

MELHORAMENTO GENÉTICO DO MAMOEIRO ASSISTIDO POR MARCADORES MOLECULARES

Laercio Francisco Cattaneo

Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural - Incaper
lfcattaneo@ig.com.br - Caixa Postal 62, CEP: 29.900-970, Linhares – ES

INTRODUÇÃO

A sustentabilidade da cultura do mamoeiro depende basicamente de novos genótipos com características agronômicas superiores, frutos que atendam as exigências dos consumidores, dos mercados interno e externo, com maior longevidade pós-colheita, e que apresentem resistência às principais pragas e doenças que atacam a cultura.

A pouca disponibilidade de genótipos superiores tem sido um dos principais fatores limitantes à obtenção de altas produtividades, associadas a características de frutos que possam atender esses mercados, disponibilizando-lhes frutos de alta qualidade. Nesse cenário, o melhoramento genético tem papel fundamental no desenvolvimento da cultura do mamoeiro, disponibilizando novos cultivares de interesse comercial, que possam proporcionar a continuidade e o aumento das exportações, seja na manutenção dos atuais, bem como na conquista de novos mercados consumidores.

Os trabalhos na área de seleção de plantas têm se baseado, tradicionalmente, no desempenho fenotípico dos indivíduos. Entretanto, a avaliação genética dos indivíduos baseada no fenótipo é influenciada por uma série de fatores ambientais, que torna difícil, em muitos casos, a separação do componente de natureza genética. Deve-se considerar, ainda, a existência de características de importância econômica, de difícil mensuração ou de baixa herdabilidade, para as quais os métodos tradicionais de seleção não são efetivos.

Nos últimos anos, com o avanço da genética molecular, alternativas técnicas estão sendo disponibilizadas aos melhoristas de plantas. Dentre elas estão os marcadores moleculares, empregados com sucesso em estudos de divergência genética em populações, confecção de mapas genéticos de ligação, DNA - *Fingerprinting*, mapeamento de QTLs (locos de características quantitativas), clonagem de genes de interesse agrônomico, além de ser ferramenta importante em trabalhos de seleção assistida por marcadores.

A CULTURA DO MAMOEIRO

A cultura do mamoeiro no Brasil concentra-se, atualmente, na região Norte do Estado do Espírito Santo e no Estado da Bahia, com área cultivada, em 1998, de aproximadamente 39.700 ha (AGRIANUAL, 2001).

Na década de 1970, o Estado de São Paulo destacava-se como o principal produtor nacional, com predominância, em seus pomares, de cultivares de mamoeiros dióicos ou 'comum', de frutos grandes e arredondados. O declínio da área plantada no Estado de São Paulo decorreu do aparecimento do vírus do mosaico do mamoeiro nas regiões produtoras, inviabilizando seu cultivo naquele estado (MARIN e RUGGIERO, 1988).

A partir dos anos de 1976/77, com a introdução dos cultivares havaianos do grupo 'Solo' e de cultivares híbridos do grupo 'Formosa', nos Estados do Pará, da Bahia e do Espírito Santo, houve aumento significativo da comercialização e da área cultivada, em razão da grande aceitação dos frutos tanto no mercado interno quanto no externo (MARIN et al., 1994b).

Na região Norte do Estado do Espírito Santo e no Estado da Bahia, as condições edafoclimáticas favoráveis e a introdução do cultivar 'Sunrise Solo' possibilitaram que a exploração da cultura do mamoeiro, em poucos anos, se tornasse uma atividade agrícola de alta rentabilidade e de grande importância para essas regiões como geradora de empregos.

A área cultivada com mamoeiro na região Norte do Estado do Espírito Santo, no ano de 1999, era de 6.561 ha, e, devido à alta tecnologia aplicada ao manejo dos pomares, obtiveram-se as maiores produtividades do País, com rendimento médio estimado em 57,0 t/ha. No ano de 2002, segundo dados obtidos na Unidade Regional do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, a área plantada com mamoeiros dos grupos 'Solo' e 'Formosa' chegava a 10.686,60 ha.

No final da década de 1980, a cultura do mamoeiro gerava para o Estado do Espírito Santo divisas da ordem de 55 milhões de dólares com a comercialização dos frutos no mercado interno e externo, além da criação de aproximadamente 12.000 empregos diretos por ano (MARIN et al., 1989).

Em 1999, as exportações de frutos de mamão do Brasil foram da ordem de 15.709 toneladas, gerando divisas para o País de aproximadamente 13,57 milhões de dólares (AGRIANUAL, 2001).

TAXONOMIA E MORFOLOGIA DO MAMOEIRO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma planta diplóide ($2n = 18$), pertencente à classe Dicotyledoneae, ordem Violales e à família Caricaceae. Essa família apresenta quatro gêneros, com 31 espécies, distribuídas em: *Carica* (22 espécies), *Jacaratia* (seis espécies), *Cylicomorpha* (duas espécies) e *Jarilla* (uma espécie) (FREIRE, 1966; JOLY, 1993).

De acordo com Andrade (1980), o caule do mamoeiro é cilíndrico, com 10 a 30 centímetros de diâmetro, fistuloso, ereto, encimado pelas folhas, as quais são dispostas em forma de espiral. A altura das plantas pode variar de 3 a 8 metros. O sistema radicular é pivotante, com a raiz principal bastante desenvolvida. Há ocorrência de vasos laticíferos em todas as partes da planta. As folhas de *Carica papaya* L. apresentam limbo amplo, com até 70 centímetros de diâmetro, orbicular, profundamente palmatilobadas, com 7 a 13 nervuras principais. Apresentam pecíolos, fistulosos com 50 a 70 cm de comprimento.

O mamoeiro é uma espécie polígama, que se caracteriza por apresentar três tipos de plantas em relação à expressão do sexo, ou seja, macho, fêmea e hermafrodita (HOFMEYR, 1938). Assim, por essa razão, a biologia floral do mamoeiro tem sido estudada intensivamente, em especial com relação à expressão do sexo.

De acordo com Simão (1971), o mamoeiro apresenta um polimorfismo muito grande no que diz respeito à sua biologia floral, podendo apresentar até 32 formas florais diferentes. Os cinco tipos de flores que ocorrem com maior frequência, segundo Giacometti e Mundim (1953), Marin e Gomes (1986) e Medina (1989), são brevemente descritos a seguir:

- Tipo I (Flor feminina): É uma típica flor feminina ou pistilada. Não apresenta estames ou, quando presentes, são rudimentares. O ovário é grande, arredondado, afunilando-se para o ápice, onde se inserem cinco estigmas em forma de leque. Originam frutos normalmente arredondados ou ligeiramente ovalados, apresentando a cavidade interna grande em relação à espessura da polpa.

- Tipo II (Flor hermafrodita pentândrica): Assemelha-se muito à flor feminina, diferenciando-se apenas por apresentar o órgão masculino com cinco estames curtos, cujos filamentos se inserem em sulcos profundos na parede do ovário. Dá origem a frutos arredondados com cinco sulcos longitudinais.

- Tipo III (Flor hermafrodita carpelóide): Apresenta inúmeras formas anormais, causadas pela tendência dos

estames de se tornarem carpelóides em grau variado. Os estames são em número de 2 a 10, com variados graus de fusão das pétalas no ovário ou ambos. Dá origem a frutos malformados, denominados frutos carpelóides.

- Tipo IV (Flor hermafrodita alongada): É a típica flor perfeita ou bissexual. O órgão masculino apresenta dez estames funcionais e o feminino, um ovário alongado, geralmente composto de cinco estigmas. Origina frutos alongados com variações de periforme a cilíndrico. Quando comparado aos frutos originados de flores femininas, apresenta uma cavidade interna menor que a dos primeiros com relação à espessura da polpa.

- Tipo V (Flor masculina): Estas flores apresentam os órgãos masculino e feminino, sendo o primeiro constituído por dez estames funcionais, soldados às pétalas e dispostos em duas séries, sendo cinco superiores e cinco inferiores. O segundo é muito rudimentar e geralmente estéril, entretanto, em certas épocas do ano, as plantas do sexo masculino podem produzir algumas flores hermafroditas, oriundas da alteração ou do desenvolvimento do pistilo rudimentar, dando origem a frutos denominados mamões-machos.

Dentre os cinco tipos de flores que ocorrem com maior frequência, anteriormente descritos, a rigor, os Tipos II e III são variações fortemente influenciadas por fatores ambientais.

As características do fruto do mamoeiro, citadas por Simão (1971) e Purseglove (1971), são: forma oblonga, arredondada, alongada, cilíndrica e piriforme. A casca é fina, lisa, verde, tornando-se amarelada ou alaranjada quando madura. A polpa pode variar de amarela, rosada, alaranjada ou avermelhada, é comestível, possui textura firme ou delicada e perfume acentuado ou não.

GENÉTICA DO SEXO DO MAMOEIRO

O mamoeiro é uma espécie polígama que se caracteriza por apresentar três tipos primários de plantas: masculina, feminina e hermafrodita. Os primeiros estudos genéticos sobre a herança do sexo em mamoeiro foram conduzidos, de forma independente, por Hofmeyr (1938), na África do Sul, e por Storey (1941), no Havaí. Nos cruzamentos controlados realizados por ambos os autores, entre os três tipos de flores, os seguintes resultados foram encontrados: flor masculina x flor feminina - as sementes produzidas nesse cruzamento originaram 50% de plantas masculinas e 50% de plantas femininas; flor hermafrodita x flor feminina - 50% de plantas hermafroditas e 50% de plantas femininas; flor masculina x flor hermafrodita - 33% de plantas masculinas, 33% de plantas hermafroditas e 33% de plantas femininas; e flor hermafrodita x flor hermafrodita - 66% de plantas hermafroditas e 33% de plantas femininas. Com base nos resultados obtidos, Hofmeyr (1938) adotou os símbolos **m** para o alelo que determina feminilidade, **M₁** para masculinidade e **M₂** para hermafroditismo. Assim, o genótipo dos indivíduos ginóicos é **mm**, dos andróicos **M₁m** e dos andromonóicos **M₂m**. As combinações entre os alelos dominantes **M₁M₁**, **M₂M₂** e **M₁M₂** de acordo com Storey (1941), são letais no zigoto, não ocorrendo na natureza. A única forma homozigota viável é **mm**. Storey (1953) também sugeriu que estão presentes dois genes supressores: o gene **sa**, controlando a supressão completa da masculinidade quando a planta é feminina e o efeito parcial de supressão da masculinidade em plantas masculinas e hermafroditas em determinadas condições climáticas; e o gene **sg**, controlando a supressão completa da feminilidade em condições de homozigose ou supressão parcial em heterozigose em determinadas condições ambientais.

Horovitz e Jimenez (1967), trabalhando com outras espécies de *Carica*, além de *Carica papaya* L., propuseram uma hipótese similar, usando a terminologia de cromossomo sexual **X**, **Y** e **Z**, em que **XX** designa planta feminina, **XY¹**, a planta masculina, e **XY²**, a planta hermafrodita (somente na espécie *Carica papaya* L.) e **ZZ**, plantas monóicas. No cruzamento entre espécies dióicas e monóicas, o genótipo **XZ** pode ser de planta monóica ou de planta feminina, dependendo da planta pistilada usada como genitor. As combinações **Y¹Y¹**, **Y¹Y²** e **Y²Y²** são letais.

Em razão do insucesso do cruzamento entre plantas hermafroditas de *Carica papaya* L., bem como de outras espécies monóicas e dióicas, a combinação genotípica **ZY²** é somente teórica. A hipótese também postula que o cromossomo **Z**, homólogo ao **X** e ao **Y**, contém o gene **F**, que controla a expressão da feminilidade (ginoícia) e o gene **Am**, que controla a expressão da masculinidade (androícia).

A herança do sexo em mamoeiro tem controle monogênico com alelos múltiplos (HOFMEYR, 1967; HOROVITZ e JIMENEZ, 1967).

MELHORAMENTO GENÉTICO DO MAMOEIRO

O desenvolvimento de um programa de melhoramento genético deve basear-se em objetivos claramente definidos, com ações de curto, médio e longo prazos, visando facilitar o planejamento das etapas subseqüentes (BORÉM, 1997).

No Havaí, de acordo com Nakasone (1980), foram estabelecidos os objetivos do programa de melhoramento genético do mamoeiro: plantas com alto vigor, frutificação precoce e com menor altura de inserção do fruto, ausência ou ocorrência mínima de carpeloidia, ausência ou ocorrência mínima de esterilidade feminina na forma hermafrodita, resistência a insetos e alta produtividade de frutos por planta; fruto uniforme, com peso aproximado de 0,45 kg/fruto, forma alongada, piriforme ou oval, casca lisa, sem manchas, polpa espessa, de coloração amarelo-alaranjada e de consistência firme, com altos teores de açúcares e ausência de odor desagradável, bem como resistência a várias doenças específicas do fruto.

Na região Norte do Estado do Espírito Santo, Marin et al. (1989) estabeleceram, na seleção de cultivares do grupo "Solo", nas condições de cultivo daquela região: altura das primeiras flores inferior a 70 cm, ausência ou ocorrência máxima de até 10% de flores hermafroditas estéreis, ausência ou ocorrência de até 20% de flores hermafroditas pentândricas, capacidade de produção acima de 80 frutos por planta e fruto com peso entre 400 e 750 gramas, formato piriforme, casca lisa, polpa consistente e de coloração vermelho-alaranjada.

A base para os trabalhos de melhoramento genético do mamoeiro em vários países tem sido os estudos genéticos feitos por Hofmeyer (1938), Storey (1938), Awada (1953) e Horovitz (1954).

A obtenção de cultivares de mamoeiro endogâmicos foi o principal objetivo de trabalhos de melhoramento genético conduzidos na Índia (SING, 1953), no Havaí (STOREY, 1953) e em Porto Rico (DHALIWAL, 1966).

Efeitos depressivos da endogamia sobre o vigor do mamoeiro não foram reportados em trabalhos conduzidos por Sing (1953); Morin (1967) e Nakasone (1980). Em estudos conduzidos por Hofmeyer (1938), na África do Sul, e por Hamilton (1954), no Havaí, os autores também verificaram que autofecundações sucessivas não causaram efeitos depressivos sobre o vigor do mamoeiro.

De acordo com Nakasone, citado por Vasconcelos et al. (1982), no Havaí os trabalhos de melhoramento genético não exploram o efeito da heterose no mamoeiro, devido ao fato de as linhagens oriundas do grupo "Solo" não apresentarem caracteres contrastantes, portanto não sendo viável a exploração do vigor híbrido em trabalhos de melhoramento genético.

A heterose ou o vigor híbrido, fenômeno decorrente do cruzamento entre indivíduos contrastantes, tem sido observada na maioria das espécies, inclusive nas autógamas (BORÉM, 1997). Estudos acerca da divergência genética, ou seja, das diferenças nas frequências alélicas das populações, têm importância fundamental na escolha de variedades a serem utilizadas como genitores, uma vez que a distância genética entre os genitores é indicativa da expressão heterótica nas progênies (FALCONER, 1981).

No mamoeiro, efeitos benéficos da heterose foram observados por Lassoudiere (1968), trabalhando com

um híbrido F_1 , proveniente do cruzamento entre os genótipos “Philippine” x “Solo”, o qual se mostrou mais vigoroso e com florações mais precoces.

Mekano e Nakasone (1975) observaram efeito positivo da heterose em cruzamentos interespecíficos de *Carica cauliflora* e *Carica goudotiana* como genitores com *Carica monoica*. Em ambos os cruzamentos, a altura de plantas, o diâmetro do caule, o número e o peso médio dos frutos da geração F_1 foram significativamente superiores em comparação aos genitores mais vigorosos (*C. cauliflora* e *C. goudotiana*).

Tem-se observado vigor híbrido na geração F_1 dos cruzamentos entre “Solo” e outros genótipos contrastantes entre si, entretanto o mesmo não acontece quando o cruzamento é feito entre linhagens do grupo “Solo”, provavelmente devido à relação genética muito próxima entre elas (HAMILTON, 1954).

Vasconcelos et al. (1982) avaliaram seis linhas endógamas e quatro híbridos oriundos de cruzamento entre elas e observaram efeito positivo da heterose sobre a produção, o número e o peso de frutos, a precocidade e altura de plantas entre os híbridos, quando comparados com as linhas.

Storey (1953) cita que um dos métodos de melhoramento mais usados na cultura do mamoeiro é o estudo da capacidade combinatória para produção de híbridos, que consiste em reunir tantos genótipos quanto possível em um mesmo local e selecionar, dentre eles, aqueles que apresentam características mais desejáveis para serem usados nos cruzamentos.

Giacometti e Mundin (1953) estudaram a capacidade combinatória em cruzamentos de dez genótipos de mamão dióico e hermafrodita introduzidos no Instituto Agrônomo de Belo Horizonte. Os autores não observaram combinações desejáveis, provavelmente, devido à heterozigose dos genótipos utilizados nos cruzamentos.

De acordo com Nakasone e Storey (1955), após o cruzamento entre cultivares contrastantes, duas estratégias podem ser utilizadas. A primeira consiste em conduzir as gerações subseqüentes por meio de autofecundações sucessivas, visando aumentar a probabilidade de se recuperar genótipos com caracteres desejáveis por meio da análise do *pedigree*; os retrocruzamentos são a segunda opção, especialmente se um dos progenitores apresenta características desejáveis para ser usado como recorrente.

Nakasone et al. (1972) afirmam que a melhoria das principais características da planta e do fruto do mamoeiro poderá ser conseguida por meio de cruzamentos sistemáticos entre cultivares contrastantes. Entretanto, o processo de seleção demanda tempo, pois, junto com as características desejáveis, poderão ser introduzidas no novo híbrido outras características indesejáveis, acarretando, dessa forma, demora na obtenção de cultivares com aceitação comercial.

Giacometti e Ferreira (1988) entendem que as etapas de seleção das progênies dependem da escolha dos progenitores de acordo com a herdabilidade de cada característica em estudo. Os mesmos autores sugerem duas alternativas para cruzamentos de mamoeiros ginóico-andromonóico: cruzamentos entre progenitores de porte baixo e frutos com cor de polpa salmão, podendo, neste caso, já na geração F_1 , selecionar combinações híbridas desejáveis de porte baixo e frutos com polpa de cor salmão; e cruzamentos de um progenitor de porte alto e fruto de polpa alaranjada com outro de porte baixo e fruto de polpa cor salmão, sendo, nesse caso, a seleção efetuada entre os genótipos segregantes da geração F_2 , para plantas baixas e frutos de polpa cor salmão. Nas duas alternativas, se na geração F_3 as qualidades do fruto, como tamanho, consistência, sólidos solúveis e sabor, não estiverem presentes entre as plantas selecionadas, retrocuza-se com um dos progenitores com características desejáveis. Na geração resultante do retrocruzamento, poder-se-ão obter plantas e frutos portadores de características agrônômicas desejáveis, as quais serão autofecundadas novamente. Os genótipos selecionados na geração F_3 serão autofecundados até a fixação genotípica, o que deverá ocorrer nas gerações F_7 ou F_8 .

Em trabalhos conduzidos no Havaí, Nakasone (1980) concluiu que a forma do fruto é um caráter herdado quantitativamente, enquanto o odor forte semelhante a éter é um caráter controlado por gene simples recessivo. Também mostrou que os tipos de casca lisa são dominantes sobre os tipos de casca rugosa, e, em relação à cor de polpa, há evidências de que a polpa vermelha é um mutante controlado por gene simples recessivo.

Cattaneo (2001), em trabalho conduzido em Linhares (ES), verificou que as características altura de florescimento, número de frutos por planta e peso de frutos apresentaram alta herdabilidade no sentido restrito. Os resultados evidenciaram que métodos simples aplicados à seleção dessas características podem possibilitar ganhos expressivos. As características altura de plantas, diâmetro de caule e produtividade de frutos apresentaram baixa herdabilidade no sentido restrito, sugerindo a necessidade de métodos de melhoramento mais trabalhosos ou a seleção indireta para a obtenção de ganhos satisfatórios.

MARCADORES GENÉTICOS

Marcadores genéticos são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes (BORÉM, 1997). Os marcadores genéticos utilizados em plantas podem ser morfológicos, citológicos, bioquímicos ou moleculares.

Os primeiros marcadores utilizados, que contribuíram com a genética e o melhoramento de plantas, foram os marcadores morfológicos, de acordo com Sax (1923), citado por Borém (1997) e Ferreira e Grattapaglia (1998). Embora essa classe de marcadores seja de fácil monitoramento, existe em número limitado em uma mesma espécie; sua descrição depende do desenvolvimento da planta e sua expressão gênica pode ser influenciada por fatores ambientais.

As isoenzimas foram os primeiros marcadores moleculares a serem utilizados com várias aplicações. Entretanto, de acordo com Ferreira e Grattapaglia (1998), apesar de os marcadores isoenzimáticos serem co-dominantes, de baixo custo e de fácil execução, têm a desvantagem de proporcionar pequena cobertura do genoma.

O desenvolvimento das técnicas de marcadores de DNA trouxe novos avanços para o melhoramento genético vegetal, sendo utilizados com êxito em várias culturas. Entre as várias aplicações dos marcadores de DNA, estão os estudos de divergência genética em populações, a confecção de mapas genéticos de ligação (PEREIRA et al., 1994; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1988) e o mapeamento de QTLs (locos de características quantitativas) (LEE, 1995; PEREIRA e LEE, 1995), além de ser ferramenta importante em trabalhos de seleção assistida por marcadores.

Entre os marcadores moleculares que se baseiam na análise do DNA genômico, estão o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ou polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição, os Minissatélites ou VNTR (Variable Number Tandem Repeats), o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), ou polimorfismo de DNA amplificados ao acaso, o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados, e os Microsatélites (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

MARCADORES MORFOLÓGICOS

O uso de genes polimórficos para facilitar a seleção de plantas foi proposto por Sax, em 1923, segundo Borém (1997). Até meados da década de 1960, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral, características fenotípicas de fácil

visualização, como nanismo, deficiência de clorofila, cor de pétala ou morfologia foliar (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). O número de marcadores morfológicos é muito variável para as diferentes espécies de plantas, e também muito limitado, sendo insuficiente para o mapeamento genético ou outras aplicações. Além disso, esses marcadores freqüentemente são afetados pela ação gênica de dominância, pelo efeito ambiental, pela pleiotropia e epistasia. O reduzido número e a natureza dos marcadores morfológicos restringiram os estudos dos caracteres quantitativos (QTs) às espécies nas quais havia sido alcançada uma caracterização genética substancial, como o milho, a ervilha e o tomate. A eficiência máxima do marcador ocorre quando ele se constitui no próprio alelo de interesse (RAMALHO et al., 2001).

Os marcadores morfológicos apresentam a desvantagem de serem identificados, em sua maioria, somente em planta inteira ou adulta, podendo ocasionar demora no processo. Por outro lado, os marcadores bioquímicos ou fragmentos de DNA podem ser utilizados a partir de amostras de células ou de tecidos de partes da planta (folhas, embriões, cotilédones, pólen etc.) e também em qualquer estágio de desenvolvimento dela, sem estarem sujeitos às variações ambientais.

MARCADORES BIOQUÍMICOS

Isoenzimas

O termo isoenzima define um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorrem em uma espécie, como resultado da presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas de acordo com Moss, 1982, citado por Ferreira e Gratapaglia (1998).

As isoenzimas têm sido utilizadas no estudo de dispersão de espécies, na análise de filogenias, no melhoramento de plantas – possibilitando a detecção de ligação gênica com caracteres mono e poligênicos, identificação de cultivares, introgressão gênica, avaliação de germoplasma – e, de forma mais limitada, na seleção indireta de caracteres agrônômicos (BORÉM, 1997; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

As isoenzimas desempenham a mesma atividade catalítica, mas podem ter diferentes propriedades cinéticas e ser separadas por processos bioquímicos. O número de isoenzimas de determinada enzima está relacionado ao número de compartimentos subcelulares onde a mesma reação catalítica é realizada (Gottlieb, 1982, citado por FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A análise isoenzimática envolve basicamente três etapas: extração de proteínas do tecido vegetal, separação destas proteínas através de eletroforese e coloração histoquímica do gel, o que permite a visualização do produto em forma de uma “banda”.

As isoenzimas fornecem ampla informação genética para diversas aplicações. É uma técnica relativamente barata e acessível, que, embora em pequeno número, mais de um loco isoenzimático pode ser analisado rápida e simultaneamente. Por isso, mesmo hoje, com técnicas mais modernas, as isoenzimas continuam sendo uma classe de marcadores muito útil para análises genéticas que não requeiram amostragem ampla do genoma. Alelos isoenzimáticos são co-dominantes, isto é, genótipos heterozigotos e homozigotos de determinado loco são facilmente identificados, permitindo estimar parâmetros como freqüências genotípicas e alélicas e, a partir destes, coeficientes de diversidade gênica e heterozigosidade (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Porém, quando a investigação requer cobertura mais ampla do genoma, como no caso de mapeamento genético ou caracterização detalhada de germoplasma, as isoenzimas apresentam duas limitações básicas: o número total de locos que podem ser detectados no genoma e o número de alelos por loco. Outras limitações das isoenzimas como marcadores são: modificações pós-tradução das enzimas, produzindo as “isoenzimas

conformacionais”, as quais diferem em estruturas secundárias e terciárias; polimorfismo enzimático em resposta a condições ambientais; diferenças na atividade isoenzimática associadas a estádios diferentes de desenvolvimento, dentre outras (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; BORÉM, 1997).

MARCADORES MOLECULARES BASEADOS EM RESTRIÇÃO E HIBRIDAÇÃO DE SEQÜÊNCIAS DE DNA

Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição – RFLP

Na técnica RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), fragmentos são obtidos por corte da fita dupla de DNA, que é evidenciado pela fragmentação do DNA por meio do uso de enzimas de restrição e observado por hibridização desses fragmentos com seqüências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência. Para que o polimorfismo seja detectado, é necessário que as seqüências de nucleotídeos nas fitas de DNA de dois ou mais indivíduos comparados sejam distintas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; BORÉM, 1997).

O polimorfismo observado na técnica de RFLP ocorre porque o DNA de indivíduos geneticamente distintos difere na seqüência de nucleotídeos ao longo da fita. A presença ou ausência de seqüências específicas de quatro a oito pares de bases, reconhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, pode variar entre diferentes indivíduos, gerando polimorfismo. Ao ser submetido à clivagem com uma enzima de restrição, o DNA de indivíduos geneticamente distintos é cortado nos sítios de restrição, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. A base genética do polimorfismo observado resulta de mutações nos sítios de restrição, deleções e rearranjos entre os sítios (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; BORÉM, 1997; RAMALHO et al., 2001).

As sondas podem ser obtidas por meio de: transcrição reversa de mRNA do organismo em estudo, produzindo-se uma biblioteca de moléculas de DNA complementar (“cDNA library”), sendo esta a mais comum; fragmentos de DNA genômico clonados ao acaso (“genomic library”); amplificação via PCR de seqüências conhecidas utilizando primers específicos; e por fim, por meio de bandas RAPD selecionadas e obtidas de gel de eletroforese e amplificadas via PCR (RAMALHO et al., 2001).

Comparados às isoenzimas, os marcadores RFLP possuem a vantagem de cobrir todo o genoma do organismo estudado. Possuem expressão co-dominante, isto é, em cada loco estudado é possível identificar genótipos hetero e homozigotos, gerando mais informações e permitindo análise detalhada da ação gênica e da interação entre os alelos. Ao contrário das isoenzimas, o número de marcadores RFLP é praticamente ilimitado, e o nível de polimorfismo alélico em cada loco é muito maior. Outra característica de marcadores de DNA em relação a isoenzimas é a alta estabilidade do DNA, que pode ser extraído, conservado e reutilizado por longos períodos de tempo. As membranas de hibridização também podem ser conservadas e reutilizadas por 15 ou mais vezes, o que assegura que o processo de obtenção delas seja compensado por seu prolongado uso (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; RAMALHO et al., 2001).

Sabendo-se que a maioria dos experimentos de melhoramento genético envolve a análise de centenas de indivíduos para vários locos marcadores, é fundamental que a técnica de marcadores moleculares utilizada seja eficiente na geração de dados e possa, em algum tempo, ser automatizada. A técnica de RFLP apresenta uma série de limitações nesse aspecto, uma vez que envolve vários passos com exigências em relação à mão-de-obra. O uso de RFLP requer um pessoal técnico habilitado para a manipulação de DNA recombinante, neste aspecto é uma técnica mais complexa do que a de isoenzimas. Esses aspectos têm tornado limitado o uso do RFLP (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Minissatélites

Os minissatélites, ou locos VNTR (*'Variable Number of Tandem Repeats'*), são regiões dispersas no genoma que contêm um número variável de seqüências repetidas e enfileiradas (*tandem*) de DNA que têm um núcleo comum de 10 a 100 pares de bases (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Podem ser analisados da mesma maneira que na técnica de RFLP, compartilhando as mesmas vantagens e limitações descritas anteriormente. Muitos dos minissatélites são altamente polimórficos, produzindo um grande número de bandas. Por estarem espalhados por todo o genoma e apresentarem um número variável de repetições em diferentes indivíduos em relação a uma mesma região cromossômica (loco), os minissatélites simultaneamente proporcionam um conjunto de marcadores genéticos que se constitui no que tem sido denominado impressões digitais de DNA.

MARCADORES MOLECULARES BASEADOS EM PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*)

RAPD - Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso

Os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) constituem a classe de marcadores de DNA mais utilizada atualmente, pois são de fácil implementação, possibilitando resultados rápidos e de grande validade.

A técnica de RAPD (WILLIAMS et al., 1990) utiliza-se de uma reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), baseada no anelamento e na extensão de um par de iniciadores (*primers*), pequenas moléculas de DNA de fita simples, que delimitam a seqüência-alvo da molécula de DNA (WELSH e McCLELLAND, 1990).

Os marcadores RAPD podem ser utilizados na caracterização genética de bancos de germoplasma (CIPRIANI et al., 1994), em estudos de variabilidade genética entre e dentro de populações (MARGALÉ et al., 1995; HARVEY e BOTHA, 1996), como também na construção de mapas de ligação genética (GRATTAPAGLIA e SEDEROFF, 1994).

Marcadores moleculares RAPD, quando utilizados na avaliação da diversidade genética, podem fornecer subsídios úteis ao melhorista de plantas na seleção de populações básicas a serem utilizadas em programas de melhoramento (LINDHOUT et al., 1994). Isso porque os marcadores RAPD geram grande quantidade de caracteres adicionais, que, combinados com as características fenotípicas, fornecem uma descrição mais completa para o agrupamento dos genótipos, permitindo melhor planejamento de cruzamentos (GRATTAPAGLIA e FERREIRA, 1995).

O polimorfismo genético detectado por marcadores RAPD é de natureza binária, sendo caracterizado pela ausência ou presença do marcador no gel, conferindo-lhe a característica de marcador dominante, sendo, para a maioria dos locos, impossível a distinção entre indivíduos homozigotos dominantes e heterozigotos (WILLIAMS et al., 1990; WELSH e McCLELLAND, 1990).

Um dos principais problemas da técnica RAPD está na padronização das condições de amplificação (PENNER et al., 1993; SKROCK e NIENHUIS, 1995).

Na avaliação da repetibilidade de ensaios de RAPD, em termos de fragmentos amplificados, Penner et al. (1993) verificaram grande variabilidade quando diferentes termocicladores foram utilizados, principalmente, em razão de variações de temperatura. Os autores observaram que a variabilidade era reduzida com a padronização das condições da reação de amplificação. Skrock e Nienhuis (1995) concluíram que as diferenças na reprodutibilidade dos resultados e erros de leitura das bandas não afetaram a estimativa da distância genética entre variedades de feijão, pois a distribuição de erros de leitura entre os genótipos foi aleatória. Esses mesmos autores também verificaram que houve variação entre os iniciadores quanto à reprodutibilidade dos resultados e sugeriram, como

estratégia para melhoria dos dados, pré-seleção de iniciadores.

AFLP - Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados

Os marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorfism*) se baseiam na amplificação seletiva, via PCR, de fragmentos de DNA genômico total, gerados pela clivagem com enzimas de restrição (ZABEAU e VOS, 1993; VOS et al., 1995; LIU, 1998).

A análise de AFLP, de acordo com Ferreira e Grattapaglia (1998), Liu (1998) e Ramalho et al. (2001), envolve quatro etapas. A primeira etapa consiste na clivagem do DNA genômico utilizando-se duas enzimas de restrição, sendo uma de corte raro e outra de corte freqüente. Na segunda etapa, adaptadores específicos são ligados às extremidades coesivas dos fragmentos de DNA genômico, gerados pela clivagem com as enzimas de restrição. Na terceira etapa, ou etapa de amplificação seletiva, uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR, utilizando-se iniciadores específicos que reconhecem as seqüências dos adaptadores que servem como sítios de anelamento na reação de amplificação. Na quarta etapa, a fração de fragmentos amplificados é separada em gel de poliacrilamida.

Os marcadores AFLP se destacam pelo grande número de fragmentos que geram em apenas um gel, tornando-se muito eficiente a amostragem do genoma. O grande poder de detecção de variabilidade genética se deve à exploração simultânea da presença e ausência de sítios de restrição, a exemplo dos marcadores RFLP, e à ocorrência de amplificação de seqüências arbitrárias, como nos marcadores RAPD. Outra vantagem dos marcadores AFLP é a robustez, quando comparados ao RAPD. A utilização de iniciadores mais longos no AFLP, na fase de PCR, aumenta a especificidade da amplificação, evitando, dessa forma, a competição que ocorre durante a amplificação na análise RAPD (VOS et al., 1995; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; RAMALHO et al., 2000).

De maneira análoga aos marcadores RAPD, a principal limitação dos marcadores AFLP é serem dominantes (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1988; LIU, 1988 e RAMALHO et al., 2001). Dessa forma, apenas um alelo é detectado, ou seja, aquele que é amplificado e visualizado no gel. Os genótipos homozigotos não podem ser diretamente separados dos heterozigotos, e o padrão de bandas se caracteriza por fornecer dados binários, ou seja, presença e ausência de banda. Eventualmente, de acordo com Liu (1998), as marcas podem ser identificadas como co-dominantes.

Outros aspectos que podem limitar as análises de AFLP, segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), são: o maior número de etapas que envolvem as análises, o maior número de reagentes e equipamentos de biologia molecular necessários, além de requerer DNA de qualidade e com alto nível de pureza. A digestão parcial ou a má qualidade do DNA poderá levar a interpretações equivocadas do polimorfismo.

A análise de AFLP tem sido empregada de forma crescente, com o propósito de estudos de DNA '*finger-printing*', de divergência genética, de mapeamento genético localizado e de construção de mapas genéticos, independentemente da espécie e da complexidade do DNA (VOS et al., 1995; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Microssatélites

Entre as diversas seqüências repetidas em tandem, algumas são simples, formadas por um ou poucos nucleotídeos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Essas repetições curtas em tandem (STR - '*Short Tandem*

Repeat) são denominadas microssatélites ou STR, ou SSRP (*'Simple Sequence Repeat Polymorphisms'*) ou, ainda, STMS (*'Sequence Tagged Microsatellite Sites'*). São seqüências repetidas de um, dois, três ou quatro nucleotídeos e que estão espalhadas pelo genoma de um indivíduo. São altamente polimórficos em plantas, animais e microorganismos. Assim, cada região genômica que contenha determinado número de repetições de uma dessas seqüências constitui-se num loco genético, altamente variável entre indivíduos, e multialélico, portanto altamente informativo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

Comparativamente aos RFLPs, os microssatélites proporcionam três a quatro vezes mais polimorfismos. Entretanto, para seu uso rotineiro, é necessário, primeiramente, amplificar uma região, posteriormente, fazer o seqüenciamento e, em seguida, sintetizar os iniciadores específicos para cada loco. Uma vez feito isso, o loco marcador pode ser utilizado indefinidamente naquela espécie. O custo inicial é elevado e o processo, trabalhoso, mas o custo subsequente é baixo e a simplicidade é muito grande. Seu uso está associado, principalmente, à caracterização de cultivares para fins de proteção e de conservação de germoplasma, entretanto tem sido empregado para o mapeamento genético (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os microssatélites são altamente polimórficos em plantas, animais e microorganismos e já estão sendo utilizados em larga escala para as principais espécies de importância agrícola, podendo se tornar os marcadores mais comuns nos laboratórios.

APLICAÇÕES DOS MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO GENÉTICO

Os marcadores moleculares estão facilitando a realização de estudos de genética, taxonomia e evolução de plantas, proporcionando substancial avanço no conhecimento científico. As principais implicações deste avanço no conhecimento se refletem no poder, na precisão e na rapidez na manipulação da variabilidade genética. Assim, o melhoramento de plantas pode se beneficiar de várias maneiras com o avanço e a aplicação dos marcadores moleculares.

SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES

A seleção indireta para caracteres de baixa herdabilidade poderá ser intensamente explorada desde que os genes de interesse estejam fortemente ligados a marcadores moleculares. A seleção indireta possibilita a seleção de alelos com efeitos positivos provenientes dos dois ou mais progenitores envolvidos na geração da população segregante (LANDE e THOMPSON, 1990).

O procedimento conhecido como *'Bulked Segregant Analysis'* (MICHELMORE et al., 1991), em conjunto com a PCR, é uma alternativa eficiente de mapear genes específicos e selecionar indiretamente genótipos desejados.

CONSTRUÇÃO DE MAPAS GENÉTICOS

O grande volume de marcadores disponíveis possibilita o desenvolvimento de densos mapas de ligação, uma ferramenta tanto para pesquisa básica quanto aplicada. Os marcadores de DNA segregam em proporções mendelianas e não interferem na segregação de outros genes. Quando em grande quantidade segregando num cruzamento, é possível a construção de um mapa genético de ligação, cuja saturação depende da quantidade de marcadores. Mapas genéticos de alta saturação eram praticamente impossíveis antes do desenvolvimento desses marcadores. Nos últimos anos, foram construídos mapas genéticos de ligação das principais espécies vegetais

cultivadas, dentre eles o do mamoeiro.

Sondur et al. (1996) utilizaram a técnica RAPD para a construção de mapa genético de ligação do mamoeiro, em uma população segregante F_2 oriunda do cruzamento entre as linhagens havaianas UH 356 x 'Sunrise'. O estudo permitiu a obtenção de 96 marcas polimórficas. Dentre essas, 62 marcas polimórficas apresentaram segregação mendeliana, ou seja, segregação 3:1, em 11 grupos de ligação, cobrindo 999,3 cM do genoma do mamoeiro, de um total estimado de aproximadamente 1350 cM. O estudo também permitiu o mapeamento do loco ligado ao sexo do mamoeiro.

ESTUDOS DE DIVERGÊNCIA GENÉTICA

Uma vez caracterizado o germoplasma disponível, o melhorista pode escolher genotipicamente os progenitores para um cruzamento tanto com o objetivo de maximizar a segregação de genes de importância agrônômica como restringir esta segregação a poucos genes. Além de se escolher os progenitores, será possível identificar os recombinantes desejados.

Estudo da divergência genética em dez cultivares de mamoeiro utilizando marcadores RAPD foi conduzido por Stiles et al. (1992). Os resultados evidenciaram que a técnica de RAPD permitiu a formação de três grupos distintos, discriminando dentro e entre os cultivares em estudo, de acordo com a origem e o conhecimento da genealogia destes.

Cattaneo et al. (1999) avaliaram a divergência genética de nove genótipos de mamoeiro dos grupos 'Solo' e 'Formosa', utilizando marcadores RAPD. Os autores encontraram ampla divergência genética entre os genótipos dos grupos 'Formosa' e 'Solo', sendo os resultados utilizados na seleção de progenitores para cruzamentos, visando a utilização da heterose.

A divergência genética entre 22 genótipos de mamoeiros foi avaliada por Cattaneo (2001), por meio de marcadores RAPD, AFLP e pela integração de marcas RAPD+AFLP. Os marcadores RAPD discriminaram os genótipos em apenas dois grupos, enquanto os marcadores AFLP mostraram-se mais robustos, permitindo a formação de seis grupos. A integração de marcas RAPD+AFLP mostrou-se muito eficiente na detecção de variabilidade entre os 22 genótipos de mamoeiros, possibilitando discriminá-los em 10 grupos.

Análises de microssatélites e minissatélites foram utilizadas por Sharon et al. (1992), em trabalhos de análise genética e de identificação e caracterização entre e dentro de espécies de *Carica*. Os resultados mostraram que a técnica foi uma ferramenta útil na identificação de espécies e de cultivares, podendo ser usada também na identificação de híbridos específicos e interespecíficos.

MONITORAMENTO

Monitorar a recuperação do genoma do pai doador nos retrocruzamentos (intra e interespecíficos) por meio de marcadores específicos pode diminuir o tempo e a quantidade de trabalho necessários para a introgressão de um ou poucos genes.

"DNA - FINGERPRINTING"

Fingerprinting ou a caracterização genética de um genótipo é outra aplicação dos marcadores moleculares. Os mini ou microssatélites, isoladamente ou em conjunto com outros marcadores moleculares, podem ser

utilizados para caracterizar e distinguir um cultivar de outro. Na diferenciação de cultivares, três condições são necessárias: 1^ª) distinção - diferentes genótipos devem apresentar distintos padrões de bandas; 2^ª) uniformidade - o mesmo padrão de bandas deve ser obtido se o procedimento for repetido; e 3^ª) estabilidade - o padrão de bandas não se altera mesmo se o genótipo é cultivado em diferentes ambientes. Dependendo da legislação brasileira de proteção aos cultivares e das regras de patentes a serem definidas, as impressões digitais de DNA ('*fingerprinting*') poderão ter grande utilidade.

MAPEAMENTO GENÉTICO DE QTLs

A maioria das características relacionadas com os processos de crescimento em plantas depende da expressão de muitos genes. Com o advento dos mapas genéticos de ligação, altamente saturados, foram criadas as condições para o estudo individualizado dos QTL (*Quantitative Trait Loci*), pois estes mapas proporcionam marcadores moleculares em todas as regiões do genoma, em alguns casos espaçados apenas de menos de 2 cM.

O mapeamento de QTLs proporciona a identificação não só de alelos envolvidos na expressão do caráter, mas, o que é mais importante, também de possíveis interações entre os QTLs, o que tem proporcionado informações que podem ser úteis na escolha dos progenitores para a realização dos cruzamentos. Proporciona, ainda, condições para o desenvolvimento de estoques genéticos com diferentes composições genéticas. Essas combinações permitirão a comprovação dos efeitos individuais dos QTLs, anteriormente estimados.

Existem programas computacionais que permitem determinar as distâncias genéticas entre marcadores, como é o caso do Linkage-1 (SUITER et al., 1983), e outros que facilitam a construção de mapas, como o MAPMAKER (LANDER et al., 1987).

CLONAGEM DE GENES DE INTERESSE AGRONÔMICO

Os marcadores auxiliam na clonagem e transferência de genes. Entre os mais freqüentemente citados encontram-se os genes de resistência a pragas e doenças. Entretanto, outros genes podem causar profundo impacto nos produtos finais das plantas. Trata-se dos genes que podem proporcionar às plantas o uso de rotas metabólicas alternativas, resultando em produtos novos ou modificados, em muitos casos de alto valor econômico.

Recentes avanços, como a possibilidade de clonar fragmentos de grande tamanho (YAC, *Yeast Artificial Chromosome*) e de separar grandes moléculas de DNA (PFGE, *Pulse Field Gel Electrophoresis*), poderão facilitar a clonagem de um gene a partir de um marcador molecular.

ESTUDOS DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS

O crescimento e o desenvolvimento das plantas estão sob o controle de muitos genes. Vários desses genes já foram identificados, inicialmente por meio da genética clássica e, mais recentemente, com o auxílio da genética molecular (YOUNG, 1993). Exemplos: fitocromo e genes que afetam o padrão de cor das plantas.

MODIFICAÇÕES NA ORGANIZAÇÃO DO GENOMA

Existem amplas evidências do surgimento de variantes durante a regeneração a partir de cultura de tecidos.

Variações somaclonal que ocorrem em nível de DNA, tanto nos sítios de reconhecimento de uma enzima de restrição como na região de anelamento de um *primer*, podem ser detectadas via RFLP ou RAPD, respectivamente. Variação no número de cópias também pode ser detectada pela intensidade de hibridização, via RFLP.

REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2001. 545p.
- ANDRADE, V.M. de M. O mamoeiro: Taxonomia e morfologia. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MAMOEIRO, 1. Jaboticabal, SP, **Anais...** Jaboticabal - SP: FCAV/UNESP, 1980. p. 61-70.
- AWADA, M. Effects of moisture on yield and sex expression of the papaya plants (*Carica papaya* L.). **Hawaii Agr.Expt. Sta. Prog. Notes**, n. 97, 1953.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa : UFV, 1997. 547p
- CATTANEO, L.F.; DAHER, R.F.; MARIN, S.L.D.; PEREIRA, M.G. Avaliação de divergência genética em mamoeiro (*Carica papaya* L.) utilizando marcadores RAPD. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45, Gramado: SBG, 1999. **Anais...** p. 524.
- CATTANEO, L.F. **Avaliação da divergência genética e análise de gerações em mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. 2001. 95f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Campos dos Goytacazes - RJ .
- CIPRIANI, G.; FRAZZA, G.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats. **Vitis**, v. 33, p. 211-215, 1994.
- DHALIWAL, T. S. **Progress in papaya breeding in Puerto Rico**. Rio Pedras: Agr. Expt. Sta., 1966. 22 p.
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Trad. SILVA, M. A.; SILVA, J.C. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 1981. 279p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- FREIRE, C.V. **Chaves Analíticas**. Viçosa: UREMG, Imprensa Universitária, 1966. 54p.
- GIACOMETTI, D.C.; FERREIRA, F.R. Melhoramento genético do mamão no Brasil e perspectivas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MAMOEIRO, 2., 1988, Jaboticabal, SP. **Anais...** Jaboticabal, SP: FCAV/UNESP, 1988. p. 377-387.
- GIACOMETTI, D.C.; MUNDIM, L.B. **Melhoramento do mamão (*Carica papaya* L.)**. Belo Horizonte: Instituto

Agrônomo de Minas Gerais, 1953. 32 p.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v. 137, p. 1121-1137, 1994.

HAMILTON, R.A. Quantitative study of growth and fruiting in inbred and crossbred progenies from two solo papaya strains. **Hawaii Agr. Expt. Sta. Bul.**, v.20, p.1-38, 1954.

HARVEY, M.; BOTHA, F.C. Use of PCR-based methodologies for the determination of DNA diversity between *Saccharum* varieties. **Euphytica**, v. 89, p. 257-265, 1996.

HOFMEYER, I. D. J. Genetical studies of *Carica papaya* L. **Africa Dept. Agr. For. Sci. Bul.**, v.187, p.1-64, 1938.

HOFMEYER, I. D. J. Some genetic breeding aspects of *Carica papaya*. **Agr. Tropical**, Venezuela, v.4, n.1, p.345-351, 1967.

HOROWITZ, S. Determinación del sexo en *Carica papaya* L. - Estructura hipotética de los cromosomas sexuales. **Agronomia Tropical**, v.3, p.229-249, 1967.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 11. ed. São Paulo: Nacional, 1993. 777p.

LANDER; THOMPSON R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics**, v.124, p.743-756, 1990.

LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, S.E.; NEWBURG, L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v.1, p.174-181, 1987.

LASSOUDIÈRE, A. Le papayer: description e genetique. **Fruits**, Paris, v.23, n.11, p.585-596, 1968.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. In: **Advances in Agronomy**. v. 55. Academic Press, 1995.

LIU, B.H. **Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis**. New York: CRC Press, 1998. 611p.

MARGALÉ, E.; HERVÉ, Y.; HU, J.; QUIROS, C.F. Determination of genetic variability by RAPD markers in cauliflower, cabbage and kale local cultivars from France. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 42, p. 281-289, 1995.

MARIN, S. L.D.; GOMES, J. A. Morfologia e biologia floral do mamoeiro. **Informe Agropecuário**, v.12, n.134, p. 10-14, 1986.

MARIN, S.L.D.; RUGGIERO, C. Toxicidade de inseticidas, acaricidas e fungicidas ao mamoeiro (*Carica papaya*

L.) cultivar Solo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MAMOEIRO, 2., 1988, Jaboticabal, SP. **Anais...** Jaboticabal, SP: FCAV/UNESP, 1988. p. 219-228.

MARIN, S.L.D.; RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, C. A. L. Efeitos fitotóxicos de inseticidas, acaricidas e fungicidas em mudas de mamoeiro (*Carica papaya* L.) cultivar Solo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 10., Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza, CE : Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1989. p. 303-311

MARIN, S. L. D.; GOMES, J. A.; SILVA, J. G. F. da; SALGADO, J. S. Comportamento de preços de mamão do grupo Solo na região Norte do Espírito Santo destinado ao mercado nacional e internacional. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13., Salvador, BA. **Resumos...** Salvador, BA : Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1994. v. 2, p. 665.

MEDINA, J. C. Cultura. In: **Mamão**. 2. Ed. Campinas: ITAL, 1989. p. 1 - 178. (Frutas Tropicais, 7).

MEKANO, H.U.; NAKASONE, H.Y. Interspecific hybridization among 6 *Carica* species. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v.100, n.3, p. 237-242, 1975.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.88, p.9828-9832, 1991.

MORIN, C. El papaya. In: MORIN, C. **Cultivo de frutales tropicales**. Lima: ABC, 1976. p. 232-288.

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

NAKASONE, H.Y. Programa de melhoramento de mamão no Havaí. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MAMOEIRO, 2., 1988, Jaboticabal, SP. **Anais...** Jaboticabal- SP: FCAV/UNESP, 1988. p. 389-405.

NAKASONE, H.Y.; CROZIER JUNIOR, J. A.; IKEHARA, D.K. Evaluation of 'Waimanalo', a new papaya strain. **Hawaii Agr. Exp. Sta. Tech. Bull.**, v.79, p.1-12, 1972.

NAKASONE, H.Y.; STOREY, W.B. Studies on the inheritance of fruiting height *Carica papaya* L. **Proc. Amer. Hort. Sci.**, v.66, p.168-182, 1955.

PENNER, G. A.; BUSH, A.; WISE, R.; KIM, W.; DOMIER, L.; KASHA, K.; LAROCHE, A.; SCOLES, G.; MOLNAR, S.J.; FEDAK, G. Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. **Research**, v. 2, p. 341-345, 1993.

PEREIRA, M. G.; LEE, M. Identification of genomic regions affecting plant height in sorghum and maize. **Theor. Appl. Genet.**, v.90, p.380-388, 1995.

- PURSEGLOVE, J. W. **Tropical crops. Dicotyledons 1**. London and Harlow: Longmans, 1971. 332 p.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. Lavras, MG: UFLA, 2000. 472p.
- SHARON, D.; HILLEL, J.; VAINSTEIN, A.; URI, L. Application of DNA fingerprints for identification and genetic analysis of *Carica papaya* and other *Carica* species. **Euphytica**, v.62, p.119-126, 1992.
- SIMÃO, S. Mamoeiro. In: SIMÃO, S. **Manual de fruticultura**. São Paulo: Ceres, 1971. p.313-338.
- SING, R.N. Prospects of papaya (*Carica papaya* L.) breeding in India. **Indian Jour. Hort.**, v.10, p. 32-36, 1953.
- SKROCK, P.; NIENNHUIS, J. Impact of scoring error reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. **Theor. Appl. Genet.**, v. 91, p. 1086-1091, 1995.
- SONDUR, S.N.; MANSARDT, R.M.; STILES, J.I. A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers. **Theor. Appl. Genet.**, v.93, p.547-553, 1996.
- STILES, J.I.; LEMME, C.; SONDUR, S.; MORSHIDI, M.B.; MANSARDT, R. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. **Theor. Appl. Genet.**, v.85, p.697-701, 1993.
- STOREY, W. B. The primary flowers types of papaya and the primary fruit types that develop from them. **Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.**, p. 83-85, 1938.
- STOREY, W. B. The botany and sex relations of de papaya. In: **Papaya production in the Hawaiian Islands**. Hawaii: Agr. Exp. Sta., Univ. Hawaii, 1941. p. 5-22. (Bul. 87).
- STOOREY, W. B. Genetics of the papaya. **Jour. Hered.**, v.44, p.70-78, 1953.
- SUITER, K.A.; WENDEL, J.F.; CASE, J.S. Linkage-1: a Pascal computer program for the detection and analysis of genetic linkage. **J. Hered** , v.74, p.203-204, 1983.
- VASCONCELOS, H.S.V.; SAMPAIO, L.S.V.; LUNA, J.V.U. Comportamento de linhas endógamas de mamão (*Carica papaya* L.) e seus híbridos, em solo infestado com *Phytophthora* sp. Proc. of the Tropical Region - Amer. **Hort. Sci.**, v.25, p.301-304, 1982.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. van de; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.21, p.4407-4414, 1995.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

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

ZABEAU, M.; VOS, P. **European Patent Application**. Publication n°: EP 0534858, 1993.

YOUNG, N. D. Applications of DNA markers to the study of plant growth and development. **Plant Growth Regulation**, v.12, p.229-236, 1993.