

FERNANDA SANTOS ARAÚJO

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS E CITOMÉTRICOS EM MAMOEIRO (*Carica
papaya* L.)**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Genética e Melhoramento, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

FERNANDA SANTOS ARAÚJO

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS E CITOMÉTRICOS EM MAMOEIRO (*Carica
papaya* L.)**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Genética e Melhoramento, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.**

APROVADA: 26 de fevereiro de 2008.

**Prof. Wagner Campos Otoni
(Co-orientador)**

**Prof^a. Sílvia das Graças Pompolo
(Co-orientadora)**

Prof^a. Mara Garcia Tavares

Pesq. Eveline Teixeira Caixeta

**Prof. Carlos Roberto de Carvalho
(Orientador)**

Aos meus pais sempre presentes, Teobaldo e Maria das Graças.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de estudo em uma instituição de ensino superior de alta qualidade.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade de desenvolvimento da pesquisa e pelo financiamento.

À empresa CALIMAN Agrícola do Espírito Santo, pelo apoio financeiro.

Ao Professor Carlos Roberto de Carvalho pela orientação, pelos ensinamentos, pela amizade e pela paciência em vários momentos.

Aos meus conselheiros Sílvia das Graças Pompolo e Wagner Campos Otoni, pela amizade e atenção dispensada a este trabalho.

À Dr^a. Eveline Teixeira Caixeta e à Professora Mara Garcia Tavares, pelas sugestões.

Aos meus pais pelo constante apoio e dedicação, em todos os momentos de minha vida.

Aos meus amigos da turma de Ciências Biológicas pelo companheirismo, pela força nos momentos difíceis, pelos conselhos e pelos momentos felizes.

Aos colegas de laboratório Wellington, Milene, Isabella, Christiane e Thaís pela amizade, pela convivência agradável, pelos momentos de descontração e pelo auxílio.

Ao funcionário do Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal, José Francisco pela amizade e auxílio.

Aos professores da Universidade Federal de Viçosa pelos ensinamentos e pela contribuição em minha formação.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

FERNANDA SANTOS ARAÚJO, filha de Teobaldo Dutra de Araújo e Maria das Graças Santos Araújo, nasceu em Barbacena, Minas Gerais, no dia 3 de fevereiro de 1984.

Em 2002, iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, graduando-se em maio de 2006.

Durante o período de graduação, foi bolsista do PIBIC/CNPq do Departamento de Biologia Geral, onde desenvolveu atividades de pesquisa em Citogenética e Citometria Vegetal.

Em maio de 2006, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Genética e Melhoramento da UFV, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2008.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais da espécie <i>Carica papaya</i>	1
1.2. Determinação do sexo em mamão.....	1
1.2.1. Hipóteses.....	2
1.2.1.1. Hipótese de um gene com três alelos.....	2
1.2.1.2. Hipótese do balanço dos cromossomos sexuais sobre os autossomos.....	3
1.2.1.3. Hipótese de um grupo de genes ligados.....	5
1.2.1.4. Hipótese da duplicação.....	6
1.2.1.5. Hipótese dos cromossomos XY.....	7
1.2.1.6. Hipótese dos elementos regulatórios da via de desenvolvimento floral.....	8
1.2.1.7. Interpretação das hipóteses segundo MING et al. (2007).....	8
1.3. Aspectos citogenéticos de <i>Carica papaya</i>	10
1.4. Bandeamento com laranja de acridina.....	11
1.5. Aspectos gerais da citometria de fluxo.....	12
1.5.1. Estimação do conteúdo de DNA nuclear.....	13
1.5.2. Determinação da relação de bases AT/GC.....	14
1.5.3. Aplicações da citometria de fluxo na determinação do sexo em plantas.	15
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Material.....	18
3.2. Métodos.....	18
3.2.1. Citogenética de plantas hermafroditas de <i>Carica papaya</i>	18
3.2.1.1. Preparação do material citogenético.....	18
3.2.1.2. Pré-tratamento e fixação das raízes.....	19
3.2.1.3. Maceração e dissociação celular.....	19

3.2.1.4. Técnica de secagem ao ar e preparações citogenéticas.....	19
3.2.1.5. Bandeamento com laranja de acridina.....	20
3.2.1.6. Análise de imagens.....	20
3.2.2. Citometria de fluxo.....	21
3.2.2.1. Isolamento dos núcleos.....	21
3.2.2.2. Estimação do conteúdo de DNA nuclear.....	21
3.2.2.3. Determinação da relação de bases AT/GC.....	22
3.2.2.4. Análise dos dados.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Citogenética de plantas hermafroditas de <i>Carica papaya</i>	24
4.1.1. Montagem do kariograma de <i>C. papaya</i>	24
4.1.2. Bandeamento com laranja de acridina.....	26
4.2. Citometria de fluxo.....	28
4.2.1. Estimação do conteúdo de DNA nuclear e determinação da relação de bases AT/GC.....	28
5. DISCUSSÃO.....	31
5.1. Citogenética de plantas hermafroditas de <i>Carica papaya</i>	31
5.1.1. Montagem do kariograma de <i>C. papaya</i>	31
5.1.2. Bandeamento com laranja de acridina.....	33
5.2. Citometria de fluxo.....	35
5.2.1. Estimação do conteúdo de DNA nuclear e determinação da relação de bases AT/GC.....	35
6. CONCLUSÕES.....	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

RESUMO

ARAÚJO, Fernanda Santos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Estudos citogenéticos e citométricos em mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. Orientador: Carlos Roberto de Carvalho. Co-orientadores: Sílvia das Graças Pompolo e Wagner Campos Otoni.

O mamoeiro, *Carica papaya*, é a espécie da família Caricaceae considerada mais importante economicamente, possuindo diversas aplicações industriais. Apesar de sua importância, são poucos os dados envolvendo a caracterização citogenética e citométrica dessa espécie. Portanto, o presente estudo visa ampliar o conhecimento com relação ao cariótipo, ao tamanho do genoma e à relação de bases do mamoeiro. Os objetivos específicos foram: caracterizar morfológicamente os cromossomos de *C. papaya*, utilizando recursos de análise de imagem; aplicar a coloração de laranja de acridina aos cromossomos mitóticos de *C. papaya*, para a identificação de regiões organizadoras do nucléolo (RONs); estimar o conteúdo de DNA nuclear e determinar a composição de bases de plantas masculinas, femininas e hermafroditas de *C. papaya*, por meio da técnica de citometria de fluxo e verificar se os dados citométricos possibilitam diferenciar os três tipos sexuais quanto ao tamanho genômico e à relação de bases AT/GC. Para isso, raízes de plantas hermafroditas foram pré-tratadas com amiprofos-metil (APM), 3 μ M, por 15h, a 4°C e fixadas. Lâminas foram preparadas por dissociação celular e secagem ao ar e submetidas à coloração com Giemsa e com laranja de acridina. A associação das técnicas de dissociação celular e secagem ao ar, com a coloração convencional com Giemsa resultou na obtenção de células metafásicas e prometáfásicas com cromossomos individualizados, bem espalhados na lâmina e sem sobreposições, com constrições primárias e secundárias bem definidas. Essas características possibilitaram o pareamento dos homólogos e a classificação morfológica dos cromossomos, com a montagem de kariogramas de uma planta hermafrodita de *C. papaya*, que apresentou número cromossômico de $2n = 18$, sendo sete pares metacêntricos (1, 2, 3, 4, 5, 7 e 8) e dois submetacêntricos (6 e 9). A coloração com laranja de acridina possibilitou a identificação de bandas verde-amareladas em dois cromossomos (1 e 2). As

bandas que emitiram maior intensidade de fluorescência corresponderam às regiões flangeadoras das RONS, como salientado pela localização do cromossomo 1 associado ao nucléolo. Considerando os resultados obtidos por meio das técnicas citogenéticas, não houve diferenças morfológicas que evidenciassem um possível par de cromossomos heteromórficos na planta hermafrodita. Para a aplicação da citometria de fluxo, folhas de plantas dos três tipos sexuais de mamão foram submetidas ao procedimento de cortes seqüenciais em tampão de extração, seguidos do tampão de coloração. A suspensão obtida foi filtrada e analisada em citômetro de fluxo, para a determinação do conteúdo de DNA nuclear total e da composição de bases AT e GC. As análises citométricas realizadas possibilitaram a geração de histogramas com picos de núcleos G_0/G_1 com coeficientes de variação (CVs) menores do que 5%. A análise dos núcleos de plantas masculinas, femininas e hermafroditas de *C. papaya*, corados com iodeto de propídio (IP), permitiu calcular os valores médios 2C de DNA, que foram 0,67, 0,65 e 0,65 pg, respectivamente, sendo estatisticamente iguais, pelo teste F, para os três sexos. A análise dos núcleos corados com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e cromomicina A_3 (CMA $_3$) possibilitou o cálculo das freqüências de pares de bases AT e GC para os três tipos sexuais, também estatisticamente iguais, de acordo com o teste F. Portanto, não houve diferença significativa quanto ao tamanho genômico ou quanto à relação de pares de bases entre os três sexos do mamoeiro. Com relação aos valores médios de conteúdos absolutos de DNA nuclear observados, e considerando a semelhança morfológica dos cromossomos de *C. papaya*, cada um dos 18 cromossomos teria, em média, 0,036 a 0,037 pg de DNA. Conseqüentemente, para a identificação de um provável par de cromossomos heteromórficos, ter-se-ia de se distinguir uma porção muito pequena do cromossomo, com uma quantidade de DNA que estaria abaixo do limite de resolução das técnicas citogenéticas e citométricas utilizadas.

ABSTRACT

ARAÚJO, Fernanda Santos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2008. **Estudos citogenéticos e citométricos em mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. Adviser: Carlos Roberto de Carvalho. Co-advisers: Sílvia das Graças Pompolo and Wagner Campos Otoni.

Carica papaya is one of the most economically important species of the Caricaceae family, with many industrial applications. Despite its importance, there is little information covering the cytogenetic and cytometric characterization of this species. Hence, this study is justified by the need to increase the knowledge related to papaya karyotype, nuclear DNA content and base composition. The specific objectives of this study were to: characterize papaya chromosomes, using image analysis resources; apply the acridine orange staining to mitotic chromosomes of *C. papaya* to identify nucleolar organizers regions (NORs); estimate the nuclear DNA content and determine the base composition of male, female and hermaphrodite plants of *C. papaya*, by the use of flow cytometry and verify if the cytometric data can differentiate the three sex types with regard to their DNA content and base pair frequencies. Root tips from hermaphrodite plants were pre-treated with amiprophosmethyl (APM) 3 μ M for 15h, at 4°C and fixed. Slides were prepared by cellular dissociation and air drying, and submitted to Giemsa and acridine orange staining. The association of cellular dissociation and air drying techniques to Giemsa conventional staining resulted in metaphasic and prometaphasic cells with individual and well spread chromosomes, without overlaps, with well defined primary and secondary constrictions. These characteristics enabled the homologues pairing and morphological classification of the chromosomes, with karyograms assembly of a hermaphrodite plant, which had 18 chromosomes, being 7 pairs metacentrics (1, 2, 3, 4, 5, 7 and 8) and 2 submetacentrics (6 and 9). The acridine orange staining allowed the identification of yellowish green bands in two chromosomes (1 and 2). The strong bands corresponded to NOR flanking regions, as sustained by the localization of chromosome 1 associated to the nucleolus. Considering the obtained results by the cytogenetic techniques, there were no morphological differences that could

evidence a possible heteromorphic pair of chromosomes in the hermaphrodite plant of *C. papaya*. For the application of flow cytometry, leaves from the three sexual forms of papaya were submitted to the chopping procedure in an isolation buffer, followed by a staining buffer. The obtained suspension was passed through a filter and analyzed in a flow cytometer, to determine the total nuclear DNA content and base composition. The cytometric analyses evidenced histograms with peaks of G_0/G_1 nuclei with coefficients of variation (CVs) lower than 5%. The analysis of male, female and hermaphrodite plants nuclei, stained with propidium iodide (PI), allowed the calculation of the mean 2C DNA values, which were 0.67, 0.65 and 0.65 pg, respectively, and statistically equal, by the F test, for the three sex forms. The analysis of nuclei stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and chromomycin A_3 (CMA $_3$) enabled the calculation of AT/GC base pair frequencies of the three sex types, also statically equal, by the F test. Therefore, there was no significant difference between the three sex forms of papaya in relation to their total nuclear DNA content and base pair composition. In relation to the obtained mean values of nuclear DNA content and considering the morphological similarity of papaya chromosomes, each one of the 18 chromosomes would have, on average, 0.036 to 0.037 pg of DNA. Hence, in order to identify a probable pair of heteromorphic chromosomes, a tiny portion of the chromosome would have to be distinguished, corresponding to an amount of DNA under the limits of resolution of the cytogenetic and cytometric techniques employed in this study.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Aspectos gerais da espécie *Carica papaya*

O mamoeiro, *Carica papaya* L., é uma planta herbácea, nativa da América Tropical, pertencente à classe Eudycotyledoneae, ordem Vidales, família Caricaceae (MARIN e GOMES, 1986), com seis gêneros e 35 espécies, das quais 32 são dióicas, 2 trióicas e uma monóica (MING et al., 2007).

O mamão pode ser encontrado em regiões que apresentam clima quente, precipitação abundante, solos férteis e bem drenados (MARIN e GOMES, 1986), sendo cultivado nas regiões tropicais e subtropicais (MING et al., 2007).

O gênero *Carica* é o único da família Caricaceae com espécies domesticadas, e entre elas, *C. papaya* é a mais importante economicamente (BADILLO, 1993), sendo considerada uma das principais fontes de vitaminas A e C e da enzima papaína (BHATTACHARYA e KHUSPE, 2001). Segundo Jones e Mercier (1976), citados por PARASNIS et al. (1999), essa enzima proteolítica extraída do látex do mamoeiro, apresenta grande importância comercial e tem sido utilizada nas indústrias alimentícias, têxteis, farmacêuticas e de cosméticos.

De acordo com os dados da Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aqüicultura e Pesca (SEAG, 2007), o Brasil é o maior produtor e o terceiro maior exportador de mamão, e responde por cerca de 25% da produção mundial, com 1,6 milhões de toneladas por ano. O mamão é a sétima fruta *in natura* mais exportada no país, sendo cultivado em aproximadamente 30 mil hectares, concentrados nos estados do Espírito Santo e Bahia, que juntos são responsáveis por 70% da produção nacional (SEAG, 2007).

1.2 – Determinação do sexo em mamão

O sistema de determinação do sexo em *C. papaya* tem atraído a atenção de geneticistas e melhoristas devido à biologia intrigante da espécie e aos problemas econômicos causados pela segregação dos tipos sexuais (MING et al., 2007), assim como pela reversão sexual sazonal observada em plantas

masculinas e hermafroditas do mamoeiro, cujas flores variam em expressão sexual sob diferentes condições ambientais (STOREY, 1941, 1953). Conforme relatado por STOREY (1941), o processo de reversão sexual pode ser interpretado como uma resposta das plantas masculinas e hermafroditas a mudanças fisiológicas. Esse efeito tem se mostrado mais evidente, sob condições naturais, em decorrência de mudanças de estações do ano (STOREY, 1941).

De acordo com STOREY (1953), *C. papaya* apresenta três sexos: masculino, feminino e hermafrodita. Segundo PARASNIS et al. (1999), o sexo do mamoeiro pode ser deduzido, de forma prática, após atingir a maturidade reprodutiva (de 6 a 8 meses). Como alimento, os frutos piriformes de árvores hermafroditas são preferidos no mercado, aos frutos esféricos de plantas femininas, sendo desejável que indivíduos hermafroditas sejam cultivados no campo. Entretanto, como a determinação do sexo em mamão nos estágios de sementes não tem sido realizada por meio de métodos práticos e de baixo custo, as plantas femininas são removidas após florescerem (URASAKI et al., 2002). Esse tipo de cultivo é indesejável, pois acarreta desperdício de recursos, demanda de espaço, tempo de plantio e manejo, o que poderia ser minimizado se o sexo da planta fosse determinado em estágios juvenis. Nesse sentido, é necessário o desenvolvimento de metodologias práticas que possam contribuir com a identificação do sexo desta planta (URASAKI et al., 2002). Entretanto, estudos citológicos e morfológicos não têm permitido diferenciar os tipos sexuais do mamão (PARASNIS et al., 1999).

Várias hipóteses têm sido propostas por pesquisadores, visando elucidar o sistema de determinação sexual em *C. papaya*.

1.2.1 - Hipóteses

1.2.1.1 – Hipótese de um gene com três alelos

Baseados nas segregações obtidas a partir das combinações de cruzamentos entre os três tipos sexuais de *C. papaya*, STOREY (1938) e

HOFMEYER (1938), concluíram, independentemente, que o sexo em mamão é determinado por um único gene com três alelos: M, masculino; M^h, hermafrodita; e m, feminino. Segundo esses pesquisadores, o sexo feminino (mm) é homozigoto recessivo, enquanto os sexos masculino (Mm) e hermafrodita (M^hm) são heterozigotos obrigatórios, com tipicamente 25% das sementes inviáveis no fruto, sendo todas as combinações de alelos dominantes (MM, MM^h, M^hM^h) letais ao embrião. Os cruzamentos realizados e os resultados obtidos encontram-se listados a seguir:

Cruzamentos	Segregação		
	mm	M ^h m	Mm
mm X Mm	1	0	1
mm X M ^h m	1	1	0
Mm X Mm	1	0	2
M ^h m X M ^h m	1	2	0
M ^h m X Mm	1	1	1

1.2.1.2 – Hipótese do balanço dos cromossomos sexuais sobre os autossomos

De acordo com HOFMEYER (1941), a presença de fatores letais aparentemente associados aos alelos M e M^h e a estabilidade sexual diferenciada observada entre os tipos sexuais de *C. papaya*, sugeriam que a hipótese que propunha a existência de um gene com três alelos não era inteiramente satisfatória. Assim, uma hipótese de determinação do sexo baseada no balanço gênico entre determinantes sexuais masculinos e femininos foi proposta por esse pesquisador, visando explicar a letalidade dos genótipos homozigotos dominantes, e também a estabilidade sexual diferenciada entre os três sexos.

Segundo HOFMEYER (1941), os cromossomos contendo os alelos M, M^h e m seriam os “cromossomos sexuais” de mamão. Em sua hipótese, assumiu-se

que os fatores femininos determinantes do sexo estariam presentes nos “cromossomos sexuais”, ao passo que os fatores masculinos estariam contidos nos autossomos. Posteriormente, assumiu-se que M e M^h representariam uma pequena seção inativa ou inerte dos “cromossomos sexuais”, cujos genes vitais estariam faltando. Em virtude da ausência de genes vitais nessas regiões inativas, os genótipos MM, MM^h e M^hM^h seriam letais, ao passo que os genótipos Mm e M^hm seriam viáveis, pela presença de um “cromossomo sexual” m.

A hipótese do balanço gênico foi ilustrada por HOFMEYER (1941), por meio da atribuição de valores arbitrários aos cromossomos sexuais e aos autossomos. Os valores em favor da feminilidade atribuídos aos “cromossomos sexuais” foram: m = 25, M = 21 e M^h = 22, e o valor atribuído aos autossomos, em favor da masculinidade, foi de 47. Deste modo, o balanço gênico dos genótipos das três formas sexuais, seria:

Sexo	Genótipo	Valência dos cromossomos		Balanço gênico
		Sexuais	Autossomos	
Feminino	mm	50	47	3
Masculino	Mm	46	47	-1
Hermafrodita	M ^h m	47	47	0

Baseado nos valores encontrados, esse pesquisador sugeriu que o sexo feminino, com valor 3, estaria bem acima do valor limiar de 0, e que o sexo masculino, com valor -1, estaria relativamente próximo do valor limiar. O sexo hermafrodita, portanto, cujo valor está no limiar 0, seria facilmente afetado pelos fatores ambientais, induzindo a reversão sexual. Segundo esse pesquisador, o nível de proximidade do valor limiar refletiria a estabilidade dessas formas sexuais.

Entretanto, apesar de experimentos posteriores terem sido realizados por Hofmeyer visando confirmar sua hipótese, os dados apresentados não foram conclusivos (MING et al., 2007).

1.2.1.3 – Hipótese de um grupo de genes ligados

STOREY, em 1953, sugeriu que o sexo em *C. papaya* seria determinado não por um único gene, mas por um conjunto de genes ligados, localizados em segmentos diferenciais, correspondentes a regiões idênticas nos cromossomos sexuais. Desta forma, os segmentos determinantes do sexo comportar-se-iam como fatores únicos. Os genes contidos nos segmentos determinantes do sexo seriam, segundo STOREY (1953), os seguintes:

Genes	Função
Mp	pedúnculo longo das plantas masculinas
mp	pedúnculo curto das plantas femininas e hermafroditas
l	letal zigótico, presente nos cromossomos M e M ^h
sa	supressor do androceu
sg	supressor do gineceu
C	fator hipotético para a supressão do <i>crossing over</i> na região diferencial dos cromossomos M e M ^h

Com base no modelo proposto, os genótipos dos três tipos sexuais de mamão seriam:

Sexo	Genótipo
Masculino	Mp l C + sg / + + + sa +
Hermafrodita	+ l C + sg / + + + sa +
Feminino	+ + + sa + / + + + sa +

De acordo com STOREY (1953), o gene controlando o comprimento do pedúnculo (Mp) seria o único a diferenciar os genótipos de plantas masculinas e hermafroditas. O fator hipotético C poderia representar um gene ou possivelmente uma inversão cromossômica, uma deleção ou a proximidade do segmento determinante do sexo com o centrômero ou telômeros dos cromossomos, onde a ocorrência de *crossing over* pudesse ser impossibilitada. O fator zigótico letal seria comum a plantas masculinas e hermafroditas e reforçaria a heterozigosidade nessas formas sexuais. O autor afirmou que deleções cromossômicas sobrepostas poderiam ser a causa da letalidade zigótica e também da supressão do *crossing over*. Nesse caso, os genes I e C poderiam representar um único rearranjo cromossômico, ao invés de dois genes proximamente ligados. O gene sa, em homozigose, controlaria a supressão do androceu, ao passo que o gene sg, em homozigose, controlaria a supressão do gineceu. Segundo STOREY (1953), a maioria das plantas masculinas e hermafroditas seriam heterozigotas para esses dois últimos genes, em virtude da reversão sexual ocasional observada nesses tipos sexuais, variando de acordo com as condições climáticas.

1.2.1.4 – Hipótese da duplicação

Outra hipótese relativa ao sistema de determinação sexual em *C. papaya* foi proposta por HOROVITZ, em 1954. De acordo com esse pesquisador, o sexo em mamão poderia ser explicado por alelos múltiplos de um mesmo *locus* determinante do sexo. Assim, os genes f, F e F^h foram designados como sendo alelos sexuais femininos, masculinos e hermafroditas, contidos nos cromossomos m, M e M^h, respectivamente. Nessa hipótese, o *locus* F^h do cromossomo M^h seria composto dos *loci* F do cromossomo M, e f do cromossomo m.

Segundo HOROVITZ (1954), existe um grupo de caracteres que acompanham as formas sexuais, constituindo “complexos sexuais secundários”. Analisando alguns desses caracteres, ele observou que as plantas hermafroditas apresentavam alguns caracteres sexuais secundários semelhantes aos de plantas femininas, e alguns semelhantes aos de plantas masculinas, o que o levou a

sugerir que M^h conteria uma recombinação dos cromossomos m e M . Desta forma, a planta hermafrodita teria sido originada a partir das formas dióicas, constituindo-se de uma modificação da planta masculina: o cromossomo M^h teria se derivado de um indivíduo Mm , por meio de um *crossing over* desigual; e o *locus* F^h seria uma duplicação composta da soma dos *loci* F e f . Assim, o novo cromossomo M^h receberia a região inativa de M com sua condição letal, havendo também uma região ativa, homóloga nos três cromossomos m , M e M^h , contendo os genes ligados previamente sugeridos por STOREY (1953).

1.2.1.5 – Hipótese dos cromossomos XY

Em 1967, HOROVITZ e JIMENEZ, baseados em cruzamentos entre espécies da família Caricaceae, propuseram que a determinação do sexo em *C. papaya* seria do tipo XY. Segundo esses pesquisadores, a forma hermafrodita ter-se-ia derivado a partir das formas dióicas, em que o cromossomo Y teria dado origem a um novo cromossomo Y_2 , cujo resultado forneceu os seguintes tipos sexuais com seus respectivos genótipos:

Sexo	Genótipo*
Feminino	XX
Masculino	XY_1
Hermafrodita	XY_2

*As combinações Y_1Y_1 , Y_1Y_2 e XY_2 seriam letais.

Anos mais tarde, técnicas moleculares possibilitaram avanços nos estudos da determinação sexual em *C. papaya*, o que levou os pesquisadores, novamente, a proporem a hipótese de que o sexo em mamão seria determinado por um sistema de cromossomos sexuais XY (PARASNIS et al., 1999; URASAKI et al., 2002; LIU et al., 2004). Nesse sentido, PARASNIS et al. (1999) relataram o uso de repetições de microssatélites para a identificação de marcadores de DNA específicos para o sexo em mamão. Entre estes, a sonda de microssatélite $(GATA)_4$ apresentou diferenças sexuais específicas nas plantas analisadas,

forneendo evidências da presença de um cromossomo Y nessa espécie. Além disso, URASAKI et al. (2002) reportaram um marcador RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) específico para plantas masculinas e hermafroditas. Sua conversão em um marcador SCAR (região amplificada de seqüência caracterizada) permitiu a identificação do sexo em mamão.

Em 2004, LIU et al., utilizando marcadores sexuais SCAR e AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado), apresentaram o mapeamento físico do genoma de mamão, o que revelou uma região curta masculino-específica no cromossomo Y (MSY) que não recombina com o cromossomo X. Segundo esses autores, na região não-recombinante foram observadas seqüências duplicadas, contendo inserções de nucleotídeos, deleções e substituições, além do aumento de elementos transponíveis e repetições invertidas, o que forneceu evidências de que os cromossomos sexuais se originaram a partir de um par regular de autossomos. O cromossomo Y primitivo de mamão representaria, conforme LIU et al. (2004), um evento inicial na evolução dos cromossomos sexuais.

1.2.1.6 – Hipótese dos elementos regulatórios da via de desenvolvimento floral

Em um modelo proposto por SONDUR et al. (1996), o alelo masculino dominante, *SEX1-M*, codificaria um fator trans-ativador que promoveria o desenvolvimento dos estames e suprimiria o desenvolvimento dos carpelos, como um fator masculinizante. O alelo hermafrodita dominante, *SEX1-H*, seria um intermediário capaz de induzir a formação dos estames e de apenas reduzir o tamanho dos carpelos. O alelo feminino recessivo, *sex1-f*, seria incapaz de induzir a formação de estames e poderia ser um alelo nulo. O fator letal ligado aos alelos *SEX1-M* e *SEX1-H* seria resultado da ausência de uma função requerida adicional, presente apenas no alelo *sex1-f*.

1.2.1.7 – Interpretação das hipóteses segundo MING et al. (2007)

De acordo com MING et al. (2007), o sexo em mamão é controlado por um par de cromossomos sexuais recentemente evoluídos, havendo dois cromossomos Y na espécie. Nas plantas masculinas, o cromossomo sexual masculino-específico seria designado como Y, e como Y^h nas plantas hermafroditas. Segundo esses pesquisadores, pelo menos dois genes diferenciam esses dois cromossomos: um gene controlaria o pedúnculo longo e o outro gene masculinizante controlaria o aborto do carpelo em flores masculinas. Como o aborto de embriões de genótipos Y^(h)Y^(h) ocorre alguns dias após a polinização, um gene regulatório essencial ao desenvolvimento do embrião poderia ter estado presente e degenerado em ambos os cromossomos Y e Y^h (MING et al., 2007).

Segundo este autor, é provável que dois genes estejam envolvidos na determinação do sexo em *C. papaya*: um gene feminilizante ou supressor de estames causaria o aborto dos estames em flores femininas; e um gene masculinizante ou supressor de carpelos causaria o aborto do carpelo em flores masculinas.

Conforme relatado por MING et al. (2007), a região masculino-específica no cromossomo Y (MSY) de mamão se comportaria como uma unidade genética única, já que não há recombinação. Portanto, se a região MSY for considerada como um *locus* gigante atuando como um único gene com três alelos, a hipótese de STOREY (1938) e HOFMEYER (1938), faria sentido. Entretanto, sete genes funcionais já foram caracterizados nesse *locus* (Q. Yu, P. H. Moore, J. Jiang, A. H. Paterson, R. Ming, dados não publicados, citados por MING et al., 2007).

De acordo com MING et al. (2007), a hipótese mais plausível, com base nos resultados moleculares disponíveis, é a proposta por STOREY em 1953, relacionada a um grupo de genes ligados localizados em uma pequena região, onde o gene controlando o pedúnculo longo, Mp, estaria no cromossomo Y; o fator letal zigótico, I, seria um gene regulatório nos cromossomos Y e Y^h, que seria crítico para o desenvolvimento do embrião, mas que teria se degenerado, tornando-se não funcional e, portanto, letal. Os autores também propuseram que o fator de supressão de *crossing over*, C, seria o resultado de inversões cromossômicas, detectadas por Q. Yu, P. H. Moore, J. Jiang, A. H. Paterson, R.

Ming (dados não publicados), citados por MING et al. (2007), e que os genes *sa* e *sg* poderiam ser versões degeneradas dos genes determinantes do sexo nos cromossomos Y e Y^h.

1.3 – Aspectos citogenéticos de *Carica papaya*

Segundo BAJPAI e SINGH (2006), embora seja uma importante cultura tropical e subtropical, a literatura apresenta poucos dados envolvendo estudos citogenéticos de *C. papaya*, quando comparados com outras espécies de interesse econômico. Os autores afirmam que uma das causas é a presença de cromossomos pequenos e morfologicamente semelhantes.

Em 1921, Heilborn, citado por KUMAR et al. (1945), realizou uma das primeiras contribuições importantes para a citologia de *C. papaya*. Ele analisou citologicamente essa espécie, encontrando um número diplóide de $2n = 18$ cromossomos. Em 1942, KUMAR e ABRAHAM também consideraram importante um estudo dos cromossomos de mamão. Esses pesquisadores realizaram a análise das pontas de raízes de *C. papaya*, o que também revelou 18 cromossomos em metáfase.

KUMAR e ABRAHAM (1942) relataram que *C. papaya* contém $2n = 18$ cromossomos, classificados como metacêntricos ou submetacêntricos. Os autores também destacaram que não foi encontrado nenhum par de cromossomos heteromórficos relacionado ao sexo nessa espécie.

DATTA (1971), empregando a técnica de esmagamento e microscopia de campo claro, relatou que os cromossomos de *C. papaya* são pequenos, com uma pequena diferença em comprimento; as constrições primárias são geralmente medianas ou submedianas e alguns cromossomos apresentam mais de uma constrição secundária.

Em 2007, DAMASCENO JUNIOR et al. também realizaram o estudo dos cromossomos metafásicos de *C. papaya*, sendo encontrado número de $2n = 18$ cromossomos, classificados como metacêntricos. O mesmo número cromossômico foi relatado por COSTA et al. (2007).

Quanto ao estudo dos cromossomos meióticos de *C. papaya*, KUMAR et al. (1945) observaram que um par de cromossomos se separa precocemente durante a anáfase I da meiose de plantas masculinas de *C. papaya*. Eles relataram que essa diferença no comportamento dos cromossomos está de acordo com o observado em outras espécies vegetais que contêm cromossomos sexuais heteromórficos.

Apesar da existência de diferentes sexos em *C. papaya*, as análises morfológicas e citogenéticas de seus cromossomos não têm possibilitado a identificação de cromossomos sexuais nessa espécie (PARASNIS et al., 1999). De acordo com NEGRUTIU et al. (2001), existem exemplos de outras espécies vegetais cuja determinação sexual é cromossômica, tais como: *Silene latifolia*, *Silene dioica* (sistema XY); *Humulus lupulus* (sistema X:A) e espécies do gênero *Rumex* (sistemas XY e X:A).

Embora existam marcadores de DNA para a predição do sexo em mamão (PARASNIS et al., 1999; URASAKI et al., 2002; LIU et al., 2004), é dispendioso testar e transplantar milhões de plântulas em curto período de tempo para a produção comercial de frutos (MING et al., 2007).

1.4 – Bandeamento com laranja de acridina

Segundo SATO (1988), a laranja de acridina emite fluorescência em diferentes cores, que refletem a relação entre as fitas simples e duplas de DNA. Moléculas de DNA de fita dupla emitem fluorescência esverdeada, enquanto moléculas de DNA de fita simples emitem fluorescência avermelhada.

Em cromossomos humanos, essa técnica de coloração tem sido empregada para produzir um padrão de bandeamento reverso aos bandeamentos Q e G, com base no tratamento das lâminas em tampões sob altas temperaturas, seguido da coloração com laranja de acridina (RFA, bandeamento reverso por fluorescência com o uso de laranja de acridina) (VERMA e BABU, 1995).

De acordo com Sumner (1982), citado por VERMA e BABU (1995), o calor induzido pelo tratamento utilizado na metodologia de coloração com laranja de

acridina induz a desnaturação de proteínas cromossômicas, assim como das seqüências de nucleotídeos ricas em AT, deixando as seqüências de DNA ricas em GC na sua configuração nativa.

Embora bandas-G e, portanto, bandas reversas não sejam observadas em plantas (GREILHUBER, 1977), estudos empregando a coloração com laranja de acridina têm sido relatados. Em 1988, SATO utilizou essa técnica em cinco espécies de plantas, após o bandeamento-C de seus cromossomos mitóticos. O autor observou que os segmentos heterocromáticos associados às regiões organizadoras do nucléolo (RONs) foram diferenciados dos demais segmentos cromossômicos, por meio da emissão de fluorescência verde-amarelada.

ALMEIDA e CARVALHO (2004) utilizaram a laranja de acridina para a aplicação da técnica de bandeamento reverso em cromossomos de pimentão (*Capsicum annuum* L.). Os resultados obtidos possibilitaram a identificação de uma banda fluorescente verde-amarelada, subterminal no cromossomo 5 e duas bandas flanqueando a constrição secundária, no braço curto do cromossomo 11. Ao verificarem que essa técnica de bandeamento tinha evidenciado um padrão de bandas diferente daqueles descritos na citogenética humana (VERMA e BABU, 1995), os autores substituíram a nomenclatura RFA pela Hsc-FA (bandeamento fluorescente da heterocromatina associada à constrição secundária com o uso de laranja de acridina), mostrando a especificidade do bandeamento com laranja de acridina à região de constrição secundária.

1.5 – Aspectos gerais da citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas isoladas (células, núcleos, cromossomos) que fluem em uma suspensão líquida (SUDA, 2004).

Segundo DOLEŽEL et al. (2007), inicialmente, essa técnica não era largamente empregada em trabalhos com plantas, em razão dos altos custos e das dificuldades associadas com a preparação das amostras. Além da estrutura e rigidez da parede das células vegetais, sua composição química também era um

problema adicional, em virtude da presença de compostos como os metabólitos secundários, que poderiam interferir na coloração das partículas e apresentar autofluorescência (DOLEŽEL et al., 2007).

Apesar das dificuldades encontradas para a aplicação da técnica em plantas, a citometria de fluxo tornou-se amplamente utilizada após o desenvolvimento de um novo método para o isolamento dos núcleos. O método, desenvolvido por GALBRAITH et al. (1983), consistia no procedimento de cortes seqüenciais do tecido vegetal em tampão de extração, utilizando-se uma lâmina de barbear, seguidos da filtragem da suspensão obtida.

De acordo com DOLEŽEL et al. (2007), entre as diversas aplicações da técnica de citometria de fluxo em plantas, encontram-se a análise de ploidias, a estimativa do conteúdo de DNA nuclear ou do tamanho genômico e a determinação da composição de pares de bases de uma espécie, além da discriminação de plantas de sexos diferentes.

1.5.1 – Estimativa do conteúdo de DNA nuclear

A estimativa do conteúdo de DNA dos núcleos das células é uma das mais importantes aplicações da citometria de fluxo em plantas (DOLEŽEL et al., 2007).

Segundo DOLEŽEL e BARTOŠ (2005), para estimar o tamanho genômico, as suspensões contendo os núcleos são coradas com um fluorocromo DNA-específico e a quantidade de luz emitida por cada núcleo é quantificada. Como a citometria de fluxo analisa a intensidade relativa de fluorescência e, portanto, o conteúdo relativo de DNA, o tamanho do genoma de uma amostra desconhecida deve ser determinado após comparação com os núcleos de um padrão de referência, cujo tamanho do genoma seja conhecido (DOLEŽEL e BARTOŠ, 2005).

Com relação à coloração dos núcleos, os fluorocromos comumente usados para estimar o conteúdo de DNA podem ser classificados em dois grupos: corantes que intercalam com a dupla fita dos ácidos nucléicos, como o iodeto de propídio (IP) e brometo de etídio (BE), e corantes que apresentam maior afinidade

por bases, tais como 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, específico para bases AT), e cromomicina A₃ (CMA₃, específica para bases GC) (DOLEŽEL et al., 1992).

O resultado da análise é geralmente visualizado na forma de histograma da intensidade relativa de fluorescência, representando o conteúdo relativo de DNA (DOLEŽEL e BARTOŠ, 2005). A vantagem da citometria de fluxo é que grande número de partículas pode ser avaliado em pequeno intervalo de tempo (ROBINSON, 2004).

1.5.2 – Determinação da relação de bases AT/GC

De acordo com MEISTER e BARROW (2007), diferentes organismos apresentam quantidades distintas de pares de bases AT e GC, cujas frequências são características de cada espécie. Os autores também afirmam que, quando se sabe a sequência, as frequências de bases AT e GC podem ser determinadas, embora poucas espécies de plantas tenham suas sequências conhecidas, em virtude do sequenciamento de genomas ser um processo laborioso e de custos elevados. Uma alternativa, segundo os pesquisadores, seria a citometria de fluxo, que pode ser empregada para a determinação da composição de bases de uma espécie, já que existem corantes fluorescentes, como DAPI e CMA₃, que apresentam afinidades pelos pares de bases AT e GC, respectivamente.

DOLEŽEL et al. (1992) foram os primeiros a explorarem a especificidade dos corantes pelas bases, para a determinação quantitativa da composição das mesmas em algumas espécies de plantas empregando a citometria de fluxo. Eles verificaram que a intensidade de fluorescência de corantes base-específicos não era proporcional ao conteúdo absoluto das respectivas bases. Fundamentados nesse fato, GODELLE et al. (1993) derivaram uma fórmula para o cálculo do conteúdo AT e GC, levando em consideração que certo número de bases consecutivas do mesmo tipo (AT ou GC) era necessário para se ligar a uma molécula de corante.

MARIE e BROWN (1993) relatam que, na prática, inicialmente um corante intercalante, como o IP, é utilizado para estimar o tamanho do genoma, usando

um padrão interno de referência. Então, corantes base-específicos, tais como DAPI (específico para AT) e CMA₃ (específico para GC), são empregados. A partir desses dados citométricos, a fórmula descrita por GODELLE et al. (1993) permite o cálculo da composição de bases do genoma de uma amostra desconhecida com relação a uma espécie padrão de referência (MARIE e BROWN, 1993).

Segundo BRANDIZZI e CAIOLA (1998), diferenças no tamanho e composição do genoma podem ser utilizadas para a rápida discriminação de espécies ou de populações distintas, podendo também contribuir para a solução de problemas taxonômicos.

Estudos empregando a citometria de fluxo têm sido realizados para a verificação da ocorrência de variações inter- e intra-específicas (BRANDIZZI e CAIOLA, 1998; SCHWENCKE et al., 1998; SILJAK-YAKOVLEV et al., 2002; BOGUNIC et al., 2003) ou entre populações híbridas de plantas (BURES et al., 2004; SUDA et al., 2007), com relação ao conteúdo de DNA nuclear e à composição de bases.

1.5.3 – Aplicações da citometria de fluxo na determinação do sexo em plantas

Em relação a estudos empregando a citometria de fluxo para a determinação do sexo em plantas, COSTICH et al. (1991) empregaram essa técnica para a estimativa do conteúdo total de DNA nuclear e a determinação da composição de bases de plantas masculinas e femininas de *S. latifolia*, o que possibilitou a diferenciação dos sexos nessa espécie.

Além disso, VERUSKENS et al. (1992) utilizaram a citometria de fluxo para analisar o sexo de plantas derivadas da cultura de anteras de *S. latifolia*. Nesse trabalho, a diferença de conteúdo de DNA nuclear foi suficiente para discriminar plantas masculinas e femininas.

Em 1995, DOLEŽEL e GÖHDE demonstraram que a análise por citometria de fluxo de alta resolução de núcleos isolados de folhas jovens poderia ser usada para discriminar plantas masculinas e femininas de *S. latifolia*, no mesmo

histograma. Isso foi possível em virtude do heteromorfismo dos cromossomos sexuais dessa espécie, em que as plantas masculinas apresentam cromossomos XY (o cromossomo Y é maior) e as femininas, cromossomos XX, o que resulta em maior quantidade de DNA nas plantas masculinas, em relação às plantas femininas (DOLEŽEL e GÖHDE, 1995).

2 – OBJETIVOS

Considerando que são poucos os dados envolvendo a caracterização citogenética e citométrica de *C. papaya*, justifica-se o presente estudo pela necessidade de ampliar o conhecimento com relação ao cariótipo e ao tamanho do genoma da espécie, bem como à sua composição de bases. Os objetivos específicos foram:

- a) Caracterizar citogeneticamente os cromossomos de *C. papaya*, utilizando recursos de análise de imagem;
- b) Aplicar a coloração com laranja de acridina aos cromossomos mitóticos de *C. papaya*, para a identificação de RONS;
- c) Estimar o conteúdo de DNA nuclear de plantas masculinas, femininas e hermafroditas de *C. papaya*, por meio da técnica de citometria de fluxo;
- d) Verificar se os dados citométricos possibilitam diferenciar o tamanho genômico entre os sexos;
- e) Determinar a composição de bases AT e GC de plantas masculinas, femininas e hermafroditas de *C. papaya*, por meio da técnica de citometria de fluxo;
- f) Verificar se há diferenças entre as relações de pares de bases entre os sexos.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Material

Sementes de populações monóica e dióica da espécie *Carica papaya*, foram fornecidas pela empresa CALIMAN Agrícola, da cidade de Linhares, estado do Espírito Santo. Sementes de *Solanum lycopersicum* L. 'Stupické', anteriormente conhecido com *Lycopersicon esculentum* (SAMACH e LOTAN, 2007), com 2C = 1,96 pg; AT = 64,5% e GC = 35,5% (DOLEŽEL et al., 1992), foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Jaroslav Doležel (Instituto de Botânica Experimental, República Tcheca).

As sementes foram plantadas em casa de vegetação na Universidade Federal de Viçosa (UFV). As análises citogenéticas e citométricas foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal, localizado no Departamento de Biologia Geral da UFV.

3.2 - Métodos

3.2.1 – Citogenética de plantas hermafroditas de *Carica papaya*

3.2.1.1 - Preparação do material citogenético

Brotações laterais foram retiradas de plantas hermafroditas adultas de *C. papaya*, lavadas em água corrente e submetidas à desinfestação em câmara de fluxo. Para isso, as brotações foram imersas em béqueres contendo etanol 70%, durante 20 s, sendo transferidas para béqueres com solução 0,2% de hipoclorito de sódio, água deionizada e 0,5 mL de Tween 20 (Merck®), por 20 min. Em seguida, foram realizadas lavagens seqüenciais em água deionizada, para retirada das soluções de desinfestação.

Posteriormente, as brotações foram inoculadas em 30 mL de meio de enraizamento contendo sais e vitaminas de meio MS basal (MURASHIGE e

SKOOG, 1962), 0,55 mM de mio-inositol, 9,80 μ M de ácido indol-3-butírico (AIB), sacarose 3% (p/v) e ágar 7% (p/v), no escuro, até o enraizamento. Em seguida, as raízes foram retiradas das plântulas e transferidas para recipientes contendo água para posterior tratamento.

3.2.1.2 – Pré-tratamento e fixação das raízes

As raízes das plantas hermafroditas foram submetidas a tratamento com solução anti-tubulínica de amiprofos-metil[®] (APM) 3 μ M, durante 15 h, a 4°C.

Posteriormente, as raízes foram lavadas em água destilada por 15 min para remover o excesso da solução antimitótica e, após três trocas, fixadas em solução de metanol:ácido acético (3:1) e armazenadas a -20°C (CARVALHO e SARAIVA, 1993).

3.2.1.3 – Maceração e dissociação celular

As raízes foram retiradas da solução fixadora e lavadas em água destilada por 30 min. Em seguida, foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, contendo o complexo enzimático Pectinase[®], com atividades pectinolíticas, celulolíticas e hemicelulolíticas, diluído em água destilada na proporção de 1:15. Os tubos foram colocados em banho-maria a 34°C, por 2 h. Após a digestão enzimática, as raízes foram lavadas em água destilada, com três trocas, fixadas em solução de metanol-ácido acético (3:1) recém-preparada e armazenadas em freezer a -20°C até o momento do uso (ALMEIDA e CARVALHO, 2004).

3.2.1.4 – Técnica de secagem ao ar e preparações citogenéticas

As lâminas foram preparadas pela dissociação do meristema apical, gotejamento de solução fixadora e secagem ao ar, em movimentos rápidos, e em placa aquecedora a 50°C (CARVALHO, 1995). Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de Giemsa 5%, com tampão fosfato pH 6,8, em temperatura

ambiente, por 6 min, lavadas em água destilada e secadas ao ar e em placa aquecedora a 50°C.

Após ser determinada a morfologia dos cromossomos, as lâminas foram descoradas em solução fixadora de metanol-ácido acético (3:1) e armazenadas em estufa a 35°C, para serem posteriormente submetidas a técnicas de coloração com laranja de acridina.

3.2.1.5 – Bandeamento com laranja de acridina

Após as lâminas terem permanecido por um período de 80 a 90 dias em estufa a 35°C para o envelhecimento, essas foram submetidas à técnica de bandeamento com laranja de acridina, de acordo com ALMEIDA e CARVALHO (2004).

Inicialmente, cubetas contendo tampão fosfato, pH = 6,5 (constituído por 68% de KH_2PO_4 e 32% de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram colocadas em banho-maria até que a temperatura da solução atingisse 85°C. Em seguida, as lâminas foram imersas nas cubetas, permanecendo na solução por 15, 18 e 20 min. Posteriormente, as lâminas foram retiradas da solução, sendo gotejadas com solução de laranja de acridina (Sigma®) gelada, durante 20 min, em câmara úmida.

Após a etapa de coloração, as lâminas foram submetidas a duas lavagens em água destilada durante 1 e 2 min, e imersas em tampão fosfato durante 3 min. Para a montagem das lâminas, gotejou-se tampão fosfato e cobriram-se as mesmas com lamínulas, selando-as com esmalte incolor.

3.2.1.6 - Análise de imagens

Imagens dos cromossomos em metáfases foram capturadas por uma objetiva de imersão 100x, com uma vídeo câmera CCD acoplada a um microscópio Olympus™ BX 60, equipado com sistema de epifluorescência (filtros WB para análises de fluorescência com laranja de acridina) e digitalizadas pelo

programa CoolSNAP-Pro™. A análise de imagem foi processada em um computador Power Macintosh G4 usando o software Image SXM software (BARRETT, 2002), o qual está disponível via Internet no site <http://reg.ssci.liv.ac.uk>. Este software é de domínio público e corresponde a uma versão modificada do programa original *Image analysis application NIH Image*, que foi desenvolvido por RASBAND (1998).

Para a montagem dos cariogramas, os cromossomos foram pareados visualmente pela similaridade morfológica e dispostos em ordem decrescente de comprimento.

3.2.2 - Citometria de fluxo

3.2.2.1 – Isolamento dos núcleos

A extração dos núcleos de *C. papaya* (amostra) e *S. lycopersicum* (padrão interno) foi realizada em placas de Petri, de acordo com o método de GALBRAITH et al. (1983), por meio da técnica de cortes seqüenciais de fragmentos de 2 cm² de folhas jovens, em 0,5 mL de tampão de lise OTTO I (OTTO, 1990) a 4°C, com auxílio de uma lâmina de barbear. Em seguida, adicionou-se 1 mL do mesmo tampão à suspensão, que foi filtrada em um filtro de nylon de 30 µm e centrifugada a 1100 rpm em tubos Eppendorff, durante 5 min.

O sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspensionado em 100 µL do tampão de lise OTTO I. As amostras foram incubadas por 10 min em temperatura ambiente, coradas com 1,5 mL da solução OTTO I:OTTO II (1:2) (LOUREIRO et al., 2006) e filtradas em um filtro de nylon de 20 µm.

3.2.2.2 – Estimação do conteúdo de DNA nuclear

A coloração da suspensão nuclear foi realizada no escuro durante 30 min, utilizando-se a solução OTTO I:OTTO II (1:2) (LOUREIRO et al., 2006) suplementada com 75 µM de iodeto de propídio (IP, comprimentos de onda de

excitação/emissão: 480-575/550-740 nm, SHAPIRO, 2003) e 50 µg/mL de RNase (DOLEŽEL et al., 1992; MEISTER, 2005). O valor de fluorescência do pico G₀/G₁ de *S. lycopersicum* (padrão) foi posicionado no canal 100. A intensidade de fluorescência do pico G₀/G₁ de *C. papaya* foi obtida por comparação com a de *S. lycopersicum*. O tamanho do genoma de *C. papaya* foi determinado de acordo com a fórmula:

$$2C(\text{Amostra}) = \frac{FA \times 2C(\text{Padrão})}{FP}, \text{ onde}$$

FA: intensidade de fluorescência da amostra;

FP: intensidade de fluorescência do padrão;

2C (Padrão): valor de DNA previamente determinado para o padrão *S. lycopersicum*.

O valor 2C obtido (pg) foi convertido em pares de bases (pb), considerando-se que 1 pg de DNA corresponde a $0,978 \times 10^9$ pb (DOLEŽEL et al., 2003).

3.2.2.3 – Determinação da relação de bases AT/GC

Os fluorocromos 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, comprimentos de excitação/emissão: 320-385/400-580 nm, SHAPIRO, 2003) e cromomicina A₃ (CMA₃, comprimentos de excitação/emissão: 365-460/475-680 nm, JENSEN, 1977 e SHAPIRO, 2003) foram utilizados para corar especificamente as bases AT e GC, respectivamente. A coloração da suspensão nuclear com DAPI foi realizada no escuro, durante 20 min, acrescentando-se a solução de tampão OTTO I:OTTO II (1:2) (LOUREIRO et al., 2006) contendo 1,5 µM de DAPI. A coloração com CMA₃ foi realizada no mesmo tampão OTTO com 50 mM de MgCl₂ e 42,5 µM de CMA₃ durante 1 h, no escuro (JENSEN, 1977).

A composição de bases de *C. papaya* foi determinada por meio da fórmula descrita por GODELLE et al. (1993):

$$\begin{aligned} \text{AT (\%)}_{\text{amostra}} &= \text{AT (\%)}_{\text{padrão}} \times (R_{\text{DAPI}}/R_{\text{IP}})^{1/3} \\ &\text{e} \\ \text{GC (\%)}_{\text{amostra}} &= \text{GC (\%)}_{\text{padrão}} \times (R_{\text{CMA3}}/R_{\text{IP}})^{1/4}, \end{aligned}$$

onde R_{IP} = razão entre a intensidade de fluorescência da amostra em relação à do padrão, utilizando o corante IP, R_{DAPI} utilizando DAPI, e R_{CMA3} , a CMA₃.

3.2.2.4 – Análise dos dados

As suspensões foram analisadas em um citômetro de fluxo Partec PAS[®] (Partec[®] GmbH, Munster, Germany), equipado com uma fonte de laser (488 nm) e uma lâmpada UV (388 nm). A fluorescência emitida pelos núcleos corados com IP foi coletada por um filtro RG 610 nm, enquanto a fluorescência emitida pelos núcleos corados com DAPI e CMA₃ foi coletada por filtros GG 435 nm a 500 nm. O equipamento foi calibrado e alinhado utilizando micro-esferas e soluções-padrão conforme as recomendações do fabricante (Partec[®]). O software FlowMax[®] (Partec[®]) foi utilizado para a análise dos dados. Três repetições para cada sexo de *C. papaya* foram realizadas, contabilizando mais de 10.000 núcleos cada. Os valores relativos de conteúdo de DNA total e da composição de bases AT/GC foram obtidos a partir das médias das três repetições. Picos com coeficientes de variação (CV) superiores a 5% foram rejeitados. Para a comparação dos valores médios de conteúdo absoluto de DNA e da relação de bases AT e GC foi utilizado o teste F, a 5% de significância.

4 – RESULTADOS

4.1 - Citogenética de plantas hermafroditas de *Carica papaya*

4.1.1 – Montagem do kariograma de *C. papaya*

O tratamento das raízes de plantas hermafroditas de mamão com amiprofos-metil (APM), na concentração e tempo descritos, juntamente com a digestão enzimática, foram considerados adequados, ao possibilitarem o acúmulo de cromossomos em prometáfases e metáfases.

A técnica de secagem ao ar, com gotejamento de solução fixadora, possibilitou a obtenção de cromossomos individualizados, preservados morfológicamente, sem sobreposições e bem espalhados na lâmina, com constrições primárias e secundárias bem definidas. Essas características facilitaram a montagem de kariogramas da planta hermafrodita de *C. papaya*, em diferentes níveis de compactação da cromatina (Figura 1).

A obtenção dos cromossomos mitóticos em prometáfase e metáfase foi importante para a diferenciação de cromossomos com comprimentos similares, facilitando o pareamento dos homólogos e a classificação morfológica de cada par. A análise dos cromossomos prometafásicos possibilitou a visualização de dois *gaps*, um deles correspondente à constrição secundária e o outro ao centrômero, no par 1, além de ter facilitado a classificação morfológica do par 9 como submetacêntrico. Ao observar os cromossomos metafásicos, foi facilitada a classificação do par 6 como submetacêntrico. Os demais homólogos foram classificados como metacêntricos.

Segundo os dados obtidos, portanto, a planta hermafrodita de *C. papaya* apresentou um número diplóide de $2n = 18$ cromossomos, sendo sete pares metacêntricos (1, 2, 3, 4, 5, 7 e 8) e dois submetacêntricos (6 e 9).



Figura 1 – Cariogramas de planta hermafrodita de *C. papaya* com $2n = 18$ cromossomos, obtidos de meristemas radiculares pré-tratados com APM $3 \mu\text{M}$, durante 15h a 4°C e corados com Giemsa 5%. Observar os cromossomos em prometáfase (acima) e metáfase (abaixo), e as constrições primárias bem definidas. Nos cromossomos prometafásicos, os dois *gaps* no par 1 correspondem à constrição secundária e ao centrômero. Barra = $5 \mu\text{m}$.

4.1.2 – Bandeamento com laranja de acridina

O bandeamento com laranja de acridina dos cromossomos metafásicos da planta hermafrodita de *C. papaya* apresentou os melhores resultados quando as lâminas envelhecidas foram incubadas em tampão fosfato durante 20 min e coradas por 20 min. Tais tratamentos foram considerados adequados, ao possibilitarem a observação de marcações positivas nos cromossomos de mamão.

Bandas verde-amareladas foram observadas na região adjacente ao centrômero do cromossomo 1 e na região próxima ao centrômero do cromossomo 2 (Figura 2a). As regiões cromossômicas sem marcações positivas apresentaram fluorescência alaranjada. No cromossomo 1, a fluorescência evidenciada pela laranja de acridina foi mais intensa, em comparação com a do cromossomo 2. As bandas mais intensas representaram a porção flanqueadora da constrição secundária, correspondente à região organizadora nucleolar (RON), conforme salientado pela localização do cromossomo 1 associado ao nucléolo (Figura 2b). A Figura 2c apresenta um gráfico do perfil de densidade relativa medida ao longo do cromossomo 1, corado com laranja de acridina. Os picos observados evidenciam as regiões cromossômicas que apresentaram maior intensidade de fluorescência, indicando as bandas flanqueadoras da RON. O cromossomo 2, com marcações positivas de fluorescência menos intensa, não apresentou constrição secundária evidenciada pela coloração com laranja de acridina.

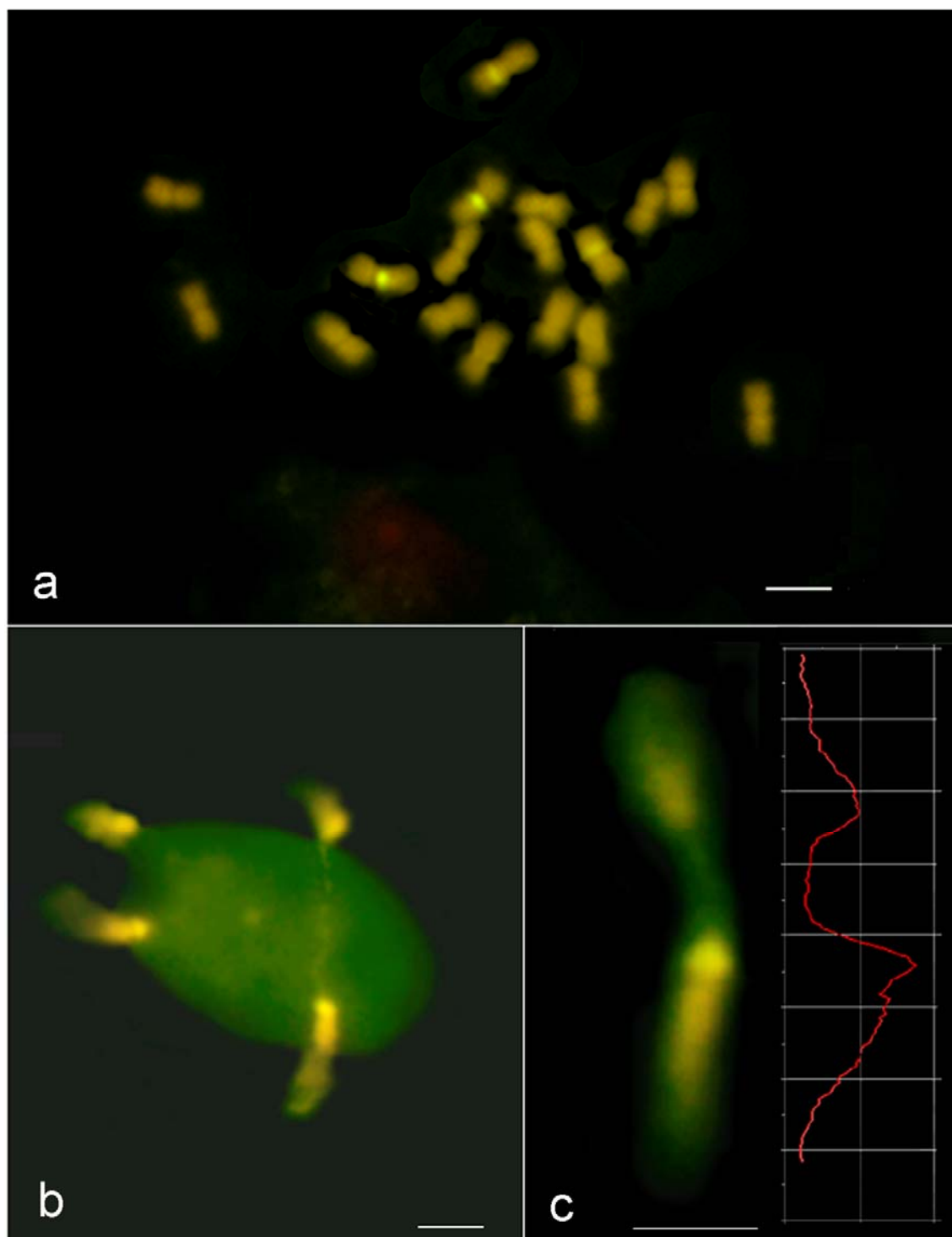


Figura 2 – Cromossomos mitóticos de planta hermafrodita de *C. papaya*, obtidos de meristemas radiculares pré-tratados com APM 3 μ M, durante 15h a 4°C e corados com laranja de acridina a 0,01%. 2(a) bandas verde-amareladas nos cromossomos 1 e 2. Observar, no cromossomo 1, a banda de fluorescência mais intensa na região adjacente ao centrômero; 2(b) cromossomo 1, em prófase, associado ao nucléolo, com fluorescência verde-amarelada nas regiões flangeadoras à RON. 2(c) gráfico do perfil de densidade relativa do cromossomo 1. Observar que os picos apresentaram maior intensidade de fluorescência, correspondendo às bandas flangeadoras da RON. Barra = 5 μ m.

4.2 - Citometria de fluxo

4.2.1 – Estimação do conteúdo de DNA nuclear e determinação da relação de bases AT/GC

Os valores 2C de DNA médios das amostras de plantas masculinas, femininas e hermafroditas de *C. papaya* foram 0,67, 0,65 e 0,65 pg, respectivamente (Tabela 1). As análises dos núcleos corados com IP possibilitaram a obtenção de histogramas (Figura 3) com picos de núcleos G₀/G₁ com coeficientes de variação (CVs) oscilando de 2,36% a 3,04%.

A análise citométrica dos núcleos corados com DAPI e CMA₃ possibilitou o cálculo da relação de pares de bases AT e GC para cada fluorocromo (Tabela 1). Histogramas (Figuras 4 e 5) com picos de núcleos G₀/G₁ com CVs variando de 3,72% a 3,92%, para DAPI e de 4,22% a 4,72%, para CMA₃, foram obtidos.

De acordo com o teste F, a 5% de significância, não houve diferença quanto ao tamanho genômico ou à relação de pares de bases, entre os três sexos de mamão.

Tabela 1 – Conteúdo de DNA e composição de bases de plantas masculinas, femininas e hermafroditas de *C. papaya*, por citometria de fluxo

Tipos sexuais	Conteúdo de DNA (pg)	Conteúdo de DNA (pb x 10 ⁹)	CV (%)	Composição de bases (%)		
				AT	GC	AT + GC
Masculino	0,67	0,655	2,36	68,65	38,29	106,94
Feminino	0,65	0,636	3,04	68,77	38,78	107,55
Hermafrodita	0,65	0,636	2,85	68,77	38,57	107,34

pg = picogramas, pb = pares de bases, CV = coeficiente de variação. O teste *F* (*P* < 0,05) evidenciou que os valores médios de conteúdo de DNA e da composição de bases, obtidos a partir de três repetições, não diferem entre si.

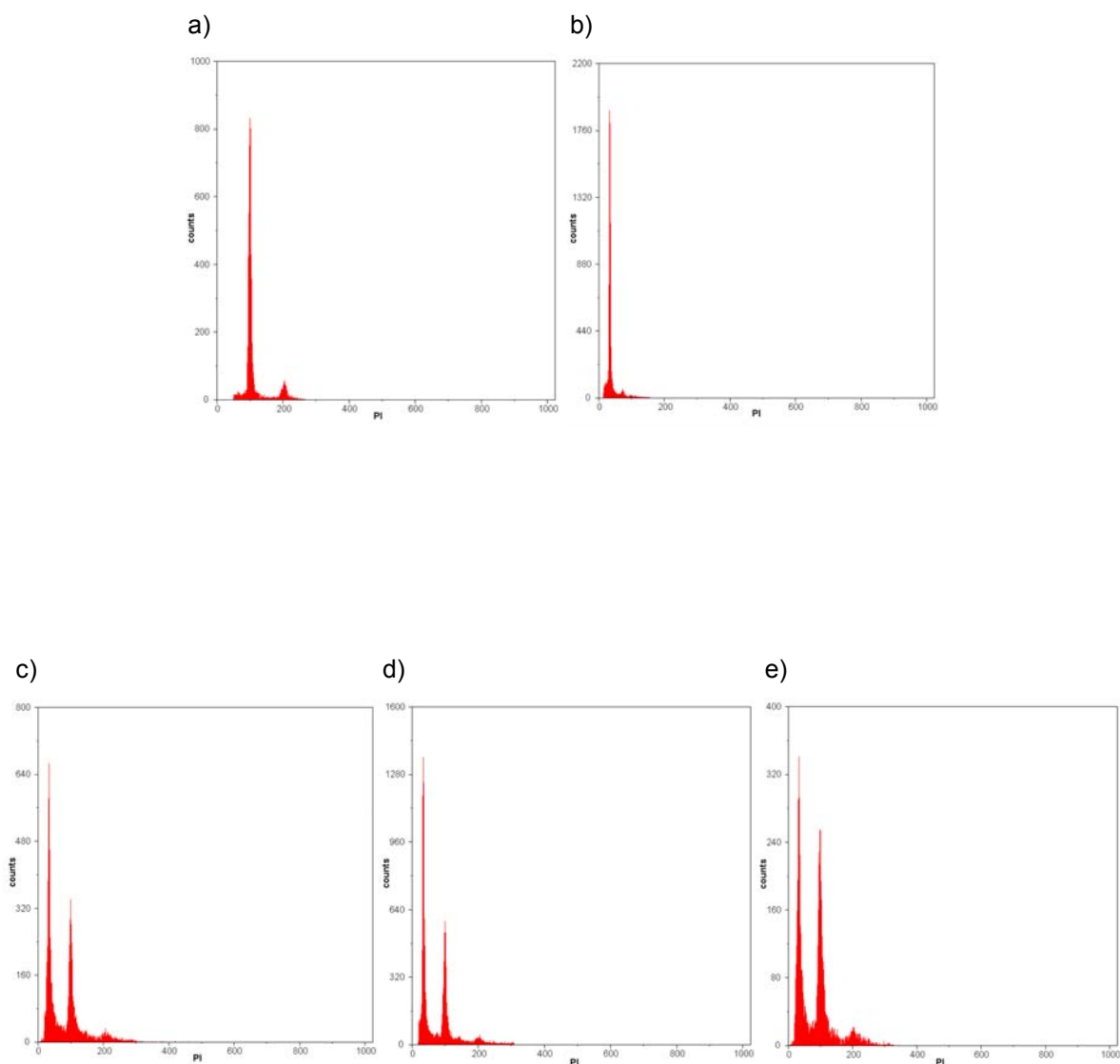


Figura 3 – Histogramas obtidos a partir de análises citométricas de núcleos de *C. papaya* corados com IP, utilizando *S. lycopersicum* como padrão interno, ajustado para correr no canal 100. 3(a) *S. lycopersicum*; 3(b) *C. papaya*; 3(c) planta feminina; 3(d) planta masculina e 3(e) planta hermafrodita. O primeiro pico dos histogramas (c), (d) e (e) corresponde à intensidade de fluorescência dos núcleos de *C. papaya*, e o segundo pico, à intensidade de fluorescência dos núcleos de *S. lycopersicum*.

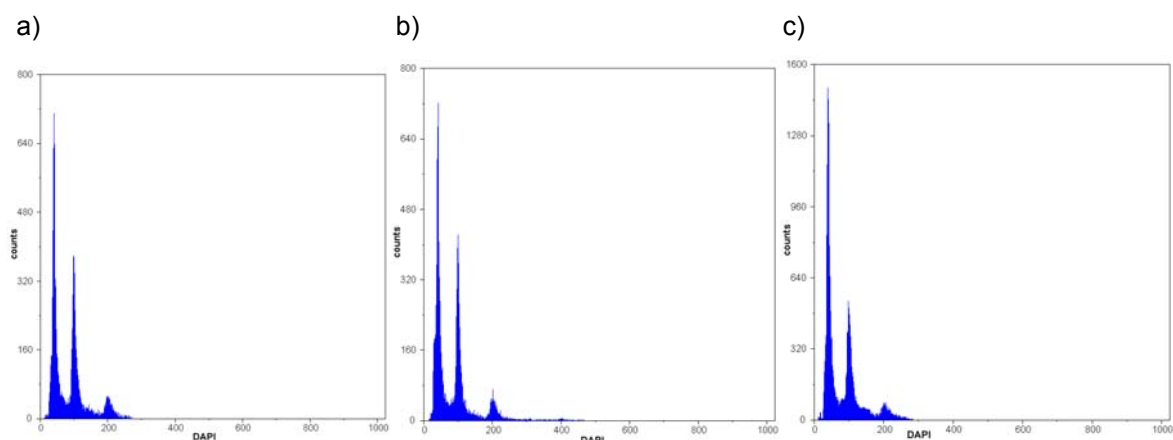


Figura 4 – Histogramas obtidos a partir da coloração com DAPI de núcleos de *C. papaya*, utilizando *S. lycopersicum* como padrão interno, ajustado para correr no canal 100. 4(a) planta feminina; 4(b) planta masculina e 4(c) planta hermafrodita. O primeiro pico corresponde à intensidade de fluorescência dos núcleos de *C. papaya* e o segundo pico, à intensidade de fluorescência dos núcleos de *S. lycopersicum*.

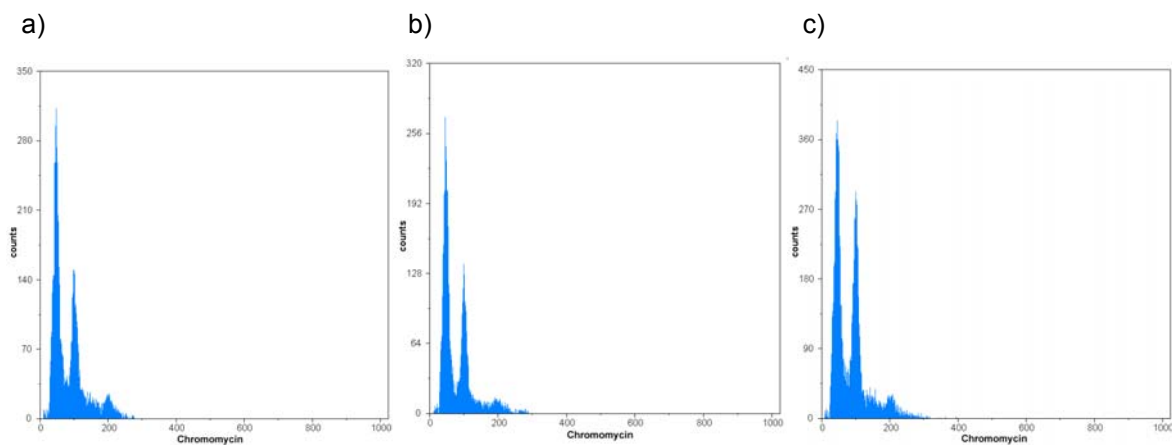


Figura 5 – Histogramas obtidos a partir da coloração com CMA₃ de núcleos de *C. papaya*, utilizando *S. lycopersicum* como padrão interno, ajustado para correr no canal 100. 5(a) planta feminina; 5(b) planta masculina e 5(c) planta hermafrodita. O primeiro pico corresponde à intensidade de fluorescência dos núcleos de *C. papaya* e o segundo pico, à intensidade de fluorescência dos núcleos de *S. lycopersicum*.

5 - DISCUSSÃO

5.1 - Citogenética de plantas hermafroditas de *Carica papaya*

5.1.1 – Montagem do kariograma de *C. papaya*

O pré-tratamento das raízes da planta hermafrodita de *C. papaya* com o bloqueador APM, na concentração de 3 μ M, durante 15h, a 4°C, resultou no acúmulo de células em prometáfases e metáfases. O mesmo bloqueador foi usado por CLARINDO e CARVALHO (2006), que também o consideraram adequado para o acúmulo de cromossomos mitóticos de *Coffea canephora*. Outros agentes antimitóticos têm sido utilizados, por diferentes autores, em *C. papaya*. DAMASCENO JUNIOR et al. (2007) submeteram as pontas de raízes de mamão a tratamento com paradiclorobenzeno, durante 9h, enquanto COSTA et al. (2007) aplicaram trifluralina 2 μ M, por 21h, o que resultou também no acúmulo de células em metáfases, em ambos os trabalhos.

A etapa de fixação das raízes de mamão em solução recém-preparada de metanol-ácido acético (CARVALHO e SARAIVA 1993, 1997) foi importante para a manutenção da integridade dos cromossomos, assim como foi observado por ALMEIDA e CARVALHO (2004), em *Capsicum annuum*, e por CLARINDO e CARVALHO (2006), em *Coffea canephora*. Segundo LEITCH et al. (1994), o fixador preserva a integridade estrutural da cromatina, pela precipitação de endonucleases. Além disso, a solução fixadora aumenta a basofilia dos cromossomos, facilitando sua coloração (SHARMA e SHARMA, 1999).

A dissociação dos meristemas radiculares submetidos à digestão enzimática em solução de pectinase, associada com a técnica de secagem ao ar, possibilitou o acúmulo de células em prometáfases e metáfases, com os cromossomos individualizados, bem espalhados na lâmina e sem sobreposições. Essas características cromossômicas facilitaram a observação de constrições primárias e secundárias bem definidas, o pareamento dos homólogos e a montagem de kariogramas de uma planta hermafrodita de *C. papaya*. A aplicação

da técnica de secagem ao ar também possibilitou a caracterização citogenética de outras espécies vegetais, como *Glycine max* (CLARINDO et al., 2007) e *Paullinia cupana* (FREITAS et al., 2007), que apresentam, assim como o mamão, cromossomos pequenos e similares morfológicamente.

A utilização de uma vídeo-câmera CCD foi importante para a captura de imagens de prometáfases e metáfases adequadas para estudos citogenéticos. Os programas do sistema digital de análise de imagens utilizados contribuíram para a discriminação de diferenças sutis entre os cromossomos de *C. papaya*, facilitando a identificação de cada par de homólogos e a conseqüente montagem dos kariogramas.

A análise de células mitóticas com cromossomos em diferentes níveis de compactação da cromatina é importante para a diferenciação de cromossomos com comprimentos similares, facilitando o pareamento dos homólogos e a classificação morfológica de cada par. O número cromossômico de $2n = 18$ foi obtido, concordando com o resultado relatado por outros autores (KUMAR e ABRAHAM, 1942; DATTA, 1971; DAMASCENO JUNIOR et al. 2007; COSTA et al., 2007).

Os cromossomos foram classificados em ordem decrescente de tamanho, sendo sete pares metacêntricos (1, 2, 3, 4, 5, 7 e 8) e dois submetacêntricos (6 e 9). A classificação do par 9 como submetacêntrico foi facilitada pela análise dos cromossomos prometafásicos, que também possibilitaram a observação de dois *gaps* no par 1, um deles correspondente à constrição secundária e o outro ao centrômero. Já a observação dos cromossomos metafásicos facilitou a classificação do par 6 como submetacêntrico.

A literatura apresenta relatos conflitantes acerca da localização de constrições secundárias e da classificação morfológica dos cromossomos de *C. papaya*. DATTA (1971), analisando citogeneticamente cinco diferentes linhagens da espécie, observou a presença de 6 a 10 constrições secundárias, por kariograma, sendo os cromossomos geralmente pequenos, com diferenças mínimas em comprimento e constrições primárias medianas ou submedianas. Esse autor empregou a técnica de esmagamento dos meristemas radiculares, e

cinco metáfases de cada uma das cinco variedades foram desenhadas sob uma câmera. Segundo CARVALHO e SARAIVA (1993), a técnica de esmagamento é inadequada para a obtenção de cromossomos morfológicamente preservados no mesmo plano de foco, sem fragmentos e sem sobreposições. No estudo atual, entretanto, o uso da técnica de dissociação dos meristemas radiculares associada à secagem ao ar possibilitou a obtenção de cromossomos bem definidos e individualizados de *C. papaya*, facilitando a observação de constrições primárias e secundárias e a classificação morfológica dos cromossomos.

Enquanto no presente trabalho os cromossomos foram classificados como metacêntricos (1, 2, 3, 4, 5, 7 e 8) e submetacêntricos (6 e 9), DAMASCENO JUNIOR et al. (2007) classificaram todos como metacêntricos. A classificação realizada por esses autores, baseada somente em kariogramas de cromossomos metafásicos, pode ter dificultado a observação de diferenças entre os braços curtos e longos dos pares 6 e 9, as quais foram visualizadas, no presente estudo, em kariogramas de cromossomos metafásicos e prometáfásicos, respectivamente. A análise de cromossomos em diferentes níveis de compactação auxilia a sua caracterização citogenética, por facilitar a observação de diferenças entre cromossomos morfológicamente semelhantes.

5.1.2 – Bandeamento com laranja de acridina

A aplicação do bandeamento com laranja de acridina aos cromossomos metafásicos da planta hermafrodita de *C. papaya*, de acordo com o protocolo utilizado por ALMEIDA e CARVALHO (2004), gerou bandas positivas quando as lâminas envelhecidas foram incubadas em tampão fosfato durante 20 min e coradas por 20 min. Segundo VERMA e BABU (1995), a duração do tratamento em tampão fosfato a 85°C, assim como o tempo de coloração com laranja de acridina, são fundamentais para a obtenção de marcações positivas no bandeamento. Ele afirma que uma coloração ideal deve mostrar regiões cromossômicas coradas em diferentes gradações variando entre o verde e o vermelho.

Bandas verde-amareladas foram observadas nos cromossomos 1 e 2 do mamão, enquanto as regiões sem marcações positivas apresentaram fluorescência alaranjada. Resultados semelhantes foram encontrados por SATO (1988), que aplicou essa técnica de coloração em cinco espécies de plantas, *Vicia faba*, *Allium fistulosum*, *Chrysanthemum coronarium*, *Lycoris aurea* e *Nothoscordum fragrans*, após o bandeamento-C de seus cromossomos mitóticos. Por meio da técnica de bandeamento com laranja de acridina, SATO (1988) diferenciou os segmentos heterocromáticos associados à RON, que emitiram fluorescência verde-amarelada, dos segmentos cromossômicos eucromáticos, que emitiram fluorescência variando de laranja a laranja-amarelado, de acordo com as espécies estudadas. O mesmo padrão de bandas foi relatado por ALMEIDA e CARVALHO (2004) e por CLARINDO e CARVALHO (2006), ao aplicarem a coloração com laranja de acridina aos cromossomos de milho e pimentão, e de café, respectivamente. Nessas plantas, as bandas foram localizadas na região heterocromática flanqueadora da constrição secundária.

O bandeamento com laranja de acridina possibilitou a identificação de bandas verde-amareladas em dois cromossomos de *C. papaya*. Na região próxima ao centrômero do cromossomo 2, a fluorescência revelada pela laranja de acridina foi menos intensa, ao passo que no cromossomo 1, a fluorescência apresentou-se mais intensa, estando localizada na região adjacente ao centrômero. De acordo com a Figura 2b, esta região apresentou uma banda flanqueando a constrição secundária do cromossomo 1, observado em associação com o nucléolo. Portanto, o bandeamento com laranja de acridina revelou a região flanqueadora da RON em mamão, o que foi destacado pelo gráfico de densidade relativa de fluorescência medida ao longo do cromossomo 1. O padrão observado de bandas flanqueando a constrição secundária em *C. papaya* está de acordo com os resultados obtidos por outros pesquisadores que aplicaram a coloração de laranja de acridina em plantas (SATO, 1988; ALMEIDA e CARVALHO, 2004; CLARINDO e CARVALHO, 2006). Em *Capsicum annuum*, *Zea mays* (ALMEIDA e CARVALHO, 2004) e *Coffea canephora* (CLARINDO e CARVALHO, 2006), esse bandeamento também evidenciou a heterocromatina flanqueadora da RON.

Embora a coloração com laranja de acridina dos cromossomos da planta hermafrodita de *C. papaya* tenha proporcionado marcações positivas em dois cromossomos, foi evidenciada apenas a constrição secundária do par 1. O cromossomo 2, com bandas positivas de fluorescência menos intensa, pode ter apresentado uma constrição secundária que se perdeu ao longo do processo evolutivo, ou esta pode estar presente, mas não evidenciada. Por ser uma técnica que não diferencia RONS ativas e inativas (SATO, 1988), a coloração com laranja de acridina pode ter possibilitado a identificação da RON inativa nesse cromossomo.

Além de revelar segmentos heterocromáticos associados à RON em cromossomos de plantas (SATO, 1988; ALMEIDA e CARVALHO, 2004; CLARINDO e CARVALHO, 2006), a coloração com laranja de acridina tem sido utilizada para a identificação de bandas teloméricas (GENDEL e FOSKET, 1978) e regiões de heterocromatina pericentromérica (PEREIRA e SOUZA, 2000). A metodologia empregada nos cromossomos de *C. papaya* não evidenciou bandas nas constrições primárias, resultado também encontrado por ALMEIDA e CARVALHO (2004) em cromossomos de milho e pimentão, e por CLARINDO e CARVALHO (2006) em cromossomos de café. A resistência da constrição primária ao bandeamento com laranja de acridina pode ser justificada, segundo ALMEIDA e CARVALHO (2004), pela diferença de composição e estrutura das heterocromatinas que flanqueiam as constrições secundárias e primárias. Os autores sugeriram que os dois tipos de heterocromatina apresentaram diferenças quando submetidos à coloração com laranja de acridina, em virtude das condições de desnaturação do tratamento.

5.2 - Citometria de fluxo

5.2.1 – Estimação do conteúdo de DNA nuclear e determinação da relação de bases AT/GC

As análises citométricas realizadas nos três tipos sexuais de *C. papaya* possibilitaram a geração de histogramas com picos de núcleos G₀/G₁ com CVs variando de 2,36% a 4,72%. Esses valores indicam que núcleos intactos, isolados e estequiometricamente corados foram obtidos, o que está de acordo com as condições que devem ser satisfeitas para a estimação adequada do tamanho do genoma, segundo DOLEŽEL e BARTOŠ (2005). De acordo com esses autores, CVs abaixo de 5% são considerados aceitáveis para garantir a interpretação adequada dos dados obtidos por meio da técnica de citometria de fluxo e revelam a alta qualidade da suspensão nuclear e da coloração do DNA.

Considerando a análise citométrica dos núcleos de plantas masculinas, femininas e hermafroditas de *C. papaya*, corados com IP, os conteúdos médios de DNA nuclear total encontrados foram 0,67, 0,65 e 0,65 pg, respectivamente. O teste F revelou que os valores obtidos não diferiram significativamente a 5%, o que mostra que os três tipos sexuais apresentam o mesmo tamanho genômico. O conteúdo de DNA nuclear de *C. papaya* foi estimado pela primeira vez, por meio da técnica de citometria de fluxo, em 1991, por ARUMUGANATHAN e EARLE. Um valor 2C de 0,77 pg foi descrito por esses pesquisadores, que também utilizaram IP como corante.

Os valores encontrados no presente estudo podem ter-se diferido dos relatados na literatura, em virtude da utilização de diferentes metodologias, padrões e tampões de extração e coloração. Enquanto no presente trabalho, *S. lycopersicum* foi utilizado como padrão interno, ARUMUGANATHAN e EARLE (1991) empregaram eritrócitos de aves. De acordo com DOLEŽEL e BARTOŠ (2005), o uso de animais como padrões de referência tem sido limitado, em virtude de seus tamanhos genômicos exatos não serem conhecidos (com exceção de *Caenorhabditis elegans*), o que não oferece vantagens sobre a utilização de plantas como padrão. DOLEŽEL e BARTOŠ (2005) também afirmaram que o uso de animais como padrão é simples quando na forma de suspensão nuclear em um tubo. Entretanto, os núcleos são adicionados somente após a preparação da suspensão nuclear vegetal, o que viola, segundo DOLEŽEL e BARTOŠ (2005), o conceito de padrão interno.

No presente trabalho, os tampões OTTO (OTTO, 1990) foram utilizados. Segundo DOLEŽEL e BARTOŠ (2005), durante o procedimento de isolamento dos núcleos, a composição do tampão de extração é crítica para facilitar a liberação dos núcleos livres de citoplasma e em quantidades suficientes, para a manutenção da integridade dos núcleos isolados, para proteger o DNA contra a degradação por endonucleases e para facilitar a coloração do DNA. Para esses autores, a vantagem do procedimento de extração dos núcleos e coloração utilizando os tampões OTTO I e OTTO II, é provavelmente relacionada à presença de ácido cítrico. Este aumenta a acessibilidade da cromatina e homogeneiza a sua estrutura, eliminando diferenças na intensidade de coloração entre populações de núcleos com o mesmo conteúdo de DNA, mas com diferentes estados de compactação da cromatina. Além do ácido cítrico, o agente anti-oxidante ditioneitol (DTT) adicionado à preparação preserva as proteínas da cromatina e minimiza a interferência de compostos fenólicos na coloração do DNA (DOLEŽEL e BARTOŠ, 2005; LOUREIRO et al., 2006).

A análise dos núcleos de *C. papaya* corados com DAPI e CMA₃ possibilitou, pela primeira vez, a determinação da composição de bases de plantas femininas, masculinas e hermafroditas dessa espécie. As frequências de bases AT e GC foram calculadas para cada fluorocromo, de acordo com fórmula descrita por GODELLE et al. (1993). Com base no teste F, a 5% de significância, as frequências de pares de bases AT e GC para os três tipos sexuais de *C. papaya* não diferiram significativamente.

Embora não tenha havido distinção quanto ao tamanho genômico e à relação de pares de bases entre os três sexos de mamão, outros autores relataram a ocorrência de diferenças relacionadas ao conteúdo de DNA nuclear e à composição de bases em *Silene latifolia* (COSTICH et al., 1991; DOLEŽEL e GÖHDE, 1995). Entretanto, as diferenças encontradas são explicadas pelo conhecido heteromorfismo dos cromossomos sexuais dessa espécie, o que resulta em uma maior quantidade de DNA nas plantas masculinas.

Com relação aos valores médios de conteúdos absolutos de DNA nuclear observados para os três sexos de *C. papaya*, e levando em consideração a

semelhança morfológica de seus cromossomos revelada pelas técnicas citogenéticas, cada um dos 18 cromossomos teria, em média, 0,036 a 0,037 pg de DNA. Portanto, para que um provável par de cromossomos heteromórficos pudesse ser identificado, ter-se-ia de se distinguir uma porção muito pequena do cromossomo, com uma quantidade de DNA que estaria abaixo do limite de resolução das técnicas citogenéticas e citométricas utilizadas.

6 - CONCLUSÕES

A associação das técnicas de dissociação celular e secagem ao ar, com a coloração convencional com Giemsa resultou em células prometafásicas e metafásicas com cromossomos individualizados, bem espalhados na lâmina e sem sobreposições, com constrições primárias e secundárias bem definidas. Essas características possibilitaram o pareamento dos homólogos e a classificação morfológica dos cromossomos, com a montagem de kariogramas de uma planta hermafrodita de *C. papaya*.

A técnica de bandeamento com laranja de acridina permitiu a identificação de bandas verde-amareladas nos cromossomos 1 e 2, evidenciando a região flangeadora da RON no cromossomo 1 de *C. papaya*. O cromossomo 2, com marcações positivas de fluorescência menos intensa, não apresentou constrição secundária identificada pela coloração com laranja de acridina.

Não houve diferenças morfológicas que identificassem um possível par de cromossomos heteromórficos na planta hermafrodita de *C. papaya*.

Por meio da análise citométrica dos núcleos de plantas femininas, masculinas e hermafroditas de *C. papaya*, o conteúdo absoluto de DNA e a frequência de pares de bases AT e GC foram calculados. De acordo com os dados citométricos encontrados, não houve diferença significativa entre os sexos quanto ao tamanho genômico e quanto à relação de bases.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, P. M., CARVALHO, C. R. NOR-associated heterochromatin of pepper chromosomes stained with acridine orange. **Caryologia** 2: 177-181, 2004.
- ARUMUGANATHAN, K., EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter** 9 (3): 208-218, 1991.
- BADILLO, V. Caricaceae, Segundo Esquema. Publicada por la Asociación de Profesores, Alcance 43, Universidad Central de Venezuela, Maracay, 111 p., 1993.
- BAJPAI, A., SINGH, A. K. Meiotic behavior of *Carica papaya* L.: spontaneous chromosome instability and elimination in important cvs. in north Indian conditions. **Citologia** 71 (2): 131-136, 2006.
- BARRET SD. Software for scanning microscopy. **Proceedings of the Royal Microscopical Society** 37: 7-14, 2002.
- BHATTACHARYA, J., KHUSPE, S. S. *In vitro* and *in vivo* germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. **Scientia Horticulturae** 91: 39-49, 2001.
- BOGUNIC, F., MURATOVIC, E., BROWN, S. C., SILJAK-YAKOVLEV, S. Genome size and base composition of five *Pinus* species from the Balkan region. **Plant Cell Reports** 22: 59-63, 2003.
- BRANDIZZI, F., CAIOLA, M. G. Flow cytometric analysis of nuclear DNA in *Crocus sativus* and allies (Iridaceae). **Plant Systematics and Evolution** 211: 149-154, 1998.

- BURES, P., WANG, Y., HOROVÁ, L., SUDA, J. Genome size variation in Central European species of *Cirsium* (Compositae) and their natural hybrids. **Annals of Botany**, 1-11, 2004.
- CARVALHO, C. R. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.)**. Viçosa, UFV, Imp. Univ., 127p. (Tese D. S.), 1995.
- CARVALHO, C. R., SARAIVA, L. S. A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes. **Heredity** 70: 515-519, 1993.
- CARVALHO, C. R., SARAIVA, L. S. High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosomes. **Journal of Plant Research** 110: 417-420, 1997.
- CLARINDO, W. R., CARVALHO, C. R. A high quality chromosome preparation from cell suspension aggregates culture of *Coffea canephora*. **Cytologia** 71: 243-249, 2006.
- CLARINDO, W. R., CARVALHO, C. R., ALVES, B. M. G. Mitotic evidence for the tetraploid nature of *Glycine max* provided by high quality karyograms. **Plant Systematics and Evolution** 265: 101-107, 2007.
- COSTA, F. R., PEREIRA, T. N. S., HODNETT, G. L., PEREIRA, M. G., STELLY, D. M. Hibridização *in situ* fluorescente em mamoeiro (*Carica papaya* L.) In: Frutimamão: resumos: Boletim Técnico da III Reunião de Pesquisas do Frutimamão, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 230-231, 2007.
- COSTICH, D. E., MEAGHER, T. R., YURKOW, E. J. A rapid means of sex identification in *Silene latifolia* by use of flow cytometry. **Plant Molecular Biology Reporter** 9 (4): 359-370, 1991.

- DAMASCENO JUNIOR, P. C., COSTA, F. R., NETO, M. F., PEREIRA, T. N., PEREIRA, M. G. Cariotipagem convencional de três espécies da família *Caricaceae*. In: Frutimamão: resumos: Boletim Técnico da III Reunião de Pesquisas do Frutimamão, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 227-229, 2007.
- DATTA, P. C. Chromosomal biotypes of *Carica papaya* Linn. **Cytologia** 36: 555-562, 1971.
- DOLEŽEL, J., SGORBATI, S., LUCRETTI, S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Physiologia Plantarum** 85: 625-631, 1992.
- DOLEŽEL, J., GÖHDE, W. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. **Cytometry** 19: 103-106, 1995.
- DOLEŽEL J., BARTOŠ J., VOGLMAYR H., GREILHUBER J. Nuclear DNA and genome size of trout and human. **Cytometry** 51:127-128, 2003.
- DOLEŽEL, J., BARTOŠ, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany** 95: 99-110, 2005.
- DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J., SUDA, J. Flow Cytometry with plants: an overview. In: DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J., SUDA, J. (eds.). **Flow Cytometry with Plant Cells**, pp.41-65. Wiley-VCH, 2007.
- FREITAS, D. V., CARVALHO, C. R., FILHO, F. J. N., ASTOLFI-FILHO, S. Karyotype with 210 chromosomes in guaraná (*Paullinia cupana* 'Sorbilis'). **Journal of Plant Research** 120: 399-404, 2007.

- GALBRAITH, D. W., HARKINS, K. R., MADDOX, J. M., AYRES, N. M., SHARMA, D. P., FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science** 220:1049-1051, 1983.
- GENDEL, S., FOSKET, D. E. Differential rates of DNA denaturation and renaturation *in situ* in relation to the C-banding of *Allium cepa* chromosomes. **Cytobios** 21: 91-101, 1978.
- GODELLE, B., CARTIER, D., MARIE, D., BROWN, S. C., SILJAK-YAKOVLEV, S. Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. **Cytometry** 14: 618-626, 1993.
- GREILHUBER, J. Why plant chromosomes do not show G-bands. **Theoretical and Applied Genetics** 50 (3): 121-124, 1977.
- HOFMEYER, J. D. J. Genetical studies of *Carica papaya* L. **South African Journal of Science** 35: 300–304, 1938.
- HOFMEYER, J. D. J. Genetics of *Carica papaya* L. **Chronica Botanica** 6: 245-247, 1941.
- HOROVITZ, S. Determinacion del sexo en *Carica papaya* L.: estructura hipotética de los cromosomas sexuales. **Agronomia Tropical** 3 (4): 229-249, 1954.
- HOROVITZ, S., JIMENEZ, H. Injertos entre especies de *Carica*. **Agronomia Tropical** 7: 33-37, 1967.
- JENSEN R. H. Chromomycin A₃, as a fluorescent probe for flow cytometry of human gynecologic samples. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 25: 573-579, 1977.

- KUMAR, L. S. S., ABRAHAM, A. Chromosome number in *Carica*. **Current Science** 11: 58, 1942.
- KUMAR, L. S. S., ABRAHAM, A., SRINIVASAN, V. K. The cytology of *Carica papaya* Linn. **The Indian Journal of Agricultural Science** 15: 242-253, 1945.
- LEITCH, A. R., SCHWARZACHER, T., JACKSON, D., LEITCH, I. J. **In situ hybridization: a practical guide**. Oxford, BIOS Scientific, USA, 1994.
- LIU, Z., MOORE, P. H., HAO, M., ACKERMAN, C. M., RAGIBA, M., YU, Q., PEARL, H. M., KIM, M. S., CHARLTON, J. W., STILES, J. I., ZEE, F. T., PATERSON, A. H., MING, R. A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. **Nature** 427: 348-352, 2004.
- LOUREIRO, J., RODRIGUEZ, E., DOLEŽEL, J., SANTOS, C. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. **Annals of Botany** 98: 679-689, 2006.
- MARIE, D., BROWN, S. C. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell** 78: 41-51, 1993.
- MARIN, S. L. D., GOMES J. A. Morfologia e biologia floral do mamoeiro. **Informe Agropecuário** 134: 10-13, 1986.
- MEISTER, A. Calculation of binding length of base-specific DNA dyes by comparison of sequence and flow cytometric data. Application to *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Theoretical Biology** 232: 93-97, 2005.
- MEISTER, A., BAROW, M. DNA base composition of plant genomes. In: DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J., SUDA, J. (eds.). **Flow Cytometry with Plant Cells**, pp.177-215. Wiley-VCH, 2007.

- MING, R., YU, Q., MOORE, P. H. Sex determination in papaya. **Seminars in Cell & Developmental Biology** 1-8, 2007.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-497, 1962.
- NEGRUTIU, I., VYSKOT, B., BARBACAR, N., GEORGIEV, S., MONEGER, F. Dioecious plants. A key to the early events of sex chromosome evolution. **Plant Physiology** 127: 1418-1424, 2001.
- OTTO F. J. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: DARZYNKIEWIEZ, Z., CRISSMAN, H. A., ROBINSON, J. P. (eds.) **Methods in cell biology**, vol. 33. San Diego: Academic Press, pp. 105-110, 1990.
- PARASNIS, A. S., RAMAKRISHNA, W., CHOWDARI, K. V., GUPTA, V. S., RANJEKAR, P. K. Microsatellite (GATA)*n* reveals sex-specific differences in Papaya. **Theoretical and Applied Genetics** 99: 1047-1052, 1999.
- PEREIRA, L. G., SOUZA, M. J. Nature and distribution of constitutive heterochromatin and NOR location in the grasshopper *Phaeoparia magacephala* (Romaleidae: Orthoptera). **Cytobios** 103 (403): 111-119, 2000.
- RASBAND, W. NIH Image is a public domain program developed at the U.S. National Institute of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>, 1998.
- ROBINSON, J. P. Flow Cytometry. **Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering**, 630-640, 2004.

- SAMACH, A., LOTAN, H. The transition to flowering in tomato. **Plant Biotechnology** 24: 71-82, 2007.
- SATO, S. Collor differential staining of NOR-associated heterochromatic segments using acridine orange. **Stain Technology** 63: 235-240, 1988.
- SCHWENCKE, J., BUREAU, J. M., CROSNIER, M. T., BROWN, S. Cytometric determination of genome size and base composition of tree species of three genera of Casuarinaceae. **Plant Cell Reports** 18: 346-349, 1998.
- SEAG (Secretaria da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca). Disponível em: <http://www.seag.es.gov.br>. Acesso em: 29 de dezembro de 2007.
- SHAPIRO H. M. **Practical Flow Cytometry**. Wiley-Liss, New Jersey, 2003.
- SHARMA, A. K., SHARMA, A. **Plant Chromosomes: Analysis, Manipulation and Engineering**. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1999.
- SILJAK-YAKOVLEV, S., CERBAH, M., COULAUD, J., STOIAN, V., BROWN, S. C., ZOLDOS, V., JELENIC, S., PAPES, D. Nuclear DNA content, base composition, heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*. **Theoretical and Applied Genetics** 104: 505-512, 2002.
- 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 Genetics** 93:547–553, 1996.
- STOREY, W. B. Segregations of sex types in *Solo papaya* and their application to the selection of seed. **American Society for Horticultural Science Proceedings** 35: 83-85, 1938.

- STOREY, W. B. The botany and sex relations of the papaya. **Hawaii Agricultural Experimental Station Bulletin** 87: 5-22, 1941.
- STOREY, W. B. Genetics of the papaya. **The Journal of Heredity** 44 (2): 70-78, 1953.
- SUDA, J. An employment of flow cytometry into plant biosystematics. Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Botany, 50p. (PhD. thesis), 2004.
- SUDA, J., KRAHULCOVÁ, A., TRÁVNÍČEK, P., ROSENBAUMOVÁ, R., PECKERT, T., KRAHULEC, F. Genome size variation and species relationships in *Hieracium* sub-genus *Pilosella* (Asteraceae) as inferred by flow cytometry. **Annals of Botany** 100: 1323-1335, 2007.
- URASAKI, N., TOKUMOTO, M., TARORA, K., BAN, Y., KAYANO, T., TANAKA, H., OKU, H., CHINEN, I., TERAUCHI, R. A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 104: 281-285, 2002.
- VERMA, R. S., BABU, A. **Human chromosomes: principles and techniques**. McGraw-Hill, Inc. New York, 419p, 1995.
- VERUSKENS, J., YE, D., OLIVEIRA, M., CIUPERCESCU, D. D., INSTALLÉ, P., VERHOEVEN, H. A., NEGRUTIU, I. Sex determination in the dioecious *Melandrium album*: androgenic embryogenesis requires the presence of the X chromosome. **Genome** 35: 8-16, 1992.