas à luz por 48 dias
4	2	31	Plantas permaneceram 2 dias no escuro antes de serem expostas à luz por 48 dias
5	1	0	Plantas permaneceram nesse meio por 50 dias expostas à luz
6	2	0	Plantas permaneceram nesse meio de cultura por 50 dias expostas à luz

Em abril de 2001, de acordo com as publicações de VIANNA (1996), MONDAL et al. (1990), REUVENI et al. (1990), WINNAAR (1988) e GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998) foi montado o **4º Experimento de Enraizamento**, sendo composto por 40 tratamentos (Tabela 5), com cinco repetições por tratamento, sendo uma repetição igual a um tubo de ensaio, contendo uma plântula. Foram testados meios sem carvão ativado e com 1 g.L⁻¹ de carvão ativado, meios com o MS completo e com ½ MS (metade dos sais e vitaminas do MS), contendo cinco concentrações de AIB (0,25 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 4,0 mg.L⁻¹), sem o uso de meios sequenciais (explantes permanecendo por 40 dias nos mesmos meios em que foram inicialmente inoculados) e com o uso de meios sequenciais (explantes transferidos para meios sem AIB após terem permanecido por 14 dias em meios contendo AIB, para que ocorresse a indução do enraizamento).

Logo que os brotos foram individualizados e antes que fossem inoculados nos meios de indução de enraizamento, tomou-se o cuidado de banha-los com ¼ dos sais e vitaminas do MS líquido, autoclavado, com pH ajustado para 5,7, para evitar a desidratação dos mesmos. Os meios de indução de enraizamento foram

suplementados com 20 g.L⁻¹ de sacarose, solidificados com 7 g.L⁻¹ de ágar e o pH foi ajustado para 5,7, tendo sido distribuídos 10 mL de meio por tubo. As condições da sala de cultura de tecidos foram modificadas com fotoperíodo passando de 16 h para 12 h, de acordo com a sugestão de DREW (1988), e a temperatura continuou ao redor de 27°C.

Tabela 5. Tratamentos aplicados no 4º Experimento de Enraizamento.

Tratamentos		MS*	AIB (mg.L ⁻¹)	Uso de Meio Sequencial
Sem carvão	Com carvão			
1	21	1	0,25	Não
2	22	1	0,50	Não
3	23	1	1,00	Não
4	24	1	2,00	Não
5	25	1	4,00	Não
6	26	1	0,25	Sim
7	27	1	0,50	Sim
8	28	1	1,00	Sim
9	29	1	2,00	Sim
10	30	1	4,00	Sim
11	31	1/2	0,25	Não
12	32	1/2	0,50	Não
13	33	1/2	1,00	Não
14	34	1/2	2,00	Não
15	35	1/2	4,00	Não
16	36	1/2	0,25	Sim
17	37	1/2	0,50	Sim
18	38	1/2	1,00	Sim
19	39	1/2	2,00	Sim
20	40	1/2	4,00	Sim

(*) 1 MS (MS completo), 1/2 MS (metade da concentração dos sais e vitaminas do MS)

Na repicagem feita em abril de 2001, metade dos explantes originais foi inoculada no meio de proliferação convencional, e a outra metade foi inoculada no meio de proliferação acrescido de 1 g.L⁻¹ de carvão ativado. Esse tratamento teve por objetivo verificar a ação do carvão ativado sobre a brotação dos explantes de

mamão, e se iria diminuir a formação de calo na base dos explantes. Também foi feita uma contagem do número de brotos produzidos em cada magenta contendo explantes originais provenientes das plantas S1 hermafroditas e femininas.

As plantas do **3º Experimento de Enraizamento** foram transplantadas para tubetes em bandeja de isopor contendo vermiculita autoclavada, sendo irrigadas com $\frac{1}{4}$ MS, mantidas em um estufim, na sala de Cultura de Tecidos de Plantas. Algumas plantas do **4º Experimento de Enraizamento** foram também transplantadas diretamente para a vermiculita, sem passar por nenhum tipo de meio de indução de enraizamento, sendo também irrigadas com $\frac{1}{4}$ MS e mantidas em estufim na sala de Cultura de Tecidos de Plantas.

A partir dos resultados obtidos no **4º Experimento de Enraizamento**, executou-se o **5º Experimento de Enraizamento *in vitro*** do mamoeiro, composto por 6 tratamentos (0,4 - 0,5 - 0,6 - 0,7 - 0,8 - 0,9 mg.L⁻¹ AIB), com 10 repetições por tratamento, sendo uma repetição igual a um tubo de ensaio, contendo um broto individualizado, usando-se um total de 60 brotos.

O meio de cultura usado foi o MS modificado, contendo a metade da concentração dos macronutrientes, e a concentração total dos micronutrientes e das vitaminas do MS. Os meios de foram suplementados com 20 g.L⁻¹ sacarose, solidificados com 7 g.L⁻¹ ágar e o pH foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem, tendo sido distribuídos 15 mL de meio por tubo de ensaio. As condições da sala de cultura de tecidos foram ajustadas para um fotoperíodo de 16h (lâmpadas fluorescentes brancas e Grolux - 1:1) e temperatura ao redor de 27°C.

A seguir foi montado o **6º Experimento de Enraizamento *in vitro*** do mamoeiro (Tabela 6), composto por meios MS com AIB ou sem AIB, uso de iluminação por lâmpadas fluorescentes brancas e Grolux (1:1) ou apenas por lâmpadas brancas, e uso de cinco concentrações de carvão ativado (0,0 - 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1,0 g.L⁻¹), em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições por tratamento, sendo uma repetição igual a um tubo de ensaio, contendo um broto individualizado, usando-se um total de 60 brotos.

O meio de cultura usado foi o MS completo. Os meios foram suplementados com 20 g.L⁻¹ sacarose, solidificados com 7 g.L⁻¹ ágar e o pH foi ajustado para 5,7

antes da autoclavagem, tendo sido distribuídos 15 mL de meio por tubo de ensaio. As condições da sala de cultura de tecidos foram ajustadas para um fotoperíodo de 16 h. A temperatura da sala de crescimento foi ajustada para cerca de 27°C.

Tabela 6. Tratamentos empregados no 6º Experimento de Enraizamento.

Tipos de Meios de Cultura	Tipos de Lâmpadas Fluorescentes	Concentração de carvão (g.L ⁻¹)
MS sem AIB	Branca e Grolux (1:1)	0,0 - 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1,0
	Branca	0,0 - 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1,0
MS com AIB	Branca e Grolux (1:1)	0,0 - 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1,0
	Branca	0,0 - 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1,0

3.2.1 Análise estatística dos experimentos de enraizamento

No 4º **Experimento de Enraizamento** *in vitro* do mamoeiro, foi usado o delineamento estatístico inteiramente casualizado, sendo composto por 40 tratamentos (Tabela 5), com cinco repetições por tratamento, onde uma repetição é igual a um tubo de ensaio, contendo um broto individualizado, usando-se um total de 200 brotos. Através do Teste Exato de Fisher (ZAR, 1999) foram analisadas as independências de cinco concentrações de AIB (0,25 - 0,5 - 1,0 - 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) na resposta às três possíveis situações de enraizamento (brotos não enraizados e sem formação de calos; brotos normalmente enraizados; ou brotos com formação de calos e raízes anormais), em uma tabela de contingência 5x3. Posteriormente, essa tabela 5x3 foi subdividida em 10 tabelas de contingência 2x3, para identificar a melhor faixa de concentração de AIB. Esse experimento foi realizado com modificações de protocolos previamente descritos por VIANNA (1996), MONDAL et al. (1990), e REUVENI et al. (1990). Pelo Teste de Wilcoxon (ZAR, 1999) foram testados os efeitos do uso do meio sequencial e da concentração dos sais e vitaminas do MS para cada concentração de AIB.

A partir dos resultados obtidos no **4º Experimento de Enraizamento**, executou-se o **5º Experimento de Enraizamento *in vitro*** do mamoeiro, com delineamento estatístico inteiramente casualizado, composto por 6 tratamentos (0,4 - 0,5 - 0,6 - 0,7 - 0,8 - 0,9 mg.L⁻¹ AIB), com 10 repetições por tratamento, sendo uma repetição igual a um tubo de ensaio, contendo um broto individualizado, usando-se um total de 60 brotos. Foi aplicado o Teste Exato de Fisher (ZAR, 1999) em uma tabela de contingência 6x3, testando-se a independência das seis concentrações de AIB com relação às três possíveis situações de enraizamento (brotos não enraizados e sem formação de calos; brotos normalmente enraizados; ou brotos com formação de calos e raízes anormais). Posteriormente subdividiu-se essa tabela 6x3 em 15 tabelas de contingência 2x3, para identificar a melhor concentração de AIB.

3.3. Aclimação em casa de vegetação das plantas cultivadas *in vitro*

As plântulas que enraizaram *in vitro* foram aclimatadas em casa de vegetação, em dezembro de 2001, sob condições controladas de temperatura (27±5 °C), umidade relativa do ar à 60% mantida com nebulização, e 60% de luz natural proporcionada por uma cobertura na casa de vegetação com tela (Aluminet). Foram plantadas em tubetes contendo como substrato areia lavada e esterilizada em estufa à 180 °C por 2 h, e Plantmax HT autoclavado à 121°C por 20 min, na proporção 1:1. Foram irrigadas diariamente com água, e três vezes por semana com a metade da concentração dos sais do MS. O substrato Plantmax HT é composto por cascas processadas enriquecidas, vermiculita expandida, e turfa processada enriquecida.

Alguns brotos foram postos para enraizar *ex vitro*, como microestacas, diretamente em três diferentes tipos de substratos, em badeja de isopor, na casa de vegetação, em dezembro de 2001, sob as mesmas condições ambientais controladas anteriormente descritas. Os substratos são vermiculita expandida autoclavada, areia lavada estéril, e Plantmax autoclavado com areia lavada estéril em proporção (1:1).

3.4. Plantio no campo das plantas aclimatadas em casa de vegetação

As plantas clonadas e aclimatadas em casa de vegetação por 70 dias, foram plantadas no campo em março de 2002, com aproximadamente 15 cm de altura, em covas de 40x40x40 cm, adubadas com esterco bovino curtido misturado com terra, e 100 g de Superfosfato Simples por cova. Após o plantio no campo, as plantas foram irrigadas diariamente com água.

3.5. Marcadores moleculares

3.5.1. Extração de DNA

Os DNAs das amostras testadas com os marcadores RAPD, SCAR e fAFLP, foram extraídos pelo método de SAGHAI-MAROOF et al. (1984), com algumas modificações, estando descrito a seguir:

- 1- Em um tubo de eppendorf de 1,5 mL pesar 0,1g de tecido vegetal previamente macerado em almofariz com nitrôgenio líquido
- 2- Adicionar 650 μ L de tampão de extração CTAB preparado na hora e aquecido à 65°C
- 3- Homogenizar suavemente por inversão
- 4- Incubar em banho à 65°C, por 1 hora e 15 min em banho-maria, agitando o tubo por inversão suavemente de 15 em 15 min
- 5- Deixar esfriar por 10 min
- 6- Adicionar 300 μ L de clorofórmio/octanol (24:1), e agitar suavemente por 8 min
- 7- Centrifugar a 6000 rpm, à 20°C por 10 min
- 8- Coletar o sobrenadante e colocar em outro tubo limpo
- 9- Adicionar 300 μ L de clorofórmio/octanol (24:1), e agitar suavemente por 8 min
- 10-Centrifugar a 6000 rpm, à 20°C, por 10 min
- 11-Coletar o sobrenadante e transferir para outro tubo contendo 5 μ L de RNAase (10 μ g. μ L⁻¹). Misturar suavemente por 4x e deixar em repouso por no mínimo 30 min à 37°C
- 12-Adicionar 600 μ L de isopropanol. Agitar 4x suavemente e deixar em geladeira por 3 horas
- 13-Centrifugar a 10.000 rpm à 5°C por 10 min, e descartar o sobrenadante
- 14-Ressuspender o DNA precipitado em 200 μ L de tampão TE (10:1), por 1 hora em geladeira
- 15-Adicionar 200 μ L de fenol equilibrado. Agitar suavemente por inversão durante 10 min

- 16-Centrifugar a 10.000 rpm, à 20°C por 20 min. Coletar o sobrenadante, e transferir para um tubo novo
- 17-Adicionar 100 µL de clorofórmio/octanol (24:1) e agitar suavemente por 10 min
- 18-Centrifugar a 10.000 rpm, à 20°C por 15 min. Coletar o sobrenadante e transferir para tubo novo
- 19-Adicionar 10 µL de NaCl 5,0 M + 500 µL de etanol absoluto. Agitar suavemente por 4x, e deixar em repouso em geladeira por 1 hora
- 20-Centrifugar a 10.000 rpm, à 5°C por 10 min
- 21-Descartar o sobrenadante, verter o tubo em papel absorvente por 1 a 2 min
- 22-Adicionar ao precipitado 1,0 mL da solução "Wash 1", e deixar em repouso por 20 min
- 23- Descartar a solução "Wash 1" e verter o tubo em papel absorvente por 1 a 2 min
- 24-Adicionar 1,0 mL da solução "Wash 2", e deixar por 10 seg
- 25- Descartar a solução "Wash 2" e verter o tubo para secar em papel absorvente por 5 min, e depois continuar secando em fluxo laminar por 30 min
- 26-Adicionar 30 µL de tampão TE (10:1) e deixar em geladeira por 1 hora para solubilizar o DNA
- 27-Quantificar em espectrofotômetro ($1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ ng DNA}/\mu\text{L}$)
- 28- Armazenar em freezer à -20°C

A quantificação dos DNAs foi realizada em Biofotômetro (Eppendorf), medindo-se a absorbância em contraste com uma amostra de água (branco), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Para estimar a quantidade dos DNAs utilizou-se o padrão onde 1 unidade de densidade ótica (OD) equivale a 50 ng de DNA por µL de solução. A pureza e qualidade dos DNAs foi determinada através da relação $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$. Se a relação está entre 1,8-2,0, a absorção é provavelmente devido a ácidos nucleicos de boa qualidade. Uma relação menor do que 1,8 indica que pode haver proteínas e/ou outros contaminantes na amostra que também são detectados pela UV. Uma relação acima de 2,0 indica que as amostras podem estar contaminadas com clorofórmio ou fenol (SAMBROOK et al., 1989).

- Tampão de Extração CTAB

Para preparar 100 mL de tampão de extração CTAB:

Reagente	Quantidade
Água	65 mL
Tris-HCl 1,0 M pH 7,5	10 mL
NaCl 5,0M	14 mL
EDTA 0,5 M pH 8,0	10 ml
CTAB*	1,0 g
Mercaptoetanol**	1,0 mL

* Adicionar o CTAB somente na hora do uso.

** Não aquecer o mercaptoetanol em banho maria

- Tampão TE (10:1)

Preparo de 100 mL de tampão TE

- Tris-HCl 10 mM pH 8,0

- EDTA 1mM

- Solução “Wash 1”

Preparo de 100 mL de solução “Wash 1”

Etanol absoluto 76 mL

Acetato de sódio 2,5 M 8 mL

Água milli Q 16 mL

- Solução “Wash 2”

Preparo de 100 mL de solução “Wash 2”

Etanol absoluto 76 mL

Acetato de amônio 1M 1 mL

Água milli Q 23 mL

3.5.2. RAPD

LEMOS et al. (2002) com o uso do primer de RAPD UBC210 (5'- GCA CCG AGA G -3'), observaram um fragmento de 438pb presente somente nas plantas hermafroditas, e ausente nas femininas, de *Carica papaya* cultivares Baixinho de Santa Amália, Sunrise Solo, e Improved Sunrise Solo line 72/12. Os mesmos autores isolaram e sequenciaram este fragmento, não tendo encontrado homologia com outras sequências armazenadas no banco de dados BLAST.

No presente trabalho, o primer UBC210 foi testado com as amostras de plantas hermafroditas e femininas do cv. Sunrise Solo, tendo sido testadas as matrizes, a progênie S1, e as plantas clonadas obtidas por cultura de tecidos. Foram testadas também amostras de plantas masculinas e femininas do cv. Cariflora.

A PCR foi realizada em um volume total de 20 μL , contendo Tampão 1x (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM KCl), 2 mM MgCl_2 , 200 μM de cada dNTP, 2,5U Taq DNA polimerase (5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ - Invitrogen), 30 ng do primer UBC210 (25 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 30 ng de DNA genômico (10 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), e água milli-Q autoclavada e filtrada para completar o volume da reação para 20 μL .

As reações foram realizadas em termociclador (PTC-100 Programable Thermal Controller - MJ Research, Inc.), utilizando-se os seguintes ciclos: 1 ciclo a 94°C por 1 min, 35 ciclos (94°C por 1 min, 35°C por 1 min, e 72°C por 2 min), 1 ciclo (94°C por 1 min, 35°C por 1 min, e 72°C por 5 min), e um ciclo final a 5°C.

Após a reação de amplificação, 3 μL do tampão de amostra (40% de glicerol, 0,02% de azul de bromofenol) foram adicionados às amostras. Desta mistura, 15 μL foram aplicados nas canaletas do gel de agarose 1,5%, contendo brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), e submetidas à eletroforese horizontal (100 V constante, por 3 horas) em cuba de eletroforese horizontal da FisherBiotech (FB-SB-2025), conduzida em tampão TEB 1x (Tris-HCl 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, e EDTA 2,5 mM, pH 8,3). O marcador de peso molecular utilizado foi o 1 kb (Invitrogen). Os fragmentos foram visualizados sob luz UV em equipamento de fotodocumentação (GEL DOC 1000-BioRad).

3.5.3. SCAR

De acordo com a sequência de nucleotídeos do marcador UBC210₄₃₈ publicada por LEMOS et al. (2002), foram desenhados primers SCAR de 20 pb forward (5'- GCA CCG AGA GGG CGA GGT TT -3') e reverse (5'- GCA CCG AGA GAA CTA AGA TA-3'). Pode-se observar que a sequência do primer UBC210 (5'- GCA CCG AGA G -3') foi mantida no início das sequências dos primers SCAR (parte em vermelho e sublinhada) e foram acrescentados mais 10 nucleotídeos internos do fragmento sequenciado (parte em vermelho), pois para cada nucleotídeo acrescentado à sequência do primer ocorre um aumento de quatro vezes na especificidade do primer.

1 5'-	<u>GCACCGAGAG</u>	<u>GGCGAGGTTT</u>	GAATTG	GGGT	TGAGTTCCAA	AATACTCAAT	50
51	AAGATAAGCA	ATAATAGAGT	CATACAATAT	GTTATAAAAA	TATTCATTAA		100
101	TGCATAGTTT	AAAGAAAACA	ATGATATGTT	CAACTACCCA	TGTTACTAAA		150
151	CAATATTTCT	ATACCATAAG	GTTTATGCAA	TATCAATTAA	ATAATTTTCA		200
201	TATGATGCAC	AATACCATAT	TCAATAGGTT	TACGTAATAA	ACACATAGAG		250
251	GACTAGGTAC	ATCTTTGAAG	TTTTATTACA	CATTTAAAAT	ATAAATTATG		300
301	TTATATTAAT	TACAATCCTA	CACGTGCAAC	CGCTTCACGT	ATTTCAAAAG		350
351	AGGGTAACCA	GGACACCAAA	CTAGTCAAGG	CTAAGTGCAT	AAATAATTAT		400
401	AATAATATGA	CATAAAATAT	ATATACAATA	<u>TCTTAGTTCT</u>	<u>CTCGGTGC</u>	-3'	448

A princípio foram usados parâmetros de PCR, e concentrações dos componentes da reação de PCR, ainda não otimizados, o que inicialmente resultou no insucesso do uso desta técnica. A princípio testou-se uma reação de PCR de 20 µL, contendo 30 ng de DNA (10 ng.µL⁻¹), 200 µM de cada dNTP, 2,5 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 2,0 mM de MgCl₂ (Invitrogen), Tampão 1x (20 mM Tris-HCl (pH8,4), 50 mM KCl), 30 ng de cada primer SCAR (10 ng.µL⁻¹), e água milli-Q autoclavada e filtrada para completar o volume final de 20 µL.

As reações foram realizadas em termociclador (PTC-100 Programable Thermal Controller - MJ Research, Inc.), utilizando-se os seguintes ciclos: 1 ciclo a 94°C por 1 min, 19 ciclos (94°C por 1 min, 58°C por 1 min, e 72°C por 2 min), 1

ciclo (94°C por 1 min, 58°C por 1 min, e 72°C por 5 min), e um ciclo final a 4°C infinito.

Após a reação de amplificação, 3 µL do tampão de amostra (40% de glicerol, 0,02% de azul de bromofenol) foram adicionados às amostras. Desta mistura, 15 µL foram aplicados nas canaletas do gel de agarose 1,5%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg.mL⁻¹), e submetidas à eletroforese horizontal (100 V constante, por 3 horas) em cuba de eletroforese horizontal da FisherBiotech (FB-SB-2025), conduzida em tampão TEB 1x (Tris-HCl 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, e EDTA 2,5 mM, pH 8,3). O marcador de peso molecular utilizado foi o 1 kb (Invitrogen). Os fragmentos foram visualizados sob luz UV em equipamento de fotodocumentação (GEL DOC 1000 - BioRad).

A seguir foram otimizados os parâmetros do programa do termociclador, e também as concentrações dos componentes da reação de PCR. As condições ótimas foram encontradas com o uso de uma reação de PCR de 20 µL, contendo 15 ng de DNA, 100 µM de cada dNTP, 1,25 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), Tampão 1x (20mM Tris-HCl (pH8,4), 50 mM KCl), 5 ng de cada primer SCAR (10 ng/µL), e água milli-Q autoclavada e filtrada para completar o volume final de 20 µL. Os DNAs foram amplificados com o PCR "touchdown".

Após a reação de amplificação, 3 µL do tampão de amostra (40% de glicerol, 0,02% de azul de bromofenol) foram adicionados às amostras. Desta mistura, 20 µL foram aplicados nas canaletas do gel de agarose 1,5%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg.mL⁻¹), e submetidas à eletroforese horizontal (100 V constante, por 3 horas) em cuba de eletroforese horizontal da FisherBiotech (FB-SB-2025), conduzida em tampão TEB 1x (Tris-HCl 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, e EDTA 2,5 mM, pH 8,3). O marcador de peso molecular utilizado foi o 1 kb (Invitrogen). Os fragmentos foram visualizados sob luz UV em equipamento de fotodocumentação (GEL DOC 1000 - BioRad).

No programa de PCR " touchdown" foram usados os seguintes parâmetros:

Início		Ciclo		Número de Ciclos
94°C 3min	94°C 1 min	65°C 1 min	72°C 1 min	2
-	94°C 1 min	64°C 1 min	72°C 1 min	2
-	94°C 1 min	63°C 1 min	72°C 1 min	2
-	94°C 1 min	62°C 1 min	72°C 1 min	2
-	94°C 1 min	61°C 1 min	72°C 1 min	2
-	94°C 1 min	60°C 1 min	72°C 1 min	2
-	94°C 1 min	59°C 1 min	72°C 1 min	2
-	94°C 1 min	58°C 1 min	72°C 1 min	2
-	94°C 1 min	57°C 1 min	72°C 1 min	2
-	94°C 1 min	56°C 1 min	72°C 1 min	2
-	94°C 1 min	55°C 1 min	72°C 1 min	2
-	94°C 1 min	54°C 1 min	72°C 1 min	2
-	94°C 1 min	53°C 1 min	72°C 1 min	2
-	94°C 1 min	52°C 1 min	72°C 1 min	2
-	94°C 1 min	51°C 1 min	72°C 1 min	2
-	94°C 1 min	50°C 1 min	72°C 1 min	15
-	-	-	72°C 5 min	1
4°C infinito				1

3.5.4. fAFLP

De acordo com o AFLP Plant Mapping Protocol da Applied Biosystems (1997), com algumas modificações:

Preparo do DNA Molde e ligação dos Adaptadores: o primeiro passo da técnica fAFLP é a geração de fragmentos de restrição pelo uso de duas endonucleases de restrição (EcoRI e MseI). Os adaptadores vindos em cada kit são ligados nas extremidades dos fragmentos de DNA, gerando um DNA molde para a subsequente amplificação por PCR.

Amplificação Pre-seletiva: as sequências dos adaptadores e o sítio de restrição servem como um local de ligação do primer para uma subsequente seleção de baixo nível ou amplificação pre-seletiva dos fragmentos de restrição.

O primer complementar MseI contém uma Citosina na extremidade 3'. O primer complementar EcoRI contém uma Adenina na extremidade 3'. Apenas aqueles fragmentos genômicos que tenham um adaptador em cada extremidade amplificam exponencialmente durante a amplificação por PCR. Esse passo efetivamente "purifica" o alvo a partir de sequências que amplificam apenas linearmente, ou seja, aquelas com uma extremidade modificada.

Amplificação Seletiva: Amplificações adicionais por PCR são feitas para reduzir a complexidade da mistura de tal modo que possa ser resolvida em um gel de poliacrilamida. Essas amplificações usam primers escolhidos a partir de 24 possíveis primers AFLP seletivos (oito primers MseI, 8 primers EcoRI para plantas com genomas de tamanho regular e 8 primers EcoRI para plantas com genomas de tamanho pequeno). Após a amplificação por PCR com esses primers, uma porção de cada amostra é analisada em um Sequenciador de DNA da Perkin-Elmer Applied Biosystems.

A amplificação seletiva com um primer EcoRI e um primer MseI amplifica principalmente fragmentos com extremidades EcoRI-MseI. Os fragmentos com extremidades EcoRI-EcoRI não amplificam bem. Os fragmentos MseI-MseI não são visualizados porque eles não contêm a marcação com corantes fluorescentes. Apenas os fragmentos contendo extremidade EcoRI são detectados. Genomas

individuais produzem distintos perfis de fragmentos de restrição com cada par de primer de amplificação.

A seguir está o protocolo já com as modificações feitas durante o curso dado pela Perkin-Elmer no protocolo original do kit AFLP Plant Mapping da Perkin-Elmer.

- Antes de Iniciar um Experimento de fAFLP

- 1- Digerir 1-3 μg de DNA genômico com as enzimas MseI e EcoRI separadamente, e também conjuntamente
- 2- Correr os produtos da digestão e também 1 μg do DNA não digerido da amostra em um minigel de agarose 1,5% com marcadores moleculares padrão como 1 kb e 100 pb
- 3- Corar com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)
- 4- Visualizar em luz UV

- Preparo de amostras para a Amplificação Pre-seletiva e Seletiva:

- a) Preparar as reações de restrição
- b) Anelar os pares dos adaptadores
- c) Preparar as reações de ligação
- d) Diluir as reações de ligação

a) Preparo das Reações de Restrição (para 1 amostra)

A reação de restrição prepara o molde para os adaptadores, e então liga-se o par de adaptadores ao DNA molde já preparado.

- 1- Misturar o seguinte em um tubo de 0,5 mL
 - DNA 5,5 μL (500 ng)
 - EcoRI 0,5 μL (10 $\text{U}.\mu\text{L}^{-1}$ - Invitrogen)
 - MseI 0,2 μL (5 $\text{U}.\mu\text{L}^{-1}$ - Invitrogen)
 - Tampão React1 2,5 μL (10x - Invitrogen)
 - Água milli-Q 16,3 μL (autoclavada e filtrada)

- 2- Misturar, e então espinar por 10 seg
- 3- Incubar à 37°C por 3 horas, em termociclador
- 4- Inativar as enzimas à 70°C por 15 min
- 5- Correr um gel de agarose 1,5% para verificar se houve a restrição das amostras, aplicando apenas 11 µL do DNA digerido

Em outro tubo, o mesmo procedimento também deve ser feito com 5,5 µL do DNA controle de tomate (0,1 µg.µL⁻¹) que já vem no kit

Observação: É importante usar preparações com altas concentrações de enzimas para evitar que exceda 5% de glicerol nas reações, para prevenir a atividade estrela da EcoRI, quando a enzima passa a restringir sítios diferentes do seu sítio de restrição.

b) Anelamento dos Pares de Adaptadores (para 1 amostra)

- 1- Pegar os tubos contendo o par adaptador da EcoRI e o par adaptador da MseI
- 2- Retirar uma alíquota de 0,5 µL de cada adaptador, e por em tubos separados
- 3- Aquecer os tubos em termociclador à 95°C por 5 min
- 4- Deixar os tubos esfriarem em temperatura ambiente por um período superior a 10 min
- 5- Espinar em uma microcentrífuga por 10 seg
- 6- Misturar os dois adaptadores em um único tubo

c) Preparo das Reações de Ligação dos Adaptadores após a Restrição (para 1 amostra)

- 1- Preparar um mix contendo:
 - DNA digerido 11,5 µL
 - Tampão T4 DNA Ligase* 4,0 µL (5x - Invitrogen)
 - T4 DNA Ligase 1,0 µL (1 U.µL⁻¹ - Invitrogen)
 - Adaptador EcoRI 0,5 µL (previamente anelado à 95°C por 5 min)
 - Adaptador MseI 0,5 µL (previamente anelado à 95°C por 5 min)
 - Água milli-Q 2,5 µL (autoclavada e filtrada)

- 2- Manter à 20°C por 2 horas em termociclador
- 3- Diluir 20x as reações de ligação em TE_{0,1} (20 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0)
- 4- Estocar a mistura em em 2-6°C por no máximo 1 mês, ou em -15 a -25°C por mais de 1 mês

*Tampão 5x da T4 DNA Ligase contendo ATP: 250mM Tris-HCl (pH 7,6), 50mM MgCl₂, 5mM ATP, 5 mM DTT, 25% (p/v) polietilenoglicol-8000

- Amplificação das sequências marcadas, deve-se:

- a) Fazer a amplificação pre-seletiva
- b) Correr um gel de agarose com as amostras para verificar se houve sucesso na reação de amplificação pre-seletiva
- c) Preparar o produto da amplificação pre-seletiva para a amplificação seletiva
- d) Fazer a amplificação seletiva

d) Amplificação Pre-seletiva (para 1 amostra)

As sequências com os adaptadores ligados nas duas extremidades amplificam exponencialmente e predominam no produto final. Deve-se manter todos os reagentes e tubos no gelo até que sejam levados ao termociclador.

- 1- Misturar em um tubo para a reação de PCR:
 - 4,0 µL do DNA diluído preparado a partir das reações de restrição e ligação
 - 1,0 µL da mistura dos primers preseletivos AFLP EcoRI e MseI
 - 15,0 µL do AFLP Core Mix
 - 2- Por as amostras em um termociclador e correr o seguinte programa de PCR
- Parâmetros do termociclador para a amplificação pre-seletiva

Início	20 Ciclos			Fim	
72°C 2 min	94°C 30 Seg	56°C 1 min	72°C 2 min	60°C 30 min	4°C infinito

- 3- Estocar as amostras em 2-6°C após a amplificação pre-seletiva

e) Verificação do Sucesso da Amplificação Pre-seletiva

Correr um gel de agarose para ver se ocorreu a amplificação pre-seletiva.

- 1- Correr 10 μL de cada reação de amplificação pre-seletiva em um gel de agarose 1,5% em tampão 1x TEB em 4V/cm por 3-4 horas
- 2- Corar o gel com brometo de etídio
- 3- Visualizar o gel em um transiluminador com UV. Uma mancha na forma de arraste do produto de 100-1500pb deve ser claramente visível.

Observação: Como o produto da reação do PCR pre-seletivo não foi visível em gel de agarose, não foi feita a etapa subsequente de diluição 20x em $\text{TE}_{0,1}$, executando-se a etapa seguinte de amplificação seletiva

f) Reação de Amplificação Seletiva

- 1- Combinar em tubo tipo eppendorf de 0,2 mL para a reação de PCR:
 - 3,0 μL do produto de reação de amplificação pre-seletiva (sem diluição)
 - 1,0 μL do EcoRI (Primer-Axx - Marcado por fluorescência)
 - 1,0 μL do MseI (Primer-Cxx)
 - 15,0 μL do AFLP Core Mix
- 2- Correr um PCR usando os parâmetros de termociclador mostrados a seguir:

Início		Ciclo		Número de Ciclos
94°C 2min	94°C 1 min	66°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 1 min	65°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 1 min	64°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 1 min	63°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 1 min	62°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 1 min	61°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 1 min	60°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 1 min	59°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 1 min	58°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 1 min	57°C 1 min	72°C 2 min	1
-	94°C 30 seg	56°C 1 min	72°C 2 min	20
60°C				1
30 min				
4°C				1
infinito				

3- Guardar o produto da amplificação seletiva à 2-6°C

- Aplicação das Amostras e Eletroforese no ABI PRISM 377 DNA Sequencer:

1- Preparar um “mix” contendo:

- 1,5 µL de formamida deionizada
- 0,3 µL de blue dextran
- 0,6 µL do padrão interno de peso molecular GeneScan-500 [ROX] marcado por fluorescência com a cor vermelha

2- Adicionar 2,4 µL do mix em um tubo de PCR para cada amostra

3- Para correr apenas uma reação por canaleta, adicionar ao tubo 0,5 µL do produto de amplificação seletiva marcado por fluorescência com uma das três cores possíveis, a saber, amarela (NED), azul (FAM) ou verde (JOE), a depender do conjunto de primer marcado que for usado. Para correr 3 reações em uma mesma canaleta, adicionar 0,6 µL do produto de amplificação seletiva marcado por fluorescência com a cor amarela (NED), 0,4 µL do marcado com a cor azul (FAM) e 0,4 µL do marcado com a cor verde (JOE). É vantajoso correr 3 reações em uma mesma canaleta, porque isso possibilita que sejam aplicadas um maior número de amostras em cada placa de corrida.

4- Aquecer os tubos a 95°C por 3 min

5- Por rapidamente em gelo

6- Aplicar 1,5 µL de cada amostra em um gel 5% denaturante Long Ranger usando TEB 1X como tampão de corrida

7- Usar uma placa de sequenciamento de 36 cm, e 3 horas de tempo de corrida, a 2500V

O padrão interno de peso molecular GeneScan-500[ROX] usado no fAFLP, é marcado por fluorescência com a cor vermelha (ROX), possuindo 15 fragmentos com os seguintes comprimentos (pb): 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250*,300, 340, 350, 400, 450, 490 e 500. (* O pico 250 pb não é levado em conta na hora da análise do gel feita através dos softwares GeneScan e Genotyper).

- Combinações dos Primers Marcados por Fluorescência

No protocolo do AFLP Plant Mapping são dadas as 64 possíveis combinações de primers EcoRI e MseI, sendo que apenas os primers EcoRI são marcados por fluorescência na extremidade 5' com uma das três diferentes cores, a saber, amarela (NED), azul (FAM) ou verde (JOE), a depender do primer EcoRI usado. Foram testadas 18 combinações de primers, sendo 6 primers com marcação azul (FAM), 6 com marcação amarela (NED) e 6 com marcação verde (JOE).

Combinações de primers (EcoRI-MseI) testadas com o fAFLP

FAM	NED	JOE
ACA - CAT	AAC – CAG	AAG - CAG
ACA - CTA	ACC – CAG	ACG - CAG
ACA - CTC	AGC – CAG	AGG - CAG
ACT - CAG	AAC – CAT	AAG - CAT
ACT - CAT	ACC – CAT	ACG - CAT
ACT - CTC	AAC-CTA	AAG - CTA

Para testar os primers foram usadas 4 amostras de DNA, sendo duas pertencentes ao cv. Sunrise Solo, com uma planta matriz hermafrodita e a uma planta matriz feminina, e duas ao cv. Cariflora sendo uma planta masculina e a uma planta feminina. O cv. Cariflora produz plantas masculinas e femininas, em proporção 1:1, não produzindo plantas hermafroditas, além de ser altamente tolerante ao Papaya Ringspot Virus – PRV (CONOVER et al., 1986), enquanto o cv. Sunrise Solo em plantios comerciais é ginodióico, ou seja produz plantas hermafroditas e femininas em proporção 2:1, não produzindo plantas masculinas.

A partir dos resultados obtidos com os testes preliminares com as 18 combinações de primers fAFLP, foi escolhido o primer AAG-CAT (JOE), para repetir o fAFLP agora com 39 amostras listadas a seguir, aplicadas apenas nas canaletas (Can) ímpares do gel fAFLP, sendo (H) hermafrodita, (F) feminina, e (M) masculina.

Tabela 7. Amostras hermafroditas e femininas do cv. Sunrise Solo, e masculinas e femininas do cv. Cariflora, amplificadas com o primer AAG-CAT (JOE), e aplicadas no gel fAFLP

Can	Código	Descrição	Can	Código	Descrição
01	146H-S1	Sunrise H - S1	41	CF4	Cariflora F
03	147H-S1	Sunrise H - S1	43	CF4.1	Cariflora F
05	149H-S1	Sunrise H - S1	45	CF5	Cariflora F
07	150H-S1	Sunrise H - S1	47	CF5.1	Cariflora F
09	151H-S1	Sunrise H - S1	49	20H-CI1	Sunrise H - Clone 1
11	155H-S1	Sunrise H - S1	51	154F-CI2	Sunrise F - Clone 2
13	142.1F-S1	Sunrise F - S1	53	26F-CI3	Sunrise F - Clone 3
15	142.2F-S1	Sunrise F - S1	55	20H-CI4	Sunrise H - Clone 4
17	142.3F-S1	Sunrise F - S1	57	155H-CI5	Sunrise H - Clone 5
19	152F-S1	Sunrise F - S1	59	26F-CI6	Sunrise F - Clone 6
21	153F-S1	Sunrise F - S1	61	SH3.1-Matriz	Sunrise H - Matriz
23	154F-S1	Sunrise F - S1	63	SH3.2-Matriz	Sunrise H - Matriz
25	CM2	Cariflora M	65	SH9-Matriz	Sunrise H - Matriz
27	CM3	Cariflora M	67	SH12-Matriz	Sunrise H - Matriz
29	CM6	Cariflora M	69	20H-S1	Sunrise H - S1
31	CM6.1	Cariflora M	71	26F-S1	Sunrise F - S1
33	CM7	Cariflora M	73	Tomate	DNA padrão
35	CM7.1	Cariflora M	75	Tomate	DNA padrão
37	CF1	Cariflora F	77	Tomate	DNA padrão
39	CF1.1	Cariflora F			

A planta 20H-S1 deu origem aos clones 1 e 4; a planta 26F-S1 deu origem aos clones 3 e 6; a planta 154F-S1 deu origem ao clone 2; e a planta 155H-S1 deu origem ao clone 5. A planta SH12-Matriz deu origem a 20H-S1; a planta SH9-Matriz deu origem a 26F-S1; a planta SH3-Matriz originou 154F-S1 e 155H-S1.

- Análise dos Dados de um Gel de fAFLP

Os dados obtidos após a corrida do gel de fAFLP são analisados com o auxílio de dois softwares:

- GeneScan Analysis Software: que coleta os dados obtidos dos produtos amplificados no gel de eletroforese fAFLP
- Genotyper DNA Fragment Analysis Software: usa como fonte de análise os dados obtidos através do software GeneScan, gerando eletroferogramas e tabelas binárias de presença (1) e ausência (0) de bandas

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cultivo no campo

A identificação do sexo das plantas S1, através das flores, só foi possível no final fevereiro de 2000, ou seja 4 meses após o plantio no campo, quando foram identificados os sexos de 164 plantas S1. Das 200 mudas inicialmente plantadas, 36 haviam morrido, 116 eram hermafroditas e 48 femininas como pode ser visto no croqui abaixo, onde as plantas S1 hermafroditas estão identificadas com a letra “H” cor preta, as femininas com “F” cor vermelha e as mortas com “M” cor azul (Tabela 8).

Tabela 8. Croqui mostrando a identificação do sexo das plantas S1.

Linhas	Fileiras							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1		144H	136H	91H	25H	142F	170H	14M
2		27F	61F	185H	118H	176H	20H	112M
3		29H	28H	131H	160H	31H	151H	8M
4		53M	50H	133H	98M	171H	113H	156F
5	46F	173H	108H	12H	48H	56F	9F	82M
6	72H	199M	186M	99H	60H	155H	69F	180F
7	162H	17H	126H	19H	150H	195M	141F	89H
8	35H	78F	40H	184H	130F	26F	55H	81F
9	44F	95H	75H	62H	169F	125H	158H	65F
10	110M	100H	2H	70H	121H	120H	147H	41F
11	114M	74F	182H	63F	7H	21M	187M	128F
12		117M	94F	193H	87M	196M	179H	140H
13		43H	115H	52H	37M	129H	3H	49F
14		103H	152F	197F	22F	77M	122H	18H
15		174F	194H	54M	73F	105F	59H	190H
16		111H	163F	101M	124H	16H	90H	153F
17		154F	132F	148F	191F	47M	6H	11H
18		79M	127H	172H	119M	178H	97H	66H
19		34H	36F	188M	58H	4H	159H	164H
20		13H	30H	157F	68M	183H	175F	32H
21		167F	67H	116H	165F	145H	83H	1H
22		92H	139M	181H	104M	51H	166H	64M
23		177F	149H	138M	134H	80H	24F	168F
24		200M	76F	71H	109H	198H	102H	10H
25		143H	189M	23H	39H	33H	192H	42H
26		106M	45H	85M	88H	84F	123H	107M
27			86F	93H	96F	38H	15H	146H
28				161H	135M	57H	137M	5F

Esses resultados são condizentes com os da literatura, pois neste trabalho existem aproximadamente 2,4 plantas hermafroditas para cada planta feminina, e pela literatura, quando flores hermafroditas de mamão são autofecundadas espera-se na S1 uma proporção de 2 plantas hermafroditas para cada planta feminina, devido à segregação genética (STOREY, 1938; HOFMEYR, 1938). Pode-se notar pelo croqui que muitas vezes coincidentemente várias plantas femininas aparecem juntas, acarretando prejuízos ao produtor, muito embora na prática os produtores plantem três mudas por cova, eliminando 4 meses após o plantio no campo as de sexo feminino, o que pode amenizar o problema, mas não erradicá-lo totalmente.

A princípio não foram observados frutos com as deformações que tipicamente podem ocorrer em frutos oriundos de plantas hermafroditas, quando estas são submetidas a estresse causado principalmente por temperaturas baixas ou oscilações constantes na temperatura. Se a princípio não havia frutos deformados com carpeloidia (tipo “cara de gato”) nem com pentandria carpelóide, era um sinal de que em geral as flores hermafroditas eram do tipo perfeita normal alongada Tipo IV de acordo com a classificação feita por STOREY (1941). A princípio ainda não haviam surgido frutos deformados porque os mamoeiros ainda não haviam enfrentado baixas temperaturas, visto que foram plantados no campo no fim de outubro de 1999, e até junho de 2000 ainda não haviam ocorrido quedas de temperatura suficientes para causar deformações nas flores e consequentemente nos frutos que delas se originassem.

O sexo das plantas pode ser identificado, quatro meses após o plantio no campo (Figura 1A). Mais ou menos na mesma época ocorreu um ataque de varíola, cujos sintomas podem ser vistos na Figura 1B.



Figura 1. (A) Plantas S1 do cv. Sunrise Solo, 4 meses após o plantio, em espaçamento 3x2, crescendo em condições de campo, (B) Folha de uma planta S1, com sintomas de varíola, apresentando manchas escuras na parte inferior.

Nas Figura 2.1 e 2.2, pode-se ver com detalhe as diferenças morfológicas entre as plantas, flores e frutos masculinas (A-B), hermafroditas (C-E) e femininas (F-H).



Figura 2.1. (A) Flores masculinas, (B) frutos masculinos ("mamão de corda").



Figura 2.2. (C) Planta, (D) flor, e (E) frutos hermafroditas piriformes; (F) Planta, (G) flor, e (H) frutos femininos arredondados.

Até a primeira quinzena do mês de julho de 2000 não havia frutos com anomalias no experimento de campo, mas de 17 a 21 de julho de 2000 ocorreram fortes geadas no Estado de São Paulo e em Jaboticabal, e os mamoeiros foram muito afetados, tendo perdido praticamente todas as folhas (Figura 3 A-B), os frutos também foram muito prejudicados, e daí em diante começaram a surgir frutos com várias deformidades (Figura 3 C). De acordo com os dados fornecidos

pela Estação Agroclimatológica da FCAV/UNESP, as temperaturas mínimas de relva, no período de 17 a 21 de julho de 2000 foram : -4,3; -2,1; 3,6; 1,6; e -0,2 °C, respectivamente, demonstrando a gravidade dos danos causados pelas geadas ocorridas neste período.



Figura 3. (A-B) Plantas sem folhas e bastante debilitadas, um mês após as geadas, (C) Frutos com deformidades em consequência das geadas.

Logo em seguida à geada, como as plantas estavam muito debilitadas, houve um ataque de ácaros brancos, e os ponteiros das plantas que já haviam

sido danificados pela geada foram mais danificados ainda, pois os ácaros brancos atacaram justamente os ponteiros das plantas, onde as novas folhas estavam começando a nascer nas plantas que pareciam mostrar os primeiros sinais de recuperação (Figura 4 A). Em consequência disso, os ponteiros de quase todas as plantas foram destruídos e as gemas laterais começaram a brotar, modificando totalmente a arquitetura das plantas, que passaram a ter um caule com várias bifurcações e não mais um caule único (Figura 4 B). Para combater o ataque dos ácaros brancos foi aplicado o acaricida Vertimec, que mostrou ser bastante eficiente no controle dos ácaros, muito embora não tenha os eliminado totalmente, e também não causou problemas de fitotoxicidade.

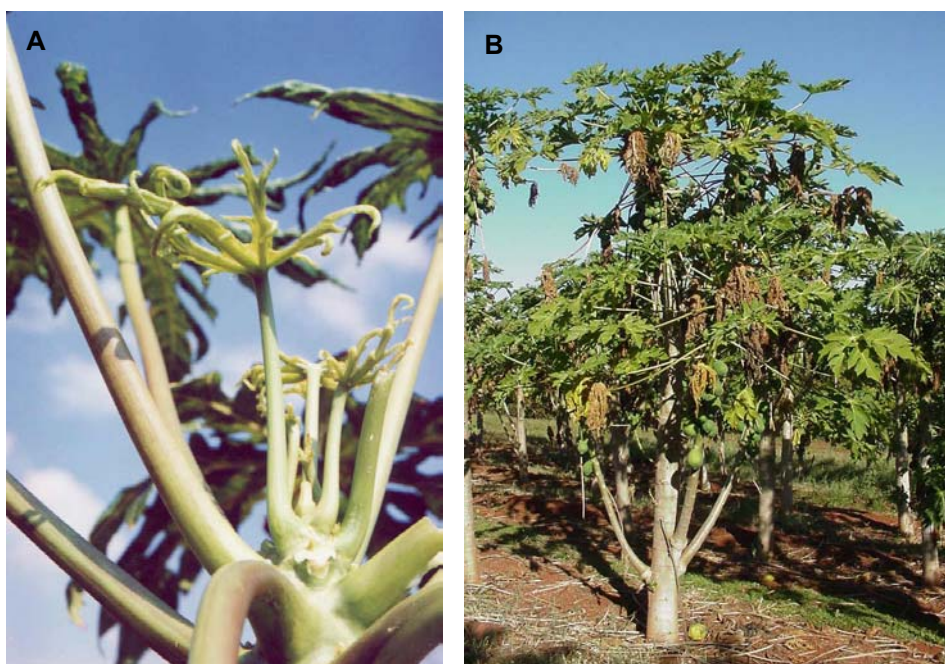


Figura 4. (A) Ponteiro de um mamoeiro com folhas mais novas mostrando sintomas do ataque de ácaros brancos, um mês após as geadas; (B) Mamoeiro com o caule bifurcado, após 10 meses dos danos sofridos no ponteiro, causados pelas geadas e pelos ácaros.

Dez meses após as geadas, foi possível observar que as plantas hermafroditas além de frutos normais, apresentam frutos com vários tipos de anomalias, como frutos carpelóides (flores Tipo III), com pentandria (flores Tipo II), e frutos alongados cilíndricos com curvatura de acordo com NAKASONE e

LAMOUREUX (1982) (Figura 5 A-F), enquanto as plantas femininas apresentam frutos perfeitamente normais, com o típico formato mais arredondado (Figura 6), provenientes de flores Tipo I de acordo com a classificação de STOREY (1941).



Figura 5. Plantas hermafroditas apresentando frutos com várias anomalias. (A-B) Frutos carpelóides “cara de gato”; (C-D) Frutos com pentandria; (E-F) Frutos alongados cilíndricos com curvatura.



Figura 6. Frutos normais de uma planta feminina, dez meses após as geadas.

Os dados obtidos no presente trabalho vêm a corroborar as informações da literatura (STOREY, 1941; NAKASONE e LAMOUREUX, 1982), onde já havia sido relatado que as plantas femininas são fenotipicamente estáveis, não sofrendo alterações nas flores e frutos devido a estresses ambientais, enquanto as plantas hermafroditas seriam fenotipicamente instáveis, apresentando alterações nas flores e frutos devido a estresses causados por temperaturas muito baixas ou muito altas, e déficits hídricos ou nutricionais.

As plantas femininas apresentavam em média 38 frutos normais/planta (100%) e nenhum fruto com anomalia, enquanto as hermafroditas apresentavam em média por planta: 27 frutos normais (77%), 6,5 frutos alongados cilíndricos com curvatura (18,6%), 1,25 fruto carpelóide (3,6%), e 0,25 fruto com pentandria (0,7%). Das 164 plantas que estavam vivas antes das geadas e ataques de ácaros brancos, aproximadamente 30 morreram (18%), restando aproximadamente 134 mamoeiros vivos. No verão, na época das chuvas, ocorreu a doença varíola, que ataca principalmente as folhas mais velhas, tendo sido controlada com a aplicação

do fungicida Cerconil. Várias plantas também foram atacadas pelo vírus do mosaico do mamoeiro.

Com a constatação de que as plantas femininas são fenotipicamente muito mais estáveis do que as hermafroditas, sendo tão produtivas quanto, a conclusão mais lógica leva a crer que poderia se tentar fazer uma campanha de marketing a favor do fruto produzido pelas plantas femininas, mostrando aos consumidores todas as vantagens que ele apresenta, embora tenha a polpa um pouco menos espessa, a cavidade interna um pouco maior e um formato mais arredondado do que o fruto produzido pelas plantas hermafroditas.

4.2. Cultivo *in vitro*

O resultado de como ficaram as plantas decepadas pode ser visto na Figura 7A, e um detalhe do ápice caulinar coletado no campo com aproximadamente 3,0 cm de altura (Figura 7 B).



Figura 7. (A) Planta S1 decepada já com brotações laterais, (B) Ápice caulinar com 3,0 cm de comprimento.

Nos 1º e 2º Experimentos de Desinfestação montados, com um total de 420 ápices inoculados individualmente em tubos de ensaio, houve perda praticamente total devido a contaminações bacterianas e morte dos explantes (Figura 8 A-C).

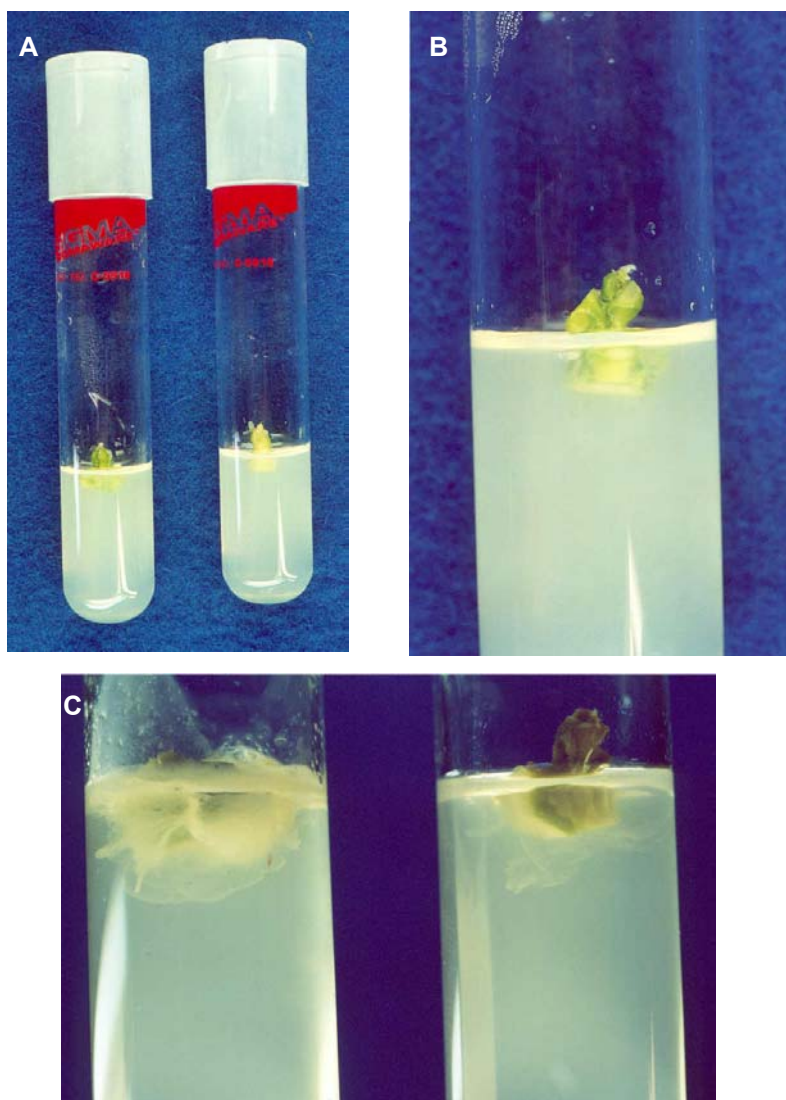


Figura 8. (A-B) Ápices inoculados in vitro, com 10 mm de altura (1º Experimento de Desinfestação), (C) Contaminação bacteriana endogêna nos ápices inoculados com 10 mm de altura.

No **1º Experimento de Desinfestação**, dos 240 ápices inoculados com 10 mm de altura, 127 contaminaram com bactéria endógena, e 111 morreram provavelmente devido às agressões causadas pelos produtos usados na desinfestação, tendo sobrevivido apenas 2 ápices caulinares, sendo que um deles formou calo cor branca translúcida. De acordo com VIANNA (1996) as bactérias endógenas que causam as contaminações durante a micropropagação do mamoeiro são as *Pseudomonas* sp.

No **2º Experimento de Desinfestação**, dos 180 ápices inoculados com 5 mm de altura em meio MS com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, 45 contaminaram com bactéria endógena e 135 morreram. Pode-se observar que a redução do tamanho dos ápices de 10 mm para 5 mm, diminuiu bastante a taxa de contaminação dos explantes, porém o número de ápices mortos aumentou.

Como o principal problema passou a ser o alto índice de morte dos explantes e não mais a contaminação bacteriana endógena, foi montado um **3º Experimento de Desinfestação**, onde foram testados 7 tratamentos, concluindo-se que o melhor foi o Tratamento 6, onde todos os ápices sobreviveram, não contaminaram e estavam com bom aspecto, ou seja folhas primordiais bem verdes, enquanto em outros tratamentos os ápices apresentavam mau aspecto, ou seja folhas primordiais esbranquiçadas.

Nota-se que em todos os tratamentos onde foi usada Q-boua com 20% v/v ou em maior porcentagem, os ápices sempre apresentam mau aspecto, ou seja as folhas primordiais ficam brancas, indicando que deve ter ocorrido a morte do meristema, e não crescem mais novas folhas, concluindo-se que a principal causa de morte dos explantes foi a porcentagem de Q-boua usada e o tempo em que os explantes ficaram imersos nela. No Tratamento 7 onde a rifampicina (50 mg.L^{-1}) só foi usado no meio de cultura, mostrou-se eficaz no controle da contaminação bacteriana, embora os ápices apresentem mau aspecto provavelmente devido ao uso da Q-boua 20% v/v, merecendo mais estudos. O resultado de todos os tratamentos pode ser visto na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados obtidos no 3º Experimento de Desinfestação

Tratamentos	Vivo Sem Cont.	Morto Sem Cont.	Morto Com Cont.	Vivo Com Cont.
1) Q-boia 100% v/v 10 min Meio com ½ MS, sem BAP	3 mau aspecto	0	0	2 mau aspecto
2) Q-boia 50% v/v 10 min Meio com ½ MS, sem BAP	0	1	2	2 mau aspecto
3) Q-boia 20% v/v 15 min Meio com ½ MS, sem BAP	0	1	2	2 mau aspecto
4) Q-boia 5% v/v 15 min Meio com ½ MS, sem BAP	2 bom aspecto	0	0	3 bom aspecto
5) Rifampicina por 20h em 1/4 MS Q-boia 12% v/v 10 min Meio com ½ MS, sem BAP	4 bom aspecto	1	0	0
6) Rifampicina por 20h em 1/4 MS Q-boia 12% v/v 10 min Meio MS inteiro, com 0,5 mg.L ⁻¹ BAP	5 bom aspecto	0	0	0
7) Q-boia 20% v/v 15 min Meio com ½ MS, sem BAP, Adicionado de Rifampicina (50 mg.L ⁻¹)	5 mau aspecto	0	0	0

Observou-se que no Tratamento 5, apesar dos ápices estarem inicialmente com bom aspecto, com o passar dos dias não houve o crescimento das folhas primordiais, indicando que o BAP juntamente com o MS completo parecem ser essenciais na fase de estabelecimento dos explantes, visto que no Tratamento 6 os ápices estão em pleno desenvolvimento com o surgimento de novas folhas, e a única diferença entre os Tratamentos 5 e 6, é que no Tratamento 6 foi usado o MS completo com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, enquanto no Tratamento 5 foi usado a metade da concentração dos sais e vitaminas do MS, omitindo-se o BAP.

O protocolo de desinfestação usado nos Tratamentos 5 e 6 é baseado no protocolo proposto por REUVENI et al. (1990), que trabalharam com três clones de mamoeiro dióico de polinização aberta, crescidos em casa de vegetação e em condições de campo, concluindo que a agitação dos ápices a 100 rpm durante 24 horas, em solução contendo rifampicina (300 mg.L⁻¹), seguida da imersão dos ápices em hipoclorito de sódio (0,6%) contendo Tween 20 (0,1%), foi o tratamento mais eficiente na redução da contaminação dos ápices obtidos a partir das plantas

crescidas em casa de vegetação, chegando a obter cerca de 90% de sucesso, mas também concluíram que este protocolo não foi eficiente na desinfestação dos ápices obtidos a partir de plantas crescidas em condições de campo.

Por outro lado, VIANNA et al. (1997) trabalhando com a micropropagação de mamoeiro do grupo Formosa, crescido em condições de campo, e usando o mesmo protocolo proposto por REUVENI et al. (1990), obtiveram sucesso de 70% na desinfestação dos ápices caulinares, indicando que este protocolo também é eficiente na desinfestação de explantes oriundos de plantas crescidas no campo. Ambos autores concluíram que a rifampicina (50 mg.L^{-1}) adicionada ao meio de cultura também foi eficiente no controle da contaminação bacteriana.

A partir do **4º Experimento de Desinfestação**, montado em maio de 2000, foi possível obter explantes de mamoeiros hermafroditas e femininos sem nenhum tipo de contaminação por bactérias endógenas *Pseudomonas* sp., mostrando que o protocolo de desinfestação (Tratamento 6), baseado na imersão dos explantes por 20 h em solução do antibiótico rifampicina (300 mg.L^{-1}), seguida da imersão em hipoclorito de sódio (0,6%) por 10 min (REUVENI et al., 1990), foi eficiente na desinfestação dos explantes provenientes de plantas S1 crescendo em condições de campo, já com o sexo identificado e bem definido. Foram inoculados 195 ápices e destes, apenas 51 sobreviveram sem contaminação, com bom aspecto, e folhas primordiais bastante verdes e em desenvolvimento, notando-se inclusive o surgimento de algumas folhas primordiais novas, correspondendo a 26% dos ápices inoculados (Figura 9 A-C). Por outro lado, foi muito alto o índice de ápices mortos sem contaminação, chegando ao número de 93, o que corresponde a 48% do total de ápices inoculados. O número de mortos contaminados foi 22 (11%), e o de vivos contaminados foi 29 (15%).

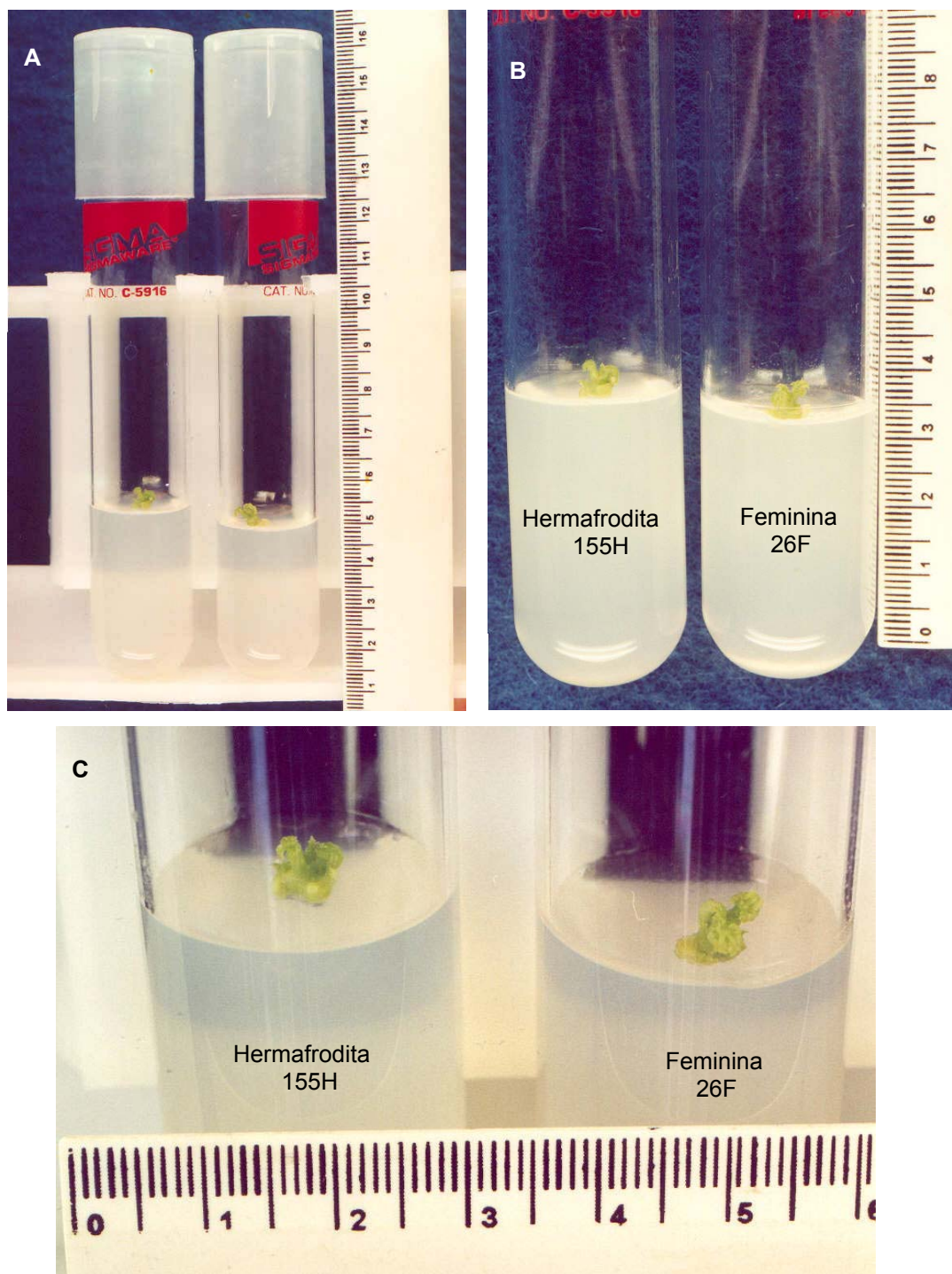


Figura 9. (A e B) Ápices inoculados com 5 mm no 4º Experimento de Desinfestação, (C) Detalhe de dois ápices inoculados no 4º Experimento de Desinfestação com 5 mm de altura, sendo um oriundo de planta hermafrodita (155H) e outro de planta feminina (26F).

Observando apenas o número de ápices vivos e mortos, independentemente se estavam contaminados ou não, pode-se concluir que 80 ápices (41%) estavam vivos e 115 mortos (59%), e observando-se somente o número de ápices contaminados e não contaminados, independentemente do fato de estarem vivos ou mortos, pode-se concluir que apenas 51 ápices estavam contaminados (26%) e 144 não estavam contaminados (74%). Como conclusão geral, pode-se observar que o principal problema foi o alto índice de morte dos explantes e não mais a contaminação bacteriana endógena.

Provavelmente as mortes ocorreram devido ao hipoclorito de sódio, cuja concentração e tempo de exposição ainda precisam ser melhor adequados para as nossas condições de trabalho e para o cultivar Sunrise Solo em particular. O problema de morte dos explantes não foi mencionado na literatura consultada pertinente ao cultivo *in vitro* do mamoeiro, as citações sempre se referem à contaminação bacteriana endógena como sendo o principal fator limitante (REUVENI et al, 1990; VIANNA et al, 1997). Esses resultados podem ser vistos resumidamente na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados obtidos no 4º Experimento de Desinfestação

Estado dos Ápices	Número	Porcentagem	Análise Geral	
			Não Contaminados	Vivos
Vivos não contaminados	51	26%	74%	41%
Mortos não contaminados	93	48%		
Mortos contaminados	22	11%	Contaminados 26%	Mortos 59%
Vivos contaminados	29	15%		
Total	195			

Foram obtidos 60 ápices sem contaminação e inoculados *in vitro*, sendo 9 ápices 155H oriundos dos Tratamentos 5 e 6 do **3º Experimento de Desinfestação** e 51 ápices provenientes do **4º Experimento de Desinfestação**. Não apresentavam nenhum sinal de contaminação e tinham excelente aspecto, sendo 25 ápices oriundos de 4 plantas S1 hermafroditas e 35 ápices oriundos de 6

plantas S1 femininas. Esses resultados podem ser vistos mais detalhadamente na Tabela 11.

Tabela 11. Número de ápices que estão vivos e sem contaminação

Plantas S1	Nº de ápices <i>in vitro</i> sem contaminação
20H	4
52H	3
155H	16
170H	2
26F	7
46F	4
132F	4
154F	6
165F	5
197F	9
Total	60

Analisando conjuntamente os Tratamentos 5 e 6 do **3º Experimento de Desinfestação**, e o **4º Experimento de Desinfestação**, 60 ápices vivos sem contaminação correspondem a aproximadamente 29% dos 205 ápices inoculados, o que pode ser considerado um índice baixo de sucesso, porém se observarmos que os explantes foram obtidos de plantas do campo, esses resultados parecem promissores, necessitando apenas que sejam feitos alguns ajustes no protocolo de desinfestação dos explantes. Se forem somados os ápices testados nos quatro experimentos, dá um total de 650 ápices, e destes, apenas 60 ápices estão atualmente se desenvolvendo bem *in vitro*, enquanto os outros 590 ápices morreram ou estavam contaminados com bactéria endógena, obtendo-se no geral apenas 9% de sucesso.

Como já foi vastamente citado na literatura relacionada ao cultivo *in vitro* do mamoeiro, quando são usados explantes oriundos de mamoeiros que estão em condições de campo, ocorre um alto índice de contaminação causada por uma bactéria endógena (*Pseudomonas* sp.) que vive nos tecidos do mamoeiro, aparentemente sem causar danos às plantas no campo (REUVENI et al., 1990; VIANNA et al., 1997). Por isso, os explantes foram imersos em solução, contendo

o antibiótico rifampicina (300 mg.L^{-1}), acrescida de 1/4 dos sais e vitaminas do MS com pH 5,8, permanecendo sob agitação constante a 100 rpm durante 20 horas, na tentativa de eliminar as bactérias endofíticas dos tecidos dos explantes. Mesmo assim ainda ocorreu aproximadamente 26% de contaminação bacteriana no **4º Experimento de Desinfestação**, independentemente se os ápices estavam vivos ou mortos.

A constante aplicação do fungicida Cerconil nas plantas S1 parece ter funcionado como uma desinfestação prévia dos ápices caulinares ainda no campo, visto que a contaminação por fungos foi praticamente inexistente durante o cultivo *in vitro*, sendo que a aplicação de fungicidas no campo antes da inoculação *in vitro* já havia sido relatada pela literatura como sendo benéfica (VIANNA et al., 1997).

Após 4 meses de subcultivo, em outubro de 2000, foi possível observar que já existiam plântulas diferenciadas brotando em tufo a partir dos explantes originais, crescidos em meio de proliferação, estando aptas para serem individualizadas e transplantadas para o meio de enraizamento (**1º Experimento de Enraizamento**).

Observou-se no **1º Experimento de Enraizamento**, que as plântulas de mamão que haviam sido individualizadas e inoculadas no meio MS sem o AIB não emitiam nenhuma raiz, não intumesciam, nem formavam calo, ou seja permaneciam exatamente com a mesma forma de quando haviam sido inoculadas, apenas com o passar dos meses as folhas foram amarelecendo e caindo, provavelmente devido ao esgotamento dos nutrientes do meio de cultura no tubo de ensaio.

No **2º Experimento de Enraizamento**, onde foi usado $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB, mais uma vez nenhuma plântula enraizou, intumescceu ou formou calo. Esses resultados não corroboram os dados obtidos por CARRER (1988), que trabalhando com o cv. Improved Sunrise Solo 72/12, obteve melhor formação de raízes normais *in vitro* quando usou a concentração de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB e o meio MS completo. SCHMILDT (1994) trabalhando com o mamoeiro do grupo Formosa, também concluiu que a melhor concentração de AIB para o enraizamento *in vitro*

do mamoeiro corresponde a $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$, em meio MS completo, por um período de 30 dias, não havendo necessidade de usar dois meios sequenciais, tendo obtido 45% de enraizamento e 44,4% de sobrevivência após a aclimação em casa de vegetação.

No **3º Experimento de Enraizamento**, pode-se verificar que os Tratamentos 1 e 2 foram os que proporcionaram melhor enraizamento, com formação de raízes normais, e melhor desenvolvimento da parte aérea, ou seja, são aqueles onde foram usados os meios sequenciais, sendo que os explantes permaneceram por cerca de 5 dias em meio contendo 1 e 2 mg.L^{-1} de AIB, e a seguir foram transferidos para novos meios sem AIB. As primeiras raízes começaram a surgir cerca de 15 dias após a inoculação. Nos Tratamentos 3 e 4, onde foi testada a riboflavina ($31 \text{ } \mu\text{M}$) nos meios com 1 e 2 mg.L^{-1} de AIB, também ocorreu enraizamento, mas as raízes e a parte aérea não eram tão perfeitas quanto as produzidas nos Tratamentos 1 e 2, mostrando que a riboflavina foi até certo ponto eficaz. Os Tratamentos 5 e 6, que correspondem ao uso de 1 e 2 mg.L^{-1} de AIB continuamente, sem o uso de meios sequenciais, mostraram resultados bastante heterogêneos, com plantas apresentando raízes muito grossas sem raízes secundárias, ou plantas sem raízes com a formação de um calo na base e parte aérea pouco desenvolvida, principalmente na concentração de 2 mg.L^{-1} de AIB, já indicando um início de toxidez (Figura 10 A-H).



Figura 10. Plântulas desenvolvidas nos diferentes tratamentos do 3º Experimento de Enraizamento. Tubos (A) Trat.1, (B) Trat.3, (C) Trat.4, (D-F) Trat.5, (G-H) Trat.6. A descrição dos tratamentos está na Tabela 4 da metodologia.

No **4º Experimento de Enraizamento**, onde foram testados 40 tratamentos, num total de 200 tubos de ensaio, com uma plântula por tubo, 5 repetições por tratamento, pode-se constatar que existe uma diferença muito grande nos resultados entre os tratamentos sem carvão ativado (Tratamentos 1-20) e com carvão (Tratamentos 21-40), sendo que em todos os 20 tratamentos em que foi usado 1 g.L^{-1} de carvão ativado, nenhuma planta emitiu raiz, nem ocorreu formação de calo na base dos explantes (Figura 11), provavelmente porque o carvão ativado adsorveu grande parte do AIB que havia sido adicionado ao meio, impedindo que ocorresse a indução do enraizamento e a formação de calo (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Por outro lado, o desenvolvimento da parte aérea das plantas inoculadas nos meios com carvão ativado foi visivelmente superior ao desenvolvimento da parte aérea das plantas inoculadas nos meios sem o carvão, provavelmente porque o carvão ativado deve ter adsorvido substâncias tóxicas presentes nos meios de cultura (CALDAS et al., 1998; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

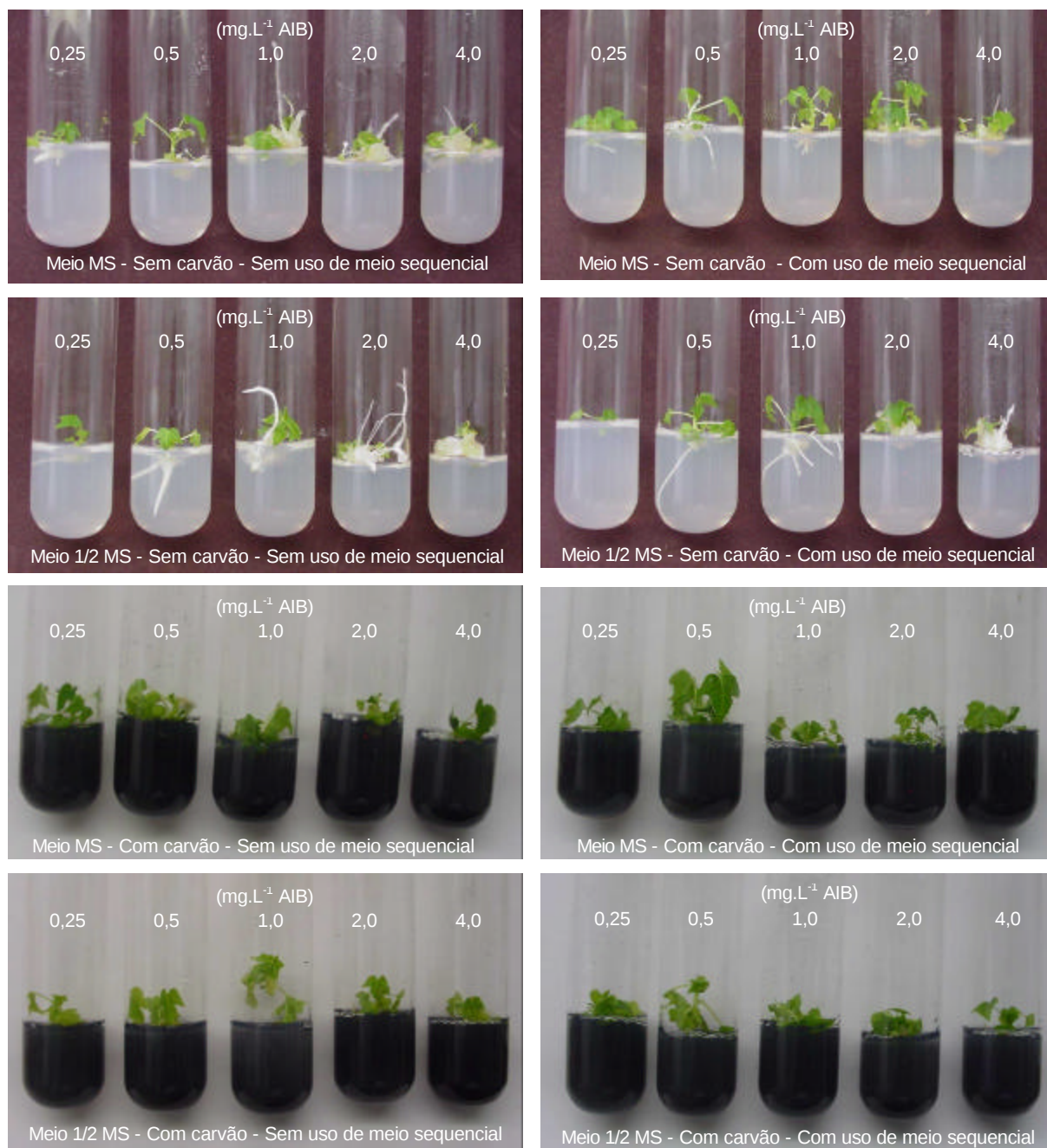


Figura 11. Plântulas desenvolvidas a partir dos 40 tratamentos aplicados no 4º Experimento de Enraizamento, 30 dias após a inoculação nos meios (Tabela 5 da metodologia) .

Em geral, nos tratamentos sem carvão ativado, pode-se observar que concentrações de AIB acima de 1 mg.L^{-1} inibem o enraizamento e o desenvolvimento da parte aérea, além de induzir a emissão de raízes muito grossas anormais, com geotropismo negativo, e causar a formação de calo na base dos explantes, dados corroborados pelo trabalho de VIANNA (1996). A concentração de $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB apresenta plantas com a parte aérea um pouco menos desenvolvida do que as plantas que estão nas concentrações $0,5$ e 1 mg.L^{-1} de AIB, concluindo-se que a concentração ótima de AIB parece estar entre $0,5$ e 1 mg.L^{-1} de AIB, principalmente quando são usados os meios sequenciais, ou seja, quando após ocorrer a indução ao enraizamento, os explantes são transferidos para um meio sem AIB (Figura 11). As primeiras raízes começaram a ser emitidas cerca de 15 dias após a inoculação dos explantes nos meios de cultura. Nos meios sem carvão, as plantas parecem estar com melhor aspecto quando foi usado o meio sequencial com o $\frac{1}{2}$ MS, e nos meios com carvão as plantas parecem estar com melhor aspecto quando foi usado o MS completo.

Pelo Teste de Wilcoxon pode-se concluir que não existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos com o MS completo e com a metade da concentração dos seus sais e vitaminas, em cada concentração de AIB; e quanto ao uso do meio sequencial, pode-se observar diferença significativa ($p < 0,01$) apenas na concentração $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, e não significativa nas demais concentrações (Tabela 12-1).

De acordo com os resultados obtidos pelo Teste Exato de Fisher, pode-se concluir que em geral existe uma dependência significativa ($p < 0,01$) entre as cinco concentrações de AIB e as três possíveis situações de enraizamento (brotos não enraizados e sem formação de calos; brotos normalmente enraizados; ou brotos com formação de calos e raízes anormais) (Tabela 12-2). Quando realizou-se a subdivisão na tabela de contingência 5×3 pelo Teste Exato de Fisher, observou-se diferenças significativas ($p < 0,01$) entre as seguintes concentrações de AIB: $0,25$ e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,25$ e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,25$ e $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,5$ e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,5$ e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,5$ e $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$, $1,0$ e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$, $1,0$ e $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$, não tendo sido observadas diferenças significativas entre as demais concentrações.

Tabela 12-1. Avaliação do 4º Experimento de Enraizamento, tratamentos sem carvão ativado, 40 dias após a inoculação dos brotos nos meios MS e ½ MS, em cinco diferentes concentrações de AIB, com e sem o uso de meio sequencial.

Trata- mentos	MS*	AIB (mg.L ⁻¹)	Uso de Meio Sequencial	Nº Brotos Enraizados	Nº Brotos sem raízes e sem calo	Nº Brotos com calo e raízes anormais
1	1	0,25	Não	1	4	0
2	1	0,50	Não	1	4	0
3	1	1,00	Não	0	0	5
4	1	2,00	Não	0	0	5
5	1	4,00	Não	0	0	5
6	1	0,25	Sim	1	4	0
7	1	0,50	Sim	2	3	0
8	1	1,00	Sim	2	3	0
9	1	2,00	Sim	0	0	5
10	1	4,00	Sim	0	0	5
11	1/2	0,25	Não	1	4	0
12	1/2	0,50	Não	3	2	0
13	1/2	1,00	Não	0	0	5
14	1/2	2,00	Não	0	0	5
15	1/2	4,00	Não	0	0	5
16	1/2	0,25	Sim	0	5	0
17	1/2	0,50	Sim	3	2	0
18	1/2	1,00	Sim	2	0	3
19	1/2	2,00	Sim	0	0	5
20	1/2	4,00	Sim	0	0	5

(*) 1 MS (MS completo), ½ MS (metade da concentração dos sais e vitaminas do MS)

Tabela 12-2. Resumo da avaliação do 4º Experimento de Enraizamento, tratamentos sem carvão ativado, 40 dias após a inoculação dos brotos, em cinco diferentes concentrações de AIB.

Concentrações AIB (mg.L ⁻¹)	Nº de brotos enraizados	Nº de brotos sem raízes e sem calos	Nº de brotos com calo e raízes anormais
0,25	3	17	0
0,50	9	11	0
1,00	4	3	13
2,00	0	0	20
4,00	0	0	20

Pode-se observar na Tabela 12-2, que nos meios sem carvão ativado, isolando-se o fator concentração de AIB, independentemente dos demais fatores, a concentração $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB foi a que resultou num maior número de plantas enraizadas, ou seja de um total de 20 plantas inoculadas nessa concentração 9 enraizaram (45%), por outro lado, nas doses mais altas de AIB (2 e 4 mg.L^{-1}) nenhuma planta enraizou normalmente, mas todas (100%) emitiram raízes com geotropismo negativo e com uma grande quantidade de calo.

A concentração $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB foi a que resultou num maior número de brotos que não emitiram raízes mas que também não formaram calo, sendo que de um total de 20 brotos inoculados nessa concentração, apenas 3 emitiram raízes (15%). A dose de 1 mg.L^{-1} AIB também proporcionou baixa taxa de enraizamento (20%), mas causou a formação de muitas plantas com raízes anormais e com calo (65%).

O fato de que apenas algumas plantas têm enraizado, enquanto outras não, dentro de um mesmo tratamento, pode ter uma relação com a observação feita por SCHMILDT (1994) de que quando as plantas são seccionadas logo abaixo de um nó, ocorre um aumento da resposta rizogênica. Logo, talvez algumas plantas não tenham enraizado por não terem sido seccionadas logo abaixo de um nó, justificando porque têm ocorrido repostas rizogênicas tão diferentes entre plantas submetidas aos mesmos tipos de tratamentos.

Nos meios com carvão ativado, 40 dias após a inoculação das plantas, foi possível notar que principalmente nos meios com $\frac{1}{2}$ MS, as plantas mostravam sinais de deficiência nutricional, pois apesar de terem a parte aérea bem desenvolvida, as folhas estavam amarelecendo, provavelmente porque o carvão ativado deve ter adsorvido alguns nutrientes.

As plântulas individualizadas durante a repicagem feita em abril de 2001, e usadas no **4º Experimento de Enraizamento**, foram contadas, obtendo-se aproximadamente 250 plântulas a partir dos explantes originais, que haviam se desenvolvido em 60 magentas GA7, contendo o meio de proliferação convencional. Os explantes originais provenientes das plantas S1 hermafroditas,

produziram em média 14 plântulas/explante, e os explantes originais oriundos das plantas S1 femininas, produziram em média 11 plântulas/explante.

Na repicagem realizada em abril de 2001, quando a metade dos explantes originais foi inoculada no meio de proliferação convencional contendo $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e a outra metade foi inoculada no meio de proliferação convencional acrescido de 1 g.L^{-1} de carvão ativado, pode-se observar que o carvão ativado inibiu a produção de brotos nos explantes originais, provavelmente por ter adsorvido o BAP do meio de cultura, porém, apesar de ter produzido menos brotos do que no meio sem carvão, esses brotos apresentavam folhas com um verde mais escuro e um aspecto mais saudável (Figura 12 A) do que as produzidas no meio sem carvão (Figura 12 B), provavelmente porque o carvão adsorveu substâncias tóxicas do meio de cultura. Também parece ter havido menor formação de calo na base dos explantes originais no meio de proliferação acrescido de carvão ativado.

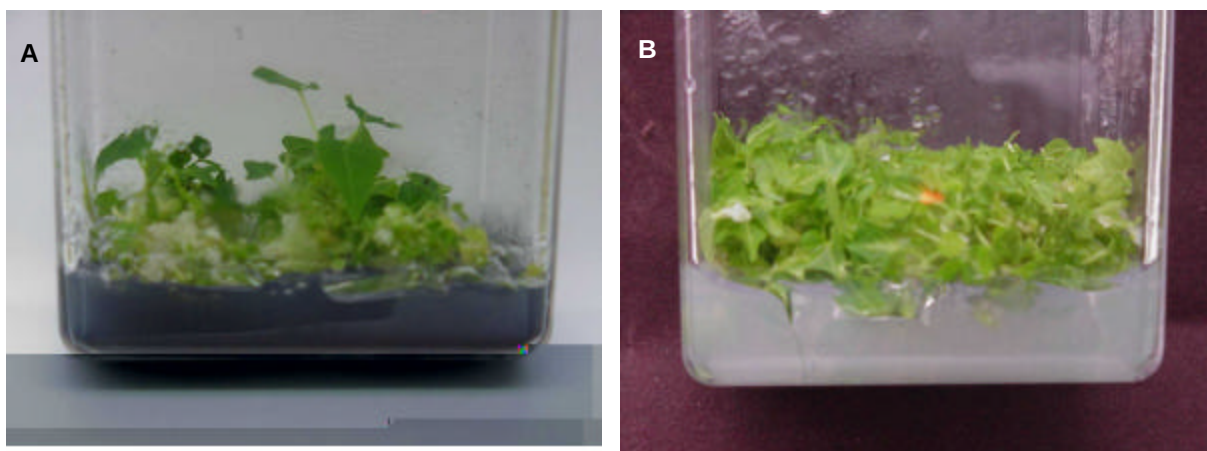


Figura 12. (A) Explantes originais em meio de proliferação convencional acrescido de 1 g.L^{-1} de carvão ativado, (B) Explantes originais com abundante formação de brotos, em meio de proliferação convencional com BAP ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$).

A partir dos resultados obtidos no 4º Experimento de Enraizamento, pode-se concluir que a melhor faixa de AIB encontra-se entre as concentrações $0,5$ e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo a seguir montado o **5º Experimento de Enraizamento**, onde procurou-se usar várias concentrações intermediárias entre $0,5$ e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$.

No **5º Experimento de Enraizamento** *in vitro* do mamoeiro (Tabela 13 e Figura 14), pode-se observar que cerca de 30 dias após a inoculação dos brotos nos meios de indução de enraizamento, 80% dos brotos inoculados no meio contendo $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB estavam emitindo raízes com características normais, sem a formação de calos, apresentando um pouco de geotropismo negativo, e também estavam emitindo folhas novas; os 20% dos brotos restantes não apresentavam raízes, nem formação de calos e não emitiram folhas novas. Por outro lado, apenas 10% dos brotos inoculados nos meios contendo 0,5, 0,6 e $0,7 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB apresentavam a emissão de raízes normais, com um pouco de formação de calos e geotropismo negativo, e estavam emitindo folhas novas, enquanto os 90% dos brotos restantes estavam formando calos, ou não apresentavam calos nem raízes.

A partir dos resultados da análise estatística do **5º Experimento de Enraizamento**, pode-se concluir pelo Teste Exato de Fisher, que em geral existe uma dependência significativa ($p < 0,01$) entre as seis concentrações de AIB e as três possíveis situações de enraizamento (Tabela 13). Quando foi feita a subdivisão na tabela de contingência 6×3 , observou-se diferenças significativas entre as seguintes concentrações de AIB: 0,4 e $0,7 \text{ mg.L}^{-1}$ ($p < 0,05$), 0,4 e $0,9 \text{ mg.L}^{-1}$ ($p < 0,05$), 0,5 e $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ ($p < 0,01$), 0,5 e $0,9 \text{ mg.L}^{-1}$ ($p < 0,05$), 0,6 e $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ ($p < 0,01$), 0,7 e $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ ($p < 0,01$), 0,8 e $0,9 \text{ mg.L}^{-1}$ ($p < 0,05$), não tendo sido observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as demais concentrações.

Pode-se observar que a concentração $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ diferiu significativamente das demais concentrações, com exceção da concentração $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$. A concentração $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ foi escolhida como a mais adequada, por ter proporcionado um maior número de brotos com rizogênese, e um menor número de brotos sem raízes ou com formação de calos e raízes anormais.

As concentrações extremas de AIB ($0,4$ e $0,9 \text{ mg.L}^{-1}$) apresentavam 40% dos brotos com rizogênese, sendo que as raízes dos brotos inoculados em $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ tinham características normais, enquanto as raízes dos brotos inoculados em $0,9 \text{ mg.L}^{-1}$ tinham geotropismo negativo e formação de calos; os 60% restantes dos brotos ou não emitiram raízes ou formaram calos. Logo, pode-se

concluir que o melhor tratamento para a indução do enraizamento envolveu o uso de meio MS modificado acrescido de $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, e também que as plântulas estavam prontas para serem aclimatadas entre 30 e 35 dias após a inoculação dos brotos nos meios de cultura.

Tabela 13. Avaliação dos tratamentos pertencentes ao **5º Experimento de Enraizamento**, 30 dias após a inoculação dos brotos nos meios MS modificados, em seis diferentes concentrações de AIB.

Concentrações AIB (mg.L^{-1})	Nº de brotos enraizados	Nº de brotos sem raízes e sem calos	Nº de brotos com calos e raízes anormais
0,4	4	5	1
0,5	1	6	3
0,6	1	3	6
0,7	1	2	7
0,8	8	2	0
0,9	4	0	6

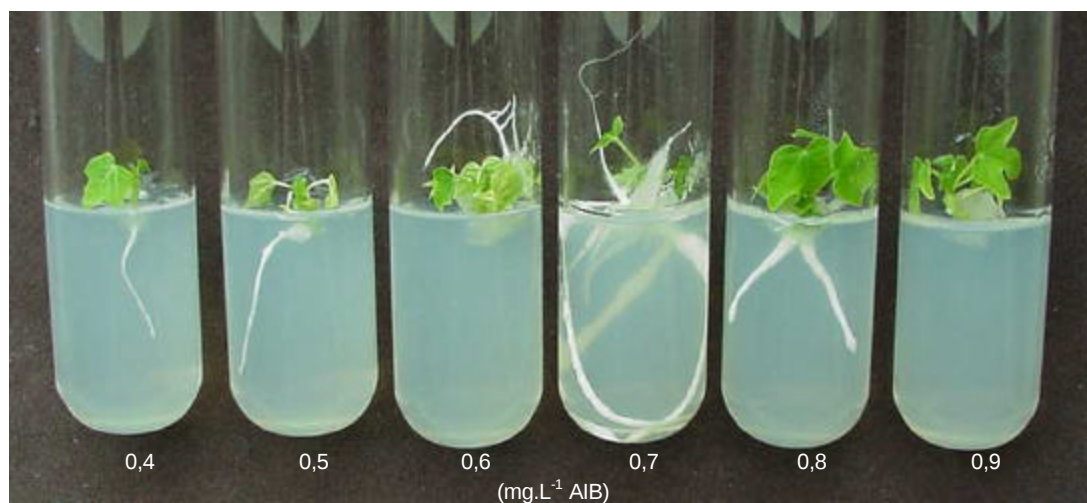


Figura 14. Enraizamento do mamoeiro cv. Sunrise Solo em seis diferentes concentrações de AIB, com uso do meio MS modificado, contendo metade da concentração dos macronutrientes, e a concentração total dos micronutrientes e vitaminas, 30 dias após a inoculação (**5º Experimento de Enraizamento**).

É possível também induzir o enraizamento usando recipientes do tipo Magenta GA7 (Figura 15), o que mostrou ser mais prático do que o trabalho com tubos de ensaio, já que todos os brotos isolados da Magenta contendo o meio de multiplicação (A) podem ser transferidos para outra Magenta contendo o meio de indução de enraizamento (B), vindo a enraizar após cerca de 15-30 dias (C).

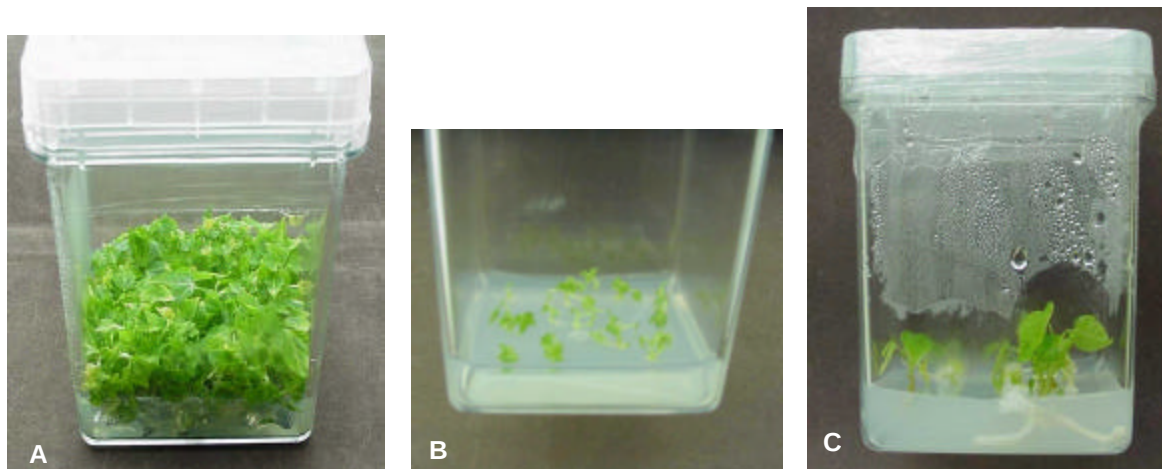


Figura 15. Etapas do enraizamento *in vitro* do mamoeiro em recipientes do tipo Magenta GA7. (A) Fase de multiplicação, onde os brotos são produzidos, em meio MS contendo $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP, (B) Brotos isolados, recém inoculados em meio de enraizamento contendo $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, (C) Broto enraizado em meio contendo $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, após 25 dias da inoculação.

Com relação aos resultados obtidos no **6º Experimento de Enraizamento** (Figura 16), pode-se observar que 30 dias após a inoculação nos meios de cultura, do total de 60 brotos, apenas 3 emitiram raízes, e todos 3 estavam na concentração $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado, estando todos submetidos à iluminação com lâmpadas fluorescentes brancas e Grolux (1:1), sendo que 2 deles estavam em meio MS contendo $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, e 1 em meio MS sem AIB.

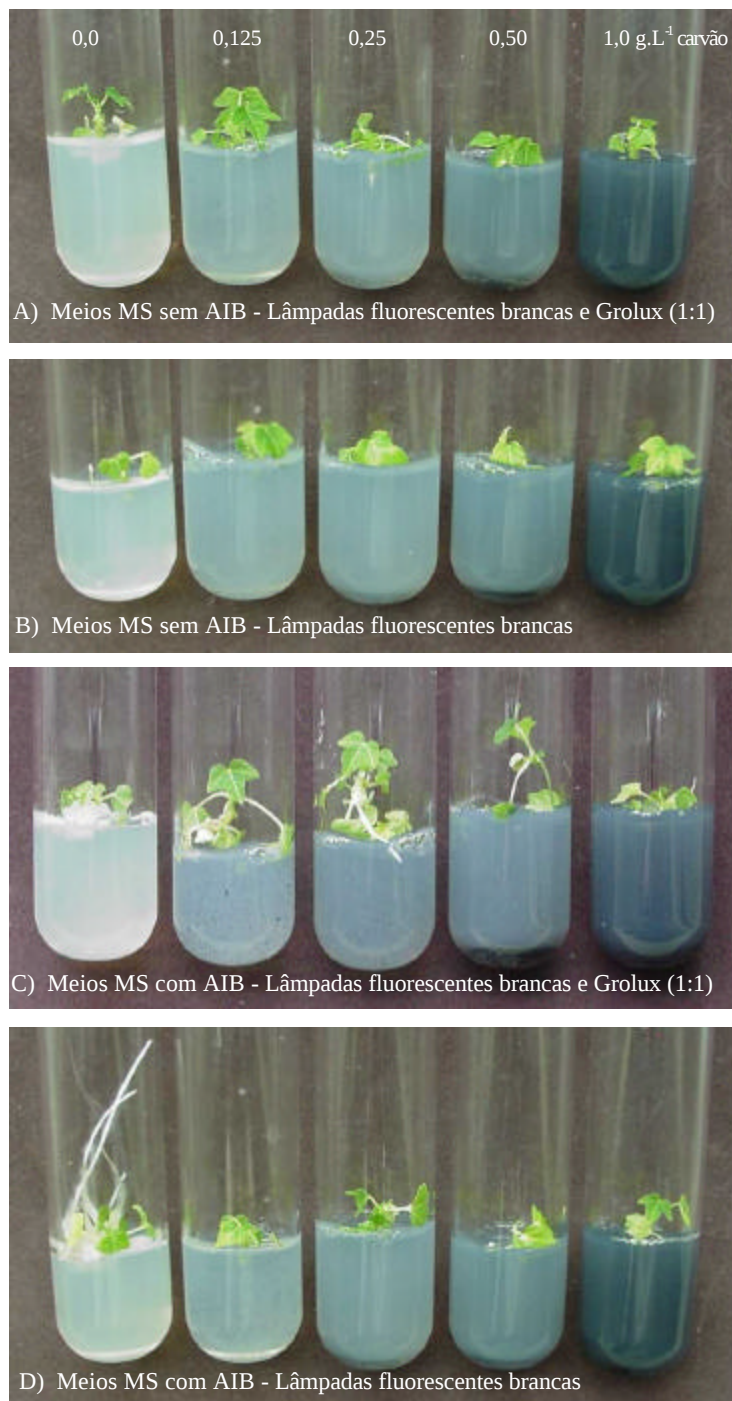


Figura 16. Enraizamento do mamoeiro cv. Sunrise Solo (6^o Experimento de Enraizamento), em 5 concentrações de carvão ativado; (A,B) em meios de cultura sem AIB; (C,D) ou com AIB (0,8 mg.L⁻¹); (A,C) crescendo sob iluminação de lâmpadas fluorescentes brancas e Grolux em proporção (1:1); (B,D) ou somente sob iluminação de lâmpadas fluorescentes brancas.

Pode-se observar que em todos os tratamentos onde foi empregada a iluminação com lâmpadas fluorescentes brancas e Grolux em proporção 1:1 (Figura 16 A,C), os brotos apresentavam parte aérea mais desenvolvida, quando comparadas às partes aéreas dos brotos submetidos aos tratamentos com iluminação apenas com lâmpadas fluorescentes brancas (Figura 16 B,D). Esses resultados são corroborados pelo trabalho de REUVENI et al. (1990), que obtiveram centenas de mudas de mamão enraizadas *in vitro* usando a iluminação apenas com lâmpadas fluorescentes Grolux.

Verificou-se também que parece existir uma interação entre AIB:Carvão:Luz, visto que apenas nos tratamentos onde foi usado ao mesmo tempo o AIB, lâmpadas fluorescentes brancas e Grolux, e o carvão ativado, pode-se observar que as folhas se desenvolveram tanto, ao ponto de suspender os brotos do meio de cultura (Figura 16-C), não tendo isso ocorrido nos demais tratamentos. De acordo com ECONOMOU e READ (1987), na rizogênese, as variáveis importantes são a intensidade luminosa, o fotoperíodo e a qualidade de luz.

Pode-se notar que em todos os tratamentos onde foi empregado o carvão ativado não houve a formação de calo na base dos brotos. Por outro lado, quando não foi usado o carvão ativado, e foi usado o AIB ($0,8 \text{ mg.L}^{-1}$), ocorreu a formação de calo e raízes com geotropismo negativo, demonstrando que existe uma interação entre a concentração de AIB usada e a concentração dos macronutrientes do MS, pois a metade da concentração dos macronutrientes do MS com $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB estimulou o enraizamento normal dos brotos (Figura 15), mas a concentração total dos macronutrientes do MS, com a mesma concentração de AIB ($0,8 \text{ mg.L}^{-1}$) estimulou a formação de calo e raízes com geotropismo negativo (Figura 16-C,D). Nos tratamentos onde não foi usado carvão, nem AIB, não houve a formação de calo nem de raízes anormais (Figura 16-A,B), independentemente do tipo de iluminação empregada.

O fato de o carvão ativado estimular o desenvolvimento *in vitro* da parte aérea dos brotos de mamão, pode vir a ser útil no enraizamento *ex vitro* do mamoeiro em substrato na casa de vegetação, visto que plantas com a parte aérea mais desenvolvida têm maior chance de sobrevivência durante a aclimação; e essas plantas com a parte aérea mais desenvolvida também

podem ter maiores chances de enraizar *in vitro*, usando-se outro meio de indução de enraizamento sem carvão e acrescido de AIB. DREW (1988) observou que após o início do enraizamento *in vitro* do mamoeiro em meio com 2 mg.L^{-1} AIB e sem carvão ativado, ocorreu um ótimo desenvolvimento da parte aérea e raízes em meio sem AIB, mas acrescido de 1 g.L^{-1} de carvão ativado.

As plantas do **3º Experimento de Enraizamento** que haviam sido transplantadas para a vermiculita, infelizmente começaram a morrer devido ao aparecimento de fungos nas plântulas, mas antes do ataque dos fungos pareciam estar se adaptando bem às condições *ex vitro* (Figura 13A-B). Por outro lado, surpreendentemente as plântulas que foram transplantadas diretamente do meio de proliferação para a vermiculita, sem passar por meios de indução de raízes, a princípio se desenvolveram muito bem, com altas taxas de sobrevivência (Figura 13-C), mas depois morreram também devido ao surgimento de fungos na vermiculita.

Infelizmente, os brotos que foram transplantados diretamente para vermiculita, na tentativa de se fazer o enraizamento *ex vitro*, em bandeja de isopor, na Sala de Cultura de Tecidos, morreram devido ao surgimento de fungos na vermiculita autoclavada, provavelmente porque a Sala de Cultura de Tecidos não oferecia as condições ideais para a realização desse tipo de experimento.

Os resultados referentes ao enraizamento *ex vitro* parecem promissores, embora os brotos usados como microestacas sejam extremamente sensíveis às condições ambientais em que estão sendo cultivados, necessitando de um ambiente com temperatura e umidade relativa do ar muito bem controladas, além de um rigoroso controle sobre o tipo de substrato usado, devendo-se prevenir o aparecimento de fungos com a aplicação de fungicidas, visto que apenas a autoclavagem da vermiculita não foi suficiente na prevenção do surgimento de fungos.

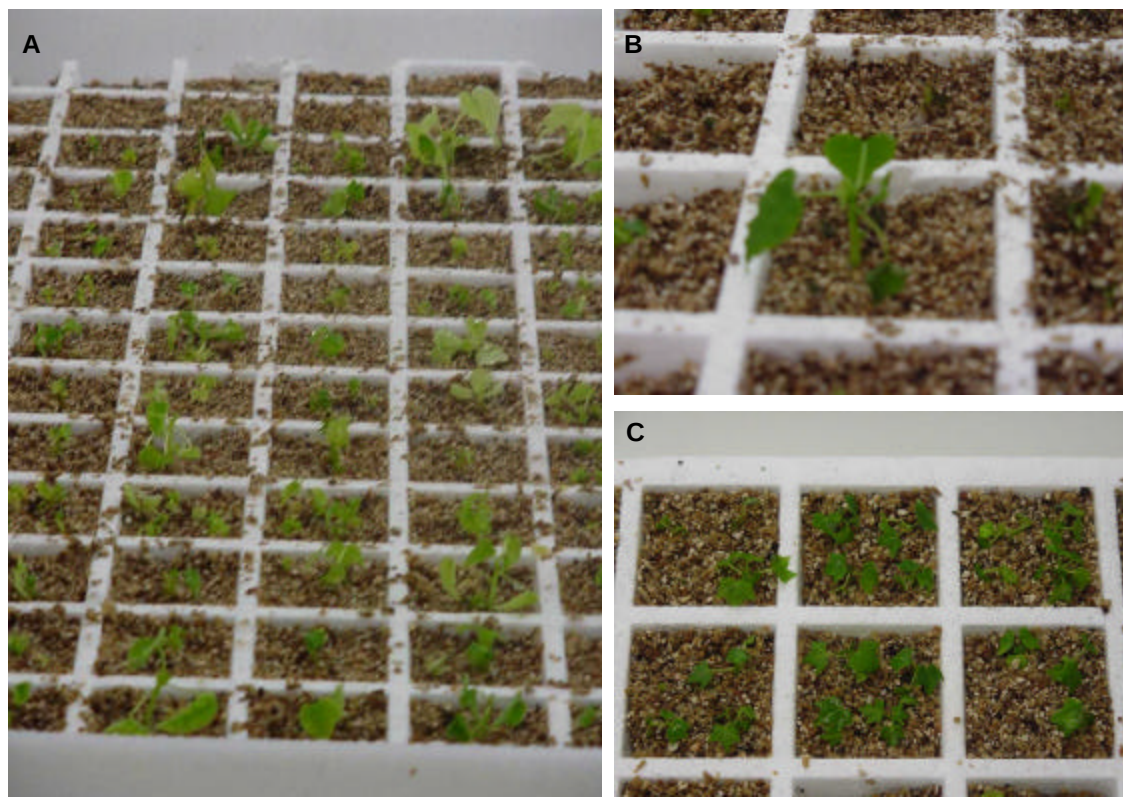


Figura 13. (A) Plântulas sendo aclimatadas a 2 dias em vermiculita, tendo passado antes por meio de indução de raízes, (B) Detalhe de plântula mostrando estar bem aclimatada a 25 dias em condições *ex vitro*, tendo passado antes por meio de indução de raízes (C) Plântulas com 25 dias sendo aclimatadas diretamente em vermiculita, sem ter passado por meios de indução de raízes.

4.3. Aclimação em casa de vegetação das plantas cultivadas *in vitro*

As plântulas que enraizaram *in vitro* foram aclimatadas em casa de vegetação, apresentando uma taxa de sobrevivência que pode ser considerada relativamente baixa, cerca de 10%. Mudanças de mamão em fase de aclimação, após 15 dias de transferidas para o substrato em tubetes na casa de vegetação, apresentavam cerca de 3 cm de altura (Figura 17 A), e após 70 dias em casa de vegetação, tinham aproximadamente 15 cm de altura, quando puderam então ser transferidas para o campo.

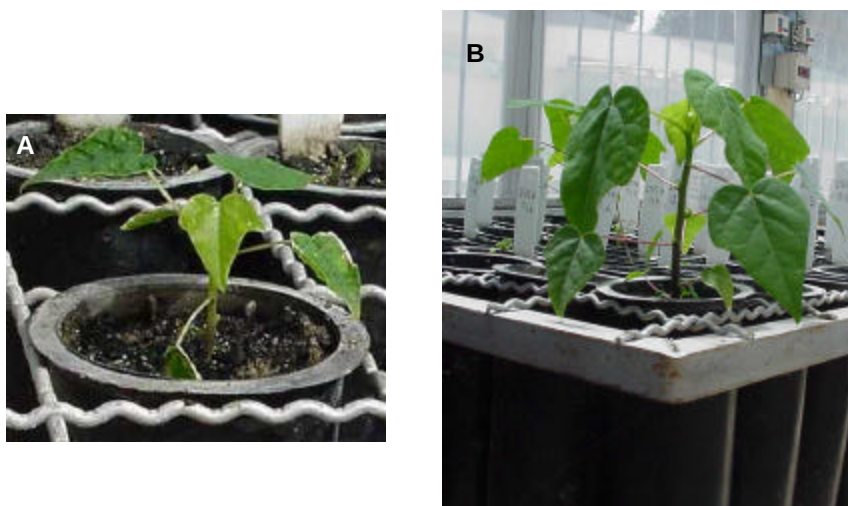


Figura 17. (A) Mamoeiro em fase de aclimação, após 15 dias do plantio em casa de vegetação, com aproximadamente 3 cm de altura, (B) Mamoeiro aclimatado, após 70 dias do plantio em casa de vegetação, com aproximadamente 15 cm de altura.

Outra opção testada foi o enraizamento *ex vitro* (Figuras 18 e 19), feito na casa de vegetação, e não mais como anteriormente na Sala de Cultura de Tecidos, e os resultados mais uma vez foram promissores, pois 30 dias após o plantio dos brotos diretamente nos substratos, sem indução de enraizamento *in vitro*, as plântulas apresentavam bom aspecto, e praticamente 100% de sobrevivência, embora não tenha sido possível verificar qual o melhor dos três substratos testados (vermiculita, areia, ou Plantmax+areia).

Na nova tentativa de obtenção do enraizamento *ex vitro*, mas em casa de vegetação, embora não tenha ocorrido a contaminação por fungos em nenhum dos três substratos testados, os brotos morreram por não ter havido um controle mais eficaz da umidade relativa do ar dentro da casa de vegetação, demonstrando mais uma vez que embora os resultados do trabalho com microestacas sejam bastante promissores, as microestacas necessitam de um rigoroso controle das condições ambientais, por serem extremamente sensíveis com relação principalmente a temperatura e umidade relativa do ar.

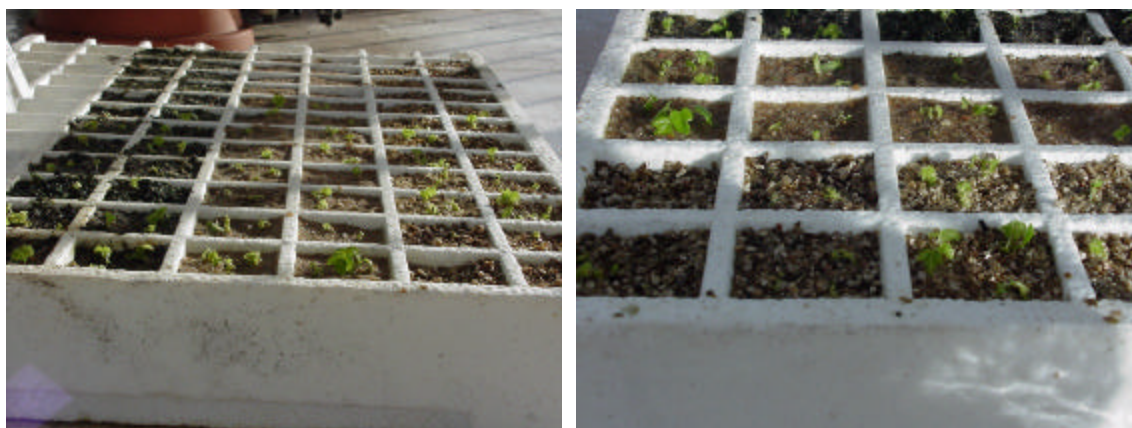


Figura 18. Plântulas de mamão cv. Sunrise Solo aclimatando direto em casa de vegetação (enraizamento *ex vitro*), após 30 dias do plantio, sem ter passado por meio de indução de enraizamento.

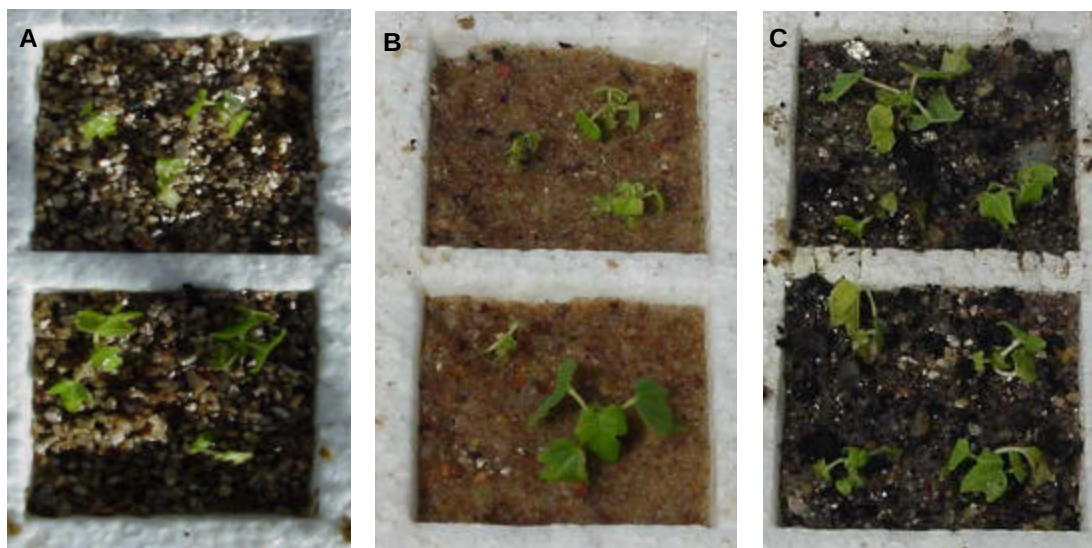


Figura 19. Detalhe das plântulas de mamão cv. Sunrise Solo aclimatando direto em casa de vegetação (enraizamento *ex vitro*), após 30 dias do plantio, sem ter passado por meio de indução de enraizamento. (A) Em substrato vermiculita (B) Em substrato areia, (C) Em substrato Plantmax misturado com areia (proporção 1:1).

4.4. Plantio no campo das plantas aclimatadas em casa de vegetação

Cerca de 2 meses após o plantio no campo das plantas clonadas *in vitro* e aclimatadas em casa de vegetação, não foi detectado nenhum tipo de alteração na arquitetura das plantas, ou no seu desenvolvimento, que pudessem indicar algum tipo de variação somaclonal. Todas as seis plantas levadas a campo estão se desenvolvendo normalmente e com vigor, apresentando 100% de sobrevivência (Figuras 20 e 21).

Esses dados são corroborados pelo trabalho de REUVENI et al. (1990), que também não detectaram a presença de variação somaclonal nas centenas de mamoeiros enraizados *in vitro*, aclimatados em casa de vegetação, e plantados no campo; contudo, observaram que as plantas micropropagadas floresceram em uma altura menor, quando comparadas às produzidas por semente. DREW (1988) também observou que mamoeiros micropropagados, quando plantados em condições de campo, mostravam excessiva vegetação em menores espaços

internós e produção de frutos próximo ao solo. No endereço da internet (<http://www2.ctahr.hawaii.edu/tpss/bookshelf/papaya/papaya.htm>), também existe uma referência de que foram notadas algumas mudanças no sexo dos mamoeiros micropropagados pela Hawaii Sugar Planter's Association.

Após 2 meses do plantio no campo, foi possível confirmar o sexo das plantas clonadas, quando surgiram os primeiros botões florais, e pode-se observar que o sexo era compatível com o sexo das plantas matrizes que as originaram, visto que dos 6 clones plantados no campo, 3 são provenientes de plantas matrizes S1 de sexo hermafrodita, e outras 3 são provenientes de plantas matrizes S1 de sexo feminino. Verificou-se também a altura de inserção no caule dos primeiros botões florais foi em média de aproximadamente 77 cm, sendo portanto menor do que nos mamoeiros plantados por semente (Figura 22).

Esses dados são corroborados pelos trabalhos de DREW (1988) e REUVENI et al. (1990). Por outro lado não foi observada nenhuma alteração no sexo das plantas clonadas, ao contrário da Hawaii Sugar Planter's Association que observou mudanças no sexo dos mamoeiros micropropagados. Deve-se ressaltar que essas observações foram feitas com base em um número reduzido de plantas clonadas, apenas seis, e talvez a avaliação de um maior número de plantas clonadas pudesse levar à identificação de alguma variação somaclonal.



Figura 20. Mamoeiro aclimatado, após 10 dias do plantio no campo, medindo aproximadamente 25 cm de altura.

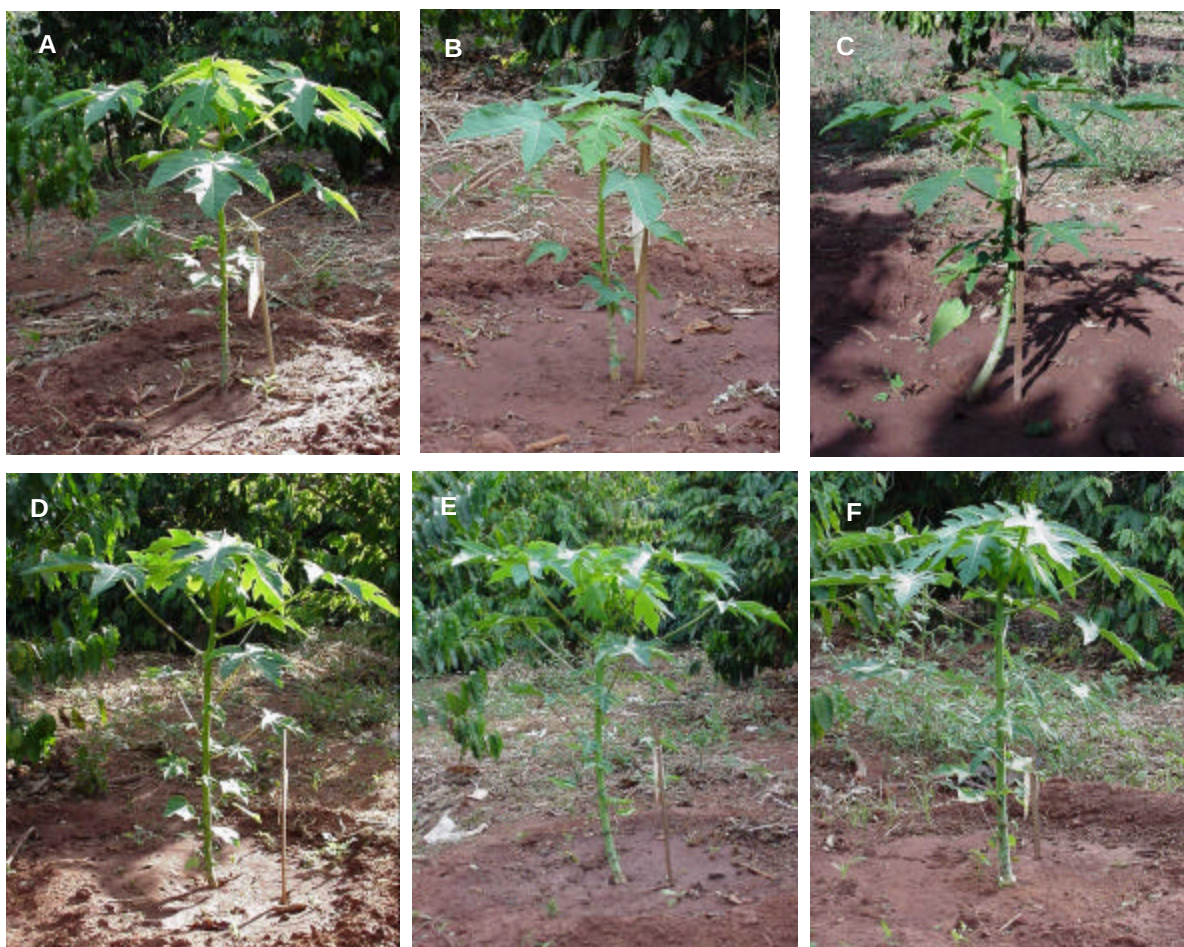


Figura 21. Mamoeiros aclimatados, após 40 dias do plantio no campo, medindo aproximadamente 60 cm, todos oriundos do 5º Experimento de Enraizamento. (A) Mamoeiro clonado a partir da planta S1 20H, enraizado em $0,9 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, (B) Mamoeiro clonado a partir da planta S1 154F, enraizado em $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, (C) Mamoeiro clonado a partir da planta S1 26F, enraizado em $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, (D) Mamoeiro clonado a partir da planta S1 20H, enraizado em $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, (E) Mamoeiro clonado a partir da planta S1 155H, enraizado em $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, (F) Mamoeiro clonado a partir da planta S1 26F, enraizado em $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB.



Figura 22. Detalhe mostrando a altura de inserção no caule dos primeiros botões florais, nas plantas clonadas, neste caso 83,5 cm.

4.5. Marcadores moleculares

4.5.1. RAPD

O emprego do primer UBC210 (LEMOS et al., 2002) visou a verificação precoce da manutenção do fenótipo sexual dos clones e da progênie S1 do cv. Sunrise Solo, visto que suas folhas foram coletadas, para extração de DNA, quando ainda estavam na fase de viveiro, não sendo portanto possível determinar o sexo das mesmas visualmente através dos botões florais. Sabe-se que durante o processo de micropropagação podem ocorrer eventos que culminam em variações somaclonais, podendo vir a modificar o fenótipo dos clones.

Na Figura 23, nas canaletas (1 a 6) foram aplicados os produtos de amplificação dos clones hermafroditas (H) e femininos (F) do cv. Sunrise Solo, nas canaletas (7 a 10) os das plantas da progênie S1 que originaram os clones, e nas canaletas (11 a 13) os das plantas matrizes que originaram a progênie S1.

A partir da verificação dos perfis RAPD, pode-se constatar que todos os clones mantiveram a característica sexual do material original, doador do ápice caulinar, empregado como explante. Um exemplo disto, é a ocorrência da banda de 438 pb, marcadora do sexo hermafrodita, presente nos clones 20H-CI1 e 20H-CI4 (Figura 23, canaletas 1 e 4), e também presente no perfil da planta doadora 20H-S1 (Figura 23, canaleta 7).

Estes resultados foram confirmados posteriormente quando os clones floresceram, permitindo a determinação visual do fenótipo. Deste fato, pode-se concluir que nenhum componente químico utilizado no meio de cultura foi capaz de induzir alterações na expressão do sexo dos clones.

MARTINEZ et al. (1999) identificaram por RAPD marcadores moleculares ligados ao sexo de algas vermelhas *Gracilaria gracilis*. Usando o primer OPD13, identificaram um fragmento de 430pb específico aos machos, e um fragmento de 620 pb específico às fêmeas. KAFKAS et al. (2001) identificaram o marcador BC360₅₀₀ presente nas plantas femininas de várias espécies de *Pistacia*, e ausente em todas as plantas masculinas.

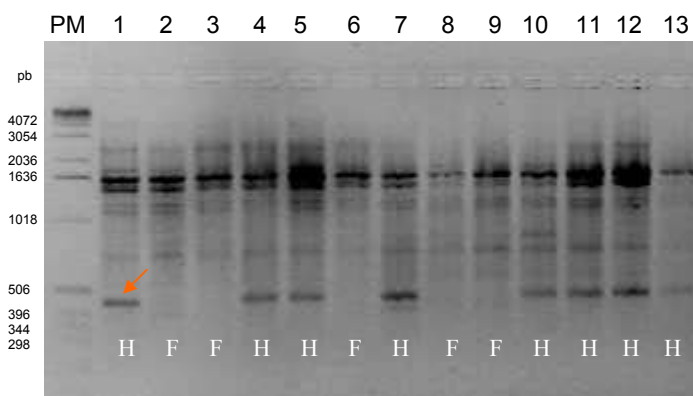


Figura 23. Perfis dos produtos de amplificação com o primer UBC210, dos clones hermafroditas (H) e femininos (F) do cv. Sunrise Solo,. (1) 20H-CI1, (2) 154F-CI2, (3) 26F-CI3, (4) 20H-CI4, (5) 155H-CI5, (6) 26F-CI6, (7) 20H-S1, (8) 26F-S1, (9) 154F-S1, (10) 155H-S1, (11) SH12-Matriz, (12) SH9-Matriz, (13) SH3-Matriz, (PM) padrão de peso molecular 1kb (Invitrogen), (→) Banda polimórfica de 438 pb

Quando o mesmo primer UBC210 foi testado com os DNAs das plantas masculinas e femininas do cv. Cariflora, também obteve-se a mesma banda polimórfica de 438 pb presente nas amostras hermafroditas do cv. Sunrise Solo, só que agora presente apenas nas amostras masculinas do cv. Cariflora e ausente nas femininas (Figura 24).

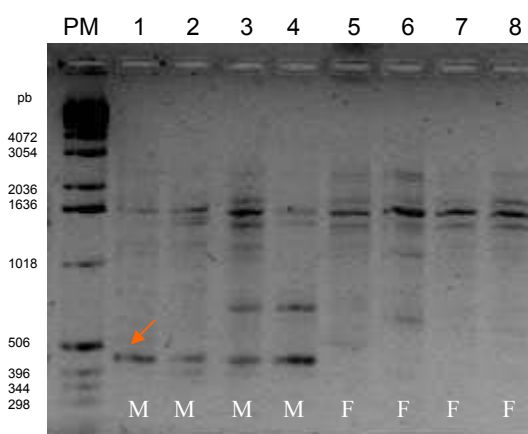


Figura 24. Perfis dos produtos de amplificação, com o primer UBC210, dos DNAs (1 a 4 - M) de plantas masculinas e (5 a 8 - F) de plantas femininas do cv. Cariflora, (PM) padrão de peso molecular 1 kb (Invitrogen), (→) Banda polimórfica de 438 pb.

4.5.2. SCAR

Foram construídos primers SCAR forward (5'-GCA CCG AGA GGG CGA GGT TT-3') e reverse (5'-GCA CCG AGA GAA CTA AGA TA-3') específicos a uma banda sequenciada de 438 pb, presente apenas nos mamoeiros de sexo hermafrodita e ausente nas plantas femininas do cv. Sunrise Solo, obtida com o uso do primer RAPD UBC210 (5'-GCA CCG AGA G-3'), usando-se para isso a sequência de nucleotídeos do fragmento de 438 pb publicada em LEMOS et al. (2002).

Esses primers SCAR, inicialmente passaram a amplificar uma única banda de 438 pb não apenas nas plantas hermafroditas, mas também nas plantas femininas (Figura 25), o que a princípio inviabilizou o uso dos mesmos na sexagem do mamoeiro. De acordo com GILL et al. (1998), frequentemente primers SCAR amplificam um alelo alternativo de mesmo tamanho, resultando na perda do polimorfismo original do RAPD. Deve-se observar que mesmo usando-se altas temperaturas de pareamento dos primers SCAR, como 58 a 61°C, mas sem alterar o programa de PCR, nem as concentrações dos componentes da PCR, ainda assim a banda de 438 pb continuou sendo amplificada para ambos os sexos.

Quando os produtos amplificados com os primers SCAR de ambos os sexos foram sequenciados, mostraram-se idênticos, e com isso podemos concluir que esta sequência de DNA também está presente no genoma das plantas femininas, porém em um número de cópias bem menor do que no genoma das hermafroditas, sendo provavelmente por isso que inicialmente ocorreu a perda do polimorfismo original do primer RAPD quando foram testados os primers SCAR "forward e reverse".

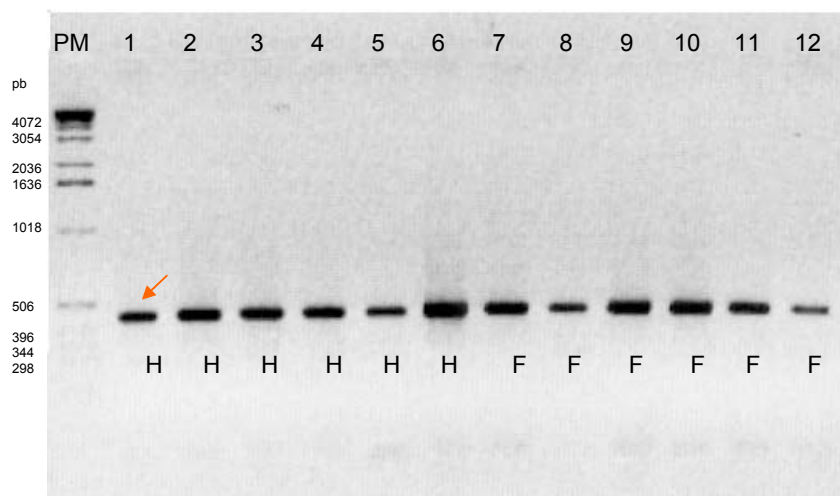


Figura 25. Perfis do produto de amplificação, com o uso dos primers SCAR, mostrando a banda única de 438 pb (→), amplificada tanto em mamoeiros S1 hermafroditas (H) e S1 femininos (F), cv. Sunrise Solo. (PM) Padrão de peso molecular 1 kb (Invitrogen).

A seguir foram feitos vários testes com diferentes temperaturas de anelamento e diferentes concentrações de $MgCl_2$, dNTP, primers SCAR, Taq, e de DNA, até que se chegou a uma condição ótima, onde apenas foi amplificada a banda de 438pb dos DNAs das plantas hermafroditas, não ocorrendo amplificação dos DNAs das plantas femininas (Figura 26). A planta SH3-Matriz foi autofecundada e deu origem às plantas da progênie S1, cujos DNAs foram amplificados e aplicados em gel de agarose 1,5%.

As condições ótimas foram encontradas com o uso de uma reação de PCR de 20 μ L, contendo 15 ng de DNA, 100 μ M de cada dNTP, 1,25 U Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1,5 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), Tampão 1x (20mM Tris-HCl (pH8,4), 50 mM KCl), 5 ng de cada primer SCAR (10 ng/ μ L), e água milli-Q autoclavada e filtrada para completar o volume final de 20 μ L. Pode-se observar que foram reduzidas as concentrações de praticamente todos os componentes da reação de PCR, ou seja, a diminuição das concentrações do DNA, dNTP, Taq DNA polimerase, $MgCl_2$, e dos primers SCAR, mostrou ser imprescindível para

que fossem encontradas as condições ótimas de amplificação dos DNAs apenas das amostras hermafroditas.

Outro fator que mostrou ser essencial para que houvesse o sucesso com o uso desta técnica, foi o emprego do programa de PCR "touchdown", onde a temperatura inicial de pareamento do primer é 65°C, e à cada 2 ciclos esta temperatura diminui 1°C, chegando até 50°C, quando então são realizados 15 ciclos. A vantagem de se usar esse tipo de programa está no fato de que em temperaturas maiores de pareamento do primer como 65°C, os primers irão se parear apenas com as sequências de DNA que sejam bem específicas, e que estejam ocorrendo em um maior número de cópias no genoma, ou seja inicialmente serão amplificadas poucas sequências de DNA, mas estas serão bem específicas às amostras hermafroditas. À medida que a temperatura de pareamento vai diminuindo, ocorre uma maior facilidade para que ocorra o pareamento dos primers com as sequencias previamente amplificadas em temperaturas maiores.

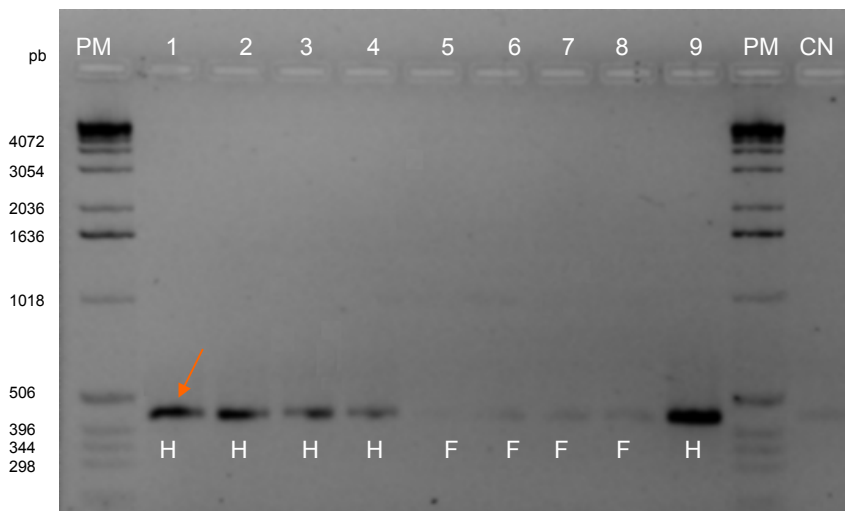


Figura 26. Gel SCAR mostrando a banda única de 438 pb (→), amplificada apenas em mamoeiros hermafroditas (H), e não amplificada nos femininos (F), cv. Sunrise Solo. Canaletas (1 a 4 - H) hermafroditas S1, (5 a 8 - F) femininas S1, (9) SH3-Matriz que originou as plantas S1, (PM) Padrão de peso molecular 1 kb (Invitrogen), (CN) Controle negativo.

Os primers SCAR também foram testados com as plantas clonadas hermafroditas e femininas, do cv. Sunrise Solo, apresentando uma banda única de 438 pb apenas nas plantas hermafroditas (Figura 27).

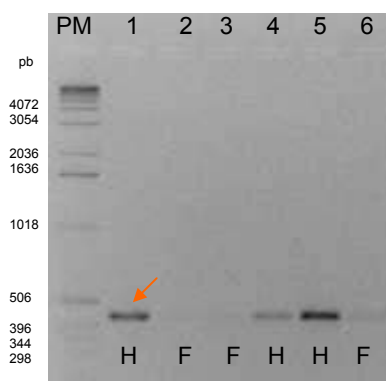


Figura 27. Perfis do produto de amplificação dos DNAs dos Clones com o uso primers SCAR, mostrando a banda única (→) de 438 pb, presente apenas nos clones hermafroditas (1, 4, 5 - H), e ausente nos clones femininos (2, 3, 6 - F). (PM) Padrão de peso molecular 1 kb (Invitrogen).

MANDOLINO et al. (1999), construíram primers SCAR específicos, e obtiveram sucesso na fácil e rápida identificação de plantas masculinas durante programas de melhoramento de *Cannabis sativa* L. dióicos e monóicos.

4.5.3. fAFLP

O primer AAG-CAT (Joe), marcado com fluorescência de cor verde, produziu três marcadores moleculares, que foram capazes de distinguir os sexos das plantas pertencentes aos cultivares Sunrise Solo e Cariflora, além de distinguir os dois cultivares entre si, independentemente do sexo das plantas. Como ocorreu com o RAPD, também com o fAFLP foram testadas amostras de DNAs dos clones hermafroditas e femininos, progênie S1 hermafrodita e feminina, e das plantas Matrizes hermafroditas do cv. Sunrise Solo, e amostras de DNAs de plantas masculinas e femininas do cv. Cariflora.

Na Figura 28 pode-se observar os eletroferogramas referentes ao marcador de 155,3 pb, obtidos com o primer AAG-CAT (Joe), presente apenas nas plantas nas hermafroditas do cv. Sunrise Solo e nas masculinas do cv. Cariflora, estando ausente nas plantas femininas de ambos os cultivares. Os picos referentes a esse marcador encontram-se indicados por setas, e na maioria das vezes estão etiquetados com o número 1.

Na Figura 29 pode-se observar os eletroferogramas referentes ao marcador de 256,9 pb, obtidos com o primer AAG-CAT (Joe), presente apenas no cv. Sunrise Solo, e ausente no cv. Cariflora, independentemente do sexo. Os picos referentes a esse marcador encontram-se indicados por setas, e na maioria das vezes estão etiquetados com o número 1.

Na Figura 30 pode-se observar os eletroferogramas referentes ao marcador de 345,39 pb, obtidos com o primer AAG-CAT (Joe), apresentando picos presentes apenas no cv. Cariflora, estando ausentes no cv. Sunrise Solo, independentemente do sexo das plantas em ambos os cultivares. Os picos referentes a esse marcador encontram-se indicados por setas, e na maioria das vezes estão etiquetados com o número 1.

Na Figura 31 pode-se observar os perfis dos produtos de amplificação dos DNAs, com o primer AAG-CAT (Joe), das plantas hermafroditas e femininas do cv. Sunrise Solo, e das plantas masculinas e femininas do cv. Cariflora.

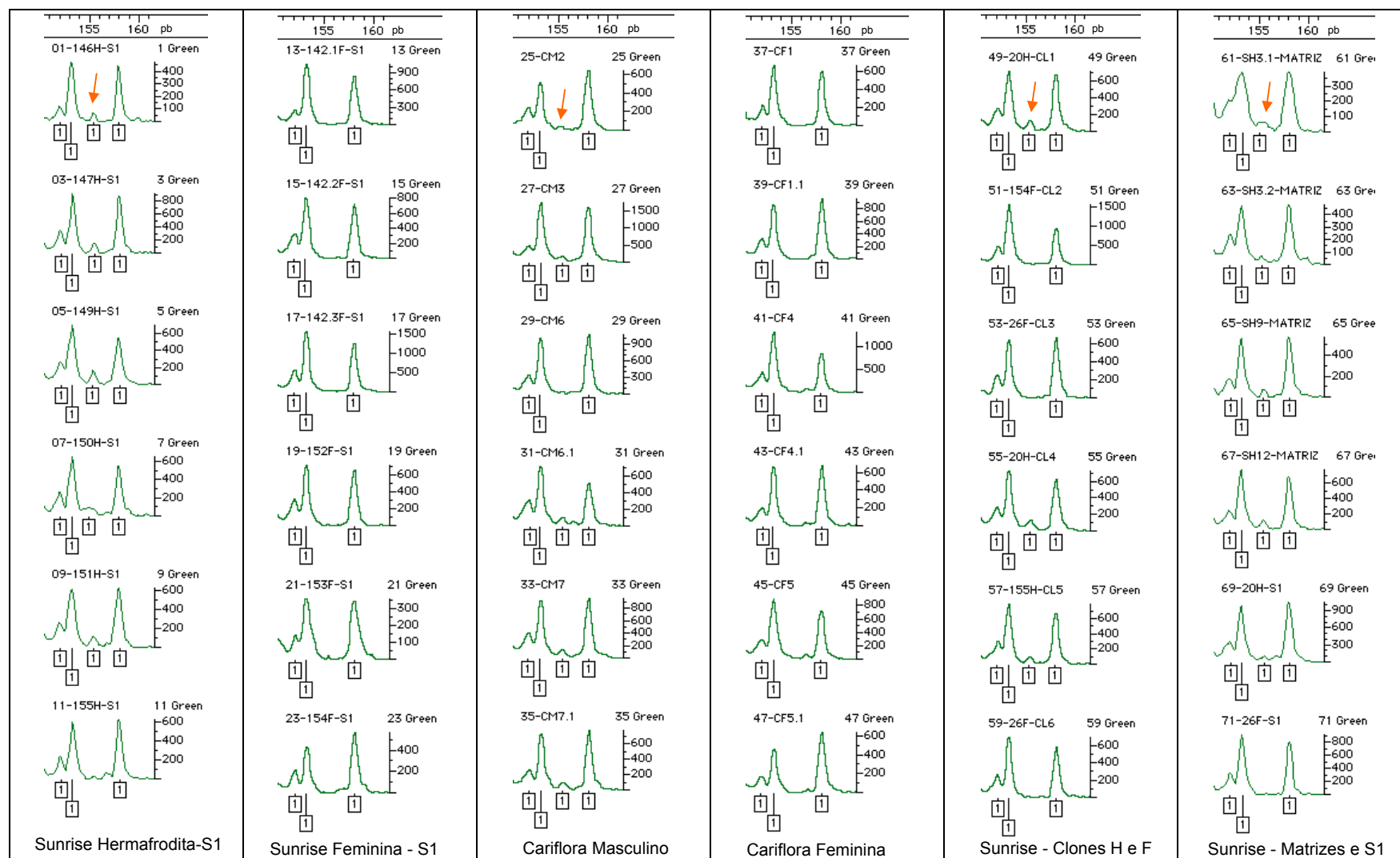


Figura 28. Eletroferogramas referentes ao marcador de 155,3 pb, obtidos com o primer AAG-CAT (Joe), presente nas hermafroditas do cv. Sunrise Solo e nas masculinas do cv. Cariflora, estando ausente nas femininas de ambos cultivares.

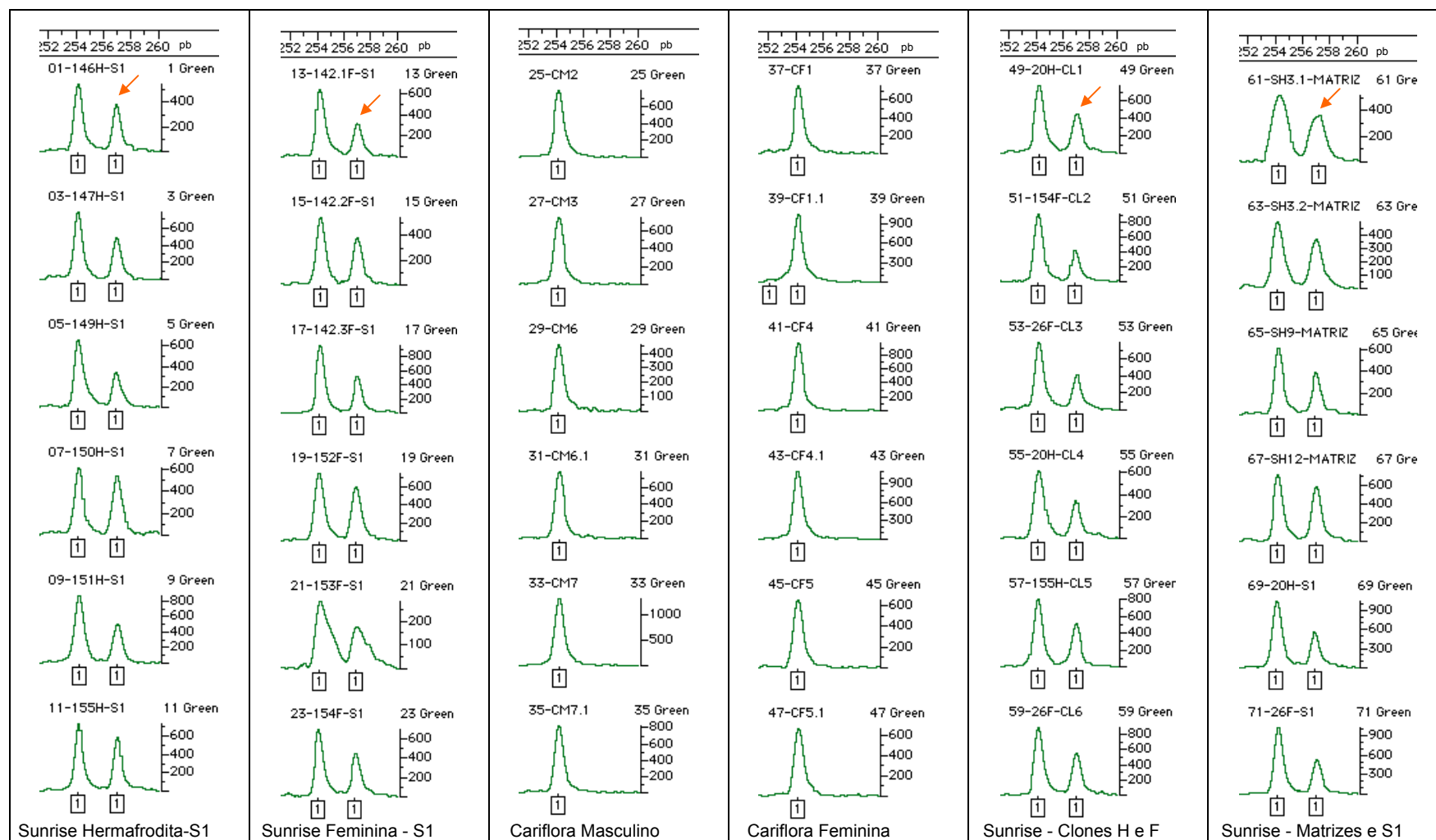


Figura 29. Eletroferogramas referentes ao marcador de 256,9 pb, obtidos com o primer AAG-CAT (Joe), presente apenas no cv. Sunrise Solo, e ausente no cv. Cariflora, independentemente do sexo.

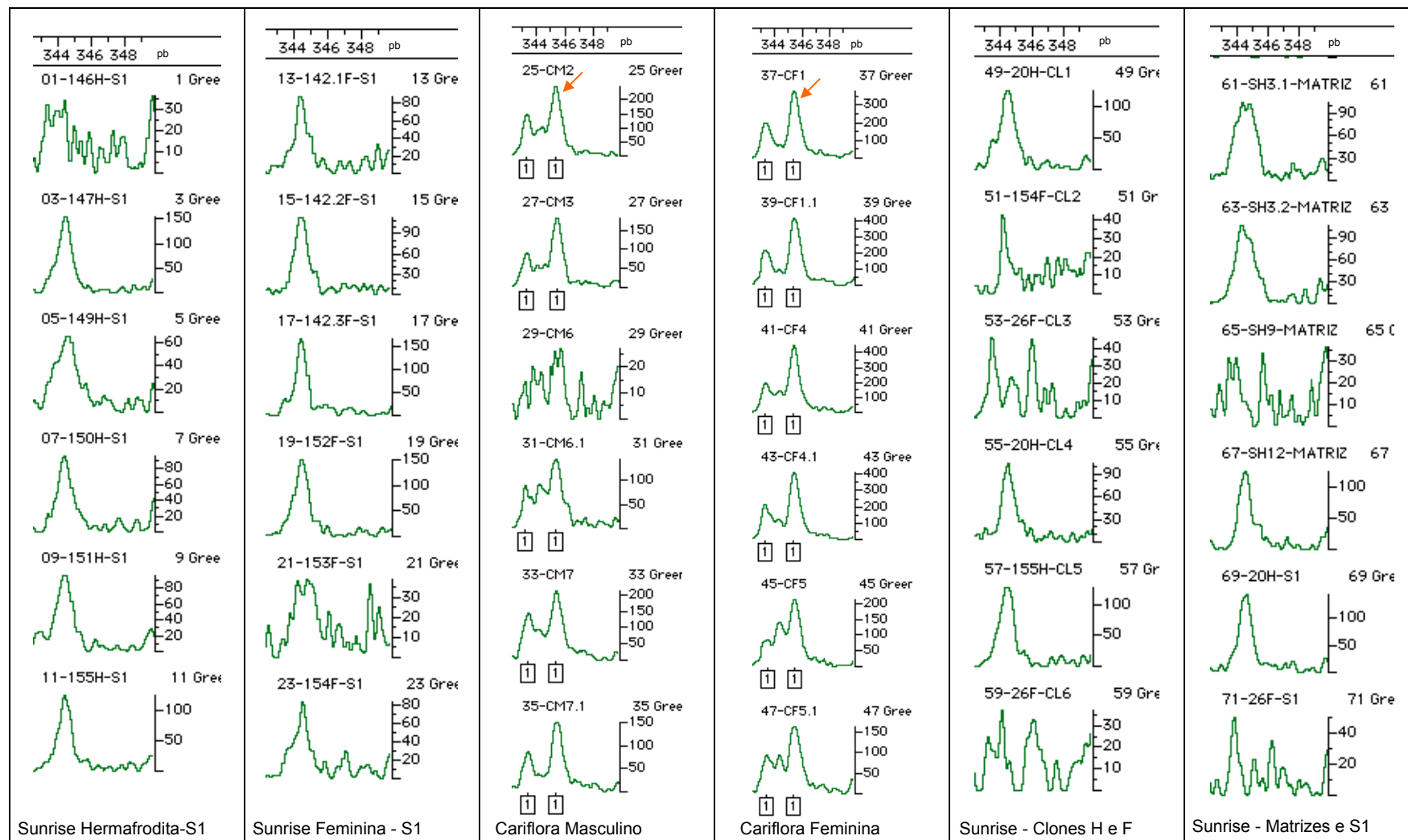


Figura 30. Eletroferogramas referentes ao marcador de 345,39 pb, obtidos com o primer AAG-CAT (Joe), ausente no cv. Sunrise Solo, e presente apenas no cv. Cariflora, independentemente do sexo.

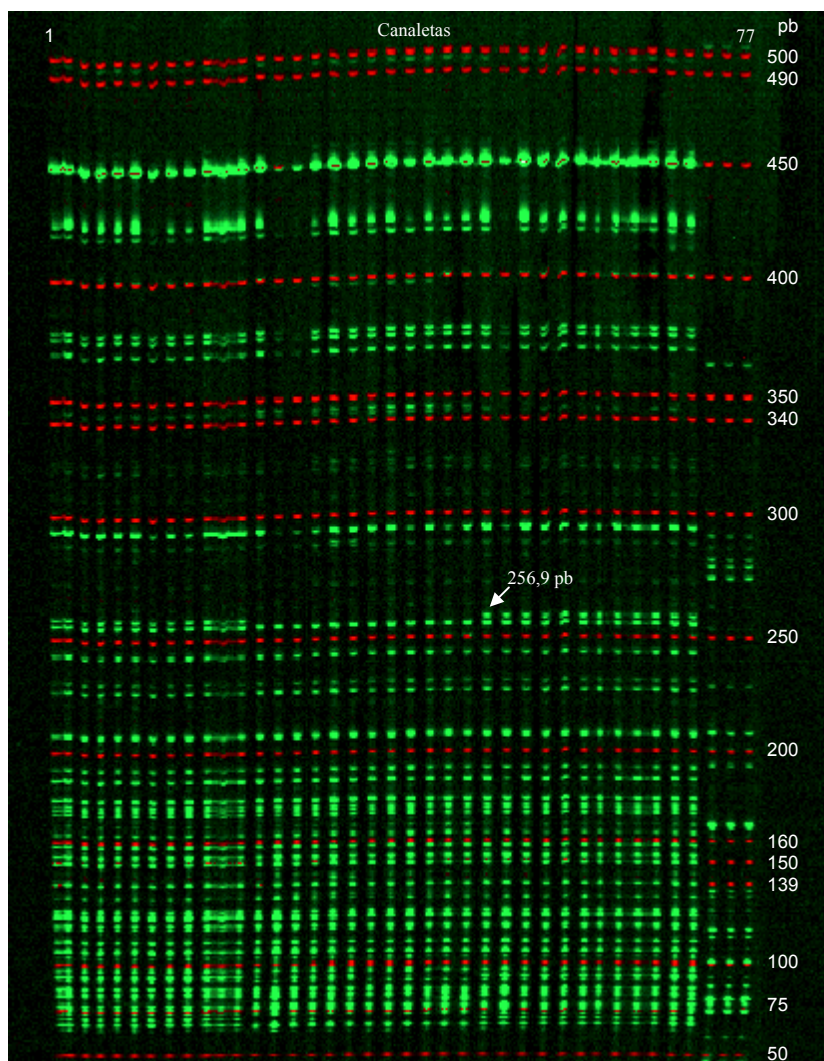


Figura 31. Perfis dos produtos de amplificação dos DNAs, com o primer AAG-CAT (Joe), das plantas hermafroditas e femininas do cv. Sunrise Solo, e das plantas masculinas e femininas do cv. Cariflora. Padrão de peso molecular interno 500-Rox, de 50 a 500 pb (bandas em vermelho). As amostras foram aplicadas apenas nas canaletas ímpares de 1 a 77 (Tabela 14).

A seguir, na Figura 32, pode-se ver em detalhe a banda correspondente ao marcador de 256,9 pb, presente apenas no cv. Sunrise Solo (canaletas 1 a 23, e 49 a 71) e ausente no cv. Cariflora (canaletas 25 a 47), independentemente do sexo. Nas canaletas (73 a 77) foram aplicadas amostras dos produtos amplificados de DNA padrão de tomate. As bandas de 155,3 pb e de 345,39 pb, são mais difíceis de serem visualizadas diretamente no gel, mas são claramente

detectadas pelos softwares GeneScan e Genotyper, apresentando picos bem definidos nos eletroferogramas.

Tabela 14. Amostras hermafroditas e femininas do cv. Sunrise Solo, e masculinas e femininas do cv. Cariflora, amplificadas com o primer AAG-CAT (JOE), e aplicadas no gel fAFLP

Can	Código	Descrição	Can	Código	Descrição
01	146H-S1	Sunrise H - S1	41	CF4	Cariflora F
03	147H-S1	Sunrise H - S1	43	CF4.1	Cariflora F
05	149H-S1	Sunrise H - S1	45	CF5	Cariflora F
07	150H-S1	Sunrise H - S1	47	CF5.1	Cariflora F
09	151H-S1	Sunrise H - S1	49	20H-CI1	Sunrise H - Clone 1
11	155H-S1	Sunrise H - S1	51	154F-CI2	Sunrise F - Clone 2
13	142.1F-S1	Sunrise F - S1	53	26F-CI3	Sunrise F - Clone 3
15	142.2F-S1	Sunrise F - S1	55	20H-CI4	Sunrise H - Clone 4
17	142.3F-S1	Sunrise F - S1	57	155H-CI5	Sunrise H - Clone 5
19	152F-S1	Sunrise F - S1	59	26F-CI6	Sunrise F - Clone 6
21	153F-S1	Sunrise F - S1	61	SH3.1-Matriz	Sunrise H - Matriz
23	154F-S1	Sunrise F - S1	63	SH3.2-Matriz	Sunrise H - Matriz
25	CM2	Cariflora M	65	SH9-Matriz	Sunrise H - Matriz
27	CM3	Cariflora M	67	SH12-Matriz	Sunrise H - Matriz
29	CM6	Cariflora M	69	20H-S1	Sunrise H - S1
31	CM6.1	Cariflora M	71	26F-S1	Sunrise F - S1
33	CM7	Cariflora M	73	Tomate	DNA padrão
35	CM7.1	Cariflora M	75	Tomate	DNA padrão
37	CF1	Cariflora F	77	Tomate	DNA padrão
39	CF1.1	Cariflora F			

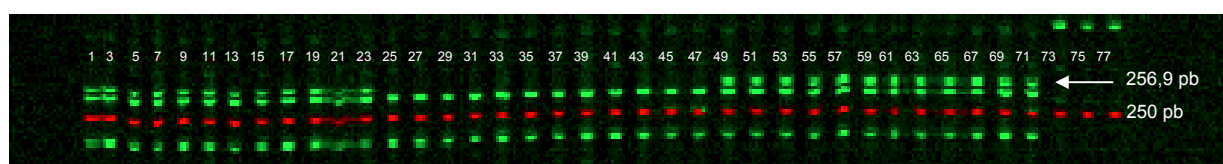


Figura 32. Detalhe do gel fAFLP, mostrando a banda (→) de 256,9 pb presente apenas nas plantas pertencentes ao cv. Sunrise Solo, e ausente nas plantas do cv. Cariflora, independentemente do sexo. Padrão de peso molecular interno 500-Rox, com bandas de 250 pb (bandas em vermelho).

TERAUCHI e KAHL(1999) trabalhando com uma planta monocotiledônea *Dioscorea tokoro*, encontraram 10 marcadores AFLP heterozigotos apenas no parental masculino, mostrando estreita ligação com o sexo de sua progênie, o que sugere que o macho é o sexo heterogamético (XY), e a fêmea é o sexo homogamético (XX). GOLAN-GOLDHIRSH et al. (2001) trabalhando com uma espécie dióica *Ilex*, encontraram sete marcadores AFLP que foram identificados como sendo associados com o sexo masculino ou feminino, tendo sido isolados do gel, clonados, e sequenciados. De acordo com GRIFFITHS e ORR (1999), trabalhando com sexagem de aves, concluíram que se os produtos AFLP de machos e fêmeas são comparados, marcadores específicos ao sexo são confinados ao sexo heterogamético, e podem ser rapidamente identificados. Conseguiram identificar três marcadores AFLP ligados ao cromossomo W (sexo masculino).

5. CONCLUSÕES

A análise dos resultados permitiu as seguintes conclusões:

1. A imersão dos explantes em solução contendo rifampicina (300 mg.L^{-1}), é imprescindível para a obtenção de explantes provenientes do campo livres de contaminação por bactérias endógenas.
2. O uso de 1 g.L^{-1} de carvão ativado inibiu totalmente o enraizamento *in vitro* do mamoeiro, e proporcionou um maior desenvolvimento da parte aérea, em comparação com os meios sem carvão.
3. A concentração de $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB juntamente com o uso de meio MS modificado, proporcionou um maior número de plântulas com rizogênese.
4. Os mamoeiros clonados, crescendo em condições de campo, apresentaram características morfológicas e sexo das flores compatíveis com as plantas matrizes que as originaram, e apresentaram menor altura de inserção de flores no caule, quando comparados às plantas matrizes.
5. O marcador UBC210₄₃₈ mostrou-se eficiente na determinação precoce do sexo das plantas clonadas e da progênie S1 do cv. Sunrise Solo, e também conseguiu diferenciar os sexos masculino e feminino das plantas do cv. Cariflora.
6. O primer SCAR foi eficiente em diferenciar precocemente o sexo entre plantas hermafroditas e femininas do cv. Sunrise Solo.
7. O primer fAFLP AAG-CAT (Joe) conseguiu diferenciar os sexos das plantas nos cvs. Sunrise Solo e Cariflora, através de uma banda de 155,3 pb, presente apenas nas plantas hermafroditas e masculinas, e ausente nas plantas femininas de ambos os cultivares, e também diferenciou os cultivares Sunrise Solo e Cariflora independentemente do sexo das plantas, apresentando uma banda de 256,9 pb exclusiva ao cv. Sunrise Solo, e uma banda de 345,39 pb exclusiva ao cv. Cariflora.

6. REFERÊNCIAS

AGRIANUAL 2001: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2000. p.378-387.

ALLAN, P.; Mc CHLERY, J.; BIGGS, D. Environmental effects on clonal female and male *Carica papaya* L. plants. **Scientia Horticulturae**, v.32, p.221-232, 1987.

ALSTROM-RAPAPORT, C.; LASCOUX, M.; WANG, Y.C.; ROBERTS, G.; TUSKAN, G.A. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in the basket willow (*Salix viminalis* L.). **Journal of Heredity**, v.89, p.44-49, 1998.

ANDERSEN, A.S. Environmental influences on adventitious rooting cuttings of non-woody species. In: JACKSON, M.B. (Ed) **New root formation in plants and cuttings**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1986. p.223-253.

ANDREANI Jr., R. Caracterização do sexo do mamoeiro (*Carica papaya* L.) através de marcadores moleculares e de microscopia eletrônica de varredura. 1998. 65p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

APPLIED BIOSYSTEMS - PE. **AFLP Plant Mapping Protocol**. 1997. 45p.

ARKLE Jr., T.D. Reproductive morphology and genetics of *Carica papaya* L. (Ph.D. Dissertation). University of Hawaii, Hawaii, 1973.

ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v.1. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. p.261-296.

AWADA, M. Effects of moisture on yield and sex expression of the papaya plants (*Carica papaya* L.). University of Hawaii, **Hawaii Agricultural Experiment Station**, Technical Bulletin, n.97, 1953.

AWADA, M. Relationships of minimum temperature and growth rate with sex expression of papaya plants (*Carica papaya* L.). University of Hawaii, **Hawaii Agricultural Experiment Station**, Technical Bulletin, n.38, 1958. 16p.

AWADA, M.; IKEDA, W. Effects of water and nitrogen application on composition, growth, sugars in fruits, e sex expression of the papaya plants (*Carica papaya* L.). University of Hawaii, **Hawaii Agricultural Experiment Station**, Technical Bulletin, n.33, 1957.

BAKER, H.G. Infection of species of Melandrium by *Ustilago-violacea* (PERS) fuckel and the transmission of the resultant disease. **Annals of Botany**, v.11, n.43, p.333-348, 1947.

BLACKBURN, K.B. Sex chromosomes in plants. **Nature**, v.112, p.687-688, 1923.

BOULAY, M. **Aspects pratiques de la multiplication in vitro des essences forestiees**. Nangis: AFOCEL, 1985. p.9-43.

BRACALE, M.; CAPORALI, E.; GALLI, M.G.; LONGO, C.; MARZIANILONGO, G.; ROSSI, G.; SPADA, A.; SOAVE, C.; FALAVIGNA, A.; RAFFALDI, F.; MAESTRI, E.; RESTIVO, F.M., TASSI, F. Sex determination and differentiation in *Asparagus officinalis* L. **Plant Science**, v.80, n.1-2, p.67-77, 1991.

BRIDGES, C.B. The genetics of sex in *Drosophila*. In: ALLEN, E. (Ed.). **Sex and internal secretions**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1932. v.1, p.55-93.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.87-132.

CARRER, H. Controle da morfogênese em mamão (*Carica papaya* L.) in vitro. 1988. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

CERVERA, M.T.; GUSMAO, J.; STEENACKERS, M., VANGYSEL, A.; VANMONTAGU, M.; BOERJAN, W. Application of AFLP^(TM)-based molecular markers to breeding of *Populus* spp. **Plant Growth Regulation**, v.20, n.1, p.47-52, 1996.

CHAN, Y.K. Studies on carpellody of stamens in papaya (*Carica papaya* L.). **Mardi**, v.12, p.157-162, 1984.

CLERC, A., MANCEAU, C., NESME, X. Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified length polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within genospecies III of *Pseudomonas syringae*. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, n.4, p.1180-1187, 1998.

COEN, E.S.; MEYROWITZ, E.M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. **Nature**, v.353, p.31-37, 1991.

CONOVER, R.A.; LITZ, R.E.; MALO, S.E. 'Cariflora' – a Papaya Ringspot Virus tolerant papaya for South Florida and Caribbean. **HortScience**, v.21, n.4, p.1072, 1986.

DARLINGTON, C.D. **Evolution of genetic systems**. Edinburgh: Oliver and Roud, 1958.

DEBENER, T.; MATTIESCH, L. Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.891-899, 1999.

DeFOSSARD, R.A.; MYINT, A.; LEE, E.C.M. A broad spectrum tissue culture experiment with tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) pith tissue callus. **Physiologia Plantarum**, v.31, p.125-130, 1974.

DELLAPORTA, S.L.; CALDERON-URREA, A. Sex determination in flowering plants. **Plant Cell**, v.5, p.1241-1251, 1993.

DEMEKE, T.; ADAMS, R.P. The use of PCR-RAPD analysis in plant taxonomy and evolution. In: GRIFFIN, H.G.; GRIFFIN, A.M. (Eds.). **PCR technology: current innovations**. Florida: CRC Press, 1994. p.179-191.

DOIGNON-BOURCIER, F.; WILLEMS, A.; COOPMAN, R. LAGUERRE, G.; GILLIS, M.; DE LAJUDIE, P. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating small Senegalese legumes by 16S-23S rRNA Intergenic Gene Spacers and Amplified Fragment Length Polymorphism fingerprint analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.9, p.3987-3997, 2000.

DREW, R.A. The effects of medium composition and cultural conditions on in vitro root initiation and growth of papaya (*Carica papaya* L.). **Journal of Horticultural Science**, v.62, p.551-556, 1987.

DREW R.A. Rapid clonal propagation of papaya *in vitro* from mature field-grown trees. **HortScience**, v.23, p.609-611, 1988.

DREW, R.A.; McCOMB, J.A.; CONSIDINE, J.A. Rhizogenesis and root growth of *Carica papaya* L. in vitro in relation to auxin sensitive phases and use of riboflavin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.33, p.1-7, 1993.

DREW, R.A.; SMITH, N.G. Growth of apical and lateral buds of papaw (*Carica papaya* L.) as affected by nutritional and hormonal factors. **Journal of Horticultural Science**, v.61, n.4, p.535-543, 1986.

DURAND, B., DURAND, R. Sex determination and reproductive organ differentiation in *Mercurialis*. **Plant Science**, v.80, n.1-2, p.49-65, 1991.

ECONOMOU, A.; READ, P.E. Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. **HortScience**, v.22, n.5, p.751-754, 1987.

ERLICH, H.A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J.J. Recent advances in the polymerase chain-reaction. **Science**, v.252, n.5013, p.1643-1651, 1991.

FAO 2001: production yearbook. Rome: FAO, 1999. v.53, p.179.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA - CENARGEN, 1995. 220 p.

FOISSET, N.; DELOURME, R.; BARRET, P.; HUBERT, N.; LANDRY, BS.; RENARD, M. Molecular-mapping analysis in *Brassica napus* using isozyme, RAPD and RFLP markers on a doubled haploid progeny. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, n.7, p.1017-1025, 1996.

FRANK, S.A. The evolutionary dynamics of cytoplasmic male sterility. **American Naturalist**, v.133, p.345-376, 1989.

GASSER, C.S. Molecular studies on the differentiation of floral organs. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.621-649, 1991.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture-handbook and directory of commercial laboratories**. Eversley: Exegetics, 1984. 709p.

GHOSH, P.; SEN, S.P. The modification of sex expression in papaya (*Carica papaya* L.). **Journal of Horticultural Science**, v.50, p.91-96, 1975.

GILL, G.P.; HARVEY, C.F.; GARDNER, R.C. Development of sex-linked PCR markers for gender identification in Actinidia. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.439-445, 1998.

GOLAN-GOLDHIRSH, A.; JONES, R.; ROWLAND, L.J. AFLP markers for sex determination in an *Illex* species. **Acta Horticultrae**, n.546, p.591-595, 2001.

GOLDSCHMIDT, R.B. **Theoretical genetics**. Berkeley: Univ. of California Press, 1955.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ, 1998. v.1, p.183-260.

GRIFFITHS, R.; ORR, K. The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers. **Molecular Ecology**, v.8, p.671-674, 1999.

HALDEMAN, J.H.; THOMAS, R.L.; McKAMY, D.L. Use of benomyl and rifampicin for in vitro shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. japonica*. **HortScience**, v.22, p.306-307, 1987.

HAMILTON, R.A. A quantitative study of growth and fruiting in inbred and crossbred progenies from two solo papaya strains. University of Hawaii, **Hawaii Agricultural Experiment Station**, Technical Bulletin, n.20, 1954.

HARDENACK, S.; YE, D.; SAEDLER, H.; GRANT, S. Comparison of MADS box gene expression in developing male and female flowers of the dioecious plant white campion. **Plant Cell**, v.6, p.1775-1787, 1994.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. **Plant propagation principles and practices**. New Jersey: Prentice-Hall, 1983. 727p.

HASDISEVE, P. et al. Relationship between endogenous auxin and gibberelin like substances and sex expression in papaya (*Carica papaya* L.). **Kasetsart Journal**, v.23, n.1, p.26-37, 1989.

HEILBORN, O. Taxonomical and cytological studies on cultivation Ecuadorian species of *Carica*. **Ark. Bot.**, v.17, p.1-16, 1921.

HESLOP-HARRISON, J. Auxin and sexuality in *Cannabis sativa*. **Physiologia Plantarum**, v.9, p.588-597, 1956.

HESLOP-HARRISON, J. Sexuality of Angiosperms. In: STEWARD, F.C. **Plant physiology a treatise**. New York: Academic Press, 1972. p.133-289.

HILLEL, J.; SCHAAP, T.; HABERFELD, A.; JEFFREYS, A.J.; PLOTZKY, Y.; CAHANER, A.; LAVI, U. DNA fingerprints applied to gene introgression in breeding programs. **Genetics**, v.124, n.3, p.783-789, 1990.

HOFMEYR, J.D.J. Genetical studies of *Carica papaya*. **South African Journal of Science**, v.35, p.300-304, 1938.

HOFMEYR, J.D.J. Genetics of *Carica papaya* L. **Chron. Bot.**, v.6, p.245-247, 1941.

HOFMEYR, J.D.J. Some genetic and breeding aspects of *Carica papaya*. **Agronomia Tropical**, v.17, p.345-351, 1967.

HORMAZA, J.I.; DOLLO, L.; POLITO, V.S. Identification of RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.9-13, 1994.

HOROVITZ, S, ZERPA, D.M.; ARNAL, H. Frecuencias de equilibrio de las formas sexuales en poblaciones de *Carica papaya* L. **Agronomia Tropical.**, v.3, n.3, p.149-174, 1953.

HOROVITZ, S. Determinacion del sexo en *Carica papaya* L.: estructura hipotetica de los cromosomas sexuales. **Agronomia Tropical**, v.3, n.4, p.229-249, 1954.

HOROVITZ, S.; JIMINEZ, H. Cruzamientos interespecificos e intergenericos en Caricaceas y sus implicaciones fitotecnias. **Agronomia Tropical**, v.17, p.353-359, 1967.

HOROVITZ, S.; ZERPA, D.M.; ARNAL, H. Frecuencias de equilibrio de las formas sexuales en poblaciones de *Carica papaya* L. **Agronomia Tropical**, v.3, n.3, p.149-174, 1953.

IRISH, E.E.; NELSON, T. Sex determination in monoecious and dioecious plants. **Plant Cell**, v.1, p.737-744, 1989.

JIANG, C.; SINK, K. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus M in asparagus. **Euphytica**, v.94, p.329-333, 1997.

KAFKAS, S.; ÇETINER, S.; PERL-TREVES, R.. Development of sex-associated RAPD markers in wild *Pistacia* species. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.76, n.2, p.242-246, 2001.

KARP, A.; SEBERG, ; BUIATTI, M. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. **Annals of Botany**, v.78, n.2, p.143-149, 1996.

KOELEMAN, J.G.M.; STOOF, J.; BIESMANS, D.J.; SAVELKOUL, P.H.M.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.J.E. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.9, p.2522-2529, 1998.

KUMAR, L.S.S.; SRINIVASAN, V.K. The cytology of *Carica papaya* Linn. **Indian Journal of Agricultural Science**, v.15, p.242, 1945.

LANGE, A.H. Factors affecting sex change in the flowers of *Carica papaya* L. **American Society for Horticultural Science Proc.**, v.77, p.252-264, 1961.

LEMOS, E.G.M.; SILVA, C.L.S.P.; ZAIDAN, H.A. Identification of sex in *Carica papaya* L. using RAPD markers. **Euphytica**, 2002. (in press)

LEWIS, D. Male sterility in natural populations of hermaphrodite plants. **New Phytologist**, v.40, p.56-63, 1941.

LIONAKIS, S.M. Genetics and physiology of sex determination in dioecious plants. **Fruits**, v.40, n.11, p.739-743, 1985.

LITZ, R.E.; CONOVER, R.A. Effect of sex type, season, and other factors on in vitro establishment and culture of *Carica papaya* L. explants. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.106, n.6, p.792-794, 1981.

LOUIS, J.P. Genes for the regulation of sex differentiation and male fertility in *Mercurialis annual* L. **Journal of Heredity**, v.80, n.2, p.104-111, 1989.

MACKILL, D.J.; ZHANG, Z.; REDOÑA, E.D.; COLOWIT, P.M. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. **Genome**, v.39, p.969-977, 1996.

MAGDALITA, P.M.; DREW, R.A.; ADKINS, S.W.; GODWIN, I.D. Morphological, molecular and cytological analyses of *Carica papaya* x *C. cauliflora* interspecific hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.224-229, 1997.

MANDOLINO, G.; CARBONI, A.; FORAPANI, S.; FAETI, V.; RANALLI, P. Identification of DNA markers linked to the male sex dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p.86-92, 1999.

MANICA, I. Cultivares e melhoramento do mamoeiro. In: MENDES, L.G.; DANTAS, J.L.L.; MORALES, C.F.G. (Eds.). **Mamão no Brasil**. Cruz das Almas: EAUFB/EMBRAPA-CNPMF, 1996. p.93-120.

MARIN, S.L.D.; GOMES, J.A. Sexagem do mamoeiro e sua aplicação no desbaste de plantas. Vitória-ES, EMCAPA, 1985. 20p. (EMCAPA. Circular Técnica, 11)

MARTINEZ, E. A.; DESTOMBE, C.; QUILLET, M. C.; VALERO, M. Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers highly linked to sex determination in the red alga *Gracilaria gracilis*. **Molecular Ecology**, v.8, p.1533-1538, 1999.

MEKAKO, H.U.; NAKASONE, H.Y. Interspecific hybridization among 6 *Carica* species. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.100, n.3, p.237-242, 1975.

MONDAL, M.; GUPTA, S.; MUKHERJEE, B.B. In vitro propagation of shoot buds of *Carica papaya* L. (Caricaceae) var. Honey Dew. **Plant Cell Reports**, v.8, p.609-612, 1990.

MOORE, J.N. Cytokinin-induced sex conversion in male clones of *Vitis* species. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.95, p.387-393, 1970.

MULCAHY, D.L.; WEEDEN, N.F.; KESSELI, R.; CARROLL, S.B. DNA probes for the Y-chromosomes of *Silene latifolia*, a dioecious angiosperm. **Sexual Plant Reproduction**, v.5, p.86-88, 1992.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v.25, p.135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirements of Citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 3. 1969. **Proceedings...** p.1155-1161.

NAKASONE, H.Y. Melhoramento de mamão no Havaí. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MAMOEIRO, 1., Jaboticabal, 1980. **Anais...**Jaboticabal, FCAV/UNESP. p. 275-287. 1980.

NAKASONE, H.Y.; LAMOUREUX, C. Transitional forms of hermaphroditic papaya flowers leading to complete maleness. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.107, n.4, p.589-592, 1982.

NAKASONE, H.Y.; PAULL, R.E. **Tropical fruits**. New York: CAB International, 1998. p.239-269.

NEGI, S.S.; OLMO, H.P. Sex conversion in male *Vitis* by a kinin. **Science**, v.152, p.1624-1625, 1966.

NEGI, S.S.; OLMO, H.P. Induction of sex conversion in male *Vitis vinifera*. **Vitis**, v.10, n.1, p.1-19, 1971.

OSTAPEMKO, V.I. The activity of oxidising enzymes in some dioecious plants. **Bot. Journal**, v.45, p.114-161, 1960.

PARASNIS, A.S.; GUPTA, V.S.; TAMHANKAR, S.A.; RANJEKAR, P.K. A highly reliable sex diagnostic PCR assay for mass screening of papaya seedlings. **Molecular Breeding**, v.6, p.337-344, 2000.

PARKER, J.S. Sex chromosomes and sexual differentiation in flowering plants. **Chromosomes Today**, v.10, p.187-198, 1990.

PARKER, J.S.; CLARK, M.S. Dosage sex-chromosome systems in plants. **Plant Science**, v.80, p.79-92, 1991.

PHILLIPS, R.; ARNOTR, S.M.; KAPLAN, S.E. Antibiotics in plant tissue culture: rifampicin effectively controls bacterial contaminants without affecting the growth of short-term explant cultures of *Helianthus tuberosus*. **Plant Science Letters**, v.21, p.235-240, 1981.

POLLEY, A.; SEIGNER, E.; GANAL, M.W. Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers. **Genome**, v.40, p.357-361, 1997.

POLLOCK, K.; BARFIELD, D.G.; SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. **Plant Cell Reports**, v.2, p.36-39, 1983.

RESTREPO, S.; DUQUE, M.; TOHME, J.; VERDIER, V. AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Microbiology**, v.145, p.107-114, 1999.

REUVENI, O.; SHLESINGER, D.R.; LAVI, U. In vitro clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.20, p.41-46, 1990.

RICHARDS, A.J. **Plant breeding systems**. Boston: George Allen and Unwin, 1986.

RUAS, C.F.; FAIRBANKS, D.J.; EVANS, P.P.; STUTZ, H.C.; ANDERSEN, W.R.; RUAS, P.M. Male-specific DNA in the dioecious species *Atriplex garrettii* (Chenopodiaceae). **American Journal of Botany**, v.85, n.2, p.162-167, 1998.

SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceeding National Academy Science USA**, v.81, p.8014-8018, 1984.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p.487-491, 1985.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, S.C. Desenvolvimento de biblioteca de microsátélites e análise bidimensional de proteínas em *Carica papaya* L. 2001. 73 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

SCHMILDT, E.R. Enraizamento “in vitro” e “ex vitro” de ramos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). 1994. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1994.

SCHMILDT, E.R.; TEIXEIRA, S.L.; CRUZ, C.D.; COUTO, F.A.A.; LANI, E.R.G. Enraizamento de ramos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) obtidos por cultivo *in vitro* de ápices caulinares. **Revista Ceres**, v.44, n.253, p.339-345, 1997.

SIQUEIRA, D.L. de; BOTREL, N. Clima e solo para a cultura do mamoeiro. **Informe Agropecuário**, n.134, p.8-10, 1986.

SONDUR, S.N.; MANSHARDT, R.M.; STILES, J.I. A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers. **Theoretical and Applied Genetic**, v.93, p.547-553, 1996.

STILES, J.I.; LEMME, C.; SONDUR, S.; MORSHIDI, M.B.; MANSHARDT, R. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.697-701, 1993.

STOREY, W.B. The primary flower types of papaya and the fruit types that develop from them. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.35, p.80-82, 1938a.

STOREY, W.B. Segregations of sex types in Solo papaya and their applications to the selection of seed. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.35, p.83-85, 1938b.

STOREY, W.B. Papaya. University of Hawaii, **Hawaii Agricultural Experiment Station**, Technical Bulletin, p.11-12, 1939.

STOREY, W.B. The botany and sex relationships of the papaya. University of Hawaii, **Hawaii Agricultural Experiment Station**, Technical Bulletin , v.87, p.5-22, 1941.

STOREY, W.B. Genetics of papaya. **Journal of Heredity**, v.44, n.2, p.70-78, 1953.

STOREY, W.B. Modifications of sex expression in papaya. **Hort. Advances**, v.2, p.49-60, 1958.

STOREY, W.B. Theory of the derivations of the unisexual flowers of Caricaceae. **Agroñomia Tropical**, v.17, p.273-321, 1967.

STOREY, W.B. Papaya. In: SIMMONDS, N.W. **Evolution of crop plants**. London: Longman, 1976. p.21-24.

SUBRAMANYAM, M.D.; IYER, C.P.A. Cytological studies in *Carica* species and hybrids. **Genética Agrícola**, v.36, p.73-86, 1982.

TANKSLEY S.D.; GANAL, M.W.; MARTIN, G.B. Chromosome landing a paradigm for map based gene cloning in plants with large genomes **Trends in Genetics**, v.11, n.2, p.63-68, 1995.

TAYLOR, G.R. Polymerase chain reaction: basic principles and automation. In: McPHERSON, M.J.; QUIRKE; TAYLOR, G.R. (Eds.). **PCR: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1993. p.1-13.

TEO, C.K.H.; CHAN, L.K. The effects of agar content, nutrient concentration, genotype and light intensity on the in vitro rooting of papaya microcuttings. **Journal of Horticultural Science**, v.69, n.2, p.267-273, 1994.

TERAUCHI, R.; KAHL, G.. Mapping of the *Dioscorea tokoro* genome: AFLP markers linked to sex. **Genome**, v.42, p.752-762, 1999.

VAN DAMME, J.M.M. Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. II. Inheritance of three male-sterility types. **Heredity**, v.50, p.253-273, 1983.

VAN DAMME, J.M.M.; VAN DELTEN, W. Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. I. Polymorphism for plasmon type. **Heredity**, v.49, p.303-318, 1982.

VIANNA, G.R. Micropropagação do mamoeiro (*Carica papaya* L.) utilizando ápices caulinares de plantas adultas. 1996. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

VIANNA, G.R.; COUTO, F.A.A.; OLIVEIRA, A.B.; ZAMBOLIM, L.; MARIA, J. A rifampicina na descontaminação bacteriana de explantes de mamoeiro provenientes do campo. **Bragantia**, v.56, n.2, p.249-254, 1997.

VIEITEZ, F.J.; BALLESTER, A. Effect of etiolation and shading on the formation of rooting inhibitors in chestnut trees. **Phyton**, v.48, n.1/2, p.13-19, 1988.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. van de; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acid Research**, v.23, p.4407-4414, 1995.

WAUGH, R.; POWELL, W. Using RAPD markers for crop improvement. **Tibtech**, v.10, p.186-191, 1992.

WEEDEN, N.F. Approaches to mapping in horticultural crops. In: GRESHOFF, P.M. (Ed.). **Plant Genome Analysis**. New York: CRS Press, 1994. p.57-68.

WESTERGAARD, M. The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. **Advances in Genetics**, v.9, p.217-281, 1958.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LAVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, W. Mechanisms of sex determination. In: JAMES, W.O. **Genetical principles and plant breeding**. Oxford: Blackwell Scient. Publ., 1964. p.235-260.

WINNAAR, W. Clonal propagation of papaya in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.12, p.305-310, 1988.

WOLF, D. E.; RIESENBERG, L.H.; SPENCER, S.C. The genetic mechanism of sex determination in the androdioecious flowering plant, *Datisca glomerata* (Datiscaceae). **Heredity**, v.78, p.190-204, 1997.

YIN, T.J.; QUINN, J.A. Tests of a mechanistic model of one hormone regulating both sexes in *Cucumis sativus* (Cucurbitaceae). **American Journal of Botany**, v.82, n.12, p.1537-1546, 1995.

YOUNG, P.M.; HUTCHINS, A.S.; CANFIELD, M.L. Use of antibiotics to control bacteria in shoot cultures of woody plants. **Plant Science Letters**, v.34, p.203-209, 1984.

ZABEU, M.; VOS, P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. **European Patent Application No. 92402629.7**. (Publication No. 0534858 A1). 1993.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 663p.

ZEE, F.T.P. Breeding for papaya ringspot virus tolerance in Solo papaya, *Carica papaya* L. (Tese PhD). University of Hawaii, Hawaii, 1985.

ZERPA, D.M. de. Cytology of inter-specific hybrids in *Carica*. **Agronomia Tropical**, v.8, p.184-196, 1959.

ZHANG, L.H.; OZIAS-AKINS, P.; KOCHERT, G.; KRESOVICH, S.; DEAN, R.; HANNA, W. Differentiation of bermudagrass (*Cynodon* spp.) genotypes by AFLP analyses. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p.895-902, 1999.