

CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MAMOEIRO (*Carica
papaya* L.) TRATADOS COM SOLUÇÃO DE COLCHICINA VISANDO
A IDENTIFICAÇÃO DE AUTOTETRAPLOIDES

FERNANDA SARAGOSA ROSSI

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2015

CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MAMOEIRO (*Carica papaya* L.) TRATADOS COM SOLUÇÃO DE COLCHICINA VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DE AUTOTETRAPLOIDES

FERNANDA SARAGOSA ROSSI

“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

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2015

CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MAMOEIRO (*Carica papaya* L.) TRATADOS COM SOLUÇÃO DE COLCHICINA VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DE AUTOTETRAPLOIDES

FERNANDA SARAGOSA ROSSI

“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 31 de março de 2015

Comissão Examinadora:

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

Dr^a. Elba Honorato Ribeiro (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) - UENF

Prof. Pedro Correa Damasceno Junior (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) - UFRRJ

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

À minha mãe Ana e a meu pai Osvaldo,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a plenitude da vida e a sabedoria por ela proporcionada;
À minha família, em especial minha mãe, meu pai e meu irmão, pelo carinho, compreensão e companheirismo em todos os momentos vividos;
À UENF, pela infraestrutura concedida e pelo suporte financeiro para realização deste trabalho, e à Faperj, pela concessão da bolsa de estudos;
Ao Guilherme, pelo carinho, companheirismo e dedicação;
À Professora Telma Nair Santana Pereira, pela orientação, pela paciência e por acreditar em meu potencial, proporcionando meu crescimento profissional;
Ao Professor Messias Gonzaga Pereira e à Dra. Elba Honorato Ribeiro, pelo conhecimento transmitido e ajuda na condução do trabalho;
Ao Professor Alexandre Pio Viana e ao Pedro Correa Damasceno Junior, pela ajuda;
Aos Professores do Programa de Genética e Melhoramento de Plantas, por todo conhecimento transmitido nestes anos de estudo e pesquisa;
Ao secretário do Programa, Daniel, pela eficiência e prontidão em ajudar;
À minha amiga/irmã Luciane Brauwerts, pela amizade eterna;
Aos amigos antigos e novos de Alta Floresta, pelo apoio, pela paz e energias positivas transmitidas a mim;
A todos os meus amigos, colegas e companheiros do LMGV e agregados, Monique, Ingrid, Érica, Kellen, Hellen, Nádia, Milene, Gabrielle, Carlos Misael,

Leandro, em especial Pedro, Lorraine, Rodrigo, Erina, Elba, pela ajuda e convivência;

Aos funcionários da Pesagro, pela ajuda prestada;

Às amigas de república, Ingrid e Poliane, pela ajuda quando cheguei aqui e pelos momentos de lazer e paciência exercitada.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	03
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3.1 Aspectos botânicos e origem do mamoeiro.....	04
3.2 Citogenética do mamoeiro.....	06
3.3 Melhoramento genético do mamoeiro.....	08
3.4 Mutagênese e Poliploidização.....	09
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Material vegetal.....	14
4.2 Metodologia.....	15
4.2.1 Caracterização Citológica.....	15
4. 2.1.1 Análise Meiótica.....	15
4. 2.1.2 Viabilidade Polínica.....	16
4. 2.1.3 Captura das Imagens.....	17
4.2.2 Caracterização dos Frutos.....	17
4.2.2.1 Peso de Fruto.....	18
4.2.2.2 Comprimento do Fruto.....	18
4.2.2.3 Diâmetro do Fruto.....	18
4.2.2.4 Espessura média da polpa do fruto.....	18

4.2.2.5 Número de sementes por fruto.....	18
4.2.2.6 Análise Estatística.....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5.1 Caracterização Citogenética.....	20
5.2. Caracterização dos Frutos.....	28
6.CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

RESUMO

ROSSI SARAGOSA, F. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; MARÇO 2015; Caracterização de genótipos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) tratados com solução de colchicina, visando à identificação de autotetraploides. Orientadora: Prof^a Telma Nair Santana Pereira. Conselheiros: Profs. Messias Gonzaga Pereira e Alexandre Pio Viana.

Este estudo teve por objetivo caracterizar citologicamente genótipos de mamoeiro supostamente poliploides (JS12 e SS72/12), identificando entre eles os autotetraploides, e caracterizar morfológicamente os frutos obtidos em plantas tetraploides. Para análise meiótica e viabilidade polínica, botões florais foram coletados, fixados e conservados a 4°C até o momento de preparo da lâmina, seguindo os procedimentos rotineiros do Laboratório. Foram estimados o percentual de produtos pós-meióticos, a frequência de gametas $2n$ e a porcentagem de grãos de pólen viáveis. As variáveis foram submetidas à análise de variância e as médias, comparadas via Teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa GENES. Nos frutos, foram mensurados peso (g), espessura (mm), comprimento (mm), diâmetro (mm) e número de sementes viáveis e inviáveis. As variáveis obtidas foram analisadas utilizando os recursos computacionais do programa SAS. Dentre os 20 genótipos estudados, 12 tiveram o número de cromossomos duplicados, 06 advindos do JS12 e 06 do SS72/12, apresentando $2n=36$ cromossomo e 8 genótipos tratados apresentaram $2n=2x=18$ cromossomos, sendo um JS12 e sete SS72/12, mantendo seu nível de ploidia, não diferindo dos controles. Foram observadas anormalidades meióticas na

divisão celular dos genótipos, como cromossomos univalentes, falta de sincronismo, e segregação precoce de cromossomos. Assim como mônades, díades, tríades, políades, e tétrades com micronúcleos resultantes das anormalidades. O percentual de tétrades normais nos genótipos autotetraplóides JS12 variou de 25% a 57,60% e de 54,80% a 62% nos genótipos autotetraplóides SS72/12. As linhagens controle apresentaram 96,4% e 89,4% para JS12 e SS72/12, respectivamente. A frequência de gameta $2n$ foi relativamente alta nos autotetraplóides advindos do JS12 variando de 6,21% a 27,60% e nos autotetraploides do SS72/12 de 3,07% a 9,18% comparando com a frequência dos respectivos controles que foram de 0,56% e de 1,90%. A viabilidade polínica dos autotetraploides foi baixa, variando de 1,87% a 13,70% nos genótipos JS12 e de 2,33% a 56,9% nos genótipos SS72/12, já os controles apresentaram uma alta viabilidade que foram de 89,80 para JS12 e de 97,50 para SS71/12. A análise de variância dos dados não mostrou diferenças significativas entre os genótipos, para todas as características avaliadas nos frutos. No genótipo SS72/12 os frutos das plantas do controle não diferiram estatisticamente dos tratados para as características peso, espessura e comprimento, mas diferiu para as características de diâmetro e número de sementes viáveis. Já no genótipo JS12 as médias para as características avaliadas de peso (392g), espessura (19,57mm), comprimento (153,25mm) e diâmetro (68,29mm) menores quando comparadas com as médias dos frutos das plantas controle para peso (1009,6g), espessura (24,58mm), comprimento (224,33mm) e diâmetro (96,60mm). o número médio de sementes viáveis foi reduzido tanto nas linhagens autotetraploides JS12 (19,64) quanto nas linhagens SS72/12 (67,09) quando comparado com número médio de sementes do controle JS12 (423,88) e do controle SS72/12 (388,84). Concluindo, foi possível confirmar a natureza tetraploide de 12 genótipos, 06 JS12 e 06 SS72/12. A meiose dos autotetraplóides foi anormal, resultando em um baixo percentual de tétrades normais, presença de gametas não reduzidos e uma baixa viabilidade polínica, características comuns em genótipos autotetraploides. Os frutos das plantas tratadas do genótipo JS12 quando comparados com os frutos das plantas controle JS12, tiveram diferenças maiores nas características avaliadas, do que os frutos das plantas tratadas do genótipo SS72/12 quando comparados com os frutos das plantas do controle SS72/12.

ABSTRACT

ROSSI SARAGOSA, F. M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; MARCH, 2015; Characterization of papaya genotypes (*Carica papaya* L.) treated with colchicine solution, aiming the identification of autotetraploids. Adviser: Prof^a Telma Nair Santana Pereira. Consultant: Profs. Messias Gonzaga Pereira e Alexandre Pio Viana.

This study aimed to characterize cytologically the papaya genotypes (JS12 and SS72/12), in order to identify autotetraploids among them, and to characterize morphologically the fruits of tetraploid plants. For the meiosis analyses and pollen grain viability, flower buds were collected, fixed and stored at 4 °C. The slide preparation was done by squash technique following the routine procedures of the Laboratory. The percentage of post-meiotic products, the frequency of 2n gametes and, the percentage of viable pollen grains were estimated. The data were subjected to analysis of variance and, means were compared by Tukey's test at 5% of probability, using the Genes software. The fruit characteristics measured were: weight (g), thickness (mm), length (mm), diameter (mm) and the number of viable and non-viable seeds. The data were analyzed using the computational resources of the SAS program. Among the 20 genotypes under study, 12 presented a duplicated number of chromosomes, 6 genotypes from JS12 and 6 genotypes from SS72/12, with $2n = 36$ chromosomes. Eight treated genotypes had $2n = 2x = 18$ chromosomes, one genotype from JS12 and seven genotypes from SS72/12, indicating that they did not duplicated their chromosome numbers and they did not differ from controls. Meiotic abnormalities were observed in the

genotype cell divisions, such as univalent chromosomes, lacking of synchronism and early segregation of chromosomes as well as monads, dyads, triads, polyads and tetrads with micronuclei. The percentage of normal tetrads in autotetraploid genotypes of JS12 varied from 25% to 57.60% and, 54.80% to 62% in genotypes of SS72/12. The control lineages showed 96.4% and 89.4% for JS12 and SS72/12, respectively. The frequency of 2n gametes was relatively high for the JS12 autotetraploids ranging from 6.21% to 27.60% and for SS 72/12 autotetraploids the values varied from 3.07% to 9.18% comparing to the frequency of their respective controls, 0.56% and 1.90%. The autotetraploid pollen grain viability was low, ranging from 1.87% to 13.70% for the genotypes JS12 and 2.33% to 56.9% for the genotypes SS72/12 while the controls showed a high viability, 89,80% for JS12 and 97,50% for SS71/12. For the genotype SS72/12 the fruits of controls did not differ statistically from treated in regards to weight, thickness and length, but differed for the diameter and number of viable seeds. The average of the JS12 genotype for the evaluated characteristics: weight (392g), thickness (19,57mm), length (153,25mm) and diameter (68,29mm), was lower compared to the averages of the fruits of controls: weight (1009,6g), thickness (24,58mm), length (224,33mm) and diameter (96,60mm). The average number of viable seeds was low for both autotetraploid lines, JS12 (19.64) and in lines SS72/12 (67,09) when compared to the average number of seeds JS12 (423.88) and SS72/12 (388.84) of the controls. In conclusion, it was possible to confirm the autotetraploid nature of the 12 genotypes, 6 of JS12 and 6 of SS72/12. The autotetraploid meiosis was abnormal, resulting in a low percentage of normal tetrads, presence of unreduced gametes and low pollen grain viability, common features in autotetraploid genotypes. The fruits of JS12 autotetraploid genotypes when compared to the JS12 control fruits presented greater differences than the SS72/12 autotetraploid genotypes compared to the SS72/12 controls.

1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma espécie da família Caricaceae, composta por 35 espécies (Badillo 2001), agrupadas em seis gêneros: *Carica*, com uma única espécie (*C. papaya*), *Vasconcellea* (21 espécies), *Cyclimorpha* (2 espécies), *Jarilla* (3 espécies), *Jacaratia* (7 espécies) e *Horovitzia* (1 espécie) (Badillo, 2000). Quase todas as espécies são dioicas, com exceção de *V. monoica*, que é estritamente monoica, e *V. cundinamarcensis* e *C. papaya*, que apresentam indivíduos dioicos e monoicos, e dioicos e andromonoicos, respectivamente (Badillo, 1993). Todas as espécies são diploides com $2n=2x=18$ cromossomos (Darlington e Ammal, 1945; Storey, 1941; Damasceno Junior *et al.*, 2010).

O mamoeiro se destaca na família Caricaceae pela sua grande importância econômica. A cultura está difundida pelas regiões tropicais e subtropicais, onde as condições são ecologicamente favoráveis ao seu desenvolvimento, como clima quente, pluviosidade elevada, solos férteis e bem drenados (Marin *et al.*, 1995).

O Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, em parceria com a empresa CALIMAN Agrícola S/A., localizada na cidade de Linhares no Estado do Espírito Santo, Brasil, vem implementando vários trabalhos na área do melhoramento genético da cultura. Como resultado deste projeto, o grupo foi responsável pelo desenvolvimento e registro de nove híbridos de mamoeiro. Atualmente, os híbridos disponíveis no mercado são as cultivares Tainung 01 e

UENF/Caliman 01. O híbrido UENF/Caliman 01 (Calimosa) assim como o Tainung 01 são altamente produtivos (Pereira, 2003).

A UENF já apresenta materiais genéticos adaptados às condições das regiões produtoras de mamão, pretendendo, atualmente, a linha de pesquisa, a obtenção de frutos sem sementes, visando ao mercado nacional e internacional, visto a tendência mundial de consumo ser orientada para produtos de boa qualidade, o que implica produtos com bom formato do fruto, ausência de sementes, entre outras características (Cardoso *et al.*, 2000). A obtenção de mamoeiros com frutos sem sementes, é conseguida via desenvolvimento de triplóides ($2n=3x=27$ cromossomos), que por sua vez pode ser conseguida pelo cruzamento entre plantas diploides ($2n=2x=18$ cromossomos) e plantas tetraploides ($2n=4x=36$ cromossomos).

A poliploidia pode ser uma poderosa ferramenta para o melhoramento genético, podendo ser obtida espontaneamente ou artificialmente. Na indução artificial, são utilizadas substâncias químicas, como, por exemplo, a colchicina, que impedem a formação do fuso acromático durante a divisão celular, não permitindo a separação dos cromossomos na anáfase. De forma sumarizada, pode-se dizer que, para a obtenção de genótipos triploides, sem sementes, é necessário primeiro a indução de poliploides pelo uso de um antimitótico, depois a identificação de tetraploides e, posteriormente, o cruzamento de diploides com tetraploides para a obtenção dos triploides (Souza *et al.*, 1999). A identificação dos tetraploides pode ser feita via análise citológica, ou via citometria de fluxo, ou via tamanho e/ou número dos estômatos (Souza *et al.*, 1999).

Considerando que na UENF foi iniciada uma pesquisa de poliploidização em mamoeiro (Ribeiro *et al.*, 2013), agora é necessário identificar e caracterizar, entre as plantas tratadas com colchicina, aquelas que tiveram o número de cromossomos duplicados ($2n=4x=36$ cromossomos), para uso posterior no programa de melhoramento genético da cultura.

2. OBJETIVOS

- a) Caracterizar citologicamente genótipos JS12 e SS72/12 supostamente poliploides e identificar, entre os genótipos tratados, os autotetraploides;
- b) Caracterizar morfológicamente os frutos obtidos em plantas tetraploides.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ASPECTOS BOTÂNICOS E ORIGEM DO MAMOEIRO

O mamoeiro é uma das fruteiras mais comuns em quase todos os países da América tropical (Dantas e Oliveira, 2009). Pertence à espécie *Carica papaya* L., classe Dicotyledoneae, subclasse Archichlamydeae, ordem Violales, subordem Caricineae, família Caricaceae, gênero *Carica* (Badillo, 1993). A família Caricaceae compreende seis gêneros e 35 espécies (Badillo, 1993; Van Droogenbroeck *et al.*, 2002). Os gêneros *Carica* (1 espécie), *Horovitzia* (1 espécie), *Jacaratia* (7 espécies), *Jarilla* (3 espécies) e *Vasconcellea* (21 espécies) são originários do continente americano, enquanto o gênero *Cylicomorpha* (2 espécies) pertence ao continente africano (Badillo, 2000; Van Droogenbroeck *et al.*, 2004). É uma espécie diploide, com $2n=2x=18$ cromossomos e número básico de $n=9$ cromossomos (Storey, 1941; Damasceno Junior *et al.*, 2010).

O centro de origem do mamoeiro é discutido há muitos anos, pois a maioria dos membros do gênero *Carica* ocorre ao longo da cordilheira dos Andes, desde o Sul da Bolívia e Peru até a Venezuela, em uma área que forma o centro primário de diversidade do gênero (Aradhya *et al.*, 1999). Embora haja opiniões divergentes quanto à origem do mamoeiro na América Tropical, é provável que esta espécie tenha se originado nas terras baixas da América Central oriental, do México ao Panamá (Nakasone e Paull, 1998). O Brasil, sendo o segundo maior produtor mundial de mamão, com produção de 1,9 milhões de toneladas no ano de

2010, fica atrás unicamente da Índia (FAO, 2014). Quanto à produção nacional de frutos, os principais produtores são os Estados da Bahia (683.474 toneladas), Espírito Santo (484.645 toneladas), Ceará (86.414 toneladas) e Rio Grande do Norte (71.293) em 2012 (IBGE, 2014).

O mamoeiro é uma planta herbácea, de clima tipicamente tropical, de modo que a cultura está difundida em regiões que apresentam pluviosidade elevada, solos férteis e bem drenados (Corandie, 1992; Marin et al., 1995). A planta tem sistema radicular pivotante, com ramificações laterais. O caule é do tipo herbáceo lenhoso, fistuloso nas regiões dos entrenós, succulento, ereto, contendo numerosas cicatrizes foliares, terminando com um grupo denso de grandes folhas na região apical. As folhas são alternadas, com grandes limbos foliares (0,70 m de diâmetro), longopeciadas, profundamente palma tilobadas, apresentando nervuras mais salientes na face abaxial. Apresentam coloração verde-claro-mate na face superior e verde-brancacento pálido na face inferior, coberto por material ceroso, apresentando um ou mais lóbulos, ou totalmente inteiros. Os pecíolos são fistulosos, cilíndricos, verde pálidos, às vezes vermelho - vinosos. As cicatrizes deixadas pelas folhas são bastante proeminentes (Badillo, 1993).

O fruto é descrito como ovoide, esférico, ou piriforme, podendo ter outras classes, com tamanhos variados, desde pequenos (com 2 a 10 cm de comprimento por 1,5 a 6 cm de largura) até muito grandes (em cultivo). A cor da polpa comumente é amarela, alaranjada ou avermelhada. Em parentes silvestres, o interior pode ser completamente preenchido por sementes e massa placentária. As sementes variam de 5 a 7 mm, podendo conter sarcotesta mucilaginosa, ser lisa e dura (esclerotesta). Contêm numerosas protuberâncias irregularmente dentadas, em formas de cristas meridianas agudas e irregulares, bastante próximas. O embrião é reto, com cotilédones ovoides e achatados, circundados por endosperma carnoso, rico em ácidos graxos. A germinação é relativamente rápida (duas a três semanas) e epígea (Badillo, 1993).

A espécie é considerada sexualmente polígama por apresentar três diferentes tipos de plantas, femininas, masculinas e hermafroditas (Storey 1953). Em mamoeiro, o mecanismo de determinação sexual é reportado como sendo governado por um gene com três formas alélicas (Hofmeyr, 1938; Storey, 1938). Hofmeyr (1938) designou os símbolos m para o alelo que determina a feminilidade, M_1 para o alelo que determina a masculinidade e M_2 para

hermafroditismo, concluindo que os genótipos *mm*, *M₁m*, *M₂m* produzem flores femininas, masculinas e hermafroditas, respectivamente. De acordo com Storey (1941), indivíduos portadores dos genótipos *mm*, *M₁m* e *M₂m* são denominados ginoicos, androicos e andromonoicos, respectivamente. Há outras teorias que explicam a determinação sexual em plantas de mamoeiro (Storey, 1953; Hofmeyr, 1967; Liu et al., 2004, Ming et al., 2007), porém a mais aceita é a de alelos múltiplos.

As cultivares de mamoeiro em muitas partes do mundo são do tipo dioico (Arkle Junior e Nakasone, 1984), sendo os frutos femininos aproveitados para o consumo da fruta fresca ou para extração da enzima papaína. No Brasil, os frutos piriformes produzidos pelas plantas hermafroditas são preferidos em relação aos frutos esféricos produzidos pelas plantas femininas, destinando-se aos mercados interno e externo. Contudo, deve ser ressaltada a limitação de alternativas para a escolha de variedades e/ou híbridos comerciais para o plantio que atendam tanto às exigências do mercado nacional quanto internacional (Marin et al., 2003).

3.2 CITOGENÉTICA DO MAMOEIRO

Os primeiros trabalhos citogenéticos foram desenvolvidos por meio do estudo da meiose do milho, mais precisamente do paquíteno, por Mc Clintock em 1929, cujo mapeamento cromossômico possibilitou a identificação do tamanho de cada cromossomo, a posição do centrômero, regiões eucromáticas e heterocromáticas (Gill et al., 1997).

Apesar da revolução provocada pela Genética Molecular, a análise cromossômica continua sendo a única maneira de observar o genoma de um eucarioto na forma de blocos individualizados de material genético, fáceis de serem mensurados, diferenciados em subunidades e manipulados de diferentes formas, pois de nenhuma outra forma o material genético é tão claramente observado (Brammer et al., 2002).

O conhecimento do número de cromossomos ou do nível de ploidia, além de importante para a caracterização de germoplasma, é importante para os trabalhos de melhoramento genético, quando são programados cruzamentos (Schifino-Wittmann, 2001).

Segundo Bajpai e Singh (2006), embora seja uma importante cultura tropical e subtropical, a literatura apresenta poucos resultados envolvendo estudos citogenéticos de mamoeiro, quando comparados com outras espécies de interesse econômico. O mamoeiro é uma espécie diploide com 18 cromossomos metacêntricos bastante similares e de tamanho pequeno (Datta, 1971; Dasmaceno Junior et al., 2009). Segundo Datta (1971) os cromossomos de mamoeiro são pequenos, com uma pequena diferença em comprimento, 1 μm a 4,23 μm mas constrições primárias são geralmente medianas ou submedianas e alguns cromossomos apresentam mais de uma constrição secundária. Já Dasmaceno Junior et al. (2009), observaram que o tamanho dos cromossomos variou de 1,43 μm a 2,29 μm todos metacêntricos (Dasmaceno Junior et al., 2007).

As espécies *V. monoica*, *V. goudotiana*, *V. microcarpa* (Micheletti de Zerpa, 1959), *V. cauliflora* (Storey, 194; Dasmaceno Junior et al., 2009) *V. quercifolia* (Darlington e Wylie, 1955; Dasmaceno Junior et al., 2009) e *Jacaratia spinosa* (Kumar e Srinivasan, 1944), da família Caricaceae, apresentam o mesmo um número somático de cromossomos, $2n=18$ cromossomos.

Quanto ao estudo dos cromossomos meióticos de mamoeiro Kumar et al. (1945) observaram que um par de cromossomos se separa precocemente durante a anáfase I da meiose de plantas masculinas de mamoeiro. Eles relataram que essa diferença no comportamento dos cromossomos está de acordo com o observado em outras espécies vegetais que contêm cromossomos sexuais heteromórficos. Pereira et al (2014) analisando o comportamento meiótico das espécies *Jacaratia spinosa* e *Vasconcellea quercifolia*, verificou que a meiose mostrou-se regular em ambas as espécies, apesar de *V. quercifolia* ter apresentado um maior número de irregularidades, como a falta de sincronia e a presença de cromossomos retardatários em algumas células.

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

Embora existam marcadores de DNA para a predição do sexo em mamão (Parasnis et al., 1999; Urasaki et al., 2002; Liu et al., 2004), é dispendioso testar e transplantar milhões de plântulas em curto período de tempo para a produção comercial de frutos (Ming et al., 2007), daí essa metodologia não ser de uso prático no estabelecimento das plantas no campo.

3.3 MELHORAMENTO GENÉTICO DO MAMOEIRO

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

O germoplasma do mamoeiro pode ser classificado em dois grandes grupos: Grupo Solo e Grupo Formosa. Os materiais do grupo Solo são geneticamente uniformes, consistindo de linhagens fixadas por sucessivas gerações de autofecundação. A cultivar *Golden*, do grupo Solo, é descrita por Marin & Gomes (2000) como tendo plantas e frutos de coloração verde-clara e acentuadamente aclorofilada, com superfície do fruto bastante lisa; é uma cultivar muito tolerante à mancha fisiológica do mamoeiro.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF iniciou em 1995 um projeto de introdução, adaptação e desenvolvimento de tecnologias a serem aplicadas à cultura do mamoeiro nas regiões do Norte e Noroeste Fluminense. Como resultado desse programa, em 2002, foram registrados nove híbridos de mamoeiro adaptados às condições da região (Pereira, 2003). Esses híbridos são superiores ao híbrido Tainung 01 nas características melhor sabor, maior teor de sólidos solúvel (mais doces), melhor coloração de polpa e maior uniformidade de frutos, atingindo melhor proporção de frutos exportáveis (Pereira, 2003).

O melhoramento da cultura tem tido por base a hibridação intraespecífica dentro do Grupo Heterótico – Solo e Formosa e/ou entre Grupos Heteróticos, existindo, com isso, cultivares como o híbrido Tainung 01, Golden, o híbrido

UENF/CALIMAN01, obtidos do cruzamento entre JS12 (Grupo Formosa) e SS 72/12 (Grupo Solo).

O desenvolvimento de cultivar que apresente frutos sem sementes, do tipo triploide, é uma inovação tecnológica dentro do programa de melhoramento da cultura do mamoeiro. Esta metodologia já foi aplicada com sucesso em outras fruteiras como a melancia (Souza et al., 1999), o melão (Ezura *et al.*, 1993), citros (Cavalcante *et al.*, 2000), entre outras.

O mamoeiro é uma espécie diploide com $2n=2x=18$ cromossomos e a poliploidia não é relatada na família, entretanto, algumas tentativas foram feitas por diferentes pesquisadores. Um dos primeiros relatos de tentativa de poliploidização foi feita por Hofmeyer e Elden (1942), que utilizaram solução de colchicina em sementes de mamoeiro e obtiveram alguns genótipos com o fenótipo indicativo de autotetraploides, induzindo pela primeira vez a poliploidização na espécie. Clarindo et al. (2008) observaram plântulas de mamoeiro obtidas via cultura de embrião zigótico imaturo *in vitro* e identificaram via citometria de fluxo genótipos diploides, triploides, tetraploides, mixiploides e aneuploides, evidenciando que a cultura *in vitro* induziu variação somaclonal em mamoeiro.

3.4 MUTAGÊNESE E POLIPLOIDIZAÇÃO

A variabilidade genética é caracterizada pela alteração das frequências gênicas e alélicas em uma população. Estudá-la é imprescindível para elucidar a biologia, conhecer a diversidade e obter informações sobre a evolução das espécies, pois mutação, recombinação e fluxo gênico são forças atuantes sobre a geração de variabilidade genética, sendo fundamentais no processo evolutivo, na adaptação de cada espécie ao seu ambiente ao longo das gerações na qual atua a seleção natural (Brammer, 2002).

As mutações cromossômicas podem ocorrer espontaneamente como podem ser induzidas. Em fruteiras, têm sido reportadas ocorrências de mutações espontâneas de valor agrônomo, que foram usadas para o desenvolvimento de novas cultivares, como, por exemplo, as cultivares de maçã ‘*Royal Gala*’, ‘*Imperial Gala*’, que são mutações ocorridas naturalmente na cultivar *Gala* (Muggleston, 2003).

As mutações induzidas podem ser causadas por agentes físicos (raios X e

gama, ultravioleta, radiação térmica e através de partículas beta) e químicos como o uso de *diethyl sulfate* (DES), *ethyl methane sulfate* (EMS), e colchicina, entre outros (Lapins, 2000). Algumas considerações têm que ser feitas na escolha do produto a ser usado para a indução de mutações como (a) a eficiência do produto, (b) a eficiência na taxa de mutação em relação a efeitos deletérios e (c) a especificidade do agente mutagênico.

A colchicina é um dos produtos mais utilizados para a indução de poliploides e variações morfológicas em plantas (Lapins, 2000). Trata-se de um alcaloide que tem a capacidade de inibir a formação do fuso mitótico em células e tem sido usada em experimentos de indução artificial de poliploidia, em células e tecidos vegetais de diversas espécies (Griffiths et al., 2002).

A poliploidia diz respeito ao aumento no número de conjuntos cromossômicos ou genomas, sendo coletivamente denominados de poliploides aqueles indivíduos com três ou mais conjuntos cromossômicos completos. Pode ser distinguida em autopoliploidia e alopoliploidia. A autopoliploidia consiste na duplicação do número de cromossomos da própria espécie, de modo que ela passa a ter 3, 4, 5, 6 ou mais cópias do mesmo conjunto básico de cromossomos. Já a alopoliploidia é resultante do cruzamento de duas espécies distintas, sendo, posteriormente, o número de cromossomos duplicado, resultando na obtenção de indivíduos com dois ou mais genomas distintos duplicados, provenientes de diferentes espécies (Wright, 1976).

Os alopoliploides geralmente exibem combinações das características dos parentais, podendo os graus de semelhança estar voltados para um ou outro dos genitores caso ocorra dominância, sendo difícil determinar em que nível de extensão as diferenças quantitativas e qualitativas observadas são reflexo de mecanismos genéticos ou da poliploidia em si, cujos efeitos são mais bem avaliados em autotetraploides (Swanson, 1957).

A poliploidia induzida pode ser uma poderosa ferramenta para o melhoramento genético, desde que bem empregada, podendo ser utilizada basicamente de três maneiras: (1) poliploidização na própria espécie, como um modo de tentar conseguir plantas maiores e melhores; (2) poliploidização de um híbrido para restaurar a fertilidade do híbrido estéril, sintetizar uma nova espécie, ressintetizar uma já existente; ou (3) como uma ponte para transferir genes de

interesse entre níveis de ploidia, na mesma espécie ou entre espécies diferentes (Dewey, 1980).

A poliploidia normalmente resulta em um aumento no tamanho das células, observando-se que células tetraploides, geralmente, têm um volume duas vezes superior e um comprimento ou largura 20% a 25% maior do que o de células diploides (Wright, 1976).

A utilização de antimitóticos na agricultura tem sido feita principalmente em programas de melhoramento genético para a geração de plantas poliploides. Essas substâncias antimitóticas se ligam às proteínas que formam as fibras do fuso acromático, denominados tubulinas, impedindo sua despolimerização e, conseqüentemente, suprimindo a formação das fibras, ou ainda inativando os fusos já formados (Guerra, 1989).

Desde a descoberta da ação poliploidizante da colchicina (Blakeslee & Avery, 1937), que no início foi considerada um “elixir do crescimento”, os melhoristas tentam utilizar a indução de poliploidia no melhoramento para obter plantas maiores, melhores e mais produtivas. A colchicina tem a capacidade de inibir o fuso durante a divisão celular, levando à formação de células e plantas com o dobro do número cromossômico (Blakeslee e Avery, 1937).

O mecanismo de ação da colchicina é conhecido. Ela se liga reversivelmente ao dímero de tubulina, causando mudança conformacional que impede a polimerização do fuso mitótico e, conseqüentemente, bloqueia a célula em metáfase. Como os sítios específicos aos quais a colchicina se liga nos dímeros são inacessíveis quando a tubulina está polimerizada na forma de microtúbulos, tal substância atua na tubulina solúvel, impedido-a de se polimerizar. Em microtúbulos já formados, a colchicina impede o crescimento destas estruturas durante a divisão celular (Morejohn et al., 1987; Sluder, 1991).

Diversos métodos de aplicação da colchicina são sugeridos e utilizados, havendo sempre necessidade de ajustes e padronizações, de acordo com a espécie com que se está trabalhando. A aplicação pode ser por imersão do tecido meristemático na solução, por gotejamento da solução sobre o meristema, ou por aplicação de algodão embebido na solução, diretamente sobre o ponto de crescimento (Eigsti e Dustin, 1957; Elliott, 1967), ou colocando a colchicina no meio de cultura *in vitro* (Silva *et al.*, 2000; Väinölä, 2000).

Após a indução, é necessário verificar o sucesso do procedimento. Características morfológicas externas, como “gigantismo” - órgãos maiores e, em geral, mais espessos, podem auxiliar na distinção entre diploides e poliploides (Eigsti e Dustin, 1957; Elliot, 1967) sendo, entretanto, avaliações subjetivas e expostas a falhas frequentes.

O teste definitivo é, sem dúvida, a contagem de cromossomos, processo que demanda tempo, sendo, frequentemente, sugeridas práticas alternativas. Como o aumento do volume celular é um dos primeiros efeitos da duplicação cromossômica, caracteres citológicos como tamanho das células dos estômatos, densidade de estômatos por área e diâmetro dos grãos de pólen são muito utilizados para identificar poliploides (Graner, 1941; Brewbaker, 1952; Evans, 1955; Armstrong e Robertson, 1960; Elliott, 1967; Silva et al., 2000; Beck et al., 2003; Morgan *et al.*, 2003), da mesma forma que o número de plastídios nas células dos estômatos (Bingham, 1968; Boaventura *et al.*, 1981).

Fenotipicamente, os tetraploides, em comparação com os diploides, apresentam folhas maiores em largura do que em comprimento, mais espessas, com tendência a uma coloração mais escura. As asas dos pecíolos são normalmente mais largas e, em algumas variedades, se fundem frequentemente com o limbo foliar. Seu desenvolvimento é mais lento, a ocorrência de brotações vigorosas é menos comum e a copa é menos ereta e mais compacta. Além disso, apresentam florescimento mais retardado e menor frutificação (Cameron & Frost, 1968; Moreira, 1980), embora existam evidências da manifestação de alta produtividade em seleções tetraploides de limão ‘Lisboa’ e de alguns pômulos (Cameron & Frost, 1968).

Quanto à influência da poliploidia sobre o número de sementes, é bem variável, havendo tetraploides que apresentam redução no número de sementes, outros que não mostram alterações (Cameron & Frost, 1968).

Plantas poliploidizadas artificialmente geralmente têm comportamento meiótico mais irregular que plantas diploides, uma vez que o pareamento cromossômico pode formar associações multivalentes, comprometendo a segregação cromossômica em direção aos polos, produzindo cromossomos retardatários, pontes e fragmentos (do Valle *et al.*, 2004). O resultado, dependendo do grau de irregularidades na divisão celular, é a diminuição da fertilidade até a completa esterilidade do indivíduo. Para Stebbins (1950), as

principais causas de esterilidade em autotetraploides são uma série de desarmonias produzidas em vários estágios do ciclo sexual, sendo a meiose a mais importante.

Como consequência do processo meiótico anormal, não ocorre a redução do número de cromossomos nos gametas (Schifino-Wittmann e Dall'agnol, 2001), formando pólen ou óvulo não reduzido ($2n$). Gametas não reduzidos são resultado de um processo meiótico anormal, em que a redução do número cromossômico não ocorre. Essa falha na redução pode ocorrer basicamente de duas formas: na meiose I, pela restituição na primeira divisão (RPD), em que os cromossomos não se dirigem para os polos na anáfase e, em vez de duas células com número haploide de cromossomos na telófase I, há formação de uma célula com número diploide; na meiose II, neste caso, ocorre normalmente, mas resulta em uma díade ao contrário da tétrade esperada. A outra forma de surgimento dos gametas $2n$ é na meiose II, pela restituição na segunda divisão (RSD), em que há falha da citocinese e restituição de núcleos diploides, com formação de díades ou tríades (Schifino-Wittmann e Dall'agnol, 2001).

No Brasil, há relatos da obtenção de melancia triploide sem sementes em pesquisa em condução pelo Centro Nacional de Pesquisa do Semiárido em Petrolina – PE. Esta pesquisa foi iniciada em 1996 quando duas linhagens de melancia tiveram suas sementes submetidas a uma solução de colchicina a 0,2% por 24 horas, tendo sido obtidas 192 possíveis tetraploides, sendo que apenas 53 foram identificadas como prováveis tetraploides. A melancia triploide foi obtida após cruzamento entre material diploide com material tetraploide (Souza *et al.*, 1999). Esse material esteve em fase de avaliação da capacidade de combinação entre linhas tetraploides e diploides para selecionar as melhores combinações que permitirão a síntese de híbridos triploides superiores (Souza *et al.*, 2002).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

Neste estudo, 100 plantas supostamente poliploides foram utilizadas, além de plantas não tratadas (controle) das linhagens SS72/12 e JS12. Essas plantas foram obtidas na pesquisa desenvolvida no Setor de Genética Aplicada (Citogenética) do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CCTA/UENF), conduzida em casa de vegetação do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da UENF.

Ribeiro et al. (2013) utilizaram sementes provenientes de frutos de linhagens dos grupos Solo e Formosa, SS72/12 e JS12, respectivamente. Quatro bandejas de 128 células, contendo substrato Vivato, foram semeadas para cada linhagem. A aplicação de solução aquosa de colchicina a 1% foi feita na gema apical, sendo aplicadas duas gotas pela manhã e duas gotas ao final da tarde, durante três dias consecutivos. Duas bandejas de cada linhagem não receberam tratamento, constituindo o controle.

Uma semana após a aplicação de colchicina, as plantas foram transplantadas para copos plásticos de 300 ml, contendo substrato Vivato, e mantidas em casa de vegetação. O *screening* de plantas supostamente poliploides foi feito segundo o aspecto morfológico, conforme descrito por Hofmeyr e Elden (1942). Desta forma, selecionaram-se entre as plantas tratadas, de cada linhagem, aquelas que apresentavam calos pronunciados, vigor

acentuado, folhas grossas e encarquilhadas. As plantas selecionadas foram transplantadas para sacos plásticos de três litros e mantidas em casa de vegetação por aproximadamente 30 dias.

Posteriormente, 40 plantas de JS12 e 60 de SS72/12, supostamente poliploides, além de 20 plantas do controle de cada linhagem, foram transplantadas para o campo localizado na área de convênio da UENF com o Centro Estadual de Pesquisa em Agroenergia e Aproveitamento de Resíduos. As plantas mantidas no campo foram dispostas em fileiras simples com espaçamento de 4 m x 2 m entre covas, com 20 plantas por fileira, sendo a irrigação por aspersão. Os tratos culturais foram feitos conforme recomendação para a cultura, e a sexagem, tão logo as plantas floresceram. Durante o experimento, algumas plantas morreram devido à ocorrência do vírus do mosaico, tendo o restante das plantas tratadas sido avaliadas, além das linhagens controle (JS12 e SS72/12).

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 CARACTERIZAÇÃO CITOLÓGICA

4.2.1.1 ANÁLISE MEIÓTICA

Botões em diferentes estádios de desenvolvimento foram coletados em plantas hermafroditas, ao caso, em solução fixadora de etanol e ácido acético na proporção 3:1, sendo conservados em freezer até o momento do preparo da lâmina. No preparo das lâminas, as anteras foram maceradas (squash) em gota de carmim acético a 1% e, posteriormente, após a retirada dos debris e do excesso de corante, a lamínula foi sobreposta, e as lâminas observadas sob microscópio ótico.

A determinação do nível de ploidia foi feita pela contagem de cromossomos e do tipo de pareamento predominante e a segregação dos cromossomos. O número cromossômico foi determinado, no mínimo, em cinco células em meiose, nas fases de diacinese ou metáfases, anáfases e telófases I e II. Foi também observada ocorrência de anomalias durante a divisão.

Foi estimado o percentual de produtos pós-meióticos e a frequência de gametas não reduzidos ($2n$). Para tal, foram preparadas cinco lâminas por botão

em cada planta analisada, sendo contabilizados 100 produtos pós-meióticos por lâmina, totalizando 500 por botão. No momento do preparo da lâmina, as anteras foram maceradas em gota de carmim acético a 1%.

Foram contados por genótipo, os produtos pós-meióticos normais e os anormais, sendo considerados produtos pós-meióticos normais as tétrades, e como anormais, as mônades, díades, tríade, políades e tétrades com micronúcleos. Posteriormente, foram estimados os percentuais de produtos pós-meióticos.

A frequência de gametas não reduzidos ($2n$) por genótipo foi estimada conforme Yan et al (1997):

$$\text{Frequência de gametas } 2n = \frac{(2D+Tr)}{(2D+3Tr+4T)} \times 100$$

Em que:

D corresponde ao número de díades; Tr, ao número de tríades; e T, ao número de tétrades. O numerador ($2D + Tr$) representa o número total de gametas $2n$ observados. O denominador ($2D + 3TR + 4T$) representa o número total de gametas observados.

Os resultados foram submetidos à análise de variância, considerando um delineamento inteiramente casualizado, em que cada lâmina foi considerada uma repetição. As médias foram comparadas via teste Tukey, utilizando o programa GENES (Cruz, 2013).

4.2.1.2 VIABILIDADE POLÍNICA

Para a análise da viabilidade polínica, botões florais na antese foram coletados em etanol 70% e conservados a 4°C até o momento de preparo das lâminas. Posteriormente, quatro anteras foram maceradas em solução tripla de Alexander para a liberação dos grãos de pólen (Alexander, 1969).

Foram preparadas três lâminas por genótipo, e em cada lâmina foram contados e classificados 500 grãos de pólen por lâmina. A classificação dos grãos de pólen foi feita em duas classes: os viáveis, de coloração vermelho-púrpura, e os grãos de pólen inviáveis, de coloração verde ou com o citoplasma retraído. Para controle, foram utilizadas as linhagens originais diploides (SS72/12 e JS12).

Por último, calculou-se a porcentagem de grãos de pólen viáveis por genótipo. Os resultados obtidos nessas avaliações foram submetidos à análise de

variância, considerando um delineamento inteiramente casualizado, em que a lâmina foi considerada a repetição. As médias foram comparadas via teste Tukey, utilizando o programa GENES (Cruz, 2013).

4.2.1.3 CAPTURA DAS IMAGENS

Todas as observações foram feitas sob microscópio óptico Olympus BX60, e as imagens ópticas, capturadas, utilizando o programa Image-Pro-Plus versão 5.1 (Media Cybernetics).

4.2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FRUTOS

Neste trabalho, ocorreu alta taxa de mortalidade das plantas causada pelo vírus do mosaico, assim como de reversão sexual nas plantas com flores hermafroditas de todos os materiais, de maneira mais acentuada nas plantas JS12 tratadas.

As plantas com frutos avaliados foram dispostas em 08 tratamentos (Tabela 01). Os tratamentos foram separados segundo as características das plantas: quanto ao genótipo, se controle ou tratado; quanto ao sexo, se hermafrodita (HERM) ou feminina (FEM); e quanto à ploidia, se diploide ($2n=2x=18$) ou tetraploide ($2n=4x=36$).

Tabela 1 – Descrição dos oito grupos nos quais as plantas com frutos foram alocadas para avaliação, com respectivos números de plantas e frutos avaliados em cada grupo.

TRATAMENTO	SEXO	PLOIDIA	Nº PLANTA	Nº FRUTOS
01 – SS72/12 – CONTROLE	HERM	$2n=2x=18$	05	25
02 – SS72/12 – TRATADO	HERM	$2n=2x=18$	06	37
03 – SS72/12 – TRATADO	HERM	$2n=4x=36$	06	22
04 – SS72/12 – TRATADO	FEM	DESC	08	36
TOTAL	-	-	25	120
05 – JS12 – CONTROLE	HERM	$2n=2x=18$	05	25
06 – JS12 – TRATADO	HERM	$2n=2x=18$	02	04
07 – JS12 – TRATADO	HERM	$2n=4x=36$	03	11
08 – JS12 – TRATADO	FEM	DESC	05	11
TOTAL	-	-	15	51

Hermafrodita (HERM), Feminina (FEM), Desconhecida (DESC)

Foi feita a colheita em todas as plantas tratadas que produziram frutos e em cinco plantas dos controles de ambos os genótipos. Os frutos foram coletados com 75% de casca alaranjada. Em cada fruto, foram feitas as seguintes mensurações, conforme IPGRI (1995):

4.2.2.1 PESO DE FRUTO (PF - g)

A pesagem dos frutos foi expressa em gramas e efetuada em balança analítica, para cada fruto, separadamente.

4.2.2.2 COMPRIMENTO DO FRUTO (CF - mm)

As medidas de comprimento foram feitas nas dimensões longitudinais dos frutos, com a utilização de paquímetro.

4.2.2.3 DIÂMETRO DO FRUTO (DF - mm)

O diâmetro do fruto foi obtido pela medida da dimensão transversal dos frutos, com a utilização de paquímetro.

4.2.2.4 ESPESSURA MÉDIA DA POLPA DO FRUTO (EPF - mm)

A espessura média da polpa dos frutos foi obtida pela medição do mesocarpo, após o corte transversal do fruto, com uso de paquímetro, medindo a espessura maior e menor do mesocarpo.

4.2.2.5 NÚMERO DE SEMENTES POR FRUTO

No Laboratório, os frutos foram cortados e suas sementes retiradas e colocadas em placas de Petri. As sementes foram contadas e classificadas em bem formadas (sementes viáveis) e sementes mal formadas (sementes inviáveis). Sementes chochas ou mal formadas ou de cor branca foram consideradas mal formadas e as sementes completamente íntegras de cor preta foram consideradas bem formadas.

4.2.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis obtidas foram analisadas utilizando os recursos computacionais do programa SAS (Statistical Analysis System, 1995). Foi feita análise de variância (ANOVA), e as médias, comparadas via teste Tukey a 5%

de probabilidade. Com base nas análises de variância de cada característica, foram obtidas as estimativas de variância genotípica e a variância fenotípica, assim como as estimativas de parâmetros genéticos como o índice de variação, coeficiente de variação experimental e coeficiente de variação genotípica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA

Foram selecionadas 100 plantas tratadas para serem transplantadas ao campo, destas poucas sobreviveram devido a incidência do vírus do mosaico, além da ocorrência da reversão sexual em algumas. Foram estudadas 37 plantas tratadas, destas, 17 eram femininas e 20 hermafroditas. Algumas plantas tratadas apresentaram um excessivo brotamento com os primórdios foliares encarquilhados e espessos. Assim como algumas plântulas tratadas apresentaram o tecido foliar com uma coloração verde mais acentuada e folhas coriáceas, quando comparadas com as plântulas não tratadas (Figura 1) características similares as observadas por Hofmeyr e Elden (1942).

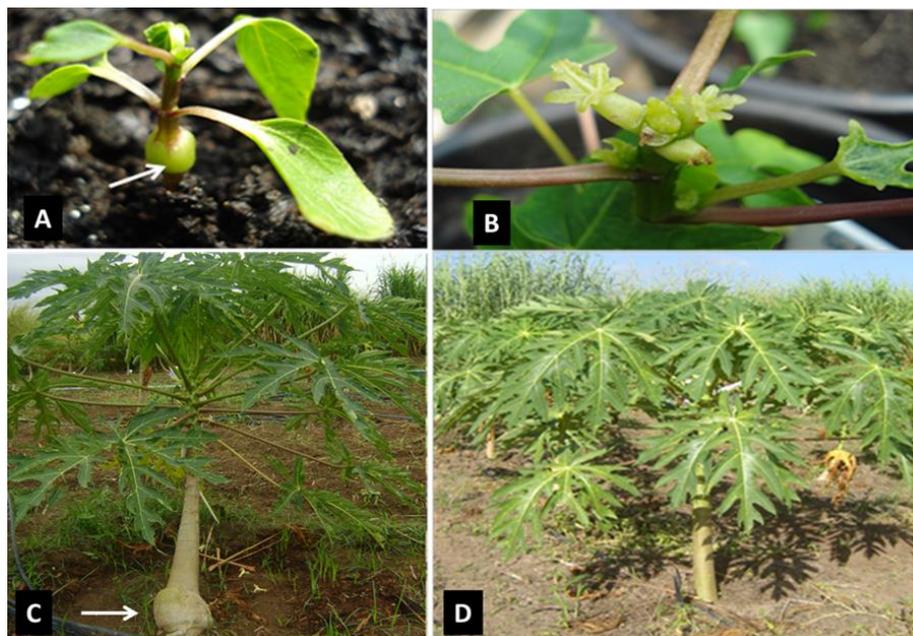


Figura 1 - Obtenção de autotetraploides em mamoeiro. (A) - Plântulas de JS12 tratadas com solução de colchicina em que se observa o calo (seta) e (B) - Proliferação de gemas a partir do ponto de aplicação da solução. (C) - Planta autotetraploide de JS12 e (D) - planta diploide de JS12, observa-se presença do calo na planta adulta (seta).

Todas as plantas tratadas e cultivadas no campo, inclusive os controles, foram avaliadas via meiose, com exceção das plantas femininas devido a dificuldade de se obter um protocolo eficiente para a contagem dos cromossomos. Das 20 plantas hermafroditas tratadas, supostamente autotetraploides, 12 delas, seis advindas do JS12 e seis do SS72/12, tiveram a natureza autotetraploide confirmada apresentando $2n=4x=36$ cromossomos (Figura 2 e Figura 3 – C e F).

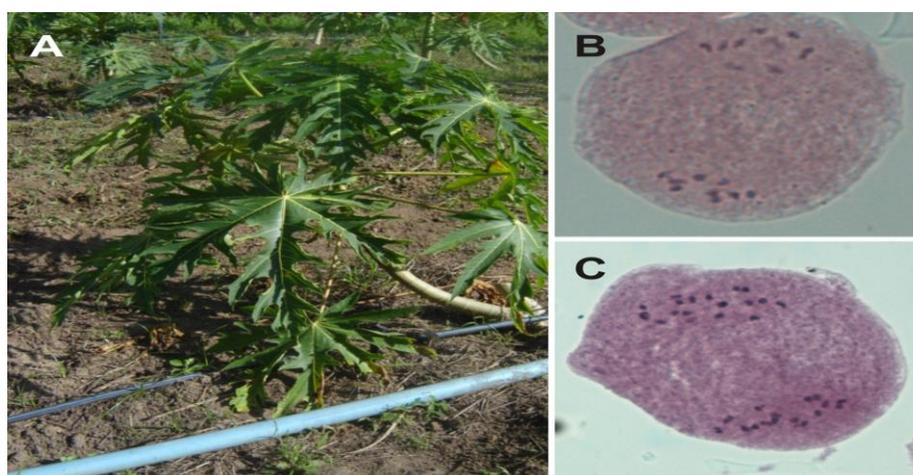


Figura 2 - (A) - Planta tetraploide JS12 – F1P01; (B) - Célula em telófase I de JS12 diploide – controle, onde se observa 9 cromossomos em cada polo; (C) - Célula em telófase I da planta tratada JS12, onde se observa 18 cromossomos em cada polo, confirmando sua natureza tetraploide.

Por outro lado, 8 genótipos tratados apresentaram $2n=2x=18$ cromossomos, sendo um JS12 e sete SS72/12, mantendo assim o mesmo nível de ploidia bem como o mesmo número de cromossomos, não diferindo dos controles (Figura 3 - B e E), concluindo-se que alguns genótipos não responderam a poliploidização.

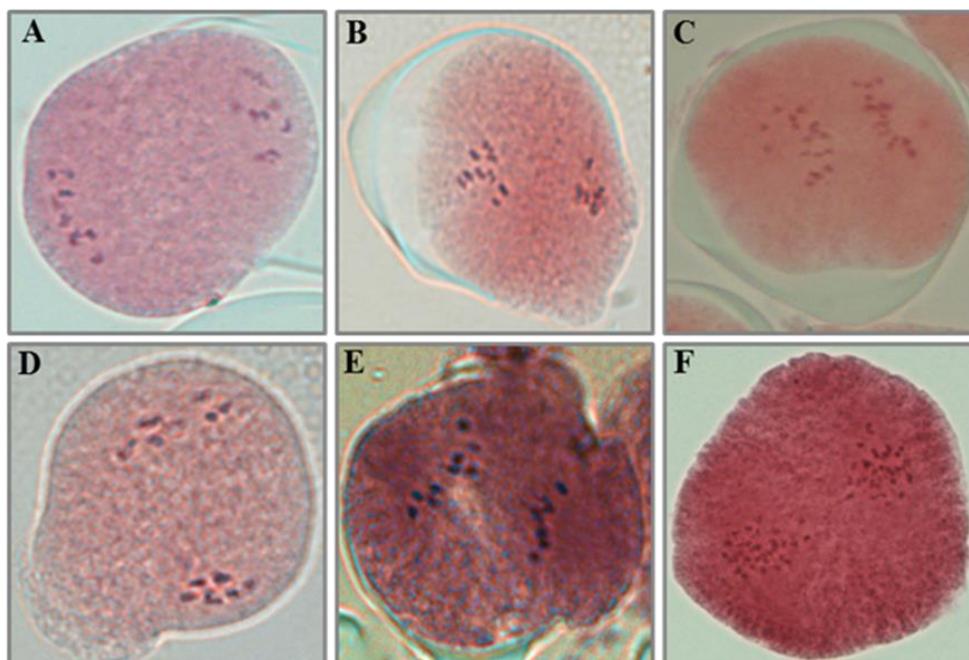


Figura 3 – Anáfases com diferentes níveis de ploidia nos genótipos de mamoeiro analisados. (A) - Anáfase de JS12 controle, diploide ($2n = 2x = 8$); (B) - Anáfase de JS12 tratado com colchicina, diploide ($2n = 2x = 18$); (C) - Anáfase de JS12 tratado com colchicina, autotetraploide ($2n = 4x = 36$ cromossomos) (D) – Anáfase SS72/12 controle, diploide ($2n = 2x = 18$); (E) - Anáfase de SS72/12 tratado com colchicina, diploide ($2n = 2x = 18$) e (F) Anáfase de SS72/12, genótipo tratado com colchicina, autotetraploide ($2n = 4x = 36$ cromossomos).

Plantas poliploidizadas geralmente têm comportamento meiótico irregular devido ao pareamento multivalente dos cromossomos, comprometendo a segregação cromossômica em direção aos polos, produzindo cromossomos retardatários, pontes e fragmentos (do Valle et al., 2004).

Nesse estudo, foram observadas algumas anormalidades durante a divisão meiótica dos genótipos estudados, como, por exemplo: cromossomos univalentes (Figura 4 - A e B), falta de sincronismo (Figura 4 - D) e segregação precoce dos cromossomos (Figura 4 - C e E). Entretanto, algumas dessas anomalias foram também observadas em mamoeiro diploide (Damasceno Junior,

2010; Bajpai e Singh, 2006), em *V. monoica*, *V. cundinamarcensis* (Damasceno Junior, 2013) e em *V. pubescens* (Zerpa, 1980).

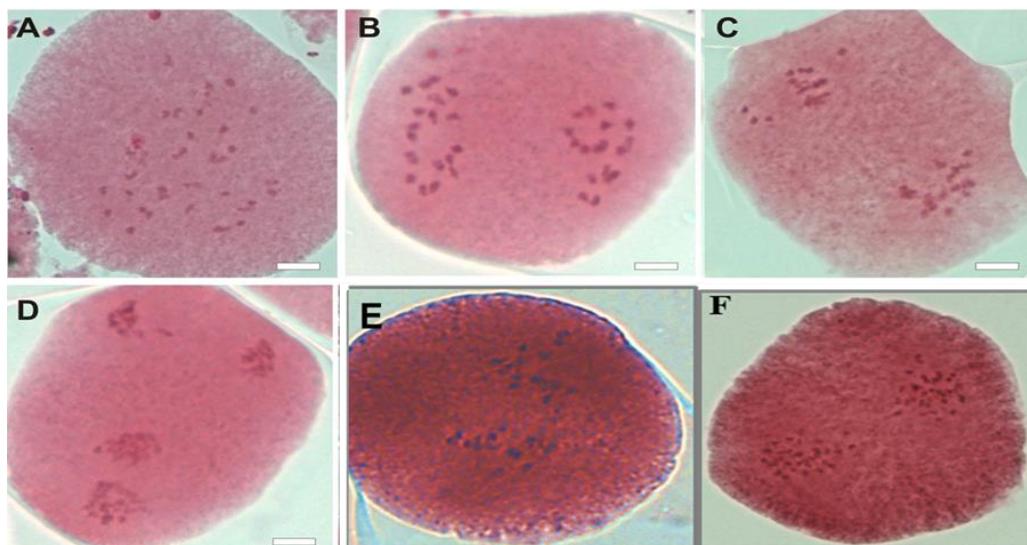


Figura 4 - Anormalidades observadas na meiose dos genótipos de mamoeiro autotetraploides tratados com solução de colchicina: A e B - cromossomos univalentes; C e E - segregação precoce dos cromossomos; e D- falta de sincronismo.

Cromossomos retardatários foram observados por Corrêa et al. (2005) em algumas células com ocorrência de cromossomos dispostos fora da placa equatorial durante a fase de metáfase e cromossomos retardatários durante as fases de anáfase e telófase, tanto na meiose I como na II.

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

Também foram observadas, durante a meiose, falta de sincronismo na divisão celular e segregação precoce. Alguns autores associam a segregação precoce de cromossomo em mamoeiro à existência de cromossomos sexuais, porém espécies com cromossomos pequenos podem apresentar problemas de segregação durante a meiose (Schubert, 2007), provavelmente o caso das espécies Caricáceas, já que a segregação precoce tem sido observada por outros autores (Storey, 1953; Bajpai e Singh, 2006, Damasceno Junior et al, 2010).

As irregularidades meióticas podem resultar em produtos pós-meióticos anormais e desbalanceados.

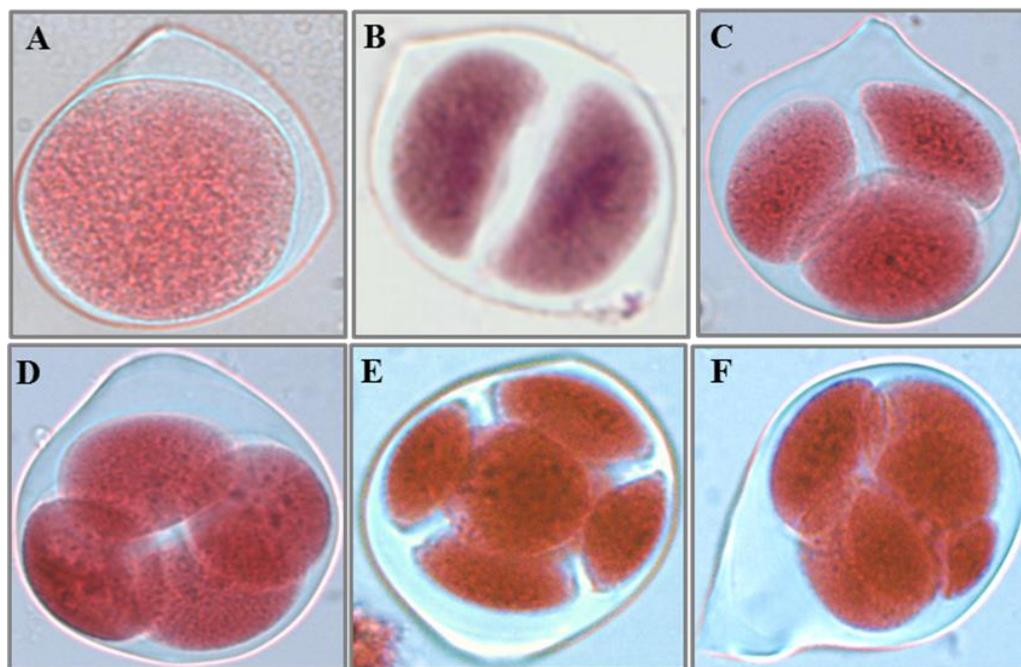


Figura 5 - Produtos pós-meióticos observados nos genótipos tratados. A-Mônades; B-Díade; C-Tríade; D-Tétrade; E-Políade. F-Tétrade com micronúcleo.

Como pode ser verificado na Tabela 2, foram observadas mônades, díades, tríades, políades e tétrades com micronúcleos resultantes das anormalidades observadas durante a meiose (Figura 5). Considerando as anormalidades meióticas, as tríades (Figura 5 – C), foram as mais frequente em todos os genótipos autotetraploides, variando de 15.8% a 33% nos autotetraploides JS12 e de 8% a 30% nos autotetraploides SS72/12.

A presença de tríades e díades podem explicar a ocorrência de gametas não reduzidos ($2n$) em alguns genótipos como JS12 e SS72/12 (Tabela 2). A frequência de gameta $2n$ foi relativamente alta nos autotetraploides advindos do JS12, em que se observou uma variação de 11,17% a 34,90%, e nos autotetraploides advindos do SS72/12, em que a variação ficou entre 3,07% e 10,34%, valores relativamente baixos quando comparados com os autotetraploides JS12. Gametas não reduzidos podem ser detectados citologicamente, pela presença de díades e tríades ao final da telófase II (Ortiz et al., 1992; Yan et al., 1997).

Gametas não reduzidos ($2n$) são resultantes de um processo meiótico anormal, em que a redução do número cromossômico não ocorre. Essa falha na redução pode ocorrer basicamente de duas formas: na meiose I, pela restituição na primeira divisão (FDR), em que os cromossomos não se dirigem para os polos

na anáfase e, em vez de duas células com número haploide de cromossomos na telófase I, há formação de uma célula com número diploide; a meiose II, neste caso, ocorre normalmente, mas resulta em uma díade ao contrário da tétrade esperada. A outra forma de surgimento dos gametas $2n$ é na meiose II, pela restituição na segunda divisão (SDR), em que há falha da citocinese e restituição de núcleos diploides, com formação de díades ou tríades (Schifino-Wittmann & Agnol, 2001).

O percentual de tétrades normais, Figura 5 – D, nos genótipos autotetraploides JS12 variou de 25% a 53,60% e de 59,20% a 62% nos autotetraploides de SS72/12. As linhagens controle apresentaram 96,4% e 89,4% para JS12 e SS72/12, respectivamente (Tabela 2). Nos genótipos tratados, não duplicados, o percentual de tétrades variou de 75,8% a 91,8%, valores que podem ser considerados satisfatórios, já que a literatura registra valores próximos a estes para genótipos diploides.

As políades e as tétrades com micronúcleos podem gerar gametas desbalanceados pela presença de micronúcleos, considerados cromossomos retardatários perdidos durante a divisão celular (Figura 5 - E).

Tabela 2– Frequência de produtos pós-meióticos, gametas não reduzidos (F2n), porcentagem de viabilidade polínica (VP) e ploidia (2n) dos genótipos SS712/12 e JS12 controle e tratados.

Genótipos	2n	Produtos Pós-Meióticos (%)						F2n	VP (%)
		TR	T	D	M	P	TRm		
JS12 – Controle	2n=2x=18	96,4 ^a	2,2	0	0	1,2	0	0,56%	89,80a
JS12 - F2 P17	2n=2x=18	96,6 ^a	2,6	0	0	0,8	0	0,66%	73,40a
JS12 - F1 P14	2n=4x=36	53,6bc	20,2	0	13,8	9,8	2,6	7,35%	2,67d
JS12 - F1 P19	2n=4x=36	57,6bc	17,6	0	15,8	9,0	0	6,21%	3,00d
JS12 - F2 P16	2n=4x=36	45,6cd	33,0	0	3,6	15,8	2,0	11,73%	3,74d
JS12 - F2 P02	2n=4x=36	43,4d	15,8	0	11,6	28,0	1,2	7,15%	9,20cd
JS12 - F1 P10	2n=4x=36	44,0d	19,8	1,4	28,2	0,6	6,0	9,49%	13,70bcd
JS12 - F1 P12	2n=4x=36	25,0e	25,0	15,6	24,2	4,2	6,0	27,26%	1,87d
SS72/12-Controle	2n=2x=18	89,4 a	7,2	0	3,0	0,4	0	1,90%	97,5a
SS72/12 - F7P03	2n=2x=18	91,8 a	5,0	0	3,2	0	0	1,31%	96,6a
SS72/12 - F7P07	2n=2x=18	91,2 a	6,6	0	2,2	0	0	1,72%	93,4a
SS72/12 - F7P14	2n=2x=18	88,8 a	8,4	0	2,4	0,4	0	2,21%	94,3a
SS72/12 - F5P13	2n=2x=18	83,4 ab	15	0	0	1,6	0	3,96%	90,5a
SS72/12 - F4P10	2n=2x=18	74,4 b	13,8	0	2,0	8,6	1,2	4,07%	91,3a
SS72/12 - F5P02	2n=2x=18	75,6 b	22,4	0	2,0	0	0	6,06%	88,93a
SS72/12 - F5P10	2n=2x=18	75,8 b	24,2	0	0	0	0	6,44%	86,9a
SS72/12 - F7P01	2n=4x=36	62,0 c	26,6	0,2	0,6	4,4	6,2	8,23%	6,87de
SS72/12 - F5P11	2n=4x=36	59,2 c	8,0	0	0	21,8	11,0	3,07%	26,9cde
SS72/12 - F5P18	2n=4x=36	58,6 c	21,4	0	8,4	5,0	6,6	7,17%	23,9cde
SS72/12 - F7P04	2n=4x=36	56,8 c	19,6	0	0	14,8	8,8	6,85%	56,9b
SS72/12 - F4P13	2n=4x=36	54,8 c	18,8	0	10,8	11,6	4,0	6,82%	2,7e
SS72/12 - F7P11	2n=4x=36	59,2 c	30,0	0	3,0	4,0	3,8	9,18%	2,3e

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si no teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Tétrades (TR), tríades (T), díades (D), mônades (M), poliades (P), tétrades com micronúcleos (TRm), gametas não reduzidos, viabilidade polínica (VP).

A determinação da viabilidade do pólen é importante na investigação das causas de infertilidade das plantas e dos problemas de fertilidade que possam ocorrer (Peñaloza, 1995). Grãos de pólen viáveis, quando corados com solução tripla de Alexander, apresentam o citoplasma na cor vermelho/púrpura em função da reação da fucsina básica com os componentes do citoplasma, enquanto grãos de pólen inviáveis se colorem de verde em função da reação do corante verde malachita com a parede do grão de pólen (Alexander, 1969). A solução tripla de Alexander foi eficaz na distinção de grãos de pólen viáveis dos inviáveis (Figura 6).

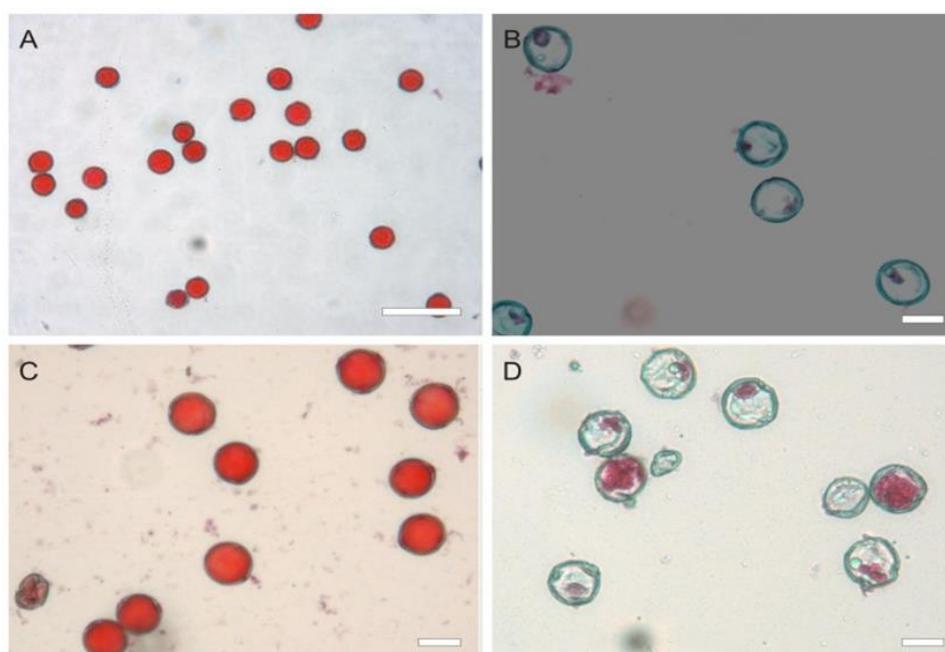


Figura 6 - Grãos de pólen corados com solução tripla de Alexander: A e C - plantas controle em que se observam grãos de pólen viáveis, respectivamente, e B e D do genótipos tratados JS12 e SS72/12 com colchicina, em que se observam grãos de pólen inviáveis.

Como esperado, a viabilidade polínica dos autotetraploides foi baixa, variando de 1,87% a 13,70% em autotetraploides JS12 e de 2,33% a 56,9% em autotetraploides SS72/12. Nos genótipos tratados, mas não duplicados, a viabilidade polínica não diferiu da viabilidade polínica dos genótipos originais (controle) tanto JS12 quanto SS72/12. Assim, conclui-se, neste estudo, que as plantas poliploides têm viabilidade polínica muito baixa, em alguns casos a planta é praticamente estéril, Tabela 2, o que já era previsto, dadas as irregularidades meióticas observadas em autotetraploide (Figuras 4 e 5).

Bajpai e Singh (2006), avaliando a viabilidade polínica de dez variedades de mamoeiro, observaram que este índice variou de 11,64% a 83,95%. Damasceno Junior et al. (2010) observaram valores de 96% e 70,93% para as espécies *C. papaya* e *V. monoica*, respectivamente.

Mendes (1994) relata que a presença de tétrades anormais é um fator indicativo de ocorrência de um processo meiótico irregular, que, conseqüentemente, leva ao desenvolvimento de grãos de pólen com diminuição da taxa de viabilidade polínica, o que explica o fato de as plantas poliploides terem viabilidade polínica muito baixa.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS FRUTOS

A análise de variância apresentada na Tabela 3 mostrou diferenças significativas, pelo teste F ($P \leq 0,01$), entre os genótipos, para todas as características avaliadas. Porém quando a fonte de variação foi planta dentro de genótipo (Planta (Genótipo)), não houve diferença significativa para maioria das características, diferindo apenas para as características comprimento e diâmetro de fruto.

O coeficiente de variação genotípica (CVg) auxilia a definir com maior precisão as estratégias de melhoramento, além de permitir a comparação da variabilidade genotípica das diferentes características. O CVg apresentou para as características peso, diâmetro e número de semente viável, valores moderados a altos (acima de 30%).

Com relação ao coeficiente de variação experimental (CVe), as estimativas para as características avaliadas, que estão abaixo de 20%, indicam uma boa precisão experimental. Contudo, para algumas características como peso, diâmetro e número de semente viável, as estimativas mostraram valores bastante elevados para CVe. Esse resultado sugere que essas características são bastante influenciadas por fatores ambientais como temperatura e umidade, por exemplo

Tabela 3 – Resumo da análise de variância (ANOVA) para as características avaliadas nos genótipos estudados.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio					
		Peso (g)	Espessura (mm)	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Stes viáveis	Stes inviáveis
Genótipos	7	1.670.431,01**	124,37**	51.456,48**	2.516,11**	613.791,76**	19.395,09**
Planta (Gen)	32	47.785,00 ^{ns}	13,53 ^{ns}	1.029,27**	403,12**	4.4005,52 ^{ns}	6.847,61 ^{ns}
Erro	131	25.607,44	7,12	197,32	88,94	21.320,38	3.091,27
CVe(%)		41,84	13,64	11,51	12,37	80,67	98,70
CVg(%)		41,79	6,92	23,19	64,64	53,160	28,33

**₁, ^{ns} Significativo a 1% e não significativo pelo teste F, respectivamente. Grau de Liberdade (G.L.), Genótipos (Gen), Sementes (Stes), milímetro (mm) o coeficiente de variação experimental (CVe) e o coeficiente de variação genotípica (CVg).

As estimativas do coeficiente de variação experimental (CVe) foram de 11,51% para comprimento, de 12,37 % para diâmetro, de 13,64% para espessura, de 41,84% para peso, de 80,67% para sementes viáveis e de 98,70% para sementes inviáveis, evidenciando assim que a precisão experimental foi média para algumas características, exceto para peso, número de sementes viáveis e inviáveis, que foi alta. Isso se deve ao fato de ter ocorrido uma grande variação dessas características nos genótipos avaliados.

O coeficiente de variação (CV) é definido como a estimativa do erro experimental em porcentagem da estimativa da média (Steel & Torre, 1980). Segundo Pimentel Gomes (2000), em experimentos de campo, se o coeficiente de variação for inferior a 10%, considera-se como baixo, ou seja, o experimento tem alta precisão, de 10% a 20%, os CVs são considerados médios, implicando boa precisão, de 20% a 30%, são julgados altos, significando baixa precisão e, acima de 30%, são tidos como muito altos, indicando baixíssima precisão.

Quando as médias para as características avaliadas nos frutos dos genótipos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre os genótipos, o genótipo controle JS12 apresentou as maiores médias para todas as características avaliadas, com exceção de sementes inviáveis (Tabela 4). No genótipo SS72/12 os frutos das plantas do controle não diferiram estatisticamente dos tratados para as características peso, espessura e comprimento, mas diferiram para diâmetro e número de sementes viáveis e inviáveis. Já no genótipo JS12, as médias dos frutos das plantas do controle diferiram para todas as 06 características avaliadas quando comparadas com todos os genótipos tratados JS12.

As médias entre os tratamentos SS72/12 Controle /Hermafrodita/ Diploide X SS72/12 Tratada/Hermafrodita/tetraploide não apresentaram diferença significativa para as características peso, espessura e comprimento do fruto em relação ao controle, diferindo apenas para as características diâmetro do fruto, número de sementes viáveis e número de sementes inviáveis. Por outro lado, as médias entre os tratamentos JS12 Controle/Hermafrodita/Diploide X JS12 Tratada/Hermafrodita/tetraploide apresentaram diferenças significativas para todas as características avaliadas. Souza et al. (2004), avaliando caracteres morfológicos na identificação de plantas poliploides de melancia, relatam que foram observadas diferenças significativas entre os grupos de ploidia para todas

as características avaliadas e que para os frutos, com exceção da relação diâmetro transversal/diâmetro longitudinal, todas as variáveis manifestaram maiores médias em nível dos genótipos triploides.

Pode-se observar que o efeito da colchicina sobre os frutos das linhagens SS72/12 e JS12 foi diferenciado, pois as linhagens autotetraploides JS12 apresentaram frutos menores (Figura 6) quando comparadas com os frutos das plantas controle JS12 (Figura 6 - E). O mesmo comportamento não foi observado nas linhagens autotetraploides de SS72/12, Figura 6, considerando que os frutos não sofreram grandes alterações no tamanho. Quanto ao número de sementes, foi observada redução tanto nas linhagens autotetraploides JS12 quanto nas SS72/12. Esse resultado já era esperado considerando as irregularidades da meiose bem como a baixa viabilidade polínica dos genótipos. Resultados semelhantes foram obtidos por Souza et al. (1999) e Jaskani et al. (2005) trabalhando com melancia.

Tabela 4 – Médias para as seis características avaliadas nos frutos (Tukey, $p < 0.05$).

GENÓTIPO	SEXO	PLOIDIA	MÉDIAS					
			PESO (g)	ESPE.S.mm)	COMP.(mm)	DIAM.(mm)	S. VIAVEIS	S.INVIAVEIS
01 – SS72/12 – CONTROLE	HERM	2n=2x =18	349,40 C	18,632 B	114,29 CD	81,818 B	388,84 A	19,08 BC
02 – SS72/12 – TRATADO	HERM	2n=2x =18	214,49 C	16,912 B	101,71 CD	67,243 CD	197,49 B	53,97 AB
03 – SS72/12 – TRATADO	HERM	2n=4x =36	224,91 C	18,564 B	98,33 D	65,103 D	67,09 CB	101,55 A
04 – SS72/12 – TRATADO	FEM	DESC	238,58 C	20,402 B	78,28 E	79,486 BC	8,50 C	86,19 A
05 –JS12 – CONTROLE	HERM	2n=2x =18	1009,6 A	24,580 A	224,33 A	96,608 A	423,88 A	50,00 AB
06 –JS12 – TRATADO	HERM	2n=2x =18	564,25 B	17,608 B	162,97 B	61,343 D	48,25 CB	5,00 C
07 –JS12 – TRATADO	HERM	2n=4x =36	392,00 BC	19,578 B	153,25 B	68,298 CD	19,64 C	10,00 C
08 –JS12 – TRATADO	FEM	DESC	255,40 C	18,602 B	117,73 C	67,326 CD	9,60 C	20,60 BC

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si no teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Hermafrodita (HERM), Feminina (FEM), Desconhecida(DESC), Espessura(ESPE.S.), Comprimento (COMP.), Diâmetro (DIAM.), Sementes (S.)

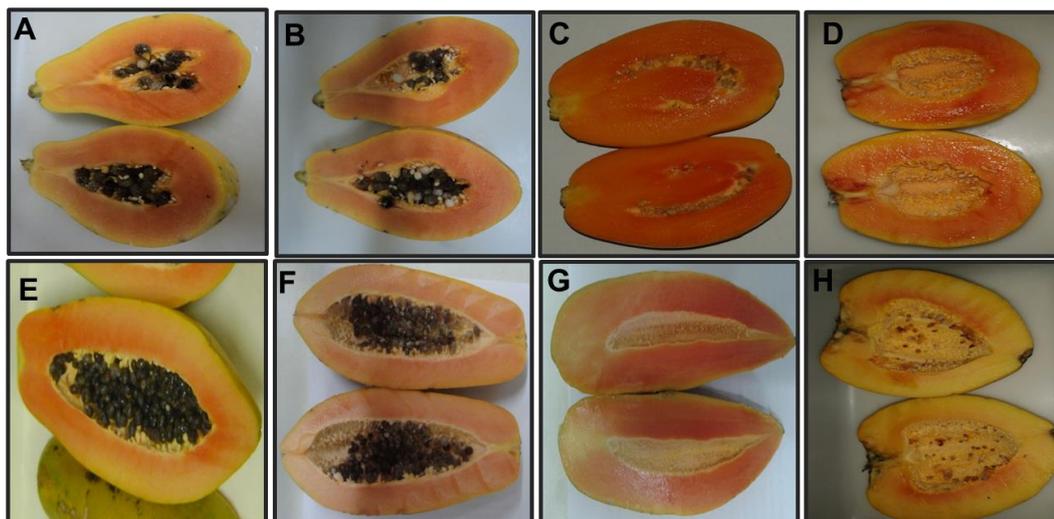


Figura 6 - Frutos avaliados nos genótipos SS72/12 E JS12 controle e tratados.
A- SS72/12 controle diploides; B-SS72/12 tratados diploides; C- SS72/12 tratados tetraploides; D-SS72/12 tratados femininos; E-JS12 controle diploides; F-JS12 tratados diploides; G- JS12 tratados tetraploides; H-JS12 tratados femininos.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, foi possível confirmar a natureza tetraploide de 12 linhagens, seis JS12 e seis SS72/12. A meiose dos tetraploides foi anormal, resultando em um baixo percentual de tétrades normais, presença de gametas não reduzidos e uma baixa viabilidade polínica, características comuns em genótipos autotetraploides.

As linhagens autotetraploides SS72/12 tiveram frutos com médias similares para as características de peso (224,91g), espessura (18,56mm) e comprimento (98,33mm) quando comparadas com as médias dos frutos das plantas controle para as respectivas características (349,40g; 18,63mm; 114,29mm). Já a característica de diâmetro apresentou média menor (65,10mm) quando comparada com o controle (81,81mm).

As linhagens autotetraploides JS12 tiveram frutos com médias para as características avaliadas de peso (392g), espessura (19,57mm), comprimento (153,25mm) e diâmetro (68,29mm) menores quando comparadas com as médias dos frutos das plantas controle para peso (1009,6g), espessura (24,58mm), comprimento (224,33mm) e diâmetro (96,60mm). O número médio de sementes viáveis foi reduzido tanto nas linhagens autotetraploides JS12 (19,64) quanto nas linhagens SS72/12 (67,09) quando comparado com número médio de sementes do controle JS12 (423,88) e do controle SS72/12 (388,84).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, M.P. (1969) Differential staining of aborted and non-aborted pollen. *Stain Tech.* 44:111-122.
- Armstrong, J.M.; Robertson, R.W. (1960) Studies of colchicine induced tetraploids of *Trifolium hybridum* L. II. Comparison of characters in tetraploid and diploid. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, Ottawa, v. 2, p. 371-378.
- Aradhya, M.K., Manshardt, R.M., Zee, F., Morden, C.W. (1999) A phylogenetic analysis of the genus *Carica* L. (Caricaceae) based on fragment restriction length variation in a cp DNA intergenic spacer region. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46:579-586.
- Arkle Jr., T. D.; Nakasone, H. Y. (1984) Floral differentiation in the hermaphroditic papaya. *HortScience*, 19:832-834.
- Badillo, V. M. (1993) Caricaceae – Segundo Esquema. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Univ. Central de Venezuela*. Maracay 64p.
- Badillo, V.M. (2000) *Carica* L. vs *Vasconcella* St. Hil. (Caricaceae): con la rehabilitación de este último. *Ernstia*, 10 (2):74-79.

- Bajpai, A.; Singh, A. K. (2006) Meiotic Behavior of *Carica papaya* L.; Spontaneous chromosome instability and elimination in important cvs. in North Indian conditions. *Cytologia*, 71(2): 131-136.
- Beck, S.L.; Dunlop, R.W.; Fossey, A. (2003) Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). *Botanical Journal of the Linnean Society*, London, v. 141, p. 177-181.
- Bingham, E.T. (1968) Stomatal chloroplasts in alfalfa at four ploidy levels. *Crop Science*, Madison, v.8, p. 509-510.
- Blakeslee, H., Avery, A.G. (1937) Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. *Journal of Heredity*, Washington, v. 28, p.393-411.
- Boaventura, Y.M.S.; Medina, D.M.; Vieira, M.J.F.R. et al.(1981) Número de cloroplastos e nível de ploidia em espécies de Coffea. *Revista Brasileira de Botânica*, Ribeirão Preto, v. 4, p. 15-21.
- Brammer, S. P. Variabilidade e diversidade genética vegetal: requisito fundamental em um programa de melhoramento. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. 9p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online).Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do29.htm>.
- Brewbaker, J.L. (1952) Colchicine induction of tetraploids in *Trifolium* species. *Agronomy Journal*, Madison, v. 44, p. 592-594.
- Cavalcante, H.C.; Schifino-Wittman, M.T.; Dornelles, A.L.C (2000) Meiotic behaviors and pollen fertility in a open-pollinated population of “Lee” mandarin [*Citrus clemantina* x (*C. paradise* x *C. tangerine*)]. *Scientia Horticulturae*, 86: 103-111.
- Cameron, J.W.; Frost, H.B. (1968) Genetics, breeding and nucellar embryony. In: Reuther, W.L.; Batchelor, L.D.; Webber, H.J. (Eds.). *The Citrus Industry*.Berkeley, University of California Press, v.2, p.325-370.

- Cardoso, C. E. L.; Almeida, C. O.; Nascimento, A.S. (2000). Frutas: tendências e implicações para o setor. <http://www.embrapa.br:8080>.
- Corandie, W. (1992) Origin of the papaya. In: Papaya. Pretória: Institute for tropical and Subtropical Crops, p.3-4.
- Clarindo, W. R.; Carvalho, C. R.; Araújo, F.S.; Abreu, I. S.; Otoni, W. C. (2008) Recovering polyploid papaya in vitro regenerants as screened by flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92: 207-214.
- Corrêa, M.G.S.; Viegas, J.;Silva, J.B.da; Avila, P.F.V.de; Busato, G.C.; Lemes, J.S. (2005) Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. *Acta Botânica Brasileira*,19(2):295-303.
- Cruz, C.D. (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*. v.35, n.3, p.271-276.
- Cruz, C.D.; Carneiro, P.C.S. (2003) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: Editora UFV,. 579p.
- Damasceno Júnior, P. C.; Pereira, T. N. S.; Freitas Neto, M.;and Pereira, M. G. (2010) Meiotic Behavior of *Carica papaya* and *Vasconcellea monoica*). *Caryologia*, Vol. 63, no. 3: 229-236.
- Damasceno Junior, P. C., Costa, F. R., Pereira, T. N. S., Freitas Neto, M.; Pereira, L. G. (2009) Karyotype determination in three Caricaceae species emphasizing the cultivated form (*Carica papaya* L.). *Caryologia* , 62:10-15.
- Damasceno Junior, P. C., Costa, F. R., Neto, M. F., Pereira, T. N., Pereira, M. G. (2007) Cariotipagem convencional de três espécies da família Caricaceae. In: Frutimamão: resumos: Boletim Técnico da III Reunião de Pesquisas do Frutimamão, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 227-229.

- Darlington, C. D.; Wylie, A. P. (1955) Chromosome Atlas of Flowering Plants. Allen & Unwin Ltd., London, 519 p.
- Dantas, J. L. L.; Oliveira, E. J. (2009) O melhoramento genético do mamoeiro: avanços, desafios e perspectivas. In: I Simpósio nordestino de genética e melhoramento de plantas, Fortaleza - CE. O melhoramento genético 63 no contexto atual. Fortaleza – CE. Anais. Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. v. 1. p. 151-180.
- Darlington C. D.; Ammal E. K. J. (1945) Chromosome atlas of cultivated plants. George Allen and Unwin LTD., London.
- Datta P. C. (1971) Chromosomal biotypes of *Carica papaya* L. Cytologia 36:555-562.
- Dewey, D.R. (1980) Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding. In: LEWIS, W.H. Polyploidy: biological relevance. New York: Plenum. p. 445 -469.
- Do Valle, C. B.; Bonato, A. L. V.; Pagliarini, M. S.; Resende, R. M. S. & Jank, L. (2004) Apomixia e sua utilização no melhoramento. In: Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília
- Eigsti, O.J.; Dustin, P. (1957) Colchicine in agriculture, medicine, biology and chemistry. Iowa: The Iowa state College Press. 470 p.
- Elliott, F. (1967) Mejoramiento de plantas- citogenética. Mexico: Compañia Editorial Continental, 474 p.
- Evans, A. M. (1955) The production and identification of polyploids in red clover, white clover and lucerne. The New Phytologist, Oxford, v. 54, p. 149-162.

- Ezura, H.; Amagai, H.; Oosawa, A.K. (1993) Efficient production of triploid melon plants by in vitro culture of abnormal embryos excised from dried seeds of diploid x tetraploid crosses and their characteristics. *Japanese Journal of Breeding*, 43: 193-19.
- Faleiro, F.G.; Luz, E.D.M.N.; Cerqueira, A.O.; Rocha, C.S.S.; Neto, A.D.; Flores, A.B.; Bahia, R.C.S.; Faleiro, A.S.G. (2004) Caracterização e diversidade de isolados de *Phytophthora* spp do cacauero com base em marcadores moleculares RAPD. *Fitop. Bras.*, n.29, v.3, p.303-306,.
- Gabrovska I.; Valdivieso, A.S.; Becquer, A.; Saenz, B. (1967) Las enfermedades virosas de la fruta bomba (*Carica papaya* L.) en Cuba. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, v.1, p.1-21.
- Gill, B. S.; Friebe, B. (1997) Plant cytogenetics at the dawn of the 21st century. *Current Opinion in Plant Biology*. 1: 109-115p.
- Graner, E. A. (1941) Polyploid cassava induced by colchicine treatment. *Journal of Heredity*, Washington, v. 32, p. 281-288.
- Griffiths, A. J. F.; Miller, J. H.; Suzuki, D.J.; Lewontin, R. C.; Gelbart, W. M. (2002) Mutaç o cromossômica. II:mudan a no número de cromossomos. In: *Introdu o   genética*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.p. 521-539.
- Guerra, M., (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética*, 4:741-743.
- Harkness, R.W. (1967) *Papaya growing in Florida*. Florida: Fla. Agr. Ext. Serv.
- Hofmeyr, J. D. J. (1967) Some genetic breeding aspects of *Carica papaya* L. *Agronomia Tropical*, 17: 345–51.
- Hofmeyr, J.D.J.; Van Elden, H. (1942) Tetraploidy in *Carica papaya* L. induced by colchicine. *South African Journal of Science* 33: 181-185.

- Hofmeyr, J. D. J. (1938) Genetical studies of *Carica papaya* L., Africa Dept. Agric. For. Sci.Bul.,187: 1-64.
- IBGE. Banco de Dados Agregados. Sistema IBGE de Recuperação Automática-SIDRA. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>.
- Ishii, Y.; Holtzmann, O.W. (1963) Papaya mosaic disease in Hawaii. Plant DiseaseReporter, Beltsville, v. 47, p. 947-951.
- Jaskani, M.J., S.W. Kwon and D.H. Kim. (2005). Comparative study on vegetative, reproductive and qualitative traits of seven diploid and tetraploid watermelon lines. Euphytica, 145: 259-268.
- Kodoru, P. R. K.; Rao, M. K. (1981) Cytogenetics of synaptic mutants in higher plants.Theor. Appl. Genet., 59: 197-214.
- Kumar LSS, Srinivasan VK (1944) Chromosome number of *Carica do decaphylla* Vell. Fl. Flum. Current Science 13:15.
- Kumar, L. S. S., Abraham, A., Srinivasan, V. K. (1945) The cytology of *Carica papaya* Linn. The Indian Journal of Agricultural Science 15: 242-253.
- Liu, Z., Moore, P. H.; Ma, H., Ackerman, C. M.; Ragiba, M.; Yu, Q.; Peari, H. M.; Kim, M. S.; Chariton, J. W.; Stiles, J. I.; Zee, F. T.; Andrew, A. H.; Ming, R. (2004) A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. Nature, 427: 348-352.
- Marin, S.L.D. et al. Hibridação de mamão. (2003) In: Martins D.S. Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno. Incaper, Vitória-ES, p. 173-188.
- Marin, S.L.D., Gomes, J. A. (2000) Cultura do mamão. In: Semana Internacional de Fruticultura e Agroindústria, 7., Instituto Frutal, Fortaleza, 50p.

- Marin, S. L. D.; Gomes, J. A.; Salgado, J. S.; Martins, D. Dos S. & Fullin, E. A. (1995) Recomendações para a cultura do mamoeiro dos grupos Solo e Formosa no Estado do Espírito Santo. 4^o ed. Rev. e ampl. Vitória, ES: EMCAPA,. 57 p. (EMCAPA-Circular Técnica, 3).
- Mendes, M. da Silva. (1994) Viabilidade do grão de pólen de *Solanum* ssp. Dissertação(Tese de mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Micheletti de Zerpa, D. (1959) Citologia de híbridos interespecíficos em *Carica*. *Agron. Trop.*, 8(4): 135-144.
- Ming, R.; Yu, Q.; Moore, P. H. (2007) Sex determination in papaya. *Seminars in Cell and Development Biology*, 18: 401-408.
- Moreira, C. S. Melhoramento de citros. (1980) In: Rodriguez, O.; Viegas, F. *Citricultura brasileira*. Campinas: Fundação Cargill. v. 1, p. 197-223.
- Morejohn, L. C.; Bureau, T. E.; Bajer, M.; Bager, A. S.; Fosket, D. E. (1987) Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. *Planta*, Berlin, v. 172, n. 2, p. 252-264.
- Morgan, E.R.; Hofmann, B.L.; Grant, J.E. (2003) Production of tetraploid *Gentiana triflora* var. *japonica* ‘ Royal Blue’ plants. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, Auckland, v. 31, p. 65-68.
- Muggleston, S. (2003) What is involved in plant breeding? Part II. <http://www.hortnet.co.nz/publications/science>.
- Nakasone, H.Y., Paull, R.E. (1998) Tropical fruits. *Crop production Science in Horticulture*. New York: Cab International, 445p.

- Negrutiu, I., Vyskot, B., Barbacar, N., Georgiev, S., Moneger, F. (2001) Dioecious plants. A key to the early events of sex chromosome evolution. *Plant Physiology* 127: 1418-1424.
- Ortiz, R., Vorsa, N., Bruederle, L.P. (1992) Occurrence of unreduced pollen in diploid blueberry species, *Vaccinium* sect. *Cyanococcus*. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.85, p.55-60.
- 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.
- Peñaloza, A.D.P.S. (1995) Germinação de sementes de *Arachis pintoi* obtidas em condições distintas de multiplicação. In: Reunião Brasileira de Zootecnia, 32., Brasília, DF. Anais... Brasília: SBT. p.78-79.
- Pereira, Telma Nair Santana ; Neto, Monique Freitas ; Junior, Pedro Correa Damasceno ; Rabelo, Fabiane Da Costa ; Pereira, Messias Gonzaga. (2014) Genetic Relationship between *Vasconcellea* and *Carica* Based on Their Chromosome Features. *Cytologia*, v. 79, p. 567-573.
- Pereira, M. G. (2003) Melhoramento Genético do Mamoeiro (*Carica papaya* L.): Desenvolvimento e recomendação de Híbridos. In: I Semana Acadêmica de Horticultura do Espírito Santo – SEAHORTES, 1: 61-65.
- Pickersgill, B. (1977) Chromosomes and evolution in *Capsicum*. In: POCHARD, E. (Ed.). *Capsicum 77*. Avignon-Montfavet, France: Institut National de la Recherche Agronomique. p.27-37.
- Pimentel Gomes, F. (2000) Curso de estatística experimental. 14. ed. Piracicaba: Nobel. 477 p.
- Ribeiro, E.H., Pereira, T. N. S., Neto, M. F., Freitas, L .L., Miranda, J. M., Pereira, M. G. (2013) Caracterização citológica de uma linhagem JS12 autotetraploide.

In: Anais do 7º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Uberlândia – MG. p.983

SAS, Institute INC.SAS/STATTM SAS user's guide for windows environment.6.11 ed. Cary : SAS Institute, 1995.

Schifino-Wittmann, M. T.; Dall'agnol, M. (2001) Gametas não reduzidos no melhoramento de plantas. *Ciência Rural*.Santa Maria, v.31, n.1, p.169-175.

Schubert, I. (2007). Chromosome evolution.*Current Opinion in Plant Biology* 10: 109-115.

Silva, P.A.K.X.M.; Callegari-Jacques, S.; Bodanese-Zanettini, M.H. (2000) Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl.(Orchidaceae) by in vitro techniques. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, p. 105-111.

Sluder, G. (1991) The practical use of colchicine and colcemid to reversibly block microtubule assembly in living cells. In: K. Adolph, editor. Marcel Dekker Inc., *Advanced Techniques in Chromosome Research*. New York. p. 27- 447.

Souza, F.F.; Queiróz, M.A. (2004) Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliploides de melancia. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.22, n.3, p. 516-520.

Souza, M. M.; Pereira, T. N. S.; Martins, E. R. (2002) Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sim sf. *flavicarpa* Degener). *Ciência Agrotécnica*. Lavras 26: 1210.

Souza, F.F; Queiroz, M.A.; Dias, R.C.S. (1999) Desenvolvimento e avaliação de híbridos triploides experimentais de melancia. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento – Encarte Especial*, n.9, p.90-95.

- Stebbins, G. L. (1950) Variation and evolution in plants. Columbia University Press. New York.
- Steel, R. G. D.; Torrie, J. H. (1980) Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. New York: McGraw-Hill Book Company. 633 p.
- Storey, W. B. (1953) Genetics of papaya. *Journal of Heredity*, 44:70–8.
- Storey, W. B. (1941). The botany and sex relations of the papaya. In: *Papaya production in the Hawaiian Island, Honolulu. Hawaii Agr. Exp. St., Univ. Hawaii, Bull. 87, p. 5-22.*
- Storey, W. B. (1938) Segregations of sex types in Solo papaya and their application to the selection of seed. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 35:83–5.
- Swanson, C. P. (1957) Cytology and cytogenetics. New Jersey: Prentice-Hall Inc. 596 p.
- Urasaki, N., Tokumoto, M., Tarora, K., Ban, Y., Kayano, T., Tanaka, H., Oku, H., Chinen, I., Terauchi, R. (2002) A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 104: 281-285.
- Van Droogenbroeck, B.; Breyne, P.; Gotghebeur, P.; Romeijnpeeters, E.; Kyndt, T.; Gheysen, G. (2002) AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 105, p. 289-297.
- Van Droogenbroeck, B.; Kyndt, T.; Maertens, I.; Romeijn-Peeters, E.; Scheldeman, X.; Romero-Motochi, J.; Van Damme, P.; Goetghebeur, P.; Gheysen, G. (2004) Phylogenetic analysis of the highland papayas (*Vasconcellea*) and allied genera (Caricaceae) using PCR-RFLP. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 108, p. 1473-1486.

- Väinölä, A. (2000) Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. *Euphytica*, Wageningen, v. 112, p. 239-244.
- Yan, G., Ferguson, A.R., Mcneilage, M.A., et al. (1997) Numerically unreduced (2n) gametes and sexual polyploidization in *Actinidia*. *Euphytica*, Wageningen, v.96, p.267-272.
- Wright, J. W. (1976) Introduction to forest genetics. New York: Academic Press.463 p.
- Zerpa, D. M. (1980) Comportamento meiotico de la descendência híbrida producida al transferor el character bisexual de *C. pubescens* e *C. stipulata*. Ver. Fac. Agronomia, Maracay, Venezuela, 1-4: 5-47.