

MORFOLOGIA FLORAL E ANÁLISE DE GENES ENVOLVIDOS NA
REVERSÃO SEXUAL EM MAMOEIRO
(*Carica papaya* Linnaeus)

MILENE DE FIGUEIREDO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
MAIO- 2011

MORFOLOGIA FLORAL E ANÁLISE DE GENES ENVOLVIDOS NA
REVERSÃO SEXUAL EM MAMOEIRO
(*Carica papaya Linnaeus*)

MILENE DE FIGUEIREDO

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

Orientadora: Telma Nair Santana Pereira
Coorientador: Márcio Alves Ferreira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MAIO – 2011

MORFOLOGIA FLORAL E ANÁLISE DE GENES ENVOLVIDOS NA
REVERSÃO SEXUAL EM MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

MILENE DE FIGUEIREDO

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

Aprovada em 21 de fevereiro de 2011

Comissão Examinadora:

Prof. Messias Gonzaga Pereira (Ph.D., Melhoramento de Plantas) - UENF

Prof. Luciano Gomes Fietto (Ph.D., Biologia Molecular) - UFV

Prof. Gonçalo Apolinário S. Filho (Dr. Biotecnologia Vegetal) - UENF

Prof^a. Telma Nair Santana Pereira (Ph. D., Melhoramento de Plantas) - UENF
(Orientadora)

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.

Fernando Pessoa

À minha querida mãe
Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Norte Fluminense e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade de Estudo em uma Instituição de Ensino Superior de alta qualidade.

À Dr^a Telma Nair Santana Pereira, minha orientadora, pela oportunidade que me ofereceu, pelos auxílios, conversas, conselhos, amizade e por confiar e acreditar no meu trabalho.

Ao Dr. Marcio Alves Ferreira, meu coorientador; pelo respeito, confiança, oportunidades, troca de experiências e, principalmente, pela amizade.

À Banca examinadora: Dr. Luciano Fietto, Dr. Gonçalo Apolinário e Dr. Messias Pereira por aceitarem o convite e por terem contribuído tanto na estruturação da dissertação.

Ao Fábio Olivares e a Daniele, pelo auxílio na Microscopia Eletrônica de Varredura.

À Bia, pela dedicação e alegria no laboratório de Preparo de Amostras (LPA);

Ao Elisson Romanel, pelas análises de bioinformática.

À Lina, pela amizade e pela ajuda fundamental na realização dos experimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), à Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nivel Superior (CAPES), pela oportunidade do desenvolvimento da pesquisa e pela concessão de bolsa.

À empresa CALIMAN Agrícola, pelo interesse, apoio e infraestrutura, em especial ao diretor técnico Geraldo A. Ferregueti e aos técnicos da fazenda.

A todos os professores da Genética e Melhoramento de Plantas da UENF, que contribuíram para com o meu título de mestre.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética da UENF, pelo auxílio e pela amizade.

Aos colegas de Laboratório de Genética Molecular de Plantas da UFRJ, que foram muito receptivos e tornaram a minha estada no Rio de Janeiro muito mais prazerosa e que contribuíram para o meu crescimento científico e pessoal durante o tempo que passei no Laboratório.

Aos funcionários do Centro de Ciências Agrárias da UENF, pelos valiosos serviços.

Ao querido Daniel, secretário da pós-graduação, pela inestimável e constante ajuda, principalmente por sempre me alertar das tarefas que esquecia.

Aos meus amigos de Campos, em especial, a Roberta Samara, Keila, Liliam, Eileen, Jardel pelos conselhos, apoio, conversas, fofocas, críticas, baladas, viagens, momentos e principalmente pela amizade.

Aos amigos de Minas, em especial, Dum, Pulha (Fred), Tofora, Mel, Milho, República Alem da Lenda, Peri, Zé Luis, sem eles não teria como viver longe; extrema importância na minha vida, muito obrigada por sempre me incentivar a perseguir os meus sonhos.

À minha querida Tia Flor sempre disposta a me auxiliar com seus valiosos ensinamentos. Obrigada por fazer parte da minha vida, minha educação e agora fazendo parte do meu mestrado com essa belíssima correção de português.

À minha família, pelos grandes momentos e por sempre permanecer ao meu lado nas minhas inúmeras decisões e indecisões!

À minha querida mãe, porque teus braços sempre se abrem, quando preciso de um abraço. Teu coração sabe compreender, quando preciso de uma amiga. Teus olhos sensíveis se endurecem, quando preciso de uma lição. Tua força e teu amor me dirigiram pela vida e me deram as asas de que precisava para voar. À Deus, pela oportunidade da vida e a minha mãe pelo meu viver!

SUMÁRIO

Resumo.....	viii
Abstract.....	x
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. A Cultura do mamoeiro	03
2.1.1. Classificação Taxonômica e Centro de Origem	03
2.1.2. Importância econômica	04
2.2. Caracterização Morfológica do Mamoeiro.....	05
2.2.1. Morfologia Reprodutiva do Mamoeiro	05
2.2.2. Anomalias Florais	08
2.2.3. Iniciação floral	11
2.3. Desenvolvimento floral e modelo ABCDE	12
2.3.1. Genes MADS- BOX.....	15
2.3.2. Genes MADS-BOX e a reversão sexual no mamoeiro.....	16
3. OBJETIVOS	18
Objetivo Geral	18
Objetivos específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. Material Vegetal	19

4. 2. Metodologias.....	19
4.2.1. Morfologia dos diferentes estádios de formação do botão	19
4.2.2. Identificação das sequências MADS-BOX	20
4.2.2.1. Análises de Bioinformática	20
4.2.2.2. Análise da Filogenia Molecular	21
4.2.2.3. Construção de primers para análise de expressão qPCR...22	
4.3. RT-PCR Quantitativo em Tempo Real –qPCR.....	24
4.3.1. Extração do RNA total e síntese de cDNA.....	24
4.3.2. PCR em tempo real (qRT-PCR).....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. Morfologia floral dos botões	28
5.2. Identificação de genes MADS-BOX	30
5.2.1. Análise de Bioinformática.....	30
5.3. Avaliação dos genes MADS-BOX	36
5.3.1. Extração de RNA total.....	36
5.3.2 Análises dos Genes de Referência para <i>Carica papaya</i>	39
5.3.3 Análise da expressão dos possíveis genes específicos de órgãos florais por qPCR.....	43
6. CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

RESUMO

FIGUEIREDO, MILENE, MSc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Fevereiro de 2011, Morfologia floral e análise de genes envolvidos na reversão sexual em mamoeiro (*Carica papaya* L.). Orientadora: Telma Nair Santana Pereira. Coorientador: Marcio Alves Ferreira Conselheiros:, Gonçalo Apolinário de Souza Filho, Luciano Gomes Fietto e Messias Gonzaga Pereira

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma espécie trióica, portanto apresenta plantas masculinas, femininas e hermafroditas. No Brasil, nos plantios comerciais são encontradas apenas plantas hermafroditas, as quais podem sofrer reversão sexual, ou seja, mudança de sexo das flores hermafroditas em flores masculinas. A reversão sexual geralmente ocorre durante o verão e causa perda na produção de frutos. Devido à importância desse mecanismo, esta pesquisa foi realizada com os objetivos de caracterizar a morfologia floral, identificar a presença de genes MADS Box no genoma do mamoeiro, através de análises de bioinformática e de filogenia molecular, e analisar a expressão de genes do tipo MADS- Box, identificados como potencialmente envolvidos na reversão sexual utilizando qPCR. A pesquisa foi realizada com o híbrido UENF/CALIMAN01, cujas plantas estavam dispostas, no campo, em fileiras com espaçamento definitivo de 1,5 m x 3,6 m. No início da floração, cem botões florais apresentando diferentes estádios de desenvolvimento, foram coletados. As medições dos botões florais foram feitas com o auxílio de papel milimetrado e classificados de acordo com o tamanho que variou de 1 mm a 10 mm. A morfologia floral entre as flores com reversão sexual

e sem a reversão sexual difere nas características do ovário. As flores perfeitas, sem reversão sexual, possuem um ovário ovóide e oblongo com comprimento variando de 2-3 cm, cinco estigmas e uma cavidade central com numerosos óvulos, enquanto que as flores com a reversão sexual apresentam um ovário pequeno ou rudimentar, sem estigmas, e sem cavidade central. Para determinar os melhores genes de referência, a serem usados em análises de qPCR, foram avaliados cinco novos genes constitutivos (A270, A320, A380, A170 e Actina). Os genes selecionados foram avaliados por qPCR em tecidos em diferentes fases de desenvolvimento com a reversão sexual e sem a reversão sexual e também em diferentes órgãos vegetativos. Os programas estatísticos geNORM e NormFinder foram utilizados para a avaliação dos melhores genes de referência. Desta análise foram selecionados dois novos genes, A210 e A320, indicados como ótimos genes de referência para mamoeiro. Para a identificação de genes específicos de flores foram realizadas análises *in silico*, com informações disponíveis no banco de dados do genoma de mamoeiro. Foi realizado um Blastn com sequências de genes MADS-box no banco de dados de *Arabidopsis*, a fim de encontrar possíveis ortólogos, principalmente da família MICK. Inicialmente, dez genes foram selecionados como pertencente à família MICK, mas apenas dois foram analisados nesse trabalho, cpAP3/TM6-1 e cpPllike. A análise desses genes por qPCR, os identificou como genes altamente expressos em tecidos florais de mamoeiro, principalmente nos estames, pétalas, sépalas e carpelos com a reversão sexual. O padrão geral de expressão dos genes específicos difere um pouco do padrão de expressão observado em *Arabidopsis*; portanto é necessária a continuidade das pesquisas para determinar a exata função dos genes MADS-Box em mamoeiro.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, MILENE, MSc., Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, February de 2011, Floral morphology and genes analysis involved in sex reversal of papaya (*Carica papaya* L.). Adviser: Telma Nair Santana Pereira. Co-Adviser: Marcio Alves Ferreira. Comitee Members:., Gonçalo Apolinário de Souza Filho, Luciano Gomes Fietto and Messias Gonzaga Pereira

Papaya (*Carica papaya* L.) is a trioecius species, therefore presents female, male and hermaphrodite plants. In Brazil, in the commercial field is found only hermaphrodite plants, which can suffer sex reversal, that is, sex change of hermaphrodite flowers for male flowers. The sex reversion generally occurs during the summer and cause a loss in fruit production. Due to the importance of this mechanism, this research had the objectives to characterize the floral morphology of papaya, to identify the Mads-box genes in the papaya genome by bioinformatics analysis and molecular phylogeny and to analyze the expressions of Mads box gene identified as potentially involved in sex reversal of papaya using qPCR. The research was done using UENF/CALIMAN01 hybrid, whose plants were, in the field, arranged in rows with definitive spaced about 1,5m x 3,6m. At the beginning of flowering, one hundred bud flowers were collected at different development stage. The measurements of bud flowers were made with a graph paper and was classified according with the size that ranged of 1mm to 10mm. The flower morphology of flowers with and without sex reversal differs in the ovary appearance and measures. The perfect flowers, without the sex reversal, have an

ovoid oblong ovary of 2-3 cm long, five furrowed and a central cavity with many ovules; on the other hand, the flowers with sex reversal have a small or rudimentary ovary without a central cavity and stigmas. To determine the best reference gene(s) to be used in qPCR, five new putative reference genes were evaluated (A270, A320, A380, 170 e ACTINA). The selected genes were evaluated by qPCR in tissues of different stages of flowers with and without sexual reversal and in different floral vegetative organs. The statistical programs geNORM and NormFinder were used for evaluation of the best reference genes. From this analysis, were selected two news genes as good candidates for reference genes in papaya. For the identification of specific flower genes, analysis *in silico* were performed, using available information in the Database of EST of the papaya genome. Initial sequences of genes Mads box were performed in a BLASTn Database of Arabidopsis, in order to find their possible orthologs, specially genes of MICK family. The first ten genes were selected as belonging the MICK family, but only two genes were analyzed in this work. The analysis of these genes by qPCR identified cpAP3/TM6-1 and cpPllike, as genes highly expressed in papaya flowers, mainly in tissues such as flower stamens, petals, carpels and sepals with sex reversal. The general expression pattern of the specific genes, differ from the expression patterns observed in Arabidopsis. Therefore, further analysis is required to determine the exact role of MADS- box genes in papaya.

1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya L.* - Caricaceae) é uma espécie diplóide com nove pares de cromossomos (Damasceno Junior et al., 2009; Bennet & Leitch 2005) e um genoma pequeno totalmente sequenciado composto por 372 Mbp/1C (Arumuganathan & Earle 1991). É uma espécie considerada trióica, ou seja, pode apresentar plantas masculinas, femininas e hermafroditas (Ming *et al.*, 2007), sendo assim considerada sexualmente polimórfica. As variedades comerciais do mamoeiro ou são dióicas, apresentando plantas femininas e masculinas, ou são ginodióicas, apresentando plantas femininas e hermafroditas (Qingyi. et al., 2008; Dellaporta & Calderon-Urrea 1993).

Apesar de as três formas sexuais (plantas femininas, masculinas e hermafroditas) serem determinadas geneticamente (Holfmeyr, 1938) pela presença de um gene com três alelos (M_1 , M_2 , e m) a expressão fenotípica do sexo é influenciada por fatores ambientais, incluindo temperatura (Awada, 1958), fatores nutricionais (Awada and Ikeda, 1957) e umidade (Awada, 1961). Portanto, a cultura apresenta uma instabilidade na expressão sexual sendo comum no campo a ocorrência de flores masculinas em plantas hermafroditas e vice-versa, fenômeno este conhecido como reversão sexual. A reversão sexual ocorre nas duas formas sexuais das flores do mamoeiro, flores masculinas e hermafroditas, sendo um grande problema em plantios comerciais especialmente no verão, quando ocorrem altas temperaturas; já as flores femininas são consideradas flores estáveis, pois não sofrem reversão (Storey, 1958). A flor hermafrodita de mamoeiro

quando sofre reversão sexual (altas temperaturas), apresenta o órgão feminino com crescimento atrofiado, similar ao observado em muitas flores masculinas, causando uma queda na produção de frutos, sendo considerado um problema no campo comercial.

As flores de grande parte das angiospermas possuem quatro tipos de órgãos, classificados de fora para dentro como: sépalas, pétalas, estames e carpelos, que estão dispostos em círculos concêntricos, chamados de verticilos florais (Qingyi et al, 2003). Estudos genéticos e moleculares com mutantes florais de dois modelos de plantas monóicas, *Antirrhinum* e *Arabidopsis*, permitiram o estabelecimento do modelo ABC, amplamente aceito no controle genético e na identidade floral em flores perfeitas ou hermafroditas (Qingyi et al, 2008). Cada classe de gene possui função em dois verticilos adjacentes. Genes da classe A, atuam sozinhos e são específicos para o primeiro verticilo de fora para dentro, que são as sépalas. Genes da classe A junto com genes da classe B, são específicos para pétalas no segundo verticilo. Genes da classe B junto com o gene da classe C são específicos para a formação do estame e o gene da classe C sozinho é específico para a formação dos carpelos (Qingyi et al, 2008).

A determinação sexual é tradicionalmente considerada ser um aborto seletivo do gineceu ou do androceu em primórdios florais hermafroditas iniciais (Erin e Nelson, 1989). Este mecanismo de repressão seletiva dos órgãos florais ainda é pouco entendido e não existem estudos conduzidos em espécies trióicas como o mamoeiro. Em sendo trióico, o mamoeiro é um excelente modelo para estudar o desenvolvimento das flores em plantas, pois possui as três formas sexuais na mesma espécie. Assim, neste trabalho, objetivou-se a caracterização morfológica do desenvolvimento do meristema floral, bem como a identificação e a análise da expressão de genes MADS-Box que estão envolvidos na diferenciação dos órgãos de reprodução em mamoeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Cultura do mamoeiro

2.1.1. Classificação Taxonômica e Centro de Origem

A classificação taxonômica do mamoeiro tem sofrido várias mudanças ao longo dos anos. O gênero *Carica* foi anteriormente classificado dentro de diferentes famílias de plantas, incluindo *Passifloraceae*, *Curcubitaceae*, *Bixaceae*, e *Papayaceae*. No entanto, atualmente é classificado na classe *Eudicotyledoneae*, ordem *Vidales*, família *Caricaceae* (Badillo, 1971, 1993). Família esta que apresenta 35 espécies em seis gêneros, dos quais 32 são dióicas, duas trióicas e uma monóica (Badillo, 2000, 2001).

Apesar das diferentes teorias, a família *Caricaceae* tem como principal centro de origem o centro americano, com maior distribuição na América do Sul, onde as espécies dos gêneros *Vasconcellea*, *Carica* e *Jacaratia* são encontradas (Garrett 1995; Aradhya et al. 1999; OECD 2005).

Quanto ao mamoeiro é provável que o centro de origem seja a Bacia Amazônica Superior, onde a sua diversidade genética é máxima, o que a caracteriza como uma planta tipicamente tropical (Badillo, 1993). O Equador possui 71% das espécies descritas de *Vasconcellea*, sendo considerado o principal centro de diversidade do gênero (Van den Eynden et al., 1999). O mamoeiro é distribuído em áreas tropicais e subtropicais do mundo (Villegas 1997), tendo sido descoberto, pelos espanhóis na região compreendida entre o sul do México e Norte da

Nicarágua. Após a descoberta, o mamoeiro foi sendo cultivado em várias regiões tropicais, sendo que a sua distribuição estende-se na faixa de 32 graus de latitude norte e sul (Litz, 1984), sendo relatada pela primeira vez no Brasil em 1857, segundo De Candolle (1895), citado por Medina (1980).

2.1.2. Importância econômica

O gênero *Carica* é o único da família *Caricaceae* com espécies domesticadas e apresenta a espécie mais importante economicamente da família, o *Carica papaya L.* (Badilho, 2003). O cultivo dessa espécie é realizado principalmente visando ao consumo como fruta *in natura*, bebidas, doces, geléias, tortas e também como fruta seca e cristalizada (Morton 1987; Facciola 1990; Villegas 1997). Nutricionalmente, o mamão maduro é uma ótima fonte de cálcio, vitamina A e C (Nakasone & Paull 1998). Bioquimicamente, as folhas e frutos produzem várias proteínas e alcalóides de grande importância na aplicação farmacêutica e industrial (El Moussaoui et al 2001). Destas proteínas produzidas, a papaína se destaca, sendo uma importante enzima proteolítica produzida em toda parte da planta principalmente nos frutos não maduros. Segundo Jones e Mercier (1976), citados por Parasnis et al. (1999), essa enzima proteolítica, extraída do látex do mamoeiro, é de grande importância comercial e tem sido utilizada nas indústrias alimentícias, têxteis, farmacêuticas e de cosméticos.

Segundo a FAO (2010), a produção mundial de mamão representa 10% da produção mundial de frutas tropicais, girando em torno de oito milhões de toneladas, das quais 39% são produzidas na América Latina e Caribe. O Brasil é considerado o segundo maior produtor mundial de mamão, ficando atrás da Índia (FAO 2010) e o segundo maior exportador (FAO 2010), ficando atrás do México, porém, o Brasil exporta mais frutos de variedades do Grupo Solo e o México mais do Grupo Formosa. No Brasil, o Estado da Bahia é o maior produtor de mamão, com 863.828 toneladas em 2007, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (AGRIANUAL 2010). O Espírito Santo é o segundo maior produtor, com 646.273 toneladas e o maior exportador brasileiro de mamão do Grupo Solo. Os municípios maiores produtores do Estado do Espírito Santo são Pinheiros (67% do cultivo corresponde ao Grupo Formosa e 37,3% ao Grupo

Solo) e Linhares (20,9% do cultivo correspondente ao Grupo Formosa e 79,1% ao Grupo Solo) (AGRIANUAL 2010).

2.2. Caracterização Morfológica do Mamoeiro

O mamoeiro possui caule normalmente indiviso, herbáceo-lenhoso, fistuloso nas regiões dos entrenós, suculento, ereto, marcado por grandes e numerosas cicatrizes foliares, terminando com um grupo denso de grandes folhas na região apical. As folhas são alternadas, com grandes limbos foliares (até 70 cm de diâmetro), longo-pecioladas, lâminas ovais ou orbiculares, profundamente palmatilobadas, e nervuras mais salientes na face abaxial (Awada, 1958).

Os lobos foliares são geralmente inteiros ou sinuado-lobados, verde-claro-mate na face superior e verde-brancacento pálido na face inferior, coberto por material ceroso, quase todos pinatifídios, os inferiores às vezes só com a margem externa apresentando um a dois lóbulos, ou totalmente inteiro. Os pecíolos são fistulosos, cilíndricos, verde-pálidos, às vezes vermelho-vinosos (Badillo, 1993). O sistema radicular é pivotante, com ramificações radiais, enquadrando-se no tipo de raiz principal denominada napiforme.

O fruto é uma baga. Dependendo do tipo de flor, pode ter as seguintes formas: arredondado, oblongo, alongado, cilíndrico e piriforme. A casca é fina com coloração que varia de amarelo claro a laranja, que protege a polpa, e espessura que varia de 2,5 a 5,0 cm. O fruto pode atingir 50 cm de comprimento e pesar até 10 kg. As sementes são pequenas, redondas e rugosas.

2.2.1. Morfologia Reprodutiva do Mamoeiro

As flores do mamoeiro são agrupadas em inflorescências simples, que aparecem pela primeira vez nas axilas das folhas imediatamente abaixo do ponto de crescimento (Storey 1941). Comparado com outras frutíferas, o mamão tem uma fase juvenil curta, apenas 3-8 meses, do plantio ao florescimento (Storey 1953). Uma vez que tenha começado a floração, e se as condições para o crescimento forem favoráveis, continua a lançar inflorescências na axila de cada folha, sem interrupção.

A descrição dos tipos de inflorescências e flores que ocorrem no mamoeiro é relatada por diversos autores, havendo diferenças relativas quanto às

diversas partes das flores e seu conjunto (Storey, 1941; Badillo, 1993). A descrição e classificação das variáveis sexuais diferem amplamente, porque a expressão do sexo em hermafroditas é profundamente influenciada por diferenças entre cultivares e condições climáticas, principalmente temperatura, e umidade do solo (Awada, 1958).

As flores pistiladas ou femininas possuem cinco pétalas, cinco sépalas, um volumoso pistilo funcional, e são inteiramente desprovidas de estames. As inflorescências femininas são cimosas e curtas (3 a 4 cm), pedúnculos curtos (1 a 2 cm), inseridas nas axilas das folhas, com poucas flores (isoladas ou em número de duas a três), ráquis glabra ou, às vezes, com tricomas densos e curtos: brácteas inconspícuas. São flores grandes, quando comparadas com as flores hermafroditas e masculinas, e apresentam cinco pétalas livres até a parte inferior da corola. O órgão feminino é composto pelo ovário de tamanho grande, arredondado, tendo na porção superior o estigma que é partido com cinco papilas em forma de leque (Figura 1 C). Não apresenta estames. É o tipo de flor mais estável, ou seja, raramente ocorre reversão do sexo nessas flores. Para serem fecundadas, necessitam de pólen de flores masculinas ou hermafroditas, produzindo frutos arredondados ou ligeiramente ovalados, com cavidade interna grande em relação à espessura da polpa, e conseqüentemente de baixo valor comercial.

As flores estaminadas ou masculinas possuem cinco pétalas e cinco sépalas, 10 estames diadelfos e um traço de pistilo abortado. Origina-se também das axilas foliares, em inflorescência com pedúnculo longo do tipo rácimo. O tubo da corola é longo e estreito apresentando cinco pétalas (Figura 1D). Esta flor apresenta órgão feminino muito rudimentar e geralmente estéril (Figura 1 E). Em certas épocas do ano, dependendo das condições climáticas, as plantas masculinas podem produzir frutos denominados “mamões-machos” ou “mamões-de-corda”, devido ao surgimento de flores hermafroditas (reversão sexual).

A flor hermafrodita, conhecida como alongada, possui cinco pétalas, cinco sépalas e apresenta pedúnculos curtos, origina-se nas axilas foliares, reunidas em pequenos grupos (Figura 1A e 1B). As flores são menores que as femininas, e apresentam as pétalas soldadas na base ou até quase a metade do seu comprimento. É uma flor completa, ou seja, apresenta o órgão masculino, androceu, representado por dez estames diadelfos, cinco maiores e cinco menores, e o órgão feminino, pistilo, formado por um ovário grande, estilete e

cinco estigmas do tipo leque soldados na base e livres no ápice. É uma flor funcional com os órgãos férteis, exceto quando há a reversão sexual de algumas flores hermafroditas para masculina, causando o fenômeno da esterilidade feminina ou de verão, por ocorrer no verão. Os frutos são de forma sempre alongada, mas variações na forma piriforme a cilíndrica são encontradas. Geralmente, a cavidade interna é menor do que a metade do diâmetro do fruto.

As variações nas flores do mamoeiro são controladas por fatores genéticos e ambientais como temperatura, nutrição e umidade (Kumar 1952). As plantas femininas são relativamente estáveis. As variações são em sua maioria encontradas em plantas masculinas e hermafroditas (Lange 1961). A Figura 2 ilustra o desenvolvimento floral de uma planta de mamão até a antese, segundo Arkle et al., (1984).

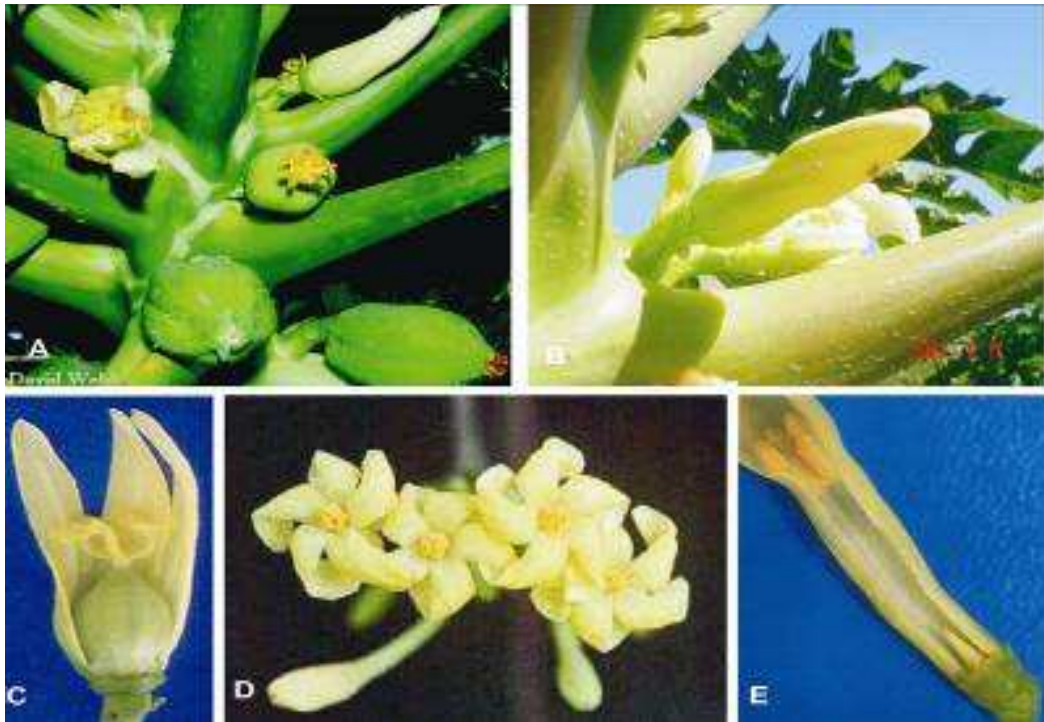


Figura 1. Flores do mamoeiro. (A e B) Flor hermafrodita alongada; (C) Flor feminina onde se observa o ovário e os estigmas em leque; (D) Racimo de flores masculinas; (E) Detalhe da flor masculina onde se observa o ovário atrofiado na base da flor <http://www.flowersgrowing.com>.

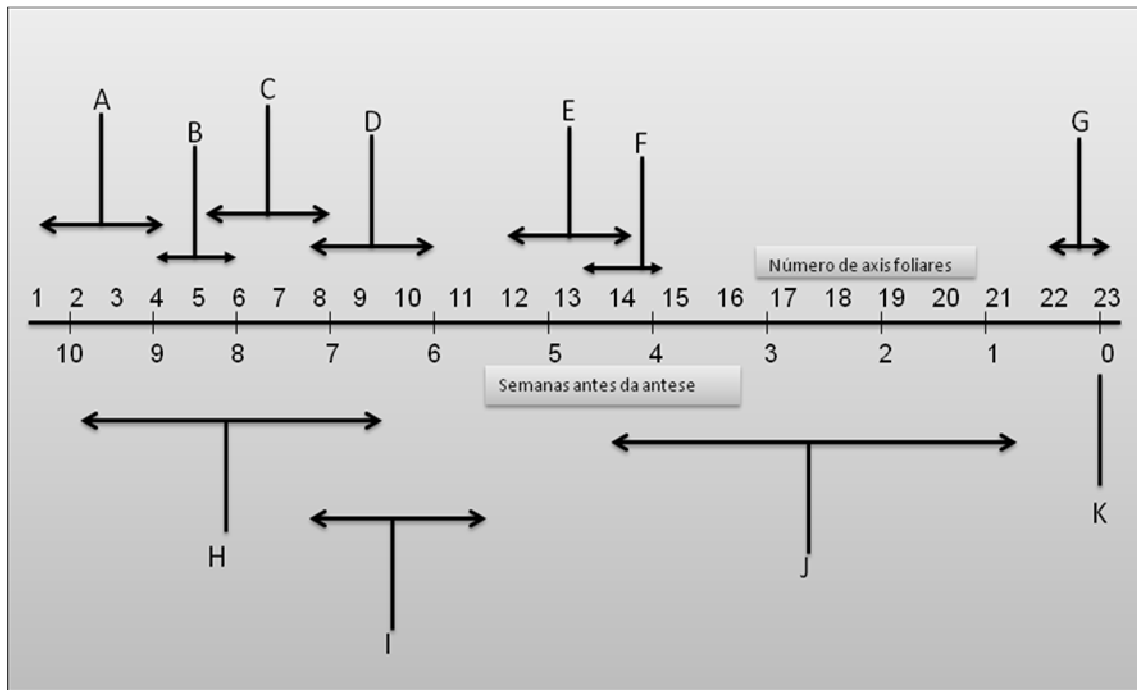


Figura 2 Fases do desenvolvimento floral do mamoeiro hermafrodita, de acordo com as semanas antecedentes a antese e o número de axis foliares. A: Iniciação floral começando a se formar na parte interna da planta; B: Botões florais começam a ser visíveis nas axis foliares; C: Inicia a diferenciação dos estames; D: Inicia a diferenciação dos ovários; E: Desenvolvimento dos estames está completo; F: Desenvolvimento dos ovários está completo; G: Autopolinização; H: Baixas temperaturas interrompem o desenvolvimento dos estames; I: Inibição do desenvolvimento de estames e carpelos por altas temperaturas; J: Maturação dos órgãos florais e K: Antese (Arkle et al., 1984).

2.2.2. Anomalias Florais

A flor hermafrodita do mamoeiro pode sofrer variações anatômicas devido, principalmente, às condições ambientais. Assim sendo, podem ser encontradas nas lavouras de plantas hermafroditas flores do tipo pentândrica, carpelóide e flores com reversão sexual, ou seja, flores masculinas.

A pentândria é um tipo de anomalia floral, que se caracteriza pela redução do número de estames, de 10 para cinco, na flor hermafrodita do mamoeiro, sendo que os estames remanescentes produzem cinco sulcos profundos no seu ovário (Figura 3A). Esses sulcos serão também observados nos frutos produzidos, a partir das flores pentândricas, o que os tornam deformados e, portanto, impróprios para o comércio (Figura 3D).

A carpeloidia se caracteriza pela tendência de os estames se tornarem carpelos com diferentes graus de transformação. Os estames são de número de dois a dez com variados graus de fusão das pétalas, ao ovário ou a ambos (Figura 3B). Dessa forma, os frutos provenientes de flores carpelóides apresentam-se deformados e, conseqüentemente, impróprios para a comercialização (Figura 3E).

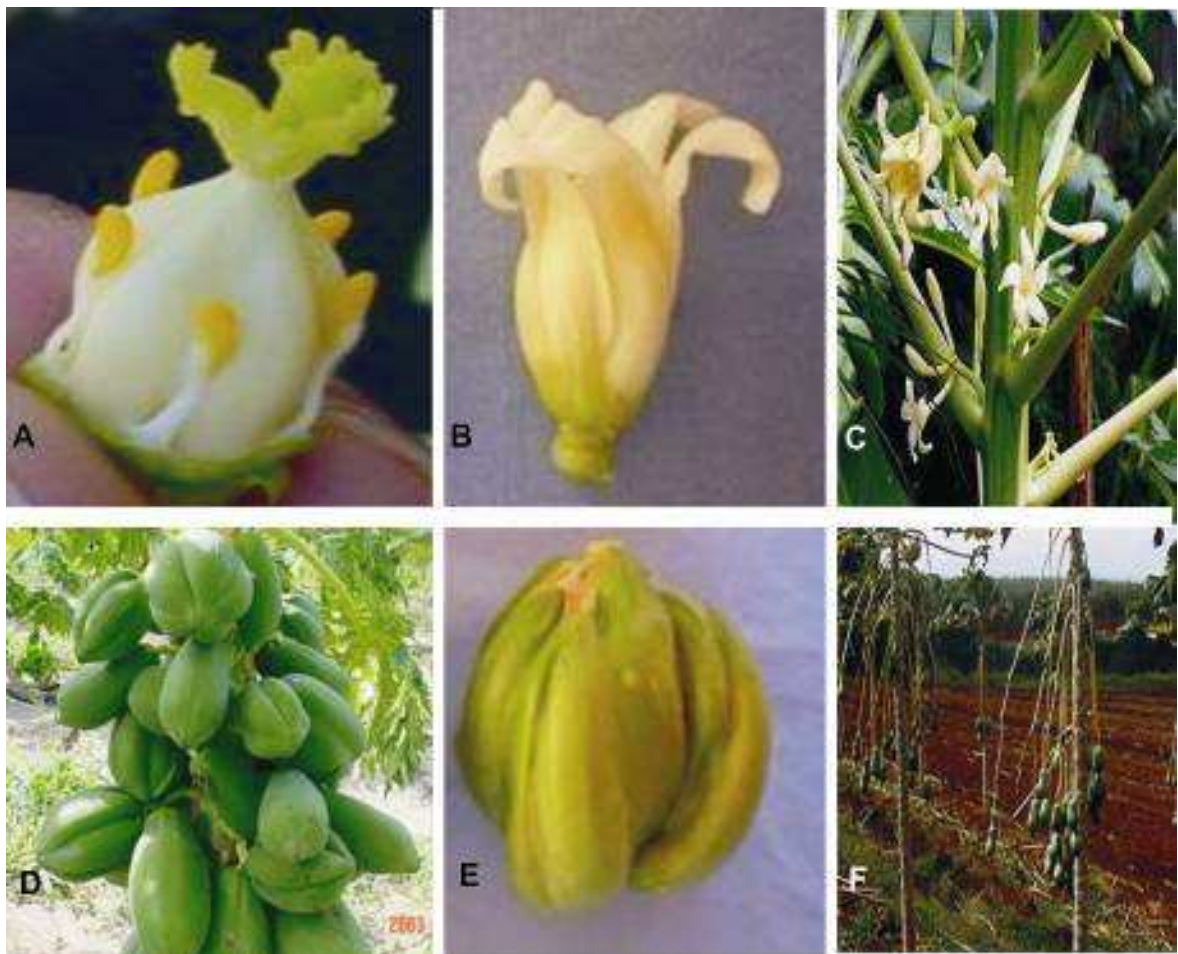


Figura 3: Diferentes tipos de anomalias florais observadas em plantas de mamoeiro. A) Pentândria; B) Carpeloidia; C) Planta hermafrodita com flores masculinas; D) frutos pentândricos; E) Fruto carpelóide; F) planta masculina com formação de frutos devido à reversão das flores masculinas para hermafroditas <http://www.flowersgrowing.com>.

A reversão sexual ocorre quando as flores hermafroditas não desenvolvem o órgão feminino, ou seja, o gineceu, ficando funcionais apenas os estames (Figura 3C). Essa anomalia, muito comum em lavouras de mamão, é conhecida como esterilidade de verão porque devido à ausência do gineceu essas flores não produzem frutos. A ocorrência dessa anomalia é fácil de ser detectada, pois as flores masculinas são mais delgadas que as hermafroditas que murcham e caem, ficando na região apenas as cicatrizes das axilas foliares; essa região é conhecida como pescoço. Por sua vez, em algumas épocas do ano, as flores masculinas podem desenvolver ovário funcional, tornando-se flores hermafroditas funcionais, produzindo frutos (Figura 3F).

As plantas hermafroditas que iniciam a floração no inverno, com temperaturas abaixo de 20°C, apresentam características, na primavera, de frutos altamente carpelóides, uma condição em que os estames assemelham-se aos carpelos, mas permanecem associados aos frutos desenvolvidos, levando a forma distorcida do fruto (Organisation for Economic Co-operation and Development – OECD 2005); em contraste, as plantas hermafroditas de mamoeiro, que têm seu início de floração durante as altas temperaturas de verão, acima de 35°C, tendem a apresentar um pistilo abortado (Watson, 1997; Nakasone e Paull, 1998).

As mudanças no sexo funcional das flores podem ser temporárias ou permanentes. Storey (1958) propôs que as alterações na expressão sexual são devido a dois conjuntos independentes de fatores genéticos, um afetando o aborto do carpelo (esterilidade de verão) e outro provocando a carpeloidia nos estames. Ambos são influenciados por fatores ambientais. Embora, o tipo sexual primário da planta seja determinado geneticamente, a expressão fenotípica dos alelos, que controlam a formação dos estames e carpelos, é influenciada por fatores ambientais vigentes no momento da iniciação das gemas florais (Storey 1958).

Essas anomalias florais são indesejáveis em plantios comerciais, especialmente a esterilidade de verão. Segundo Rugierro (1988), o melhoramento genético do mamoeiro deve desenvolver cultivares com baixa frequência dessas anomalias. As flores hermafroditas da variedade do Grupo 'Solo' podem produzir 100% de flores carpelóides, quando a temperatura mínima for menor do que 17°C (Nakasone & Paull 1998). Damasceno Junior (2008) avaliou o germoplasma e observou que a esterilidade de verão é a que mais contribui para a redução na

produção de frutos e que os materiais genéticos Costa Rica, Sunsire Solo, Diva, Caliman SG, Baixinho de Santa Amália, Caliman M5, Triwan, e Caliman G apresentam baixa frequência de esterilidade de verão. Ainda de acordo com Damasceno Junior (2008) a carpeloidia e a pentandria apresentam herança do tipo sobredominância e a esterilidade de verão dominância parcial. A produção de frutos carpelóides e pentândricos tem herança do tipo sobredominante, e expressam heterose positiva nos híbridos, porém estas características não exercem tanta influência na redução da produção de frutos comercializados, como a “esterilidade de verão”. Pode-se supor que haja um grupo de genes interagindo de forma altamente complexa na expressão e herança da reversão sexual, carpeloidia, pentandria e, conseqüentemente, no número total de flores. Portanto, os dados sugerem que tais características devam ser consideradas quantitativas (Damasceno Junior, 2008).

2.2.3. Iniciação floral

Estudar o desenvolvimento de uma flor, e a identificação dos genes envolvidos no florescimento, não é apenas uma preocupação da biologia das plantas; na agricultura também existe esse interesse e isso gera uma grande contribuição para a melhoria da cultura. Nas angiospermas, uma das características mais marcantes são as flores. A maioria das flores possui quatro tipos de órgãos florais, dois verticilos externos de órgãos estéreis, sépalas e pétalas, e dois verticilos internos férteis, estames e carpelos. Apesar de esta organização ser apresentada pela maioria das dicotiledôneas, existem também variações afetando o tipo e a posição dos órgãos florais. A floração pode ser considerada como uma grande mudança programada no desenvolvimento das plantas superiores e pode ser divididas em duas fases: iniciação floral e desenvolvimento dos órgãos florais (Gasser, 1991).

Ao contrário dos animais, as plantas continuam a gerar novos órgãos durante o seu crescimento pós - embrionário, em regiões específicas, denominadas meristemas. A parte aérea da planta é produzida pelo meristema apical (MA) que gera órgão e estruturas morfológicas e de identidade variadas, dependendo em que ciclo da fase de vida que a planta se encontra (Turner and Pumfrey 2002). Durante o crescimento vegetativo, o MA dá origem a órgãos vegetativos, tais como caule e folhas. Após a transição para o crescimento reprodutivo, o MA muda para a produção dos meristemas florais. Esta transição no MA é controlada por estímulos

ambientais e por sinais endógenos. Estes sinais endógenos transmitem informações sobre o estado de crescimento, tais como, tamanho da planta, hormônios e fluxo de nutrientes, e podem influenciar no tempo de floração (Bernier et al. 1988). A iniciação floral é um processo complexo, controlado por sinais ambientais principalmente por fatores ambientais, tais como, fotoperíodo, composição espectral, quantidade de luz, densidade de fluxo dos *fótons*, vernalização e disponibilidade de água (Levy e Dean 1998). Algumas espécies possuem uma menor sensibilidade aos fatores ambientais e o início do florescimento ocorre em resposta aos estímulos internos, como tamanho da planta ou número de nós vegetativos. Após a iniciação floral, o meristema apical começa a produzir flores, ao invés de primórdios foliares (Hempel e Feldman, 1994). Assim, o meristema floral passa a produzir uma série de órgãos primordiais que, então, deverão adotar destinos específicos, de acordo com sua posição no interior das gemas emergentes (Gasser, 1991).

2.3. Desenvolvimento floral e modelo ABCDE

Devido a recentes avanços na biologia molecular, grande série de mutantes com fenótipos florais anormais foram produzidos e analisados a partir de duas plantas modelos, *Antirrhinum* e *Arabidopsis*. Estes mutantes dividem-se em varias classes, cada uma, aparentemente afetando um ou mais processos de desenvolvimento da flor (Bowman et al., 1991).

A análise de mutantes duplos e triplos levou à proposição de um modelo simples, que explica os principais aspectos das interações genéticas entre os locos, e ficou conhecido como o modelo ABC (Coen e Meyerowitz 1991). O estudo do modelo ABC, e da constância da organização dos órgãos florais em diferentes espécies de angiospermas, confirma a hipótese de que existe um controle genético comum no programa de especificação dos órgãos florais em angiospermas (Bowman et al., 1991). O modelo “ABC” de identidade dos órgãos florais explica como a ação combinada das três classes de genes determina a identidade dos quatro órgãos florais (Coen e Meyerowitz, 1991).

Cada classe de gene possui função em dois verticilos adjacentes. Genes da classe A sozinhos são específicos para o primeiro verticilo de fora para dentro, que são as sépalas. Genes da classe A junto com genes da classe B são específicos para pétalas no segundo verticilo. Genes da classe B junto com o gene da classe C

são específicos para a formação do estame e o gene da classe C sozinho é específico para a formação dos carpelos (YU Q., et al, 2008). Em *Arabidopsis*, os genes da classe A são representados por *APETALA 1 (AP1)* e *APETALA 2 (AP2)* (Mandel *et al.* 1992). Genes da classe B são representados por *APETALA 3 (AP3)* e *PISTILLATA (PI)*. Genes da classe C são representados por *AGAMOUS (AG)* em *Arabidopsis* e um gene homólogo, *PLENA (PLE)* de *Antirrhinum* (Pelaz *et al.* 2000).

O modelo ABC tem se expandido, com a descoberta de novos genes, passando a sofrer modificações na nomenclatura e agora é chamado de modelo ABCDE (Theissen, 2001 - Figura 4). A função D foi adicionada com base no trabalho feito em petúnia. Genes da classe D são específicos para a identidade do óvulo (Colombo *et al.*, 1995), enquanto genes da classe E possuem uma função ampla, atuando em todo o meristema floral para facilitar a função de muitos locos do modelo original ABC (Pelaz *et al.*, 2000; Ditta *et al.*, 2004). Genes da classe D em *Arabidopsis* são representados pelo *SEEDSTICK (STK)*, enquanto os genes da classe E são compostos por um conjunto de quatro genes parálogos *SÉPALATTA 1-4 (SEP1-4)* (Pelaz *et al.*, 2000; Ditta *et al.*, 2004). Genes com estrutura e padrão de expressões similares foram encontrados em várias angiospermas, formando uma rede ortóloga de fatores controladores. A transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva é o primeiro passo para o desenvolvimento da flor. Durante essa primeira fase, o meristema floral é iniciado pela ação de um grupo de fatores transcricionais.

Os fatores transcricionais são importantes reguladores de processos celulares e a complexidade de vida de alguns organismos, demanda um grande número desses fatores (Riechmann e Ratchiffe, 2000). O estudo da morfologia floral no contexto evolutivo tem sido sustentado pela análise genética que permite compreender os mecanismos moleculares envolvidos na formação dos órgãos na planta e na evolução destas estruturas. Os genes responsáveis por controlar o desenvolvimento, na maioria das vezes, são os genes homeóticos. Estes genes pertencem a um número limitado de famílias multigênicas que codificam fatores transcricionais. As análises demonstraram que os membros do grupo de genes homeóticos são altamente conservados e tendem a compartilhar funções similares na morfogênese das flores. A grande maioria dos genes homeóticos florais pertence à família gênica MADS-box. Os membros da família MADS-BOX são conhecidos por estarem predominantemente envolvidos em processos de desenvolvimento floral (Parenicová *et al.*, 2003).

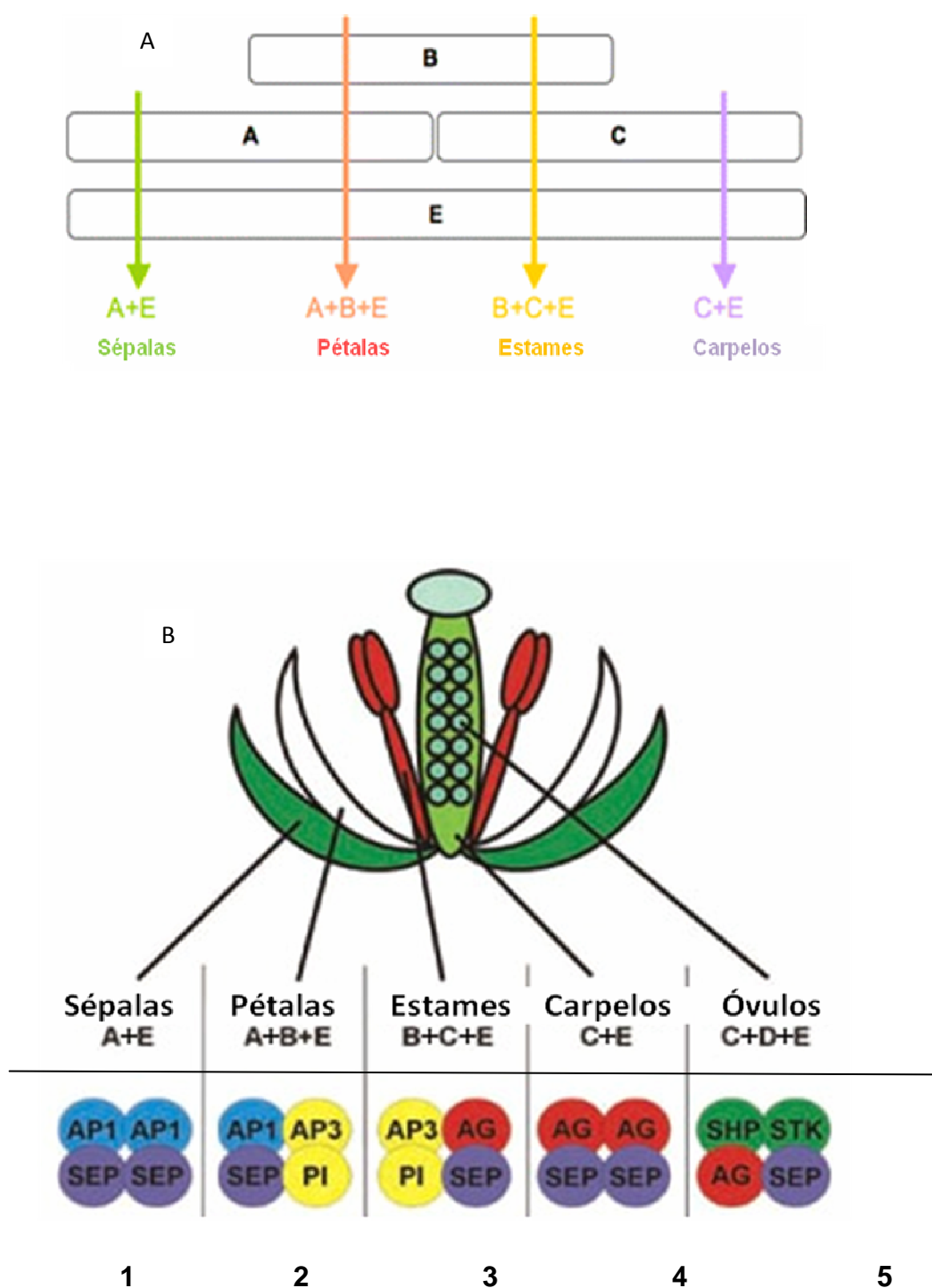


Figura 4. Dois modelos ABCDE da identidade dos orgaos florais. A figura (A) ilustra a ação combinatória dos genes da classe A, B, C, E. A figura (B) demonstra as associações dos genes para determinar o desenvolvimento das peças florais. Os números correspondem a cada verticilo floral: 1- Sépala; 2- Pétalas; 3- Estames; 4- Carpelos; 5-óvulos (ADAPTADO DE THEISSEN, 2001).

2.3.1. Genes MADS- BOX

Os genes MADS-box (Figura 5) codificam fatores de transcrição responsáveis pelo desenvolvimento de células de leveduras, plantas e animais. O nome MADS é uma acronímia dos nomes de quatro proteínas que possuem este domínio característico: **MCM1** (*Saccharomyces cerevisiae*), **AGAMOUS** (*Arabidopsis thaliana*), **DEFICIENS** (*Antirrhinum majus*) e **SRF** (*Homo sapiens*) (Schwarz-Sommer et al., 1990).

As proteínas codificadas por esses genes são modulares definidas pela presença do domínio MADS (M), composto por 180 pares de base (pb), codificando 60 aminoácidos, sendo responsável pela ligação ao DNA, a dimerização e a ligação entre funções. O domínio é altamente conservado. Eles possuem, portanto, uma origem muito antiga, anterior há 1.000 mil anos (ma), e estão divididos basicamente em dois grupos, o tipo I e o tipo II. Nas plantas, a grande maioria de proteínas MADS-BOX faz parte da categoria tipo II, contendo três domínios adicionais: intercalar (I, com cerca de 30 aminoácidos), queratinóide (K, com 70 aminoácidos) e terminal-C (bastante variável), formando uma estrutura MIKC (Becker & TheirBen 2003). O domínio K, moderadamente conservado, é específico dos genes MADS-box de plantas. Este domínio é importante na dimerização entre proteínas e na especificidade funcional provavelmente formando uma estrutura coiled-coil (Davies et al., 1996; Fan et al., 1997). O domínio I, pouco conservado, ajuda determinar a formação dos dímeros que se ligam ao DNA (Riechmann e Meyerowitz, 1997). Por fim, o domínio C-terminal, pouco conservado, pode funcionar como um domínio de trans-ativação (Egea-Cortines et al., 1999; Honma e Goto, 2001).

As proteínas codificadas pelos genes MADS desempenham muitas funções entre elas a da regulação do desenvolvimento e da diferenciação celular em praticamente todos os eucariontes. O tipo MIKC^c é o mais importante em plantas, e inclui várias subfamílias de genes reguladores do ciclo vegetativo e reprodutivo. Eles agem de maneira hierárquica e combinada na identidade meristemática e de órgãos que controlam a transição de um tipo de meristema e outro e determinam suas características (Becker & TheirBen 2003).

Nas angiospermas, os genes MADS-box abrangem várias funções biológicas importantes nos mais variados processos relacionados ao desenvolvimento de uma planta. Alguns mutantes MADS- BOX de *Arabidopsis*

foram descritos detalhadamente em vários estudos, como os genes que afetam o tempo de florescimento: (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* (Samach et al., 2000), *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (Michaels and Amasino, 1999), *AGAMOUS LIKE24 (AGL24)*; Michaels et al., 2003), *MADS AFFECTING FLOWERING 1/ FLOWERING LOCUS M (MAF1 / FLM)*; Ratcliffe et al., 2001; Scortecci et al., 2001), e *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*; Hartmann et al., 2000). Os fatores transcricionais MADS-BOX, mais estudados em plantas, são aqueles envolvidos na determinação da identidade floral, como o *APETALA 1 (AP1)*; Mandel et al., 1992), *FRUITFULL (FUL)*; Gu et al., 1998), e *CAULIFLOWER (CAL)*; Bowman et al. 1993), *SEPALLATA (SEP 1 – SEP 3)*; Pelaz et al., 2000), *APETALA 3 (AP3)*; Jack et al., 1992), *PISTILLATA (PI)*; Goto e Meyerowitz, 1994), e *AGAMOUS (AG)*; Yanofsky et al. 1990), bem como os genes envolvidos na formação do fruto, *SHATTERPROOF (SHP1 E SHP2)*; Liljegren et al., 2000). Apesar de estarem associados a vários processos do desenvolvimento da planta, os genes MADS-box foram melhor caracterizados no desenvolvimento reprodutivo. Dentre todos os genes do modelo ABCDE, o único que não faz parte da família gênica MADS-BOX é o AP2.

Genes MADS-box Arabidopsis



Figura 5 Domínio conservado do tipo II marcado pela presença domínio MADS composto por 180 pb, codificando 60 aminoácidos, a região Carbox-Terminal (N), além da região MADS, três domínios adicionais: intercalar (I, com cerca de 30 aminoácidos), queratinoide (K, com 70 aminoácidos) e terminal-C (bastante variável), formando uma estrutura MIKC (Becker & TheirBen 2003).

2.3.2. Genes MADS-BOX e a reversão sexual no mamoeiro

O mamoeiro é considerado como uma das fruteiras mais cultivadas e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo.

A produção de mamão representa 10% da produção mundial de frutas tropicais, girando em torno de 8 milhões de toneladas, das quais 39% são produzidas na América Latina e Caribe (FAO, 2010). Quanto à produção nacional,

os principais produtores são os Estados da Bahia (902 mil toneladas), Espírito Santo (630 mil toneladas), Rio Grande do Norte (106 mil toneladas) e Ceará (100 mil toneladas). No quesito exportações, o Estado do Espírito Santo responde por 50% do total (BRAPEX,2010). O mercado nacional e internacional de frutas é um mercado em expansão. Devido a essa importância econômica, o mamoeiro passou a ser um cultivo importante para fruticultura brasileira, o que suscitou uma série de iniciativas para o melhoramento genético da espécie papaya. Além das técnicas de melhoramento clássico empregadas, a genética molecular pode representar um salto quantitativo na domesticação desta espécie.

O melhoramento genético do mamoeiro pode contribuir substancialmente para uma maior produtividade. Este objetivo pode ser alcançado pela aplicação de métodos de melhoramento e seleção de variedades com rendimentos superiores, bem como mediante a obtenção de linhagens ou híbridos com resistência a doenças e pragas, o que certamente contribuirá de maneira decisiva no melhoramento da cultura, limitada em grande escala pela ampla incidência e distribuição de doenças viróticas (Harkness, 1967; Ishii & Holtzmann, 1963; Gabrovská et al., 1967).

A esterilidade feminina em flores hermafroditas é uma característica indesejável, resultante de causas genéticas e ambientais, as quais não estão desvinculadas entre si. A esterilidade feminina causa uma queda na produtividade, ocasionando uma perda significativa de mercado e, conseqüentemente, gerando um enorme prejuízo para a empresa produtora.

Diante das iniciativas realizadas no âmbito molecular, o objetivo deste trabalho não é apenas a identificação dos genes em mamoeiro, mas o uso dessas informações nas análises da expressão gênica, permitindo o desenvolvimento de novas tecnologias aplicáveis ao melhoramento vegetal nesta espécie frutífera. Ainda não estão descritos todos os genes e os mecanismos de regulação da expressão gênica que levam a morfogênese do órgão reprodutivo feminino do mamoeiro.

Os estudos de genes MADS-BOX, além de contribuir para elucidação dos mecanismos genéticos envolvidos na formação dos órgãos florais, podem posteriormente fornecer as informações e instrumentos necessários para o entendimento do mecanismo indesejável de reversão sexual, que ocorre na flor hermafrodita do mamoeiro.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Identificar os genes MADS- BOX no genoma do *Carica papaya* e analisar a expressão dos genes MADS-BOX identificados como potencialmente envolvidos na reversão sexual da flor do mamoeiro por análise de expressão quantitativa, qPCR.

Objetivos Específicos

- a) Caracterizar morfológicamente os órgãos florais do mamoeiro;
- b) Identificar a presença de genes MADS Box no genoma do mamoeiro, através de análises de bioinformática e de filogenia molecular;
- c) Analisar a expressão de genes do tipo MADS- Box como potencialmente envolvido no desenvolvimento floral do mamoeiro, utilizando qPCR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

A presente pesquisa foi realizada com o híbrido UENF/Caliman 01, cultivado na fazenda Macuco da Empresa Caliman, localizada em Linhares, norte do Estado do Espírito Santo/ ES. As plantas estavam dispostas em fileiras com espaçamento definitivo de 1,5 m x 3,6 m. As adubações, o manejo, o controle de pragas e doenças e os tratos culturais utilizados foram os mesmos utilizados nos plantios comerciais da Empresa Caliman Agrícola S/A. Parte da pesquisa foi realizada no Laboratório de Genética Molecular Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a coorientação do Professor Dr. Márcio Alves Ferreira.

4. 2. Metodologias

4.2.1. Morfologia dos diferentes estádios de formação do botão

Considerando as informações sobre o desenvolvimento e a morfologia floral e sobre a manifestação da reversão sexual em flores hermafroditas, esta parte do estudo foi realizada visando dar subsídio à pesquisa sobre a expressão gênica. Assim, cem botões apresentando diferentes tamanhos de desenvolvimento (variando de 1 mm a 10 mm) de sete plantas foram coletados, no campo. Cada botão teve seu tamanho mensurado com o auxílio de papel milimetrado e foram definidas as classes de botões, de acordo com o tamanho.

Esses botões/classe foram fixados em 2,5 % glutaraldeído e 4% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05M pH 7,2, por duas horas sob baixa temperatura (20°C) e levados ao laboratório onde foram processados para visualização. Com o auxílio de um bisturi (nº 10) e duas agulhas de seringa (nº 27G longa/ fina), as pétalas e sépalas foram removidas para a visualização dos órgãos reprodutivos. Para uma melhor visualização do órgão reprodutivo feminino, foram retirados também alguns estames. Os botões florais foram observados e fotografados individualmente, utilizando-se uma Lupa Moticam 2500 acoplada a uma câmera digital.

4.2.2. Identificação das sequências MADS-BOX

A identificação das sequências MADS-BOX foi realizada via bioinformática e a classificação pelo alinhamento e análise filogenética.

4.2.2.1. Análises de Bioinformática

Para a identificação das sequências MADS-BOX, foram realizadas diferentes buscas no genoma de *Carica papaya*. Para identificação das sequências MADS foram realizadas utilizando como fontes de informações, sequências de aminoácidos dos genes MADS-BOX de *Arabidopsis thaliana* (Parenicova et al. 2003), sequências de genes do *Carica papaya* que estão no site (www.life.illinois.edu/plantbio/faculty/ming.htm), e cinco sequências consenso das famílias $M\alpha$, $M\delta$, $M\beta$, $M\gamma$ e $Mikc$, gerada automaticamente pelo programa COBBLER (*C*onsensus *B*iasing *B*y *L*ocally *E*mbedding *R*esidues na página eletrônica: <http://blocks.fhcrc.org/blocks/cobbler.html>). As buscas foram realizadas no site phytozome (<http://www.phytozome.net/>). O phytozome possui informações do Department of Plant Biology da University of Illinois/ USA, coordenadas pelo Dr. Ray Ming. O banco da espécie de mamão (*C. papaya*) possui 54.440 sequências agrupadas em 6.894 *clusters* (dados de 01.04.2010).

Para a primeira identificação de sequências, foi feito um *BlastP* (E-value < $1e^{-5}$) das proteínas MADS- Box de *Arabidopsis* com o banco de dados de papaya disponibilizados no site (www.life.illinois.edu/plantbio/faculty/ming.htm). O domínio MADS-BOX foi marcado na sequência protéica, utilizando-se o programa *smart* (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) e *pfam* (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

A segunda etapa de identificação das sequências homólogas da família MADS-Box foi feita com um BlastP, usando-se as sequências protéicas dos membros do sistema ABCE caracterizados em *A. Thaliana* (Parenicova et al. 2003) , capturando as cinco melhores sequências para posterior análise. O resultado não alterou significativamente o número de sequências MADS-box em papaya, encontradas na primeira análise. Após a identificação dessas sequências em mamão, o mesmo foi conduzido com as espécies *Populus trichocarpa* (álamo), *Vitis vinifera* (uva) e *Arabidopsis thaliana* para posterior análise filogenética

A terceira e última etapa de identificação de sequências foi feita utilizando-se cinco sequências consenso das famílias, $M\alpha$, $M\delta$, $M\beta$, $M\gamma$ e $Mikc$ gerada automaticamente pelo programa COBBLER (*C*Onsensus *B*iasing *B*y *L*ocally *E*mbeddig *R*esidues na página eletrônica: <http://blocks.fhcrc.org/blocks/cobbler.html>.) Esta sequência é baseada em todas as sequências de aminoácidos de *Arabidopsis* do domínio MADS-BOX disponíveis (Parenicova et al., 2003). A busca foi realizada no Phytozome, comparando-se a sequência consenso MADS-BOX com sequências de proteínas do banco de dados. Para as três diferentes buscas no site Phytozome, utilizaram-se a ferramenta BLASTP E-value < $1e^{-5}$ (Altschul et al., 1997) e o parâmetro matriz BLOSUM62.

4.2.2.2. Análise da Filogenia Molecular

Para a classificação das sequências MADs-BOX de *C. papaya* nas cinco classes já caracterizadas para *A. thaliana*, foram conduzidos sucessivos alinhamentos entre as sequências de aminoácidos de *Arabidopsis* e mamão no programa *CLUSTALW* (www.ebi.ac.uk/index/clustalw.html), com os parâmetros pré-definidos pelo programa. Em seguida, análises filogenéticas foram realizadas pelo programa MEGA (*The Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), versão 4.1 (Tamura et al., 2007). As filogenias foram obtidas pelo método Neighbor-joining (Saitou e Nei, 1987) e a distância molecular, baseada no alinhamento das sequências, foi calculada de acordo com os parâmetros distância p e deleção par a par. Os ramos das árvores foram testados por *bootstrap*, com 1.000 repetições.

4.2.2.3. Construção de primers para análise de expressão qPCR

Os iniciadores para as análises da PCR quantitativa em tempo Real (qPCR) foram desenhados utilizando-se a ferramenta Primer 3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000) e avaliados usando o programa NetPrimer (Premier Biosoft International). Foram selecionados apenas aqueles resultantes em amplicons entre 100pb e 200 pb e com temperaturas médias de hibridização em torno de 60°C. Todos os iniciadores (Tabela 1 e 4) foram inicialmente testados via RT-PCR.

Tabela 1. Iniciadores dos genes MADS-BOX avaliados nos testes de expressão por qPCR neste trabalho estão em negrito. Dois genes parálogos classe B *cpAP3like* e um Pistilata ortólogo *cpPIlike*. Gene homólogo da classe A *cpAP1like*. Genes homólogos da classe D, *cpSEPlike* e outro gene da homólogo da classe B *cpSHPlike*

Gene MADS-BOX	Sequências Oligonucleotídeos
cpAP3/TM6-1like	5' ACTGCCACGACGAAGAAGAT 3' 5' CATGCAAGTCTTCCCCACTT 3'
cpAP3/TM6-2like	5' GTCATACGCGAGCGAAAGTT 3' 5' CTCCAAATTCCGGACCTTCT 3'
cpSEPlike1	5' AGCTCGAGAGCAGCTACAGG 3' 5' GAGTTGCTCCAGCTCTTTGG 3'
cpSEPlike3	5' ACTTTCCGTTCTTTGCGAT 3' 5' TCCAGTGCTTCTCTTGTTGGA 3'
cpSEPlike4	5' GAGGAGAAATGGGTTGCTCA 3' 5' AGTTGCTTCCAGTGCCTCAT 3'
cpAP1like	5' CCAGGTGACCTTCTCCAAA 3' 5' GGGTGCAACAAGCTGTCTTT 3'
cpPIlike	5' CAAGGCTGTGGGATGCTAAG 3' 5' AGTGCCTCAGCTCAATCTGC 3'
cpSHPlike	5' AGCATGTTCTGATGCCACAA 3' 5' ACCCAGAATATGCCTGTTGG 3'

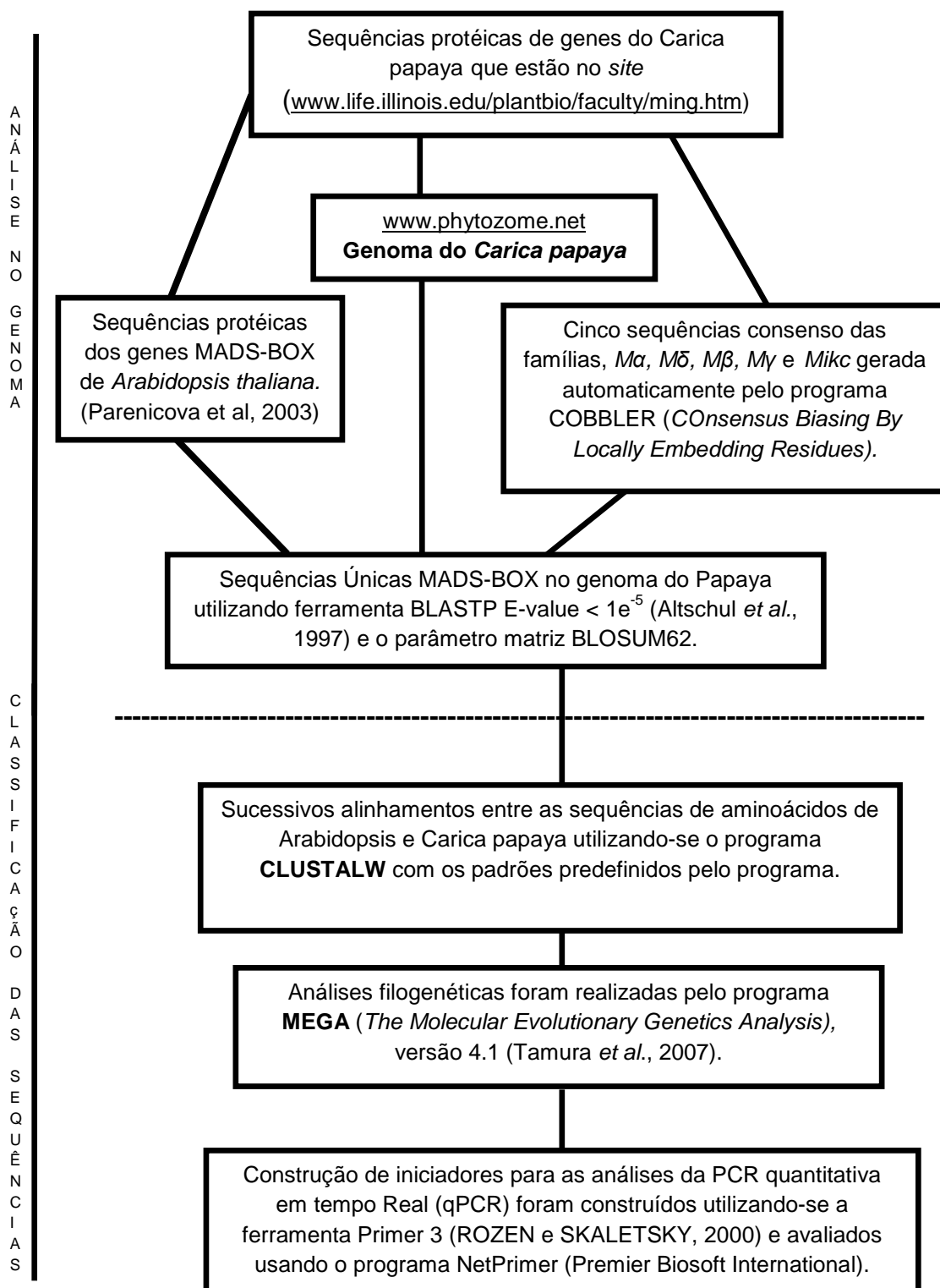


Figura 6. Organograma relativo às análises de bioinformática desenvolvida nesse trabalho.

4.3. RT-PCR Quantitativo em Tempo Real -qPCR

4.3.1. Extração do RNA total e síntese de cDNA

Para a extração de RNA, foram realizadas coletas específicas de meristemas primordiais e botões florais de tamanhos variados, Assim, no campo, foram retiradas sete plantas do híbrido UENF/ Caliman 01, sendo uma planta de cada vez. De cada planta, foram coletados os meristemas primordiais, botões de 1 mm e 2 mm e os botões de 4 mm em tubos *falcons* dentro do nitrogênio líquido sem nenhuma manipulação.

A coleta dos botões de 6 mm, 8 mm e 10 mm foi realizada após a verificação da ocorrência ou não da reversão sexual. Após essa verificação, com o auxílio de uma agulha de seringa e uma lupa ocular, os diferentes botões foram separados em partes florais (pétalas, sépalas, estames e carpelos) e as peças foram colocadas em tubos de *ependorf* no N₂ líquido. Além da parte floral, diferentes tecidos como folhas adultas e pedúnculo foram coletados, mergulhados em N₂ líquido, e armazenados no freezer a -80°C. O quadro 1 mostra separadamente todo o material vegetal coletado para extração de RNA total.

No laboratório, com um almofariz, os diferentes tecidos, separadamente, foram triturados em N₂ líquido. Um total de 100 mg de cada tecido foram utilizados para extração do RNA total com o *kit* o RNeasy® Plant (Qiagen, Valencia, CA), segundo as recomendações do fabricante. Para a dosagem das amostras, utilizou-se o NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific), com as leituras das absorvâncias na faixa 230-280 nm. Após a extração de RNA, o material foi tratado com DNase para a síntese do cDNA.

A primeira fita de cDNA de cada amostra foi sintetizada a partir de 1 µg de RNA total, ao qual foi adicionado 50 µM de oligonucleotídeos (dT24V) e 10 mM de cada deoxirribonucleosídeo 5'-trifosfato (dNTPs). Essas reações foram incubadas a 65°C por 5 minutos e resfriadas no gelo. Em seguida, foram adicionados 20 mM de ditioneitol (DTT), 200 unidades de Superscript III (Invitrogen) e o respectivo tampão First-Strand totalizando o volume de 20µL. Esta reação foi incubada a 50°C durante 1h, segundo instruções do fabricante. A inativação da transcriptase reversa foi feita por incubação da reação a 70°C por 15 minutos. A qualidade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5µl/mL em tampão TBE 0,5x (5,4g de Tris, 2,75 de ácido bórico e 2 mL de EDTA 500mM pH 8,0).

Quadro 1. Amostras biológicas de sete diferentes plantas utilizadas para a extração de RNA total. A medida dos botões se refere ao tamanho da amostra. Os órgãos florais foram coletados de botões florais de 6 mm e 10 mm de comprimento com a presença da reversão sexual (R) e ausência de reversão sexual (N)

Órgãos Vegetativos	Botões Florais	Órgãos Florais
Folha Adulta (FA) Pedúnculo (PD)	Botões 1 mm/2 mm/3 mm/4 mm Pontos Meristemáticos	Pétalas (Sem Reversão) PN Pétalas (Com Reversão) PR Sépalas (Sem Reversão) SN Sépalas (Com Reversão) SR Estames (Sem Reversão) EN Estames (Com Reversão) ER Carpelo (Sem Reversão) CN Carpelo (Com Reversão) CR

4.3.2 PCR em tempo real (qRT-PCR)

Para os experimentos de qRT-PCR os cDNAs utilizados foram diluídos 50 vezes em água MilliQ® estéril ultrapura e as mesmas alíquotas foram utilizadas em todos os experimentos. Cada reação foi realizada em triplicata para cada par de iniciador. As qRT-PCRs foram efetuadas no sistema de detecção Applied Biosystem. As reações de amplificação dos cDNAs foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo 2,00 µL do detector *SYBR Green I* (1X) (Molecular Probes), 10 µL do cDNA diluído (1:50), 0,80 µL dos iniciadores direto e reverso (10 µM cada), 0,05 µL de dNTP (10 mM), 2,00 µL de tampão PCR sem magnésio (10x), 1,20 µL de cloreto de magnésio (50 mM), 0,05 µL de Platinum® Taq DNA Polymerase (5 U/µL) e 3,90 µL de água. Na reação controle negativa, o volume do cDNA foi substituído por água MilliQ® estéril. Para a análise dos genes nos tecidos vegetativos juntamente com a coletânea de flor, o volume final de cada reação foi aumentado para 40 µL a fim de melhorar os resultados.

Os parâmetros da reação da PCR foram 94°C por 5 minutos para a ativação da enzima polimerase, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento dos iniciadores específicos para cada gene a 60°C por 10 segundos e polimerização a 72°C por 15 segundos.

As medidas dos produtos de amplificação foram realizadas pela incorporação do marcador fluorescente SYBR Green na dupla fita de DNA. Para

avaliação da eficiência do iniciador foi utilizado o programa *online Real-time PCR Miner* (Zhao e Fernald, 2005). Este programa utiliza os pontos iniciais e finais da fase exponencial da PCR juntamente com os dados brutos de fluorescência de cada iniciador em cada ciclo e estima para cada gene os valores de eficiência das amplificações e o ponto de corte C_T (*Cycles threshold*) sem a necessidade de uma curva padrão a partir de um algoritmo de regressão não linear. Estes valores de C_T gerados pelo Miner foram utilizados no programa qBase, versão v 1.3.5 (Hellemans *et al.*, 2007), que emprega o modelo de quantificação relativa delta-CT para transformar o valor de expressão em valores relativos não-normalizados, que foram corrigidos pela eficiência da PCR através da fórmula $Q = E^{\Delta C_T}$, onde E é a eficiência do gene e ΔC_T é a amostra com menor valor de expressão menos o valor de expressão em questão.

Os resultados foram submetidos a dois diferentes programas que classificam os melhores genes constitutivos, o *geNorm* (Vandesompele, et al., 2002) e *NormFinder* (Andersen, et al. 2004). Estes programas se baseiam em algoritmos diferentes que utilizam como informação a análise do ciclo limite (*Cycles threshold*) dos genes nos diferentes tecidos em duas replicatas biológicas e a eficiência do iniciador em cada amostra biológica. Com esta análise, identificaram-se os genes que apresentam a menor variação quanto ao número de transcritos em cada tecido.

Para a avaliação da expressão dos possíveis genes específicos de flor, os valores de eficiência das amplificações de cada iniciador e o ponto de corte C_T (*Cycles threshold*) dos genes nos diferentes tecidos foram determinados pelo programa *online Real-time PCR Miner*, utilizados no programa qBase versão 1.3.5 e normalizados com genes de referência indicados pelo programa *Normfinder*.

O algoritmo estatístico *geNorm* determina o valor da estabilidade do gene (M), baseado na média geométrica dos genes testados e na medida da variação par a par de um gene contra todos os outros nas diferentes amostras. Estes dados permitem classificar os genes de acordo com o seu grau de estabilidade das amostras testadas. O algoritmo prevê que dois genes ideais possuem a razão de expressão idêntica em todas as amostras. Genes com menores valores de M apresentam a expressão mais estável. Além disso, as variações par a par são calculadas para cada grupo de experimentos para determinar o número ideal de genes para cada normalização adequada. Para isso, é calculado um fator de

normalização para os genes com valores menores de M (V_n) e um fator de normalização incluindo um gene a mais (V_{n+1}).

O *NormFinder* baseia-se num modelo matemático que estima a variação de expressão intragrupos e intergrupos (no caso de replicatas biológicas e os diferentes tecidos, respectivamente) para calcular o valor de estabilidade de cada gene. Este modelo seleciona a combinação dos melhores genes com o melhor fator de normalização (NF), ou seja, com a menor variação intra e intergrupos, enquanto modelos baseados na variação par a par, como o *geNorm*, selecionam genes com a menor variação intragrupos e com a mesma variação intergrupos. A escolha da melhor combinação de genes, apontada pelo *NormFinder*, minimiza a chance de erros de normalização (Andersen et al., 2004).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Morfologia floral dos botões

Uma breve caracterização da morfologia floral foi realizada com base nos dados observados no campo e no laboratório. O período de coleta das flores coincidiu com o verão onde a reversão sexual tem sua maior frequência nos genótipos de mamoeiro. Assim, foram observadas flores normais e flores revertidas, conforme descrição abaixo.

A flor hermafrodita, conhecida como alongada, é uma flor perfeita, ou seja, apresenta o órgão masculino, androceu, representado por dez estames diadelfos, cinco maiores e cinco menores, e o órgão feminino, pistilo, formado por um ovário grande, estilete e cinco estigmas soldados na base e livres no ápice em forma de leque. É uma flor funcional com os órgãos férteis, exceto quando há a reversão sexual de algumas flores hermafroditas para masculina, causando o fenômeno da esterilidade feminina, que ocorre no verão.

Os botões normais e com reversão podem ser melhor visualizados na Figura 6. Observou-se que nos botões normais (Figura 7A, 7C, 7E) o ovário se desenvolve lentamente. De acordo com Arkle et al (1984), em linhagens do grupo Solo o ovário está plenamente formado quatro semanas antes da antese. Sippel et al (1989) observaram que os ovários de flores hermafroditas iniciam o desenvolvimento entre 6-7 semanas antes da antese quando atingem 5,8 mm e o

finalizam uma semana antes da antese, e os ovários de flores femininas iniciam o desenvolvimento oito semanas antes da antese, quando atingem 2,1 mm.

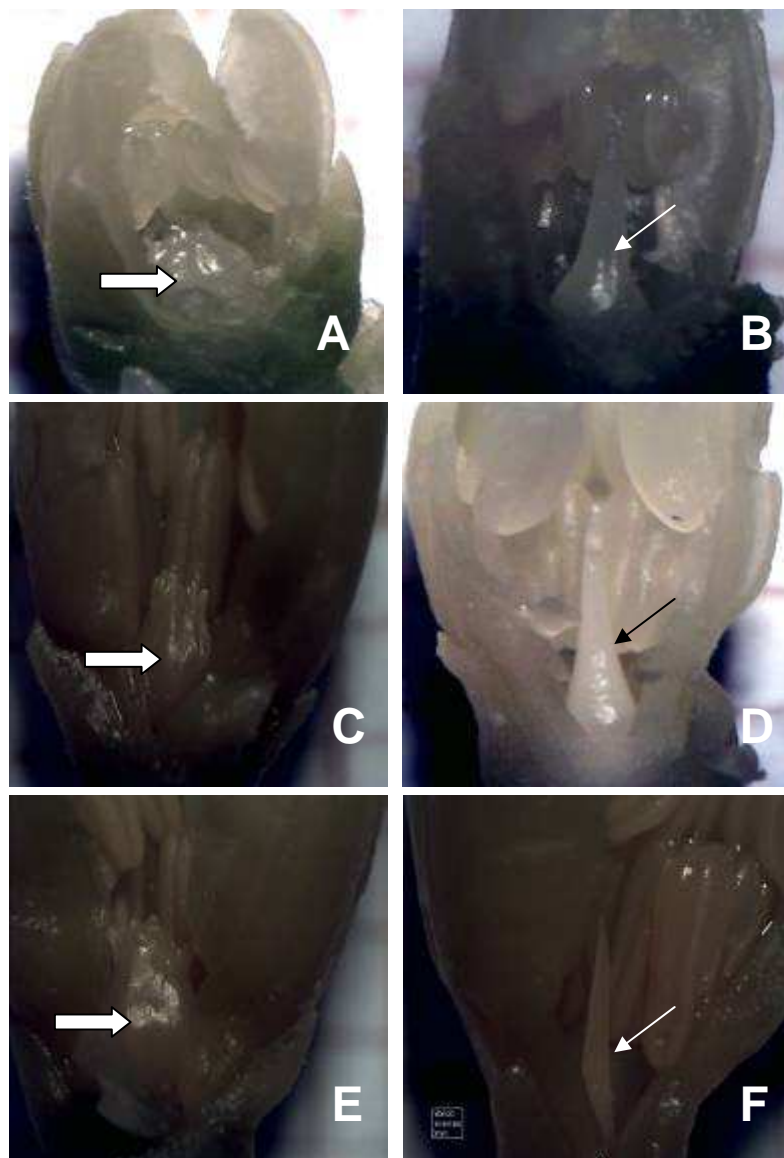


Figura 7. Botões florais normais (A, C, E) e botões com reversão sexual (B, D, e F) onde se observam o ovário nas flores normais (seta larga) e o rudimento de ovário (seta fina) nos botões revertidos, com tamanhos variando de 4 mm (B), 6 mm (D) e 8 mm (F).

O botão floral com reversão sexual apresenta um ovário reduzido, infértil, e ausência dos cinco estigmas no ápice, adquirindo um aspecto afunilado, decrescendo o diâmetro do ovário (Figuras 7B, 7D e 7F). Esses botões

apresentam características de uma flor masculina ou estaminada e que segundo Ronse Decraene e Smets (1999) apresenta na região central da flor uma estrutura chamada pistiloide que a literatura se refere como o ovário rudimentar em flores revertidas. Essa característica se manifesta em botões muito pequenos já a partir dos 4 mm (Figura 7B). Resultados semelhantes foram relatados por Arkle Jr. e Nakasone (1984) que observaram que o desenvolvimento do ovário é interrompido cerca de 6 a 7 semanas antes da antese e são visíveis já na quinta semana, após a iniciação floral.

5.2. Identificação de genes MADS-BOX

5.2.1. Análise de Bioinformática

O resultado das primeiras análises na busca por genes MADS-BOX no genoma do papaya gerou 746 sequências únicas, ou seja, sem redundância. Foi feita uma busca no *site Phytozome*, para verificar a presença do domínio MADS nas sequências encontradas, e observou-se que das 746 sequências somente 76 genes possuem o domínio MADS e em uma análise prévia desses genes, encontrados na primeira análise, foram encontrados dez possíveis sequências protéicas, pertencentes à família MIKC (Tabela 2) .

Para confirmar a análise prévia, esses possíveis genes foram submetidos a análises junto com genes MADS-BOX de *Populus trichocarpa* e *Vitis vinifera* e *Arabidopsis thaliana* e os resultados podem ser observados nas Figuras 8, 9 e 10.

Papaya e *Arabidopsis* pertencem a uma mesma ordem, Brassicales, e divergiram há 72 milhões de anos, compartilhando assim um ancestral comum, (Wikström et al. 2001). No entanto, a divergência individual dos genes destas espécies pode não refletir a sua estreita relação filogenética, devido a diferentes taxas de evolução do genoma (Tuskan et al. 2006; Yu et al. 2005). A família de genes *MADS-box* evoluiu a partir de um conjunto de genes com ancestrais comuns, por duplicação e, posteriormente, uma diversificação funcional desses genes.

Tabela 2: Genes MADS- Box da Família MIKC selecionados para os testes de expressão por qPCR. Em negritos, os genes analisados nesse trabalho

Genes da Família MIKC (MADS-BOX)	Atual Nomenclatura
emv.TU.supercontig_6.202	cpAP3/TM6-1like
emv.TU.supercontig_6.199	cpAP3/TM6-2like
emv.TU.supercontig_14.222	cpSEPlike1
emv.TU.supercontig_43.78	cpSEPlike3
emv.TU.supercontig_660.1	cpSEPlike4
emv.TU.supercontig_1.162	cpAP1like
emv.TU.supercontig_26.316	cpPllike
emv.TU.supercontig_3.196	cpSEPlike
emv.TU.supercontig_414.3	cpAGL6like
emv.TU.supercontig_50.73	cpSHPlike

Dos resultados obtidos nas primeiras fases das análises, foram encontradas sequências pertencentes aos clados AP3/PI (Figura 8); AP1, AGL6 e SEP 1-4 (Figura 9) e sequências pertencentes ao clado SHP1 (Figura 10). *Arabidopsis thaliana* apresentam dois genes da classe A (AP1 e AP2), dois genes da classe B (PI e AP3) e somente um gene na classe C (AG). Desses genes, somente AP2 não é um gene da família MADS-BOX. Estudos mostram que genes da classe B e C, controlam o desenvolvimento de pétalas, estames e carpelos e são dependentes de outros três genes MADS, SEP 1, SEP 2 e SEP 3 (Colombo, 2008). Uma duplicação do gene ancestral da classe B, antes do surgimento das angiospermas, há 260 milhões de anos, resultou nos parálogos paleoAPÉTALA3 (paleoAP3) e gene da linhagem pistillata (PI) (Purugganan et al 1995;. Kramer et al 1998; Kim et al 2004). Após uma duplicação do gene paleoAP3, na base do núcleo eudicotiledônea, produziu as linhagens euAP3 e TM6 (Kramer et al. 1998). Análises revelaram que os locos de ambas as linhagens euAP3 e TM6 têm um número de genes em comum, indicando assim um ancestral comum. As proteínas da linhagem TM6 compartilham um motivo na região C-terminal com proteínas da linhagem paleoAP3, encontradas nas monocotiledôneas, dicotiledôneas inferiores, e dicotiledôneas. Em proteínas da

linhagem *euAP3*, uma mutação na região de transferência substituiu o motivo da linhagem *paleoAP3* por um novo motivo na região C-terminal, o motivo *euAP3* (Kramer et al 1998; Vandebussche et al 2003). Desta forma, a linhagem *euAP3*, que é exclusiva para as eudicotiledôneas superiores, representa um grupo parálogo divergente (Irlanda, 2006). Os genes da linhagem TM6 se perderam em *Arabidopsis* (Rijkema, Gerats, et al. 2006), mas estudos em Petúnia e Tomate sugerem que os genes da linhagem TM6 têm função predominantemente no desenvolvimento do estame (de Martino et al 2006; Rijkema, Royaert, et al 2006).

Estudos comparativos revelaram uma região sintênica do genoma mamoeiro (*Carica papaya*) com clado da linhagem *euAP3*. No entanto, este segmento do genoma não contém um gene *euAP3*-like. Dois genes da linhagem TM6, que parecem ser o resultado de uma duplicação, foram identificados em mamão (Ackerman et al. 2008), sugerindo que o gene *euAP3* foi completamente perdido de seu genoma.

Análises filogenéticas mostram claramente que esses dois genes de mamoeiro da linhagem AP3 são ortólogos TM6 e são assim nomeados *cpAP3/TM6-1* e *cpAP3/TM6-2* (Figura 8).

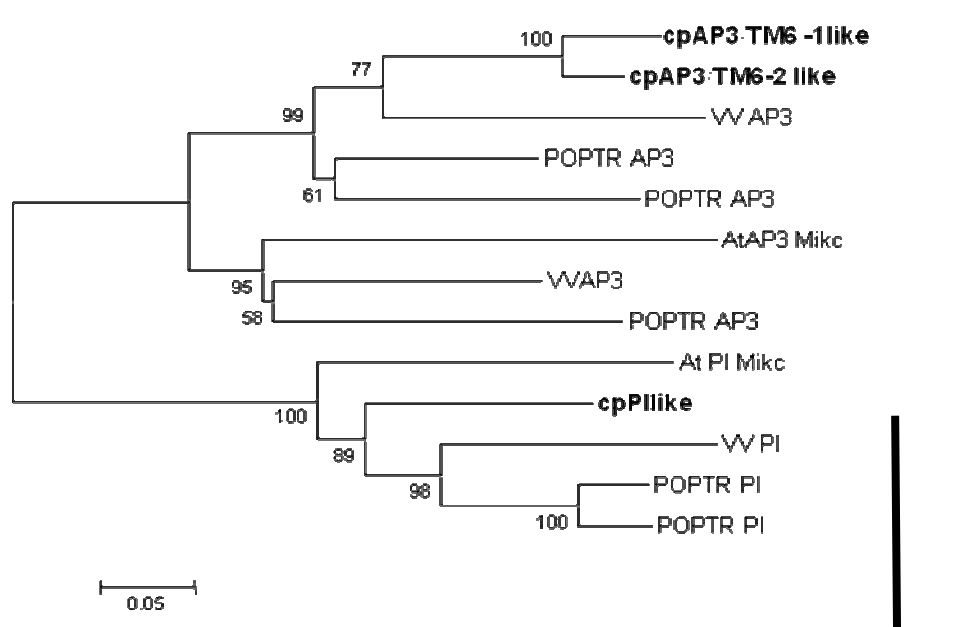


Figura 8. Análise filogenética dos genes AP3 e PI pertencentes à família MIKC^C de *Carica papaya*, *Populus trichocarpa* e *Vitis vinifera* e *Arabidopsis thaliana*.

A origem das linhagens AP3/TM6 pode ser encontrada mesmo antes da divisão Monocotiledôneas-Dicotiledôneas. Curiosamente, o desenvolvimento de pétalas e estames aparentemente pode tolerar a perda tanto de genes da linhagem TM6 quanto de genes da linhagem *euAP3*, mas o gene da linhagem PI em *Arabidopsis* é essencial para a identidade estame (Ackerman et al., 2008). A análise filogenética mostra que o gene PI não sofreu importantes duplicações na espécie *Carica papaya* (Figura 8). Resultado também observado por Ackerman et al. (2008).

AP1, FUL e CAL são membros da subfamília de genes MIKC, AP1/FUL-like, um clado de genes que sofreu inúmeros eventos de duplicação ao longo da história de diversificação das angiospermas (Becker e Theissen, 2003; Preston e Kellogg, 2006; Purugganan et al. 1995; Shan et al. 2007). Uma análise filogenética da família de proteínas APETALA1/FRUITFULL (AP1/FUL) MADS-box (Krogan e Ashton 2000; et al Theissen 2000.), cujos membros foram identificados como reguladores chave do desenvolvimento floral em várias espécies modelos, identificou duplicações e eventos de divergência em sequências, que ocorreram durante a história desta família gênica entre as angiospermas.

O genoma de *Arabidopsis* contém dois genes, *CAULIFLOWER* (*CAL*) e *FRUITFULL* (*FUL*), que são relacionados com *AP1* e que compartilham funções redundantes na especificação do meristema floral (Figura 9). Há poucas informações sobre os membros dos genes da família *AP1/ FUL* nas angiospermas. *CAULIFLOWER* (*CAL*) parece ser o resultado de uma duplicação específica para *Brassicaceae* (Purugganan 1997; Purugganan e Sudditti 1998) (Figura 8). *FRUITFULL* (*Ful-Like*) são difundidos em todas as angiospermas, mas o seu papel nas outras espécies ainda não é bem definido. Análises sugerem que *AP1* e *FUL* são genes semelhantes, mas pertencentes a clados distintos, resultado de um evento de duplicação que ocorreu em algum momento após a divergência da linhagem monocotiledônea (Hasebe e Banks, 1997). Os clados *AP1* e *FUL* foram incluídos em uma única família de genes, geralmente nomeada como família *AP1* ou *SQUA* (Theissen, 2000), que foram posteriormente agrupados na família de genes *SÉPALATA* (Buchner e Boutin, 1998) (Figura 9).

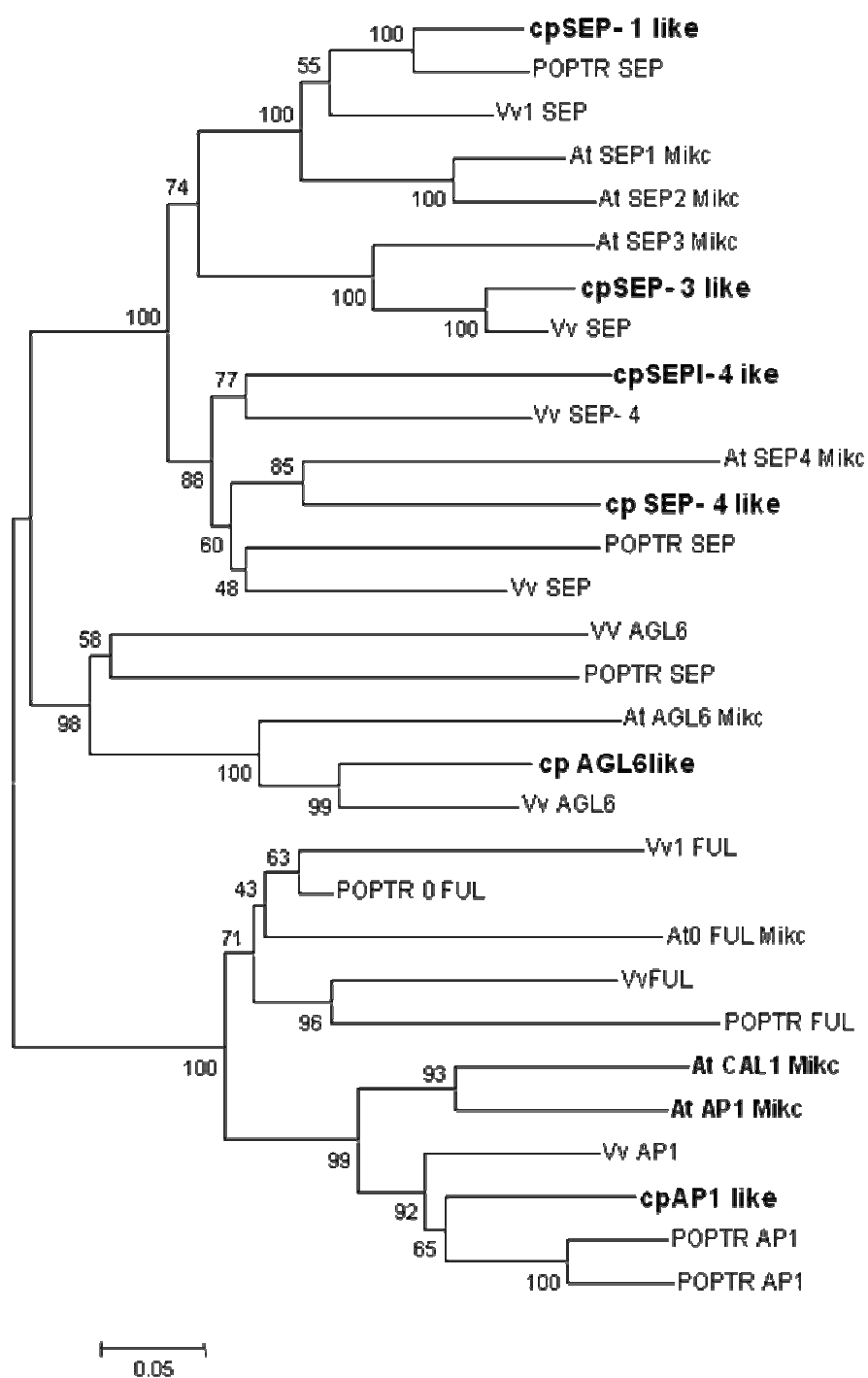


Figura 9. Análises filogenéticas dos genes AP1 , SEP e AGL 6 da família MIKC de *Carica papaya* (cp), *Populus trichocarpa* (POPTR) e *Vitis vinifera* (Vv) e *Arabidopsis thaliana* (At).

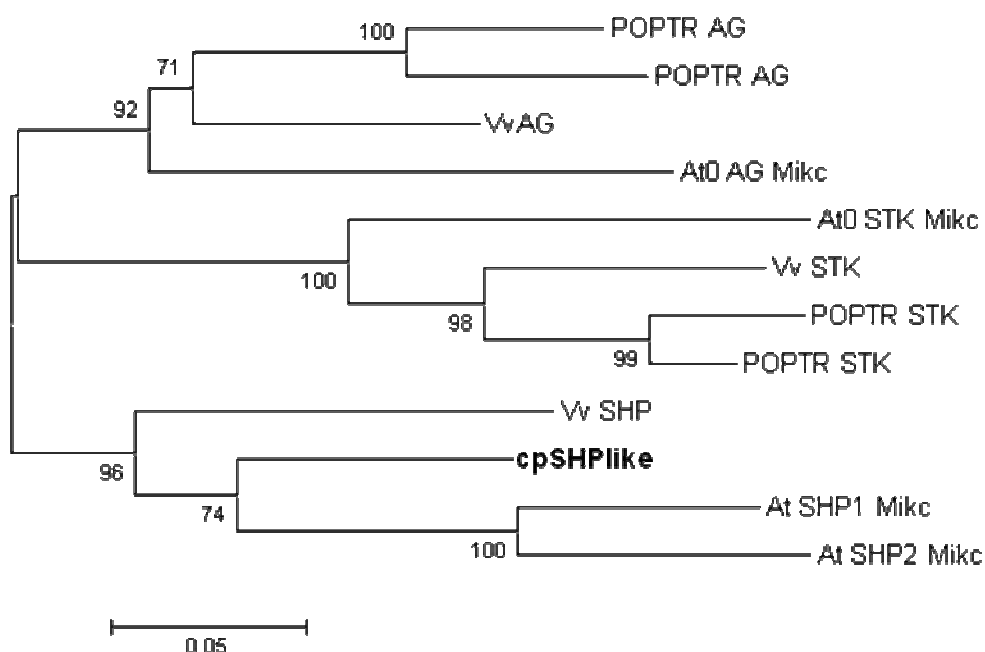


Figura 10. Análises filogenéticas dos genes SHP, STK e AG da família MIKC de *Carica papaya* (*cp*), *Populus trichocarpa* (*POPTR*), *Vitis vinifera* (*Vv*) e *Arabidopsis thaliana* (*At*).

Agamous (*AG*), que regula o desenvolvimento dos órgãos sexuais nas plantas, exibe redundâncias na duplicação de genes funcionais (Kramer et al.2004; Moore et al.2005; Pinyopich et al. 2003), o que torna complicado definir as relações ortólogas ou parálogas entre genes dentro dessa subfamília. Em *Arabidopsis*, a subfamília *AG* é composta por *AG*, *SHP1*, *SHP2* e *STK*. *AG*, *SHP1* e *SHP2* pertencem ao grupo C, enquanto *STK* é um membro da linhagem D (Kramer et al.2004; Pinyopich et al. 2003). Um evento antigo de duplicação deu origem às linhagens C e D, mas *SHP1* e *SHP2* são derivados de um evento de uma duplicação recente, há 26 milhões de anos (Kramer et al.2004; Moore et al.2005; Pinyopich et al. 2003), muito tempo depois da divergência do mamão e *Arabidopsis* de um ancestral comum (Figura 10). Uma recente duplicação no genoma de *Arabidopsis* ocorreu há 24-48 milhões de anos (Bowers et al. 2003), e *SHP1* e *SHP2* foram encontrados nestes segmentos duplicados (Moore et al. 2005). A principal função do *SHP1* e *SHP2* é promover a deiscência dos frutos e quebra de dormência da semente (Lijegren et al.2000), um papel no desenvolvimento que pode ter evoluído muito recentemente, em associação com o tipo de frutas da família *Brassicaceae*.

5.3. Avaliação dos genes MADS-BOX

5.3.1. Extração de RNA total

A integridade do RNA total extraído foi conferida por eletroforese em gel de agarose 1% com coloração em brometo de etídio. A presença das bandas dos RNAs ribossômicos intactos e claramente visíveis mostra que o RNA extraído não estava degradado (Figuras 11 e 12).

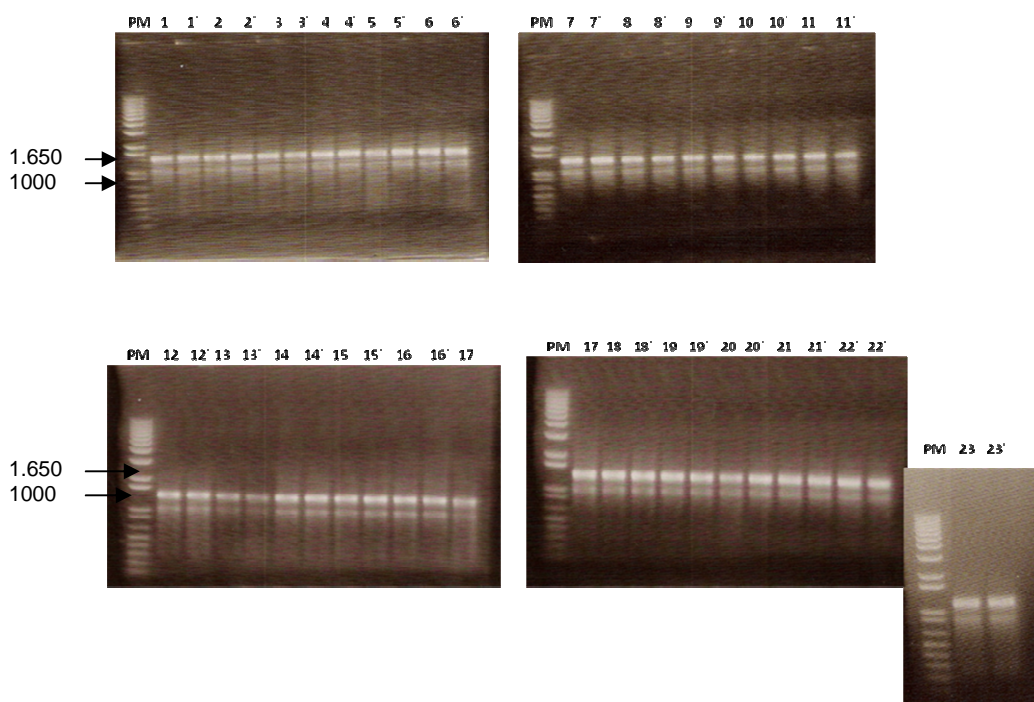


Figura 11 Perfil eletroforético de 1 μ g de RNAtotal de diversos órgãos florais em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e peso molecular 1kb. 1: Pétalas com Reversão 6 mm; 2: Pétalas sem Reversão 6 mm; 3: Pétalas com Reversão 8 mm; 4: Pétalas com Reversão 10 mm; 5: Pétalas sem Reversão 10 mm; 6: Botão floral 1 mm a 3 mm; 7: Botão floral 4 mm; 8: Pontos Meristemáticos; 9: Sépalas com Reversão 6 mm; 10: Sépalas sem Reversão 6 mm, 11: Sépalas com Reversão; 8 mm 12: Sépalas com Reversão 10 mm; 13: Sépalas sem Reversão 10 mm; 14: Estames com Reversão 6 mm 15: Estames sem Reversão 6 mm; 16: Estames com Reversão 8 mm; 17: Estames com Reversão 10 mm; 18: Estames sem Reversão 10 mm; 19: Carpelo com Reversão 6 mm; 20: Carpelo sem Reversão 6 mm; 21: Carpelo com Reversão 8 mm; 22: Carpelo com Reversão 10 mm; 23: Carpelo sem Reversão 10 mm; PM: 1Kb plus DNA LadderTM (Invitrogen®).

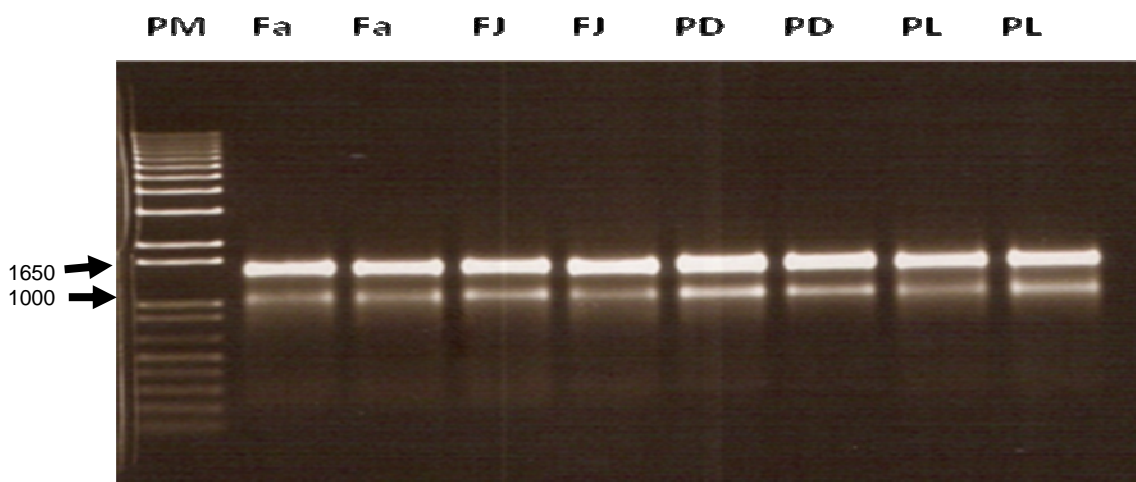


Figura 12 Perfil eletroforético de 1 μ g de RNAtotal de órgãos vegetativos em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e peso molecular 1kb. **Legenda:** Fa: Folha Adulta; FJ: Folha Jovem; PD: Pedúnculo; PL: Plântulas; PM: 1Kb plus DNA LadderTM (Invitrogen®).

A presença de DNA contaminante foi descartada com o tratamento de DNase. As quantificações do RNA total, extraído dos diferentes órgãos florais e vegetais após o tratamento com DNase no *Nanodrop*, estão especificadas nos Quadros 2 e 3.

Quadro 2 Leitura das amostras de RNA após o tratamento com DNase no NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific), com as leituras das absorvâncias na faixa 260-280 nm e 260-320 nm. Cada amostra segue com a quantificação da sua duplicata

Amostras	[ng/ μ L]	260/280	260/320
1	75,6	2,01	1,14
1`	76,4	2,04	2,47
2	75,0	2,03	2,53
2`	83,7	2,04	1,44
3	77,5	2,03	1,01
3`	68,0	2,00	2,36
4	76,1	2,03	0,96
4`	72,8	1,99	0,75
5	72,2	2,24	3,02
5`	76,6	2,04	0,84
6	77,2	2,02	1,25
6`	78,7	2,04	0,74
7	78,5	2,00	2,48
7`	70,3	2,00	1,27
8	75,3	2,00	2,56
8`	81,6	2,03	1,00
9	70,1	2,00	2,19
9`	74,4	2,10	2,7
10	67,5	2,01	0,94
10`	76,8	2,03	2,31
11	73,1	2,00	2,49
11`	76,7	2,04	1,71
12	73,9	2,02	2,07
12`	74,4	2,03	1,49
13	41,4	1,94	0,83
13`	44,2	1,93	0,85
14	80,3	2,00	1,39
14`	70,2	2,02	1,70
15	78,8	1,97	2,12
15`	110,5	2,04	1,99
16	128,3	2,06	1,12
16`	105,3	2,04	1,11
17	88,7	2,24	0,97
17`	122,7	2,04	1,24
18	84,1	2,01	1,48
18`	130,4	2,06	1,97
19	82,2	2,02	1,16
19`	83,7	2,02	1,22
20	81,4	2,01	1,09
20`	88,7	2,05	0,74
21	83,6	2,03	1,23
21`	79,2	2,03	0,80
22	82,0	2,04	1,18
22`	82,4	2,04	2,11
23	79,8	2,01	1,28
23`	84,8	2,03	1,02

Legenda 1: Pétalas com Reversão 6 mm; 2: Pétalas sem Reversão 6 mm; 3: Pétalas com Reversão 8 mm; 4: Pétalas com Reversão 10 mm; 5: Pétalas sem Reversão 10 mm; 6: Botão floral 1 mm a 3 mm; 7: Botão floral 4 mm; 8: Pontos Meristemáticos; 9: Sépalas com Reversão 6 mm; 10: Sépalas sem Reversão 6 mm, 11: Sépalas com Reversão; 8 mm 12: Sépalas com Reversão 10 mm; 13: Sépalas sem Reversão 10 mm; 14: Estames com Reversão 6 mm 15: Estames sem Reversão 6 mm; 16: Estames com Reversão 8 mm; 17: Estames com Reversão 10 mm; 18: Estames sem Reversão 10 mm; 19: Carpelo com Reversão 6 mm; 20: Carpelo sem Reversão 6 mm; 21: Carpelo com Reversão 8 mm; 22: Carpelo com Reversão 10 mm; 23: Carpelo sem Reversão 10 mm.

Quadro 3. Leitura das amostras de RNA após o tratamento com DNase no NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific), com as leituras das absorvâncias na faixa 260-280 nm e 260-320 nm. Cada amostra segue com a quantificação da sua duplicata

Amostras	[ng/ μ L	260/280	260/320
Fam	80,8	2,13	0,99
Fan`	77,5	2,13	1,94
FJp	79,2	2,13	1,82
FJq	78,8	2,12	2,21
PDr	85,1	2,13	1,13
PDt	82,8	2,13	1,76
PLv	75,9	2.15	1,98
PLs	67,1	2.12	1,78

Legenda Fam e FAn: Folha Adulta; FJp e FJq: Folha Jovem; PDr e PDt: Pedúnculo; PLv e PLs: Plântulas.

5.3.2 Análises dos Genes de Referência para *Carica papaya*

A normalização dos dados obtidos com a análise de qPCR requer genes que se apresentam transcritos com expressão uniforme na maioria das células dos organismos ou entre as espécies que estão sendo analisadas, assim como durante várias fases do desenvolvimento e sob diferentes condições ambientais. Esses genes são usualmente denominados genes constitutivos ou “*Housekeeping Genes*”. Diversos trabalhos têm constatado que genes utilizados na era pré-genômica não apresentam expressão estável entre tecidos e genótipos, e, por esse motivo, não são adequados como controles a métodos mais sensíveis como a qPCR (Thellin et al., 1999, Suzuki et al., 2000, Lee et al., 2002, Czechowski et al., 2005).

Para a avaliação dos potenciais genes de referência, selecionou-se um gene notoriamente constitutivo e normalmente usado como referências em experimentos de qPCR *Carica papaya*: ACTINA (Czechowski et al., 2005). Além desse, foram selecionados mais quatro possíveis novos genes constitutivos em *C.papaya*, potenciais ortólogos, aqueles descritos como constitutivos para *Arabidopsis* (Czechowski et al., 2005), com vistas a confirmar o caráter invariável de suas expressões. As sequências dos homólogos para mamoeiro foram identificadas por meio da ferramenta Blastn no banco de sequências de papaya no *Phytozome* e apenas as sequências que apresentaram alta similaridade (E-value $1 e^{-75}$) foram incluídas na lista final (Tabela 3).

Tabela 3 Possíveis homólogos de gene de referência em mamoeiro, identificados por meio da ferramenta Blastn no *Phytozome* (E-value 1×10^{-75})

Gene de Referência	Sequências Oligonucleotídeos
Cap_hlog_4g34270	5` GGAAGATTGCAGGGAACAAA3` 5` CAGCAGCTGGGCATTACTCT 3`
Cap_hlog_4g33380	5` TTTGGATGCCTTCCGATATG 3` 5` CATCTGACAGCAGCACCATC 3`
Cap_hlog_1g13320	5` GGAGCCTACCAGAACGGACT 3` 5` TCCCTGCTGCTGCTATTCTT 3`
Cap_hlog_2g32170	5` CGCTGGAGATCTCTTGCCTA 3` 5` GCCAATGCTTTGAGAGTGGT 3`
Cap_hlog_actin	5` GCAATCCAGGCCGTTCTCTC 3` 5` CATCACCAGAGTCCAGCACA 3`

Os perfis de expressão gênica dos cinco genes candidatos a genes de referência em mamão foram avaliados por qPCR em um conjunto de 27 diferentes amostras de tecidos. Os cDNAs obtidos, a partir de 1µg de RNA total de órgãos vegetativos (folha adulta, pedúnculo, e de órgãos florais pétala, sépala, carpelo e estames citados pela presença e ausência de reversão), foram utilizados para analisar a estabilidade de expressão dos cinco genes constitutivos selecionados por qPCR. Os resultados foram submetidos a dois diferentes programas que classificam os melhores genes constitutivos, o *geNorm* (Vandesompele, et al., 2002) e o *NormFinder* (Andersen et al., 2004).

Para o experimento com amostras de tecido de mamoeiro foi estimado o número ideal de genes considerando o ponto de corte 0,15. Segundo Vandesompele e colaboradores (2002), este é o ponto de corte onde a inclusão de um gene adicional nas análises não tem efeito significativo na variação par a par.

Quando os tecidos dos diferentes órgãos da planta foram analisados juntos, o programa *geNorm* indicou como genes mais estáveis ACT e o A320 e que apresentam os menores valores de (M) (Figura 13). A alta estabilidade de um gene indica que ele pode ser usado unicamente como controle interno apropriado. Contudo, atualmente é recomendada à utilização de dois ou mais genes estáveis como controles internos para a normalização. Calculou-se a variação par a par para determinar o número ótimo de genes controle interno para normalização desse experimento e verificou-se que são necessários os 2 genes supracitados para obter uma avaliação mais adequada da expressão de um determinado gene nos diferentes tecidos (Figura 14).

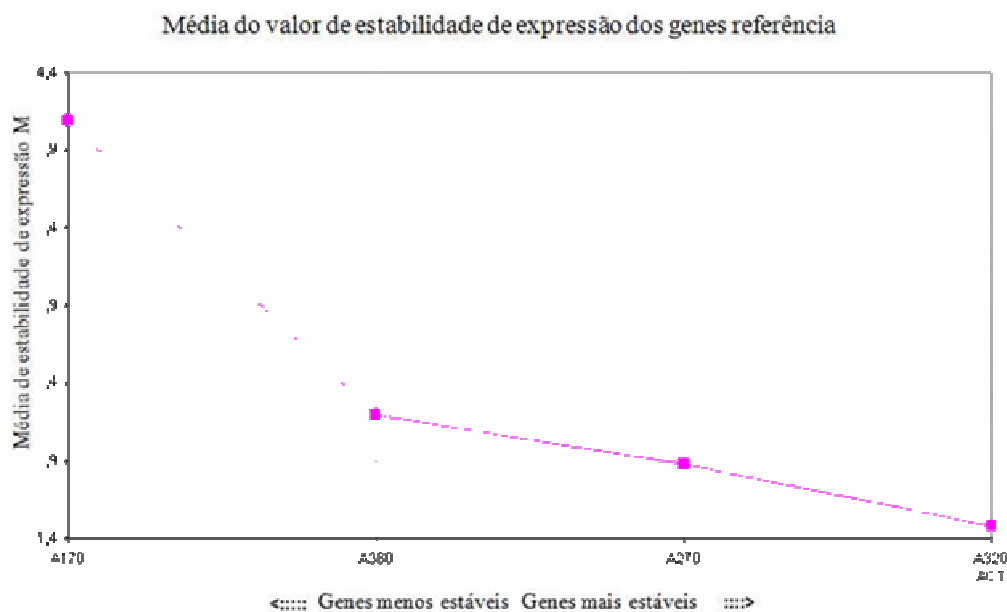


Figura 13. Classificação da estabilidade de expressão dos genes de referência para diferentes órgãos florais e vegetativos de mamão gerado pelo algoritmo *geNorm*. No eixo y, está o valor de estabilidade M e no eixo x, estão representados os genes testados ordenados do menos estável para o mais estável.

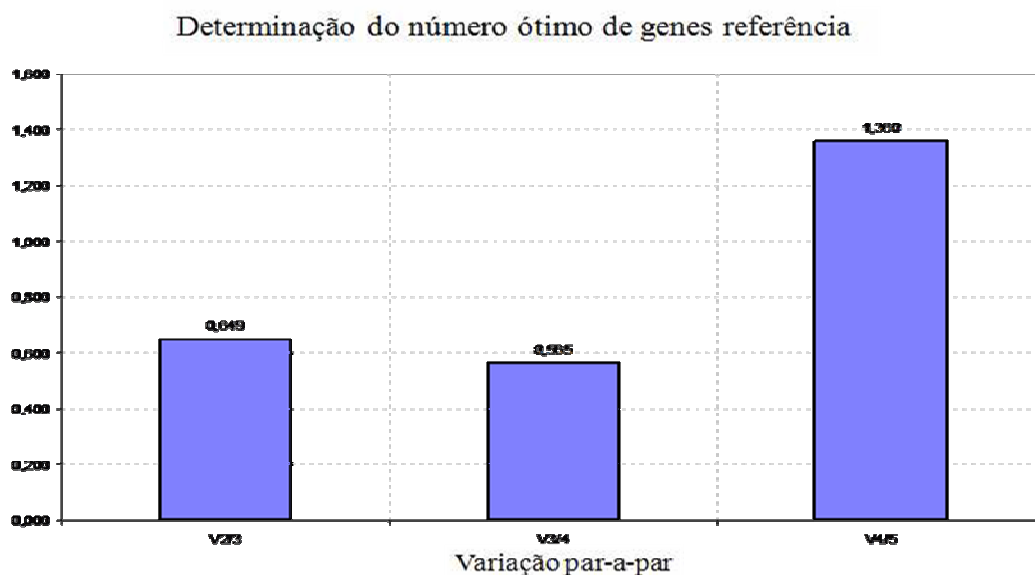


Figura 14. Cálculo da variação par a par dos genes constitutivos ($V_n/n+1$) para determinar o número ótimo de genes referência para ser utilizado em análises em órgãos florais e vegetativos de mamão, levando em consideração o ponto de corte 0,15. No eixo y, estão os valores calculados para a variação par a par entre os genes testados e no eixo x, estão representados os pares de genes, sendo que V2/3 representam dois a três genes; V3/4 representam três a quatro genes e assim sucessivamente. Dados gerados pelo algoritmo *geNorm*.

O NormFinder indicou que a combinação de A270 e o A380 apresenta o melhor valor de estabilidade intra e intergrupos, isto é, a menor variação, e estes genes também apresentam os menores valores de estabilidade entre os cinco genes testados, o que indica que são mais estáveis (Figura 15).

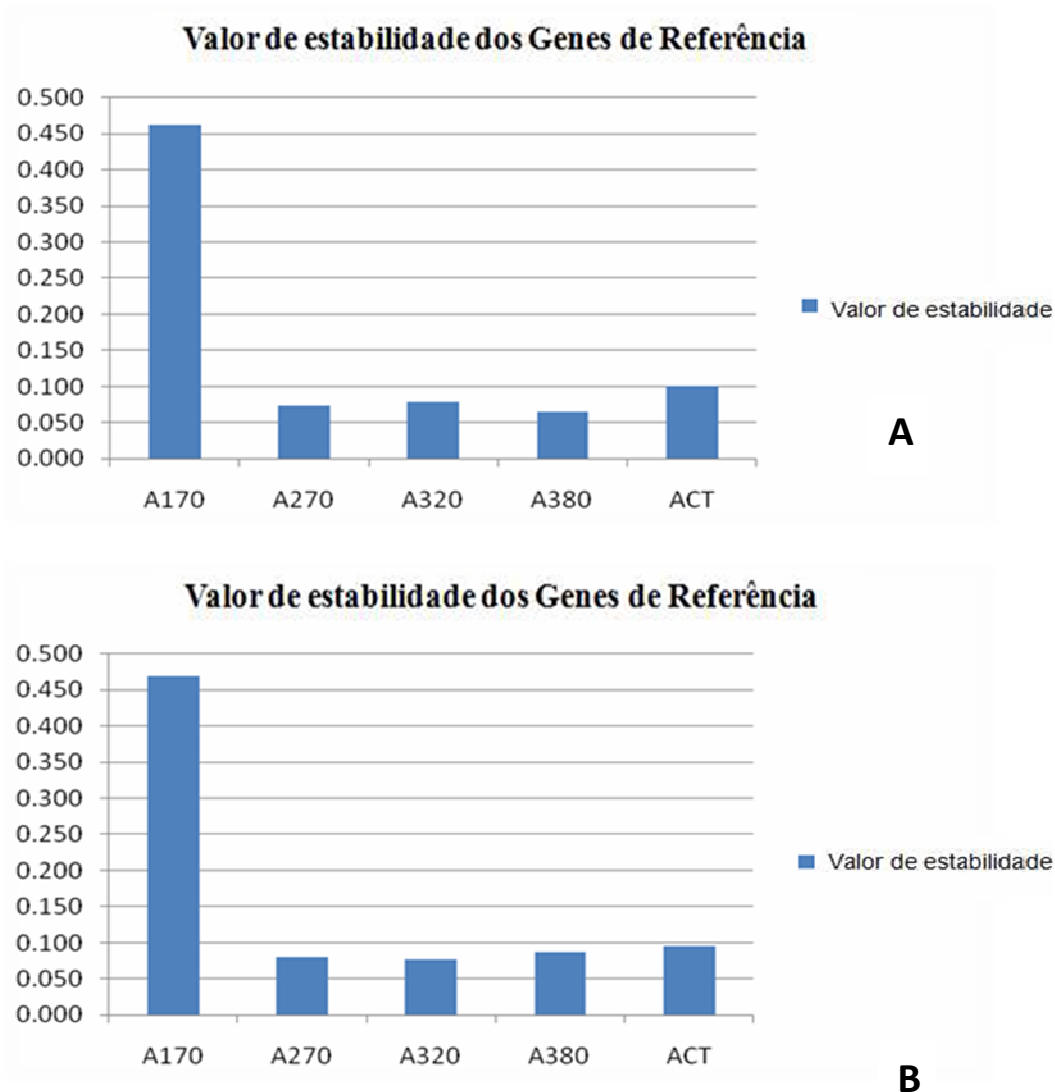


Figura 15. Classificação da estabilidade de expressão dos genes de referência para diferentes órgãos florais e vegetais de mamão gerado pelo algoritmo *NormFinder*. No eixo y, estão as médias da variação de expressão de um gene com os demais. No eixo x, estão representados os genes testados. O teste estatístico A mostrou que a combinação de A270 e A380 representa os genes com a menor variação intra e intergrupos e, portanto, a combinação de genes mais estáveis. O teste estatístico B mostrou a combinação A270 e A320 como à combinação de genes mais estáveis.

Foi eleito o *NormFinder* como o método preferencial para a seleção dos melhores genes referências, uma vez que ele considera as variações intra e intergrupo para o fator de normalização (NF). No entanto, *geNorm* também foi importante para compor o conjunto final de genes de referências para as condições experimentais testadas neste trabalho. *NormFinder* identificou como melhor combinação de genes; A270, A380 e A270, A320. Dentre as duas análises estatísticas, foi escolhido como gene para a normalização da expressão a combinação A270 que aparece nos dois testes e o gene A380 que, apesar da pouca diferença para o gene A320, apresentou menor variação intra e intergrupos no teste A (Figura 15).

5.3.3. Análise da expressão dos possíveis genes específicos de órgãos florais por qPCR

Em angiospermas, genes de ambas as linhagens, AP3 e PI, são necessários para uma função plena da classe B. Por exemplo, em *Arabidopsis*, a perda das funções dos genes da linhagem AP3 ou PI, resulta em mudanças homeóticas de órgãos florais, incluindo a perda da identidade estame (Jack et al 1992;. Goto e Meyerowitz 1994). Do mesmo modo, alelos nulos dos genes do DEFICIENS Antirrhinum (DEF; linhagem AP3) ou globosa (GLO; linhagem PI) caracterizam-se pela conversão dos estames para as estruturas do sexo feminino (Sommer et al, 1990; Trobner et al 1992).

Para uma análise de expressão detalhada por qPCR, selecionaram-se oito possíveis genes específicos no desenvolvimento floral, mas no presente trabalho avaliou-se inicialmente a expressão de dois genes, o homólogo *Pistilata* (*CpPllike* ou *PI*) e o homólogo *AP3* (*CpAP3like* ou *TM6*). Os iniciadores desenhados para as sequências selecionadas tiveram suas especificidades de amplificação avaliadas diretamente por qPCR utilizando-se cDNAs de *C.papaya*.

Para os genes específicos de flor, foram analisados os perfis de expressão gênica em três formas diferentes: órgãos vegetativos (folha e pedúnculo); órgão com diferentes estádios de desenvolvimento (ponto meristemáticos, *pool* de botões de 4mm de tamanho e um *pool* de botões entre 1mm e 3mm) e, por último, órgãos florais (sépalas, pétalas, carpelos e estames) com a presença e a ausência de reversão sexual. A predição na identificação dos transcritos órgão-específico é feita pela comparação do conjunto de dados de cada experimento das plantas com a presença da reversão sexual em relação às plantas normais, ou seja, sem a reversão sexual.

Os cDNAs para as análises dos genes específicos de flor foram produzidos a partir dos mesmos RNAs utilizados na análise dos genes de referência em

diferentes órgãos da planta e em órgãos florais. Duas replicatas biológicas, para cada amostra, foram usadas para análise por Real-Time PCR e três replicatas técnicas foram analisadas para cada replicata biológica.

A primeira análise de expressão dos genes cpAP3/TM6-1 e cpPI (Figura 16) foi feita entre carpelos que não apresentaram a reversão sexual, ou seja, carpelos com o desenvolvimento normal e carpelos que apresentaram a reversão sexual. As análises foram feitas em botões de 6mm e 10mm de comprimento. Pode-se observar que os dois genes MADS-BOX, cpAP3/TM6-1(homólogo AP3) e cpPIlike (*Carica papaya Pistilata*), tiveram uma expressão relativa mais alta em carpelos com a presença de reversão do que nos carpelos que não apresentam a reversão sexual, para ambos os tamanhos (6 mm e 10 mm) e genes. O gene cpPI demonstrou um valor de expressão relativo bem maior, quando comparado com a expressão do gene cpAP3/TM6-1 para carpelos.

Na Figura 17, pode-se observar que a expressão relativa dos dois genes, *Carica papaya Pistilata* (cpPI) e cpAP3/TM6-1(homólogo AP3), nos estames de botões florais de 6mm com a presença de reversão, apresenta um maior valor, quando comparado com estames sem a presença da reversão para ambos os tamanhos. Mas, pode-se observar que quando se comparou estames de 10mm a expressão relativa dos genes MADS-BOX mudou; os estames sem a presença da reversão apresentam uma expressão relativa dos dois genes mais alta do que nos estames com a presença de reversão.

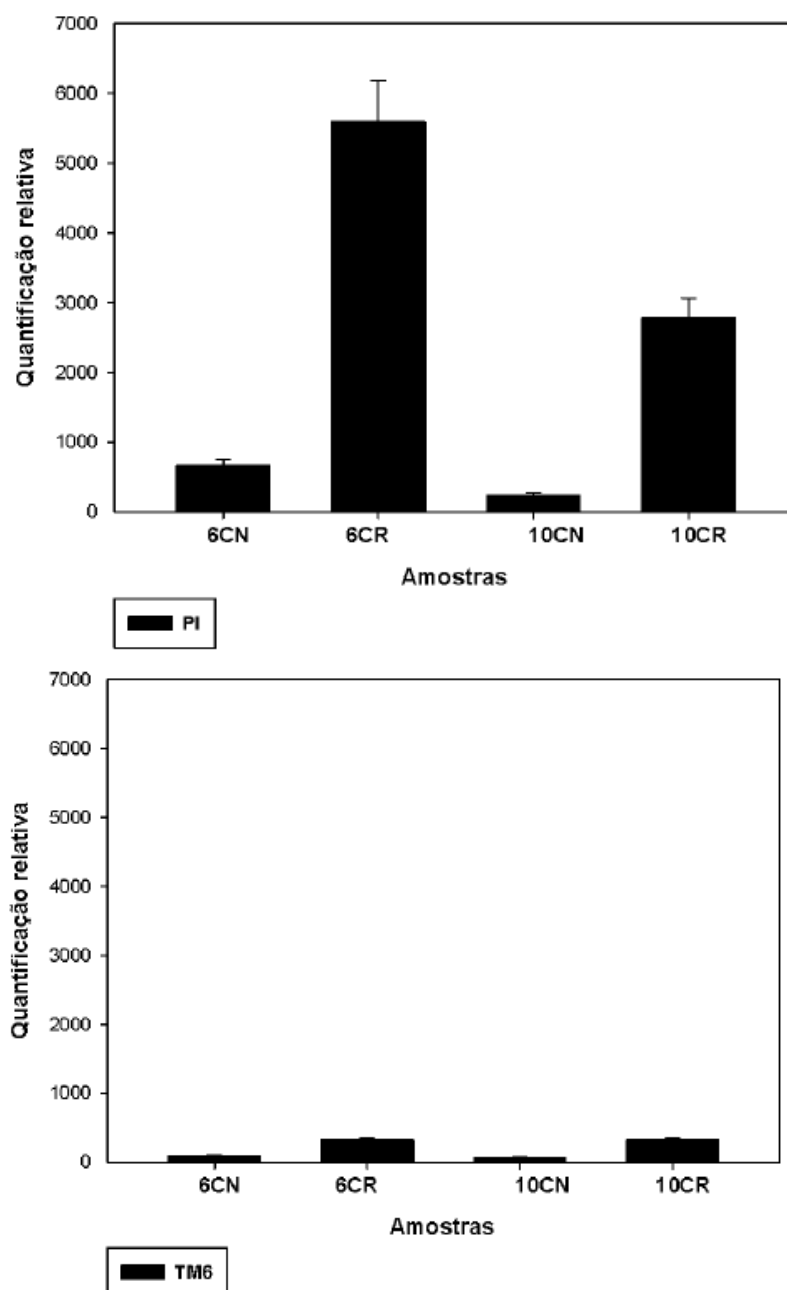


Figura 16. Análise da expressão dos genes, PI e TM6, específicos de flor por qPCR. O gráfico apresenta no eixo x, dados de expressão do carpelo normal 6 mm (6CN), carpelo com reversão 6 mm (6CR), carpelo normal 10 mm (10CN) e carpelo com reversão 10 mm (10CR). No eixo y, está representada a expressão relativa dos genes MADS-BOX específicos de flor para *Carica papaya*, cpPI e cpAP3/TM6-1, representado no gráfico por PI e TM6 .

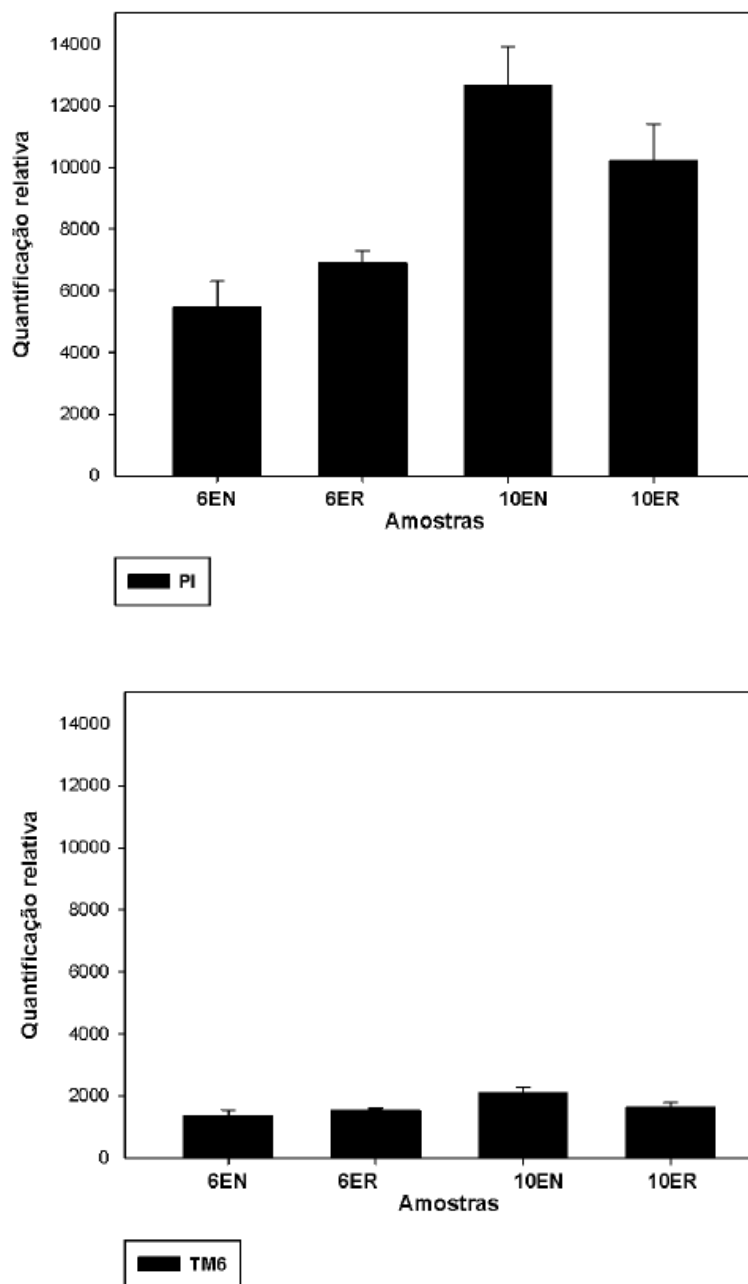


Figura 17. Análise da expressão dos genes específicos de flor, PI e TM6 por qPCR. O gráfico apresenta no eixo x, dados de expressão do estame normal 6 mm (6EN), estame com reversão 6 mm (6ER), estame normal 10 mm (10EN), estame com reversão 10 mm (10ER). No eixo y, está representada a expressão relativa genes MADS- BOX específicos de flor para *Carica papaya*, cpPI e cpAP3/TM6-1, representado no gráfico por PI e TM6.

Ao avaliar a expressão relativa em pétalas, observou-se que para ambos os tamanhos (6 mm e 10 mm) as pétalas com a presença de reversão apresentaram uma expressão relativa maior, quando comparados com pétalas sem a presença da reversão sexual, para os dois genes específicos, cpPI e cpAP3/TM6-1 (Figura 17). A figura 18 mostra a análise de expressão em sépalas. Ambos os genes, cpPI e cpAP3/TM6-1, foram expressos nesse tecido. Sépalas de botões florais com 6mm normais apresentaram uma maior expressão do que sépalas de 6mm de botões florais com a presença de reversão, o mesmo resultado foi observado para os botões de 10mm para ambos os genes.

As funções desempenhadas pelos genes responsáveis na especificação dos órgãos florais já foram bem caracterizadas em plantas modelos como *Arabidopsis*. Contudo, ainda não está claro de que maneira estes fatores transcricionais participam do processo de formação dos tecidos florais através da organogênese. Não se sabe se há redundâncias funcionais, *feedback* regulatórios, interações sinérgicas ou interdependências funcionais entre os fatores. Uma das questões que permanece sem resposta está relacionada ao fenômeno da reversão sexual que ocorre nas flores hermafroditas do mamoeiro, pois ainda não são conhecidos os genes que atuam nas vias secundárias aos fatores transcricionais das classes B (AP3/PI) e C (AG) de identidade dos órgãos florais. Desta forma, estes fatores transcricionais podem ser diretamente ou indiretamente responsáveis pela ativação de muitos genes envolvidos na morfogênese do carpelo. Além disso, é desconhecido se eles controlam a expressão de outros reguladores transcricionais ou se afetariam os níveis transcricionais dos genes que codificam proteínas estruturais, exigidas para a diferenciação celular. Muitos dos genes identificados podem ser prováveis componentes das vias regulatórias envolvidas no desenvolvimento dos órgãos florais. Alguns destes genes codificam proteínas com pressupostas funções regulatórias, muitas das quais ainda não foram caracterizadas (Wellmer et al., 2004).

Ambos os genes *cpPIlike* (PI) e o *cpAP3like* (TM6), utilizados nesse experimento são genes da classe B família MADS-BOX. O padrão de expressão do gene cpAP3/TM6-1 foi abundante em estames e pétalas, dados semelhantes aos padrões de expressão observados em *Arabidopsis* (Figura 16 e 17). Não foi observada uma diferença significativa de expressão desse gene nas pétalas e nos estames, com relação à presença ou ausência da reversão e também com

relação ao tamanho. As figuras 15 e 18 mostram uma divergência do padrão de expressão dos genes da classe B. Comparando com os padrões de expressão observados em *Arabidopsis*; foi detectada a expressão do gene *cpAP3/TM6-1* em carpelos e sépalas. O gene *cpAP3/TM6-1* apresentou uma maior expressão em carpelos (Quarto verticilo floral) com a presença da reversão comparada com carpelos normais, em ambos tamanhos (6 mm e 10 mm). Esse padrão de expressão divergente reforça a idéia da ausência do gene TM6 no genoma de *Arabidopsis* como já reportado por Arckerman et al. (2008). Outra divergência na expressão da classe B que a literatura reporta é o cpTM6-2 ortólogo, altamente expresso em folhas, ao contrário do gene *cpAP3/TM6-1* que não apresentou expressão nos órgãos vegetativos, folha na fase adulta e pedúnculo (Figura 19). Os padrões descritos na literatura do gene cpTM6-2 ortólogo e os padrões de expressão do gene *cpAP3/TM6-1* apresentados nesse trabalho, sugerem que o gene TM6 é um gene funcional da classe B. Resultados similares aos obtidos nos trabalhos com Tomate e Petúnia (De Martino et al. 2006 e Rijpkema et al.2006). Em espécies contendo ambos os genes parálogos, euAP3 e TM6, suas funções parecem ter divergido e são parcialmente redundantes. A função do gene TM6 com o gene da classe B é no primeiro verticilo, enquanto funções do gene euAP3 aparecem no segundo e terceiro verticilo floral.

Em mamoeiro, ambos os genes, *cpAP3/TM6-1* e *cpTM6-2*, são expressos em pétalas e estames, mas com algumas diferenças marcantes como: o gene *cpAP3/TM6-1* aparece também em sépalas e carpelos, ou seja, no primeiro e no quarto verticilo floral e o gene *cpTM6-2* tem uma forte expressão em folhas (Ackerman et al. 2008). Esses resultados diferem dos observados nos genes da classe B caracterizados em *Arabidopsis*. O gene *cpTM6-2* foi caracterizado por Ackerman (2008) e o gene *cpAP3/TM6-1* foi um dos genes analisados nesse trabalho. A forte expressão do gene *cpAP3/TM6-1* em pétalas contrasta com os resultados para TM6 ortólogo observados em tomate e petúnia (De Martino et al.2006 e Rijpkema et al. 2006). No entanto, esse padrão de expressão para o gene *cpAP3/TM6-1* nas pétalas é o mesmo observado em maçã (Kitahara et al. 2004).

O domínio C-terminal do gene *cpTM6-2* é exatamente o mesmo do gene TM6 em Petúnia e Tomate. No entanto, *cpTM6-2* não é expresso no quarto verticilo floral de mamoeiro, como apresenta na petúnia e no tomate. Esse fato

sugere que a subfuncionalização dos genes da classe B varia entre as espécies, particularmente naquelas espécies que não possuem um parálogo da sublinhagem euAP3 no seu genoma, como o mamoeiro. Lamb e Irish (2003) reportam que o motivo C-terminal em euAP3 e *paleoAP3* é essencial para a especificidade funcional da proteína AP3 e que cada um desses motivos foi suficiente para conferir funções distintas ao gene AP3. De Martino et al. (2006) e Rijpkema et al. (2006) fornecem maiores evidências que o ortólogo que possui somente o motivo *paleoAP3* é funcionalmente divergente dos ortólogos contendo somente motivo euAP3 ou ambos *paleoAP3* e euAP3.

O alinhamento dos aminoácidos entre cpPI e PI revelou uma identidade relativa alta (60%). O padrão de expressão do gene PI em mamoeiro sofreu divergências comparado com o padrão de expressão de *Arabidopsis*, pois foi detectado um nível de expressão desse gene em carpelos e sépalas. Observou-se que carpelos com reversão apresentaram uma expressão relativa maior, quando comparados com carpelos de flores normais para ambos os tamanhos, 6 mm e 10 mm, diferente dos observados em *Arabidopsis* (Figuras 15 e 18). Observou-se também que não ocorreu expressão relativa desse gene em órgãos vegetativos como folhas adultas e pedúnculo (Figura 19), previamente discutidos em *Arabidopsis*.

Não há relatos na literatura sobre a expressão relativa dos genes PI no quarto verticilo floral do mamoeiro, mas a figura 15 mostra que houve uma forte expressão do gene cpPIlike nesse tecido, sugerindo uma divergência desse gene na flor do genótipo híbrido usado neste trabalho. A expressão do gene cpPI já foi descrita em sépalas de flores masculinas de mamoeiro (Ackerman et al. 2008) e, na Figura 18, pode-se observar uma forte expressão em sépalas em flores hermafroditas. As sépalas de flores com a presença da reversão apresentaram uma maior expressão do gene cpPIlike, comparado com as sépalas de flores normais, para ambos os tamanhos. Esse resultado sugere que cpAP3/TM6-1 tem padrão de expressão similar aos de outros genes no mesmo clado.

Foi detectado um baixo nível de expressão relativa de ambos os genes (cpPI e cpAP3/TM6-1) em amostras do meristema primordial. Os órgãos florais nessa fase da planta ainda estão sendo formados; assim, pode-se sugerir uma resposta ao baixíssimo nível de expressão detectado nesses dois genes. Os resultados de PCR em tempo real, também mostraram que o cpAP3/TM6-1 e cpPIlike têm um padrão mais amplo de expressão tecidual que o relatado para o

PI de *Arabidopsis*, considerando que a expressão de PI foi alta no ovários e não obteve expressão nos órgãos vegetativos, folha adulta e pedúnculo. Em *Arabidopsis*, o gene PI é expresso em pétalas e estames e não apresenta expressão nos outros órgãos florais (Goto e Meyerowitz 1994).

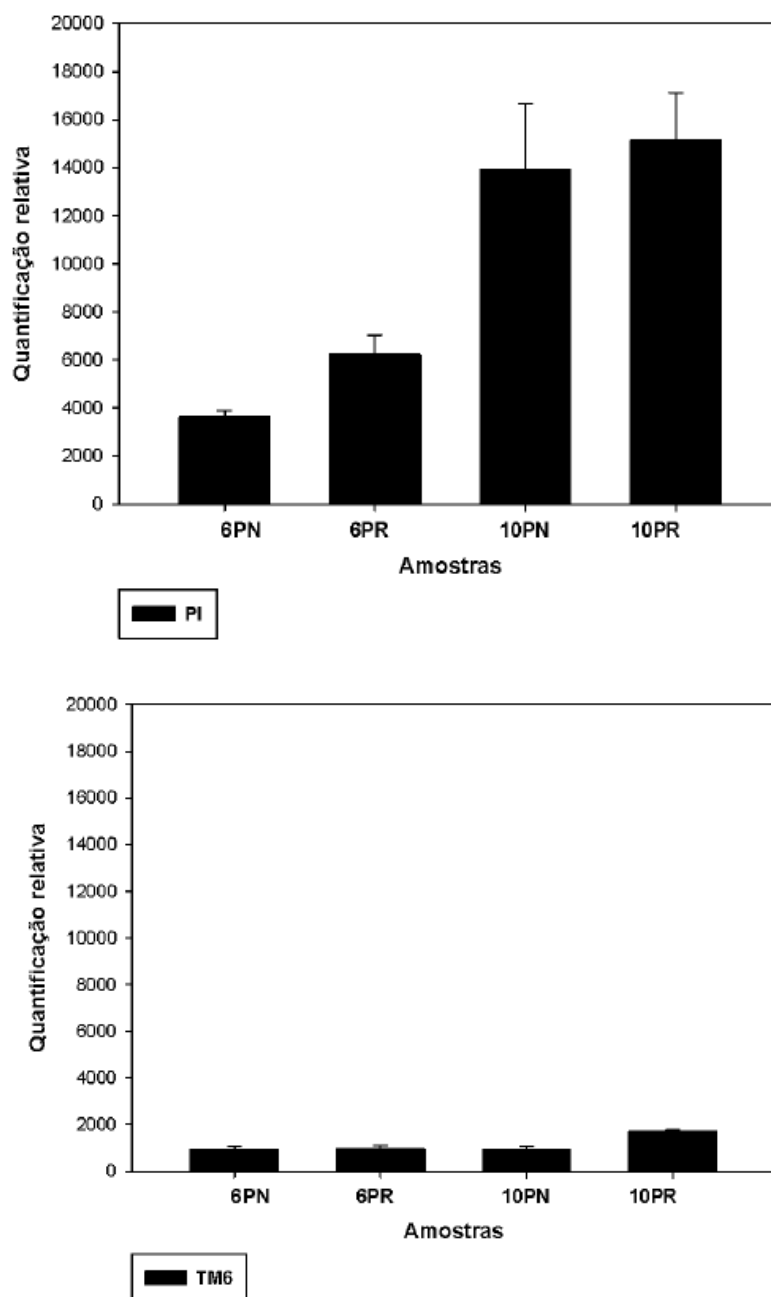


Figura 18. Análise da expressão dos genes específicos de flor por qPCR. O gráfico apresenta no eixo x, dados de expressão da pétala normal 6 mm (6PN), pétala com reversão de 6 mm (6PR), pétala normal 10 mm (10PN) e pétala com reversão de 10 mm (10PR). No eixo y, está representada a expressão relativa genes MADS- BOX específicos de flor para *Carica papaya*, cpPI e cpAP3/TM6-1, representado no gráfico por PI e TM6.

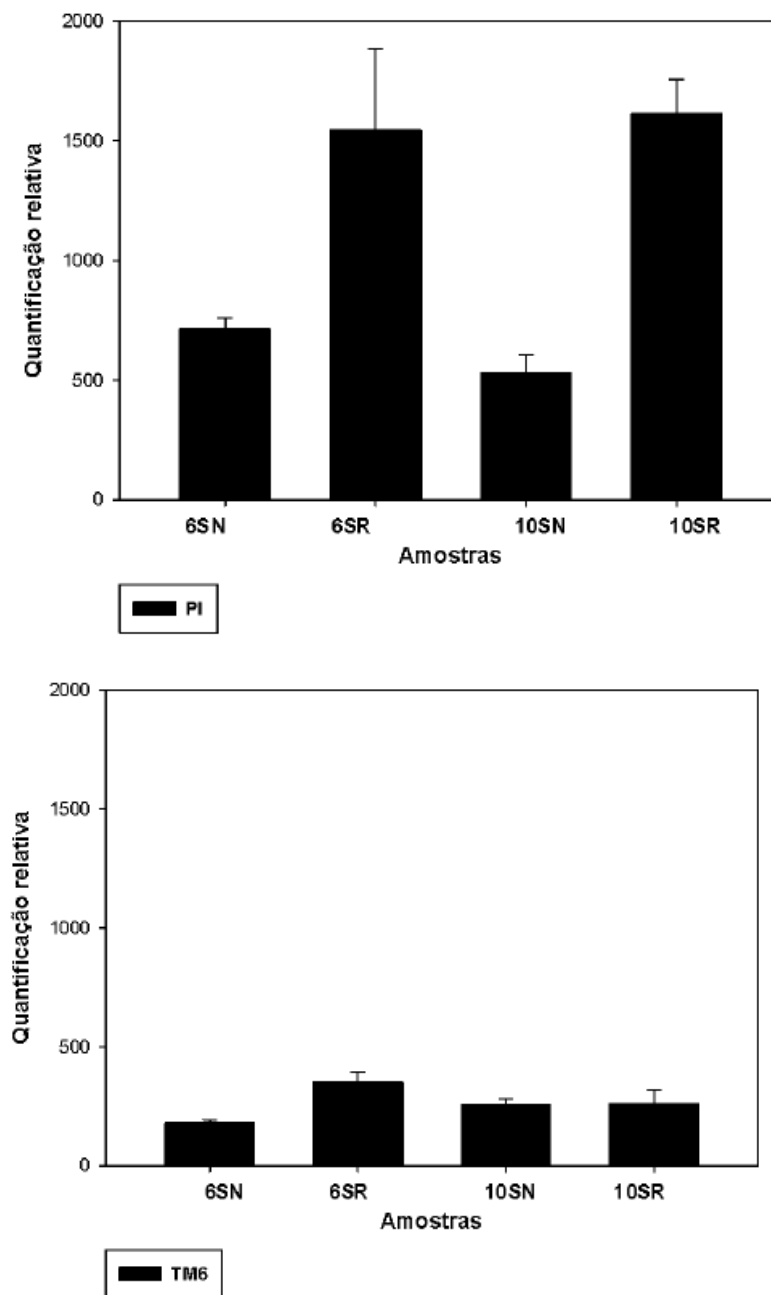


Figura 19. Análise da expressão dos genes específicos de flor por qPCR. O gráfico apresenta no eixo x, dados de expressão em sépalas sem a reversão 6 mm (6SN), sépalas com a reversão 6 mm (6SR), sépalas sem a reversão 10 mm (10SN), sépalas com a reversão 10 mm (10SR), No eixo y, está representada a expressão relativa dos genes MADS- BOX específicos de flor para *Carica papaya*, cpPI e cpAP3/TM6-1, representado no gráfico por PI e TM6.

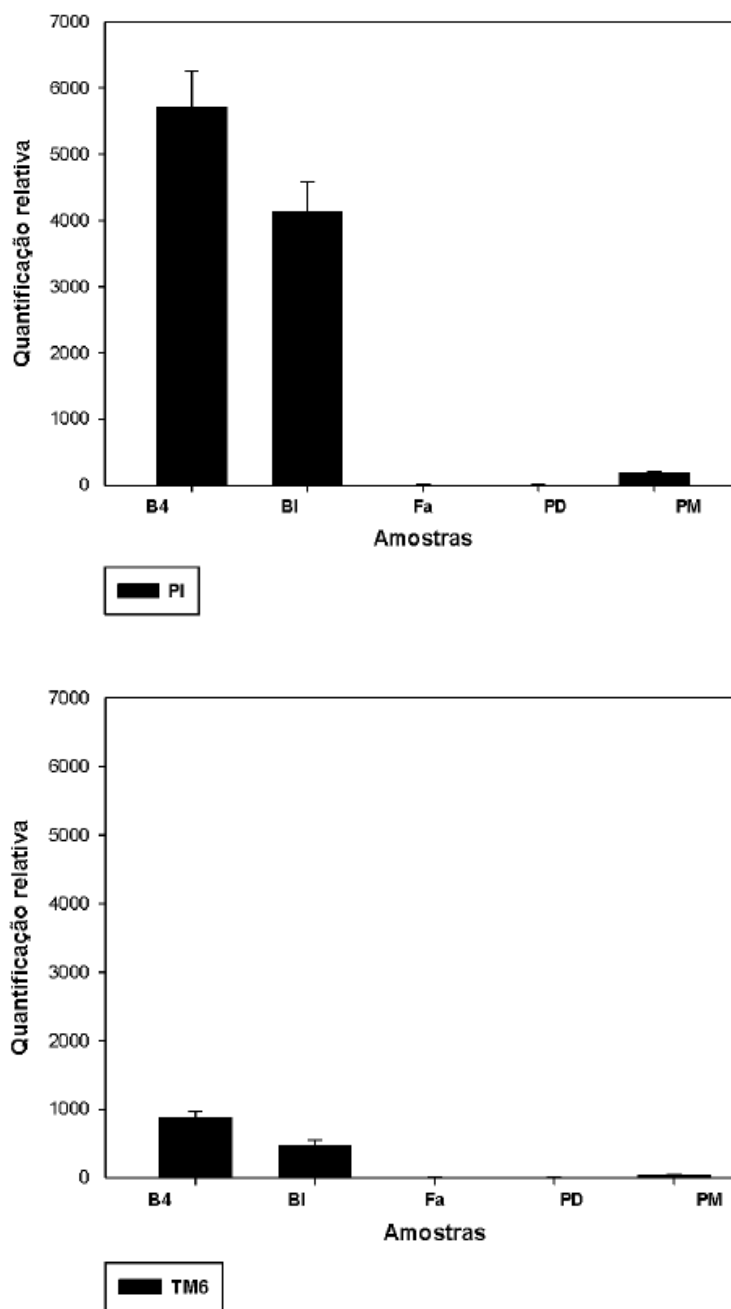


Figura 20. Análise da expressão dos genes específicos de flor por qPCR. O gráfico apresenta no eixo x, dados de expressão no botão de 4 mm (B4), Botão de 1 mm a 3 mm (BI), Folha Adulta (Fa); Pedúnculo (PD) e Pontos Meristemáticos (PM). No eixo y, está representada a expressão relativa dos genes MADS- BOX específicos de flor para *Carica papaya*, cpPI e cpAP3/TM6-1, representado no gráfico por PI e TM6.

6. CONCLUSÕES

Os botões florais de plantas hermafroditas do mamoeiro avaliadas nesse estudo não seguem um padrão constante de desenvolvimento. Botões com tamanhos iguais no comprimento possuem, na maioria dos casos, desenvolvimento diferente dos órgãos florais. O carpelo, quando revertido, assume uma forma afilada semelhante para qualquer tamanho do botão floral, mas a estrutura do órgão floral difere quanto ao diâmetro e altura. Assim, não se pode correlacionar o tamanho e o diâmetro do botão floral com as fases de desenvolvimento dos órgãos florais.

Com a análise filogenética no genoma do *Carica papaya* foram identificados alguns genes importantes da família MADS-BOX. Para identificar um grande número de sequências, foram utilizados diferentes métodos de busca, com isso o número de genes foi superior aos resultados já reportados em outros trabalhos. Os genes encontrados foram selecionados e usados para análises de quantificação. Não foi encontrado o gene da classe C (AGAMOUS), isso sugere que a sequência deste gene não está no banco de dados que foi usado para as buscas das sequências.

Foram analisados quatro novos genes de referência homólogos para *Carica papaya* e a actina. Os trabalhos anteriores sempre usaram a actina como gene de referência, mas nesse trabalho dois novos genes o A270 e o A380 foram encontrados. Esses novos genes de referência em mamão permitirão uma

normalização mais precisa e confiável dos resultados de qPCR nos estudos de expressão gênica desta importante planta cultivada.

Os genes MADS-BOX de mamoeiro, cpAP3/TM6-1 e cpPIlike são expressos de forma diferenciada nos tecidos de flores com a reversão sexual e nos tecidos de flores normais. Foi observada uma maior expressão de ambos os genes, na maioria dos órgãos florais com a presença de reversão sexual comparando com órgãos florais sem a presença de reversão, mas nenhum dos genes foi reprimido, o que se pode supor que o(s) gene(s) responsável(s) pela reversão sexual não são os genes pertencentes à família MADS-BOX. Para elucidar a questão da reversão sexual nas flores de mamoeiro, é necessário analisar outros genes da família MADS-box em mamoeiro e também em outras espécies, bem como as interações com outros genes principalmente o gene SUPPRESSOR OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC1) e LEAFY (LFY), e suas vias secundárias, que ainda são pouco compreendidas. O padrão de expressão geral dos genes cpPI e cpAP3/TM6-1 são similares aos genes da classe B de outras eudicotiledôneas, mas diferem do padrão de expressão dos seus homólogos de *Arabidopsis*. A função dos genes MADS-BOX florais está intimamente relacionada aos padrões de expressão destes genes, particularmente quando os níveis de expressão são elevados, embora mais estudos sejam necessários para determinar a função exata do cpPIlike e cpTM6-1 em papaya.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackerman C. M., Yu Q., Kim S., Paull R. E., Moore P.H., and Ming R. (2008). B-class MADS-box genes in trioecious papaya: two paleoAP3 paralogs, CpTM6-1 and CpTM6-2, and a PI ortholog CpPI. *Planta* 227, 741-753.
- Altschul S. F, Gish W, Miller W, Myers E. W, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410
- Andersen, C. L, Jensen, J. L, Orntoft, T. F (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, v. 64, p.5245-5250.
- Aradhya, M. K., Manshardt, R. M., Zee, F., Morden, C. W. (1999). A phylogenetic analyses of the genus *Carica L.* (Caricaceae) based on restriction fragment length variation in a cpDNA intergenic spacer region. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46: 579-586.
- Arkle Junior, T. D., Nakasone, H. Y. (1984) Floral differentiation in the hermaphroditic papaya. *Hort Science* 19: 832-834.
- Arumuganathan, K., Earle, E. D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant molecular Biology Reporter* 9: 208-218.

- Awada, M. (1958). Relationships of minimum temperature and growth rate with sex expression of papaya plants (*Carica papaya L.*). Hawaii Agricultural Experiment Station Technical Bulletin 38, University of Hawaii, Honolulu.
- Awada, M. (1961). Soil moisture tension in relation of fruit types of papaya plants. Hawaii Farm. Sci. 10, 7-8.
- Awada, M. and Ikeda, W. S. (1957). Effects of water and nitrogen application on composition, growth, sugar in fruit, yield and sex expression of the papaya plants (*Carica papaya L.*). Hawaii Agricultural Experiment Station Technical Bulletin 33, University of Hawaii, Honolulu.
- Badillo, V. M. (1971). Monografía de la familia Caricaceae. Publicada por la Asociación de Profesores, Universidad Central de Venezuela, Maracay, 220 pp
- Badillo, V. M. (1993). Caricaceae. Revista de la Facultad de Agronomía-Alcance, V.43, 111p.
- Badillo V. M. (2000) *Carica L.* Vs *Vasconcellea St.-Hil.* (Caricaceae) com la rehabilitacion de est ultimo. ERNSDF 10:74–79
- Badillo, V. M. (2002). *Carica L.* vs *Vasconcella St. Hil.* (Caricaceae) com la Rehabilitacion de este Ultimo. Ernstia 10: 74-79.
- Becker, A., Theissen, G. (2003). The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29: 464-489.
- Bernier, G. (1988). The control of floral evocation and morphogenesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v.39, p.175- 219.
- Bowman, J. L., Smuthy, D. R., Meyerowitz, E. M., (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 112, 1-20.

- Bowman J. L, Alvarez J, Weigel D, Meyerowitz E. M, Smyth DR (1993) Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by APETALA1 and interacting genes. *Development* 119 721-743
- Bowers J. E, Chapman B. A, Rong J, Paterson A. H (2003) Unraveling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature* 422:433–438
- Coen, E. S., Meyerowitz, E. M. (1991). The war as whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31-37.
- Colombo M., Masiero S., Vanzulli S., Lardelli P., Kater M. M., and Colombo L. (2008). AGL23, a type I MADS-box gene that controls female gametophyte and embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 54: 1037-1048.
- Czechowski, T, Stitt, M, Altmann, T, Udvardi, M. K, Scheible, W. R (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 139, p. 5-17.
- Damasceno Junior, P. C. (2008) Estudos citogenéticos e moleculares como ferramenta auxiliar no melhoramento genético do mamoeiro (*Carica papaya* L.). Tese de Mestrado- Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. 139 p.
- Davies, B., Egea-Cortines, M., de Andrade Silva, E., Saedler, H. and Sommer H. (1996) Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. *EMBO Journal*. 15 (16):4330-4343.
- Dellaporta, S L and Calderon-Urrea A. (1993) Sex determination in flowering plants *The Plant Cell* 5: 1241-1251.
- Ditta, G., Pinopich, A., Robles, P., Pelaz, S., Yanofsky, M. (2004). The SEP4 gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Current Biology* 14: 1935- 1940.

- Egea-Cortines, M., Saedler, M. and Sommer, H. (1999) Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. EMBO Journal. 18: 5370-5379.
- El Moussaoui, A., Nijs, M., Paul, C., Wintjens, R., Vincentelli, J., Azarkan, M., Looze, Y. (2001). Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation on the plant defence mechanism. Cell and Molecular Life Sciences 58:556-557.
- Erin E. Irish and T. Nelson (1989) Sex Determination in Monoecious and Dioecious Plants. Plant Cell 1: 737-744. doi:10.1105/tpc.1.8.737
- Facciola, S. (1990). Cornucopia: A source Book of Edible Plants. Kampong Publications, Vista, California.
- Fan, H. Y., Hu, Y., Tudor, M. and Ma H. (1997) Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. Plant J. 12 (5):999-1010.
- FAO (2010). Papaya production and harvested area. On line- Disponivel em: <http://faostat.fao.org/>.
- Garret, A. (1995) The pollination biology of pawpaw (*Carica papaya* L.) in central Queensland. PhD Thesis, Central Queensland University, Rockhampton.
- Gasser, C. S. (1991). Molecular studies on the differentiation of floral organs. Annual. Rev. Plant Physiol. Plant MOI. Biol. 42, 621-649.
- Goto K, Meyerowitz E. M (1994) Function and regulation of the *Arabidopsis* Xoral homeotic gene *PISTILLATA*. Genes Dev 8:1548–1560
- Gu, Q., Ferrandiz, C., Yanofsky, M. F., and Martienssen, R. (1998). The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development. Development 125, 1509–1517.

- Hartmann, U, Hohmann, S, Nettesheim, K, Wisman, E, Saedler, H & Huijser, P 2000, 'Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*', *Plant Journal*, vol. 21, no. 4, pp. 351-360.
- Hellems et al., *Genome Biology*, 2007 <http://medgen.ugent.be/qbase/>
- Hempel, F. D., and Feldman, L.J. (1994) Bi-directional inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*: Acropetal initiation of flowers and basipetal initiation of paraclades. *Planta* 192:276-286
- Holfmeyr, J. D. J. (1938). Genetical studies of *Carica papaya* L. I. The inheritance and relation of sex and certain plant characteristics. II. Sex reversal and sex forms. *So. Afr. Dept. Agri. And Sci. Bul. NO. 187. 64pp.*
- Honma, T. and Goto, K. (2001) Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409: 525-529.
- Jack T, Brockman L. L, Meyerowitz EM (1992) The homeotic gene *APÉTALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell* 68:683–697
- Koetje (1995). The *Petunia* MADS-box genes FBP 11 determines ovule identity. *The plant cell*, 7:1859- 1868.
- Kramer E. M, Jaramillo M. A, Di Stilio V. S (2004) Patterns of gene duplication and functional evolution during the diversification of the AGAMOUS subfamily of MADS box genes in angiosperms. *Genetics* 166:1011–1023
- Kumar, V. (1952). Studies in *Carica papaya* Linn.II. Sex- expression in some varieties. *Indian J.Hort.* 9, 20 -28.
- Lange, A. H. (1961). Factors affecting sex changes in the flowers of *Carica papaya* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 77, 252-264.

- Lee P. D, Sladek R, Greenwood C. M. T, Hudson T. J (2002) Control genes and variability: Absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Research*, v. 12, p. 292-297.
- Levy, Y. Y., and Dean, C. (1998) Control of flowering time. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1:49-54
- Lewis K. L, et al (2008) The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature* 452: 991–996
- Liljegrens, Ditta G, Eshed Y, Savidge B, Bowman J, Yanofsky M. 2000^a control of fruit dehiscence in *Arabidopsis* by the SHATTERPROOF MADS-BOX genes. *Nature* 40, 766-769.
- Litz, R. E. Papaya. In: Sharp, D. A.; Evans, D. A.; Ammirato, P. V. & Yamada, Y., eds. *Handbook of plant cell culture*. New York, MacMillan, 1984. p. 349-368.
- Mandel, M. A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B., and Yanofsky, M. F. (1992). Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene APÉTALA1. *Nature* 360, 273–277
- Michaels, S. D. and Amasino, R. M. 1999. FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* 11(5): 949-956.
- Michaels, S. D., He, Y., Scortecci, K. C., and Amasino, R. M. 2003. Attenuation of FLOWERING LOCUS C activity as a mechanism for the evolution of summer-annual flowering behavior in *Arabidopsis*., *PNAS*, 100(17): 10102-7.
- Ming R., Hou S., Feng Y., Yu Q., Dionne-Laporte A., Saw J. H., Senin P., Wang W., Ly B. V., Lewis k. L., et al (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature* 452: 991-996.
- Morton, J. F. (1987) Papaya, *Carica papaya* L. In: *Fruits of Warm Climates*. Creative Resources Inc., Winterville, N.C.

- Moore R. C, Grant S. R, Purugganan M. D (2005) Molecular population genetics of redundant floral-regulatory genes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biol Evol* 22:91–103
- Nakasone, H.Y., Paull, R.E.(1998). *Tropical Fruits*. CAB International, Walingford.
- OECD (2005). Consensus document on the biology of papaya (*Carica papaya*). OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No 33, France.
- Parasnis, A. S., Ramakrishna, W., Chowdari, K. V., Gupta, V. S., Ranjekar, P. K. (1999) Microsatellite (GATA)_n reveals sex-specific differences in papaya. *Theor Appl Genet* 99:1047-1052
- Parenicova, L, Folter, S, Kieffer, M, Horner, DS, Favalli, C, Busscher, J, Cook, HE, Ingram, R. M, Kater, M. M, Davies, B, Angenent, GC & Colombo, L 2003, 'Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: New openings to the MADS world', *Plant Cell*, vol. 15, pp. 1538-1551.
- Pelaz, S., Ditta, G. S., Baumann, E., Wisman, E., Yanofsk, M. (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes, *Nature*. 405:200-2003.
- Pérez, E. G. (2004). Melhoramento do mamoeiro. Toda fruta http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=6062.
- Pinyopich A, Ditta G. S, Savidge B, Lijegren S. J, Baumann E. et al. (2003) Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* 424:85–88.
- Poupin M. J, Federici F, Medina C, Matus J. T, Timmermann T, Arce-Johnson P. 2007. Isolation of the three grape sub-lineages of B-class MADS-box TM6,

PISTILLATA and APETALA3 genes which are differentially expressed during flower and fruit development. *Gene* 404, 10-24.

Preston J. C, Kellogg E. A. (2006). Reconstructing the evolutionary history of paralogous APETALLA1/FRUITFULL- like genes in grasses (Poaceae) *Genetics* ;174:421-437.

Purugganan M. D, Rounsley S. D, Schmidt R. J, Yanofsky M. F (1995). Molecular evolution of flowers development: diversification of the plant MADS-Box regulatory gene family. *Genetics* 140:345-356.

Qingyi YU, Paul H Moore, Henrik H Albert, Adrienne H. K Roder and Ray Ming (2003). Cloning and Characterization of flower development Genes in papaya. *Hawaii Agricultural Experiment Station Technical Bulletin 23*, University of Hawaii, Honolulu.

Qingyi YU, Denise Steiger, Elena M. Kramer, Paul M. Kramer and Ray Ming (2008). Floral MADS-box Genes in Trioecious Papaya: Characterization of AG and AP1 Subfamily Genes Revealed a Sex -type- specific Gene. *Tropical Plant Biology* 1: 97-107.

Ratcliff, Frank; Martin-Hernandez, Ana Montserrat and Baulcombe, David C. Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal*, January 2001, vol. 25, no. 2, p. 237-245.

Riechmann, J. L. and Meyerowitz, E. M. (1997) MADS domain proteins in plant development. *Biol. Chem.* 378: 1079-1101.

Rozen, S. S. H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, v. 132, p. 365-386.

Ruggiero, C. (1988) Mamão. FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, 428p.

- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S. E., Ditta, G. S., Schwarz-Sommer, Zs., Yanofsky, M. F. and Coupland, G. (2000). Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science* 288, 1613-1616.
- Scortecci, K. C., Michaels, S. D., Amasino, R. M. 2001. Identification of a MADS-box gene, FLOWERING LOCUS M, that represses flowering. *Plant Journal* 26(2): 229-236.
- Sippel, A. E., Stief, A., Hecht, A., Müller, A., Theisen, M., Borgmeyer, U., Rupp, R. A. W., Grewal, T. and Grussenmeyer, T. (1989). In Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. (eds), *Nucleic Acids and Molecular Biology*. Volume 3. Springer Verlag, Berlin, pp. 133-147.
- Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H., Sommer, H., (1990) Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* v.250 n. 4983, p.931 (6).
- Shan H, Zhang N, Liu C, Xu G, Zhang J, Chen Z, Kong H. (2007). Patterns of genes duplication and functional diversification during the evolution of the AP1/SQA subfamily of plant MADS-Box genes. *Mol Phylogenet Evol* ;44:26-41.
- Storey, W. B. (1941). The botany and sex relations of papaya. *Hawaii Agricultural Experiment Station Bulletin* 87, 5-22.
- Storey, W. B. (1953). Genetics of papaya. *Journal of Heredity* 44, 70-78.
- Storey, W. B. (1958). Modification of sex expression in papaya. *Hort. Adv.* 2, 49-60.
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR (2000) Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*, v. 29, p. 332-336.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S., (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. And Evol.*, 24: 1596-1599.
- Theissen, G. Saedler, H. (2001). Floral Quartets, *Nature* 409:469-471.

- Teixeira, S. J. A., (2007) Papaya biology and biotechnology. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 1: (1) 47-73.
- Thellin, O, Zorzi, W, Lakaye, B, de Borman, B, Coumans, B, Hennen, G, Grisar T, Igout, A, Heinen, E (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*, v. 75, p. 291-295.
- Turner, I. J., Pumfrey, J. E. (2002). Cell fate in shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 115: 755-764.
- Yanofsky, M. F., Ma, H., Bowman, J. L., Drews, G. N., Feldmann, K. A., and Meyerowitz, E. M. (1990). The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene AGAMOUS resembles transcription factors. *Nature* 346, 35–39.
- Van Den Eynden, V., Cueva, E., Cabrerao, O., (1999). Plantas Silvestres comestibles del Sul del Ecuador- Wild edible plants Southern Ecuador. Ediciones Abya- Yala. Quito, Ecuador. 221 pp.
- Vandesompele J, Preter K. D, Pattyn F, Poppe B, Roy N. V, Paepe A. D, Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes *Genome Biology*, v. 3, p. 7.
- Villegas, V. N. (1997) *Carica papaya* L. In: EWM Verheij, RE Coronel, eds. *Plant Resources of South- East Asia 2: Edible Fruits and Nuts*. PROSEA Foundation, Bogor, Indonesia.
- Watson B. (1997) *Agronomy/agroclimatology notes for the production of papaya*. Soil and Crop Evaluation Project, Ministry of Agriculture, Forest, Fisheries and Meterology, Australia.
- Zhao, S. and Fernald, R. D. (2005). "Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction." *Journal Comput Biol* 12(8): 1047-64.