

SEXAGEM NÃO DESTRUTIVA EM SEMENTES DE MAMÃO (*Carica  
papaya L*) VIA MARCADORES MOLECULARES

**RAFAELA PEREIRA DUARTE**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2019

SEXAGEM NÃO DESTRUTIVA EM SEMENTES DE MAMÃO (*Carica papaya L*) VIA MARCADORES MOLECULARES

**RAFAELA PEREIRA DUARTE**

“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.”

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Helaine Christine Cancela Ramos

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2019

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

D812 Duarte, Rafaela Pereira.

SEXAGEM NÃO DESTRUTIVA EM SEMENTES DE MAMÃO (Carica papaya L) VIA MARCADORES MOLECULARES / Rafaela Pereira Duarte. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

59 f. : il.

Bibliografia: 40 - 47.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2019.

Orientadora: Helaine Christine Cancela Ramos.

1. Germinação. 2. Extração de DNA. 3. Endosperma. 4. Sexagem. 5. Hermafrodita. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

SEXAGEM NÃO DESTRUTIVA EM SEMENTES DE MAMÃO (*Carica papaya* L.) VIA MARCADORES MOLECULARES

**RAFAELA PEREIRA DUARTE**

“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.”

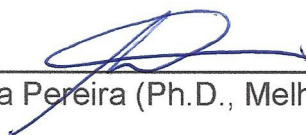
Aprovada em 29 de março de 2019.

Comissão Examinadora:



---

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



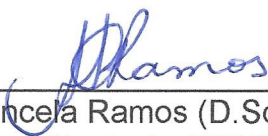
---

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



---

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



---

Prof.ª. Helaine Christine Cancela Ramos (D.Sc, Genética e Melhoramento de Plantas) - UENF  
(Orientadora)

Ao pequeno Pedro, que me ensinou o maior amor do mundo.

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida, por ter concedido paciência, sabedoria e forças durante a caminhada para realização dos meus objetivos.

À minha mãe Laiz, minha amiga e minha base, por todo amor e suporte em toda minha vida.

À professora Dra. Helaine Christine Cancela Ramos, minha orientadora, por todo apoio e aprendizado transmitido durante o mestrado, sendo sempre atenciosa e paciente.

Ao professor Dr. Henrique Duarte Vieira, pela supervisão e acompanhamento, que foram essenciais para a condução do trabalho.

À doutoranda Adriana, à Dra. Fernanda e à técnica do LMGV, Dra. Marcela, pela amizade e por todo apoio durante os trabalhos no laboratório.

Aos meus conselheiros, professor Messias Gonzaga Pereira e professora Telma Nair Santana Pereira, pelas contribuições, sugestões e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os amigos que fiz durante o mestrado, pela lealdade, confiança e motivação. Agradeço em especial às minhas amigas Débora, Ravena e Flávia, por sempre me acolherem e estarem ao meu lado nos melhores momentos e nos mais difíceis em Campos. E aos meus parceiros de mestrado, Divino, Jhean e Thiago, por todo apoio e amizade.

À minha equipe, Dieimes, Daniel, Grasiela e Tatiana, pela amizade e contribuições. E aos colegas do Laboratório de Produção e Tecnologia de Sementes, Zé, Vanessa, Amanda e Carla, por toda ajuda e companheirismo.

Ao meu noivo Izaias, que, mesmo longe, esteve sempre presente, por todo amor e compreensão.

À Ruth pela amizade e todo suporte, essenciais para a finalização dos meus trabalhos. Meu muito obrigada por todo o carinho e amor com o Pedro.

À Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade de realização desta pesquisa.

À Faperj (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro), pelo apoio financeiro e científico.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Capes) – Código de Financiamento 001.

Enfim, meu muito obrigado a cada um que contribuiu para a realização deste trabalho. Sem vocês, ele não teria sido possível.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
2.1. Objetivo geral.....	4
2.2. Objetivos específicos .....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Aspectos gerais da cultura.....	5
3.1.1 Importância econômica.....	5
3.1.2 Classificação botânica, origem e domesticação .....	6
3.1.3 Determinação sexual .....	7
3.2 Sementes de mamão .....	10
3.2.1 Aspectos morfológicos.....	10
3.2.2 Aspectos fisiológicos .....	13
3.4. Genotipagem em sementes .....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
4.1 Material vegetal.....	18



4.2 Germinação de sementes com corte (Experimento 1).....	19
4.3 Testes de germinação em casa de vegetação.....	21
4.3.1 Germinação de sementes com corte (Experimento 2).....	21
4.3.2 Armazenamento de sementes com corte (Experimento 3).....	21
8.4 Análises estatísticas .....	22
8.5 Sexagem fenotípica .....	24
8.6 Sexagem molecular .....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	28
5.1 Germinação de sementes com corte .....	28
5.2 Armazenamento de sementes com corte .....	31
5.3 Sexagem molecular .....	33
6. CONCLUSÕES .....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

## RESUMO

DUARTE, Rafaela Pereira, M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Março de 2019. Sexagem não destrutiva em sementes de mamão (*Carica papaya* L.) via marcadores moleculares. Orientadora: Profa. Helaine Christine Cancela Ramos. Conselheiros: Prof. Messias Gonzaga Pereira e Profa. Telma Nair Santana Pereira.

O mamoeiro é uma espécie trioica, apresentando plantas femininas, masculinas e hermafroditas. Como as plantas hermafroditas produzem frutos com maior valor comercial, é necessário fazer a sexagem para que os pomares sejam formados primordialmente por plantas hermafroditas. A sexagem no mamoeiro é feita com base na diferenciação de suas flores, sendo esse processo conduzido somente quatro meses após o plantio, o que ocasiona incrementos nos custos de produção. Assim, é de fundamental importância pesquisas que busquem alternativas que permitam a diferenciação sexual precoce na cultura. O presente trabalho teve como objetivo fazer a sexagem em sementes de mamão via marcadores moleculares, retirando uma amostra do endosperma para extração de DNA, sem comprometer a germinação da semente. Os genótipos do grupo Solo (Golden) e do grupo Formosa (UC-01) foram utilizados nesta pesquisa. Testes de germinação foram com o objetivo de determinar um corte (transversal e longitudinal) que permitisse a retirada de tecido do endosperma de mamão. Associado ao corte, tratamentos de desinfestação (com fungicida ou hipoclorito de sódio) foram testados, além do tempo de armazenamento de sementes com corte. As plântulas e a amostra do endosperma provenientes do melhor

tratamento dos testes de germinação foram utilizadas para validação da sexagem fenotípica e molecular, respectivamente. Para sexagem molecular seis métodos de extração de DNA aliados a dois protocolos de amplificação foram testados. Os *primers* 71E, W11, PS2 E PS4 foram utilizados para a validação dos resultados e diferenciação de plantas femininas e hermafroditas. A associação do corte longitudinal com fungicida permitiu uma alta porcentagem de germinação (81%) para o genótipo do grupo Formosa (UC-01), não tendo a germinação diferido estatisticamente do controle (88%). O genótipo Golden também apresentou melhor germinação no corte longitudinal com fungicida (32%), mas o corte levou a uma germinação inferior ao tratamento controle (82%). As sementes com corte armazenadas por até 6 dias a 4°C não apresentaram redução na taxa de germinação. Por outro lado, o tempo de armazenamento prolongado para 12 dias afetou negativamente a germinação para os dois genótipos analisados. Todos os métodos de extração de DNA testados geraram quantidade suficiente de DNA para amplificação com *primers* que permitem diferenciação sexual das amostras, mas a baixa pureza do DNA obtido não permitiu a amplificação de todos os protocolos. O *primer* W11 não permitiu a diferenciação sexual das amostras de forma eficiente, sendo que das 12 amostras hermafroditas confirmadas pela sexagem em campo apenas 5 apresentaram a banda específica. O *primer* PS2 gerou um resultado de difícil interpretação, não sendo possível identificar com precisão a banda específica do hermafroditismo. O *primer* PS4 foi eficiente na sexagem das amostras, com resultado confirmado pela sexagem fenotípica. O presente estudo permitiu, pela primeira vez, a sexagem em sementes de mamão híbridas via marcadores moleculares, retirando uma amostra do endosperma para extração de DNA, mantendo o potencial de germinação do embrião. Para sementes de linhagens, as quais têm sementes menores, mais estudos são necessários para aumentar o potencial de germinação após a retirada de tecido para análise.

## ABSTRACT

DUARTE, Rafaela Pereira, M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Março de 2019. A non-destructive sex determination in papaya seeds (*Carica papaya* L.) via molecular markers. Advisor: Prof. Helaine Christine Cancela Ramos. Committee Members: Profs. Messias Gonzaga Pereira and Telma Nair Santana Pereira.

The papaya is a trioecious species presenting female, male, and hermaphrodite plants. Because hermaphrodite plants produce fruits with higher commercial value, it is necessary to identify the sex type of the plants in order to form orchards predominantly by hermaphrodite plants. The sex in papaya tree is identified by the flowers. This process can only be done four months after planting, which causes increases in production costs, due to the need to plant three to four seedlings per hill for subsequent roguing the female plants. Therefore, it is of fundamental importance researches that look for alternatives that allow the early sexual differentiation in the culture. The aim of the present work was to perform sex identification on papaya seeds via molecular markers, removing a sample of the endosperm for DNA extraction, without compromising seed germination. Two phenotypes were used to carry out the work, one from the Solo group (Golden) and another from the Formosa group (UC-01). Germination tests were performed to determine the best cut (transverse and longitudinal) for tissue removal from the papaya endosperm associated with the best disinfestation treatment (Fungicide or sodium hypochlorite), which allowed the development of the embryo. Other test was performed to evaluate the storage time of cut seeds. Seedlings and the

endosperm sample from the best treatment of germination test were used for validation of molecular and phenotypic sex identification. For molecular tests, six DNA extraction methods allied to two amplification protocols were performed. The primers 71E, W11, PS2 and PS4 were used to evaluate the results and for differentiation of female and hermaphrodite plants. The association of the longitudinal cut with fungicide gave a high percentage of germination (81%) for the genotype of the Formosa group (UC-01), and germination rate did not differ statistically from the control (88%). The genotype Golden also presented better germination in the longitudinal cut with fungicide (32%), but the cut led to a germination inferior to the control treatment (82%). Seeds cut stored for up to 6 days at 4°C did not present a reduction in the germination rate. On the other hand, the prolonged storage time for 12 days negatively affected the germination for the two genotypes analyzed. All DNA extraction methods tested yielded enough DNA for amplification with primers that allow for sexual differentiation of the samples, but the low purity of the DNA obtained did not gave the amplification of all the protocols. The marker W11 did not allow an eficiente sex identification of the samples, among the 12 hermaphrodite samples confirmed by the flowers of the plants in the field, only 5 presented the specific band. The primer PS2 resulted in a difficult interpretation, it was not possible to identify for sure the specific band of the hermaphroditism. On the other hand, the primer PS4 was efficient, with a result confirmed by the phenotypic of the plants in the field. The present study allowed for the first time the sex determination in hybrid papaya seeds via molecular markers, taking a sample of the endosperm for DNA extraction, maintaining the potential of germination of the embryo. For lineages seeds, which are smaller, more studies are needed to increase the germination rate of the cut seeds.

## 1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Caricacpapaya L.*) é uma das fruteiras tropicais mais cultivadas e consumidas mundialmente. Os frutos dessa espécie podem ser consumidos maduros e verdes, além de serem industrializados ou utilizados para a extração da papaína. O Brasil detém o título de segundo maior produtor e exportador de mamão do mundo (IBGE, 2018).

O mamão é uma espécie trioica, ou seja, apresenta três formas sexuais: masculina, feminina e hermafrodita. Inicialmente, com base nas taxas de segregação de cruzamentos entre os três tipos sexuais, foi proposto que a determinação do sexo no mamão é controlada por um único gene com três alelos, M1, M2 e m. Indivíduos do sexo masculino (M1m) e indivíduos hermafroditas (M2m) heterozigotos, indivíduos do sexo feminino (mm) homozigotos recessivos, enquanto as combinações dominantes M1M1, M2M23 e M1M2 sendo todas letais (Hofmeyr, 1938). Mais tarde, com o mapeamento genético e físico, chegou-se à conclusão de que o sexo na cultura é geneticamente determinado por um par de cromossomos sexuais (XX feminino, XY masculino e XY<sup>h</sup> hermafrodita), havendo uma região genômica nos cromossomos Y e Y<sup>h</sup> onde a recombinação com o X é suprimida. Esta região está envolvida na determinação dos gêneros masculino e hermafrodita, sendo designada como a região macho-específica no cromossomo Y (MSY) e como a região específica para o hermafroditismo nos cromossomos Y<sup>h</sup> (HSY) (Ming et al., 2007).

O meio de propagação da cultura mais utilizado é por sementes, pela facilidade de execução e por ser um método mais barato. A semente deve, de preferência, ser proveniente de cruzamentos controlados entre plantas femininas e hermafroditas, entre plantas hermafroditas ou por autofecundação. No primeiro caso, obtém-se 50% de plantas femininas e 50% de plantas hermafroditas; já no segundo e terceiro casos, é obtida uma proporção de 2/3 de plantas hermafroditas e 1/3 de plantas femininas. Dessa forma, o tipo de semente utilizado é importante, por determinar o potencial de produção, restringindo ou aumentando o valor de outros métodos culturais.

Uma das dificuldades envolvendo a produção do mamoeiro é o desconhecimento do sexo em plântulas, sendo possível a sexagem fenotípica somente três a quatro meses após o plantio pela observação de suas flores. A relevância da determinação sexual é devida ao maior interesse comercial por plantas hermafroditas, já que seus frutos apresentam maior valor no mercado, tanto nacional como internacional, em razão de sua forma alongada e de sua menor cavidade interna, permitindo maior relação polpa/volume total do fruto (Dantas et al., 2013).

Para garantir pomares de plantas hermafroditas, plantam-se três a quatro mudas de mamão por cova, para, após a sexagem, ser feito o desbaste das plantas femininas. Esse processo contribui para o desperdício de pelo menos 10% da área de plantio dessa frutífera, levando a um maior gasto com sementes, mudas, irrigação, nutrientes minerais e serviços adicionais nas lavouras no primeiro ano de estabelecimento da cultura. Além disso, plantar mais de uma muda por cova promove maior competição por água, luz e nutrientes, o que desfavorece o desenvolvimento das plantas, podendo provocar seu estiolamento (Costa et al., 2003a).

O mamoeiro apresenta um ciclo de produção com aproveitamento comercial de aproximadamente 16 meses, o que é um tempo relativamente curto. Como o início da frutificação do mamão ocorre entre oito e nove meses após o semeio, a cultura tem um ciclo de vida total próximo de 24 meses. Desse modo, a cada dois anos, em média, as lavouras de mamão devem ser renovadas, tornando grande a demanda por sementes ou mudas para a manutenção de plantios com produção de qualidade (Ferregueti, 2008).

Nesse sentido, são de fundamental importância as alternativas que busquem a determinação precoce do sexo em plantas de mamoeiro, já que a diferenciação morfológica em mudas não se mostrou promissora (Rojas et al., 1985; São José e Cunha, 1988; Arango et al., 2008). Marcadores moleculares já foram desenvolvidos para a sexagem de mudas jovens de mamão, mas requerem desenvolvimento de todas as plantas no campo ou em casa de vegetação para coleta de tecido foliar (Vashistha et al., 2016).

A genotipagem baseada em DNA de sementes é uma alternativa atraente que economiza recursos e tempo. Trata-se de um método de amostragem não destrutivo, que permite a germinação da semente com tecido retirado para a extração de DNA, possibilita que as seleções sejam feitas antes do plantio, evitando a complexidade da amostragem das folhas e economizando espaço no campo (Gao et al., 2008). A sexagem em sementes de mamão pode ser, também, de grande uso em programas de melhoramento, reduzindo custos e mão de obra nas instalações de experimentos, além de servir como base para outros estudos moleculares em sementes.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Fazer a sexagem em sementes de mamão via marcadores moleculares, retirando uma amostra do endosperma para extração de DNA, mantendo o potencial de germinação da semente.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Determinar o melhor tratamento de desinfestação em sementes de mamão;
- Determinar o melhor corte para retirada de tecido do endosperma em sementes de mamão, sem afetar o posterior desenvolvimento do embrião;
- Determinar o tempo de armazenamento de sementes com corte;
- Testar metodologias de extração de DNA em amostras de endosperma de mamão, de modo a obter quantidade suficiente de DNA com boa qualidade; e
- Determinar a eficácia dos marcadores moleculares para a identificação do sexo das plantas avaliadas.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Aspectos gerais da cultura**

##### **3.1.1 Importância econômica**

A fruticultura tem importante papel na economia brasileira, com valor de produção avaliado em R\$ 37 bilhões no ano 2017, com acréscimo de 29,0% quando comparado ao obtido em 2015. A cultura do mamoeiro gerou cerca de R\$ 927 milhões em 2017 e está na sexta posição entre as fruteiras com maior produção nacional, sendo responsável por mais de 4% de toda produção, ficando atrás apenas da laranja, banana, abacaxi, uva e maçã (IBGE, 2018).

O Brasil, segundo maior produtor de mamão, respondeu com 14,16% da produção mundial entre os anos de 2010 e 2014. A Índia é o país responsável pela maior produção, com uma representatividade de 42,36% da produção mundial durante o mesmo período. Outros países que se destacam na produção são a Indonésia (6,07%), o México (5,99%), a República Democrática do Congo (1,88%), a Tailândia (1,60%) e a Colômbia (1,31%) (FAOSTAT, 2017).

O mamoeiro é cultivado em praticamente todo o território nacional, porém a Bahia e o Espírito Santo concentram 65% da produção brasileira. Do total de 1,05 milhão de toneladas produzidas no país em 2017, o Estado da Bahia respondeu por 369 mil toneladas, o Espírito Santo por 311 mil toneladas e o Ceará por 115 mil toneladas. Nesse cenário, também se destaca o Rio Grande do Norte, com 86 mil toneladas produzidas (IBGE, 2018).

O volume mundial de mamão exportado em 2013 foi de 293,4 mil toneladas, correspondendo a US\$ 226,7 milhões. O México, apesar de ser o quarto país maior produtor de mamão, aparece em primeiro lugar como exportador, sendo responsável por aproximadamente 40% das exportações. O Brasil gerou US\$ 48,8 milhões com a exportação e ocupa a segunda posição, com 9,7% da exportação mundial, seguido de Belize, com 8,7% (FAOSTAT, 2017).

A produção do mamão destina-se basicamente à produção de frutos, sendo sua principal forma de consumo *in natura*, tanto no mercado nacional como no internacional. A fruta do mamão é altamente apreciada em todo o mundo pelo seu sabor, qualidades nutricionais e propriedades digestivas. A presença de ácidos orgânicos, açúcares e vitaminas (A, B1, niacina e C), além de sua baixa acidez, torna este fruto um excelente alimento para pessoas de todas as idades (Jagtiani, 1988). O fruto maduro pode também ser processado na forma de polpa, néctares (sucos), mamão em calda, doce em massa, geleia, entre outros produtos.

Outra forma pelo qual o mamoeiro tem sido explorado em muitos países consiste na extração da papaína, uma proteína enzimática encontrada no látex do fruto verde, na folha e no tronco da planta. Esta enzima é empregada em muitas indústrias, e seu uso vem sendo expandido ao longo do tempo. O maior consumo da papaína está na indústria de alimentos, principalmente para clarificação de cerveja, amaciamento de carne e extração de proteínas (Matsuura e Folegatti, 2003).

### **3.1.2 Classificação botânica, origem e domesticação**

O mamoeiro cultivado insere-se na classe *Eudicotyledoneae*, subclasse *Archichlamidae*, ordem *Violales*, subordem *Caricinae*, família *Caricaceae*, gênero *Carica*. Essa família compreende seis gêneros: *Vasconcellea*, considerado o maior deles, composto por 20 espécies; *Jacaratia*, composto por sete espécies; *Jarilla*, composto por três espécies; *Cylicomorpha*, com duas espécies; *Horovitzia* e *Carica* com uma espécie cada (Badillo, 1993; Van Droogenbroeck et al., 2002).

As cultivares de mamoeiro mais exploradas no Brasil são classificadas em dois grupos conforme o tipo de fruto: Solo e Formosa. As cultivares do grupo

Formosa produzem frutos maiores, com mais de 1 kg, e são destinados, principalmente, ao mercado interno. As cultivares do grupo Solo apresentam frutos de menor tamanho, pesando de 0,35 a 0,70 kg, sendo produzidos em grande parte para exportação (Dantas e Neto, 2000).

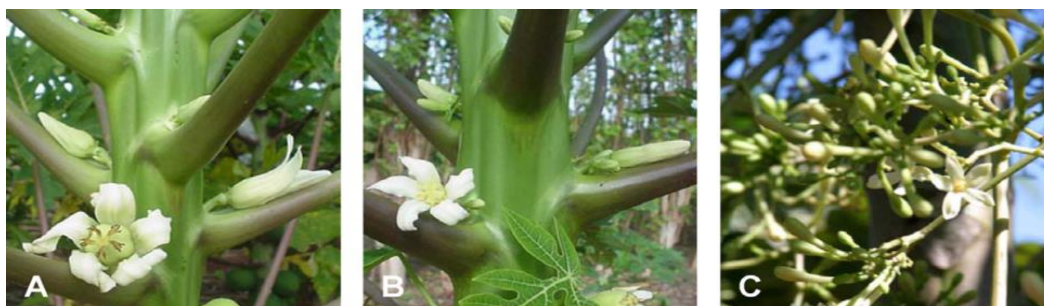
Relatos mostram que os frutos de mamão (e sementes) foram distribuídos da América Central para a América do Sul e outras partes do mundo pelos espanhóis durante o século XVI. O mamoeiro foi descrito pela primeira vez pelo espanhol Oviedo em 1526, nas áreas costeiras do Panamá. Sementes de mamão foram levadas para a República Dominicana antes de 1525, posteriormente para as Filipinas e Malásia, chegando à Índia em 1598. No início do século XVIII, a cultura do mamoeiro já havia sido largamente difundida por vários países tropicais e subtropicais entre 32º de latitude norte e sul. Não há registros de que a cultura tenha sido introduzida no Brasil antes do seu descobrimento, tendo sua expansão sido iniciada com a introdução de variedades do grupo Solo, a partir de 1973 (Ruggiero et al., 2011).

É difícil conhecer a origem precisa da espécie *C. papaya L.* em razão da sua ampla distribuição pelos espanhóis e da sua grande capacidade de adaptação às condições dos ambientes subtropicais e tropicais (Santamaría, 2014). O Centro Mesoamericano é o centro de origem de importantes culturas tropicais, tendo sido sugerido como o centro de origem de *C. papaya L.* Em relação à família *Caricaceae*, o continente americano é apontado como o principal centro de origem, com maior distribuição na América do Sul, onde são encontradas espécies dos gêneros *Vasconcellea*, *Carica* e *Jacaratia*. Restringindo para a espécie *C. papaya L.*, evidências indicam que o centro de origem é a América Central, mais precisamente Sul do México e Costa Rica, onde sua diversidade genética é máxima, o que o caracteriza como uma planta tipicamente tropical (Badillo, 1993).

### 3.1.3 Determinação sexual

O mamoeiro é uma espécie trioica, apresentando plantas femininas, masculinas e hermafroditas. Plantas masculinas são caracterizadas por inflorescências longas, apresentam um traço de pistilo abortado e cinco pares de estames. As plantas femininas têm pedúnculo curto, com poucas flores, não

apresentam estames e têm grandes pistilos funcionais. As flores hermafroditas são bissexuais, com duas séries de cinco estames cada uma e pistilo normalmente pentacarpelado (Ming et al., 2007).



**Figura 1.** Flores de planta (A) femininas, (B) hermafroditas e (C) masculinas de *Carica papaya* L (Ming et al., 2007).

O genoma básico do gênero *Carica* é  $n = 9$  cromossomos, ou seja,  $2n = 2x = 18$ . Dos seus nove pares de cromossomos, sete são metacêntricos e dois, submetacêntricos, sendo todos pequenos, com morfologia uniforme (Damasceno Junior et al., 2009).

Em relação ao sexo do mamoeiro, foi primeiramente proposto ser determinado por um único gene com três alelos. De acordo com esta hipótese, as plantas femininas apresentam genótipo homocigoto recessivo (mm), e alelos dominantes determinam a masculinidade (M1m) ou o hermafroditismo (M2m). As combinações M1M1, M1M2 e M2M2 são incompatíveis por serem letais no zigoto (Hofmeyr, 1938). Mais tarde, Storey (1953) sugeriu que o sexo no mamão seria determinado não por um único gene, mas por um conjunto de genes ligados, que se comportariam como um único fator, em razão de sua localização em uma pequena região dos cromossomos sexuais, em que não ocorre *crossing over*.

Estudos baseados em cruzamentos entre espécies da família *caricaceae* levaram Horovitz e Jimenez (1967) a classificar a determinação do sexo em mamoeiro como do tipo XY. Mais tarde, o avanço nas técnicas moleculares e a biotecnologia reforçaram essa teoria. O conhecimento gerado com dados de sequências de DNA, ligadas à determinação sexual, juntamente com estudos de mapeamento genético e mapeamento físico levaram à conclusão de que um par

de cromossomos sexuais primitivos controla a determinação do sexo em mamão (Ming et al., 2007).

Estudos mostram que os cromossomos sexuais de mamão evoluíram recentemente a partir dos autossomos, pela supressão da recombinação em torno do locus de determinação do sexo, levando à degeneração gradual do cromossomo Y, o que, por sua vez, levou a novos cromossomos sexuais. Existem dois cromossomos Y ligeiramente diferentes no mamoeiro: um Y específico para plantas masculinas e um  $Y^h$  específico para hermafroditas (Ming et al., 2007). O genoma do mamão é relativamente pequeno (442,5 Mb) e a região determinante do sexo dos cromossomos sexuais é curta e bem caracterizada; a região hermafrodita e a masculina específica do cromossomo  $Y^h$  e Y correspondem a 8,1 Mb (15% do cromossomo 1) e a região feminina do cromossomo X corresponde a 3,5 Mb (6% do cromossomo 1) (Wang et al., 2012).

Os cromossomos Y e  $Y^h$  são quase idênticos, com apenas 0,4% de divergência em suas regiões macho-específicas (MSY) (Liu et al., 2004). Pelo menos um cromossomo X é necessário para os genótipos de sobrevivência: XX feminino, XY masculino e  $XY^h$  hermafrodita (Yu et al., 2007). Qualquer combinação dos dois cromossomos Y é letal, como demonstrado pela autopolinização de flores hermafroditas e masculinas e polinização cruzada entre flores hermafroditas e masculinas (Hofmeyr, 1938).

Em razão do fator letal associado aos alelos dominantes do sexo masculino, a segregação sexual é irregular no mamoeiro (Tsai et al., 2016). A maior parte das variedades de mamão são ginoico-andromonoica, apresentando dois terços de plantas hermafroditas e um terço de plantas femininas. Também são encontradas populações dioicas, com metade do sexo masculino e metade das plantas do sexo feminino, como as populações silvestres (Vanburen et al., 2015).

A sexagem do mamoeiro é feita no início do florescimento, em torno de três a quatro meses após o plantio, quando se torna possível a identificação do sexo pela observação de suas flores, uma vez que o tipo de flor determinará o formato dos frutos (Costa et al., 2003a). Os grandes mercados consumidores preferem frutos de forma alongada ou piriforme, que são produzidos em plantas hermafroditas. Estes frutos têm um custo menor de embalagem e transporte porque ocupam menor volume para um mesmo peso. Já a plantas femininas

produzem frutos globosos, com cavidade interna muito grande em relação à espessura da polpa, o que resulta em menor preferência de mercado e menor valor comercial (Marin, 2004).

Para garantir que não mais de 3% das plantas sejam femininas, tanto em áreas produtoras como em áreas experimentais, são necessários o estabelecimento de três mudas por cova até o quarto ou quinto mês após o plantio bem como a remoção de plantas femininas durante a sexagem. Essas atividades ocasionam elevação dos custos, consumindo mais tempo, mão de obra, nutrientes, água, além de atrasar a produção pela competição entre as plantas (Ming et al., 2007).

Diversos estudos foram conduzidos com o objetivo de determinar o sexo das plantas o mais precocemente possível, técnicas de diferenciação morfológica, citológica ou molecular têm sido estudadas (Vashistha et al., 2016). Características como estruturas das sementes, posição da semente no fruto, cor de caule e forma e orientação de folhas, entre outras, não apresentaram resultados satisfatórios na diferenciação sexual em mamoeiro (Rojas et al., 1985; São José e Cunha, 1988; Arango et al., 2008).

## **3.2 Sementes de mamão**

### **3.2.1 Aspectos morfológicos**

As sementes do mamão são geralmente pequenas, redondas ou ovais. No entanto, existe uma nítida diferença no tamanho das sementes entre diferentes genótipos: as sementes do grupo Formosa são maiores, apresentando valores maiores referentes à massa de mil sementes, enquanto as de menor peso são características do grupo Solo. Ainda em relação a seu tamanho, não existe efeito xênia sobre essa característica, sendo o parental feminino o fator determinante para esse atributo. Quando o parental do grupo Solo é utilizado como genitor feminino, as sementes F1 são menores, e quando o parental feminino for do grupo Formosa, as sementes são maiores (Macedo et al., 2013a).

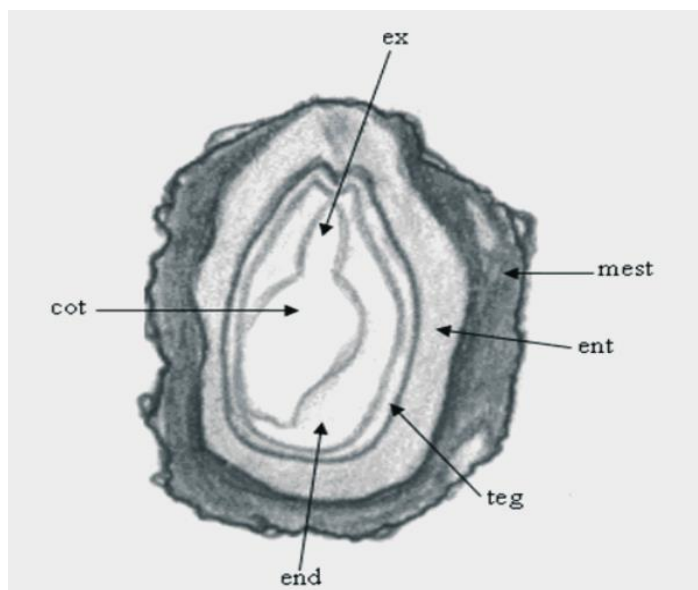
As sementes do mamão são recobertas por uma camada mucilagínosa chamada de exotesta. Apesar de a exotesta (sarcotesta) ser uma camada de proteção que reveste as sementes, sua presença diminui a velocidade e a

porcentagem de germinação. Os compostos fenólicos presentes na sarcotesta das sementes de mamão provocam inibição da germinação, sendo essa camada removida para superar a dormência (Tokuhisa et al., 2007; De Melo e Seleguini, 2013). Normalmente, a remoção da exotesta é feita manualmente pela fricção das sementes em peneiras sob água corrente, mas já foi observado que o uso de hipoclorito de sódio pode ser uma alternativa para sua remoção, além de favorecer o processo de germinação (Jesus et al., 2016).

As sementes secas, maduras e sem sarcotesta, têm formato elipsoide, com protuberâncias e coloração externa marrom escura. Por meio de corte longitudinal da semente, Figura 2, é possível observar que as protuberâncias têm coloração marrom escura na parte mais externa, constituindo a mesotesta. Na sequência, encontra-se a endotesta, caracterizada por uma camada de coloração marrom clara. Abaixo da endotesta, observa-se o tégmen, caracterizado por uma camada de tonalidade bege. Juntas, as camadas da mesotesta, endotesta e tégmen constituem a estrutura do tegumento (Santos et al., 2009). Essa estrutura é constituída de tecido materno, ou seja, desenvolve-se dos integumentos do óvulo, refletindo, assim, o genótipo da planta-mãe (Marcos Filho, 2005). Formando uma cobertura protetora da semente, o tegumento tem várias funções que podem ser assim listadas: manter unidas as partes internas da semente; proteger os tecidos meristemáticos e de reserva contra choques; servir de barreira à entrada de microorganismos e insetos; e regular a velocidade de hidratação da semente, entre outras funções (Carvalho e Nakagawa, 2000).

Abaixo do tegumento, encontra-se o endosperma, Figura 2, tecido de reserva que garante a nutrição do embrião em desenvolvimento. Nas angiospermas, o endosperma é formado pela fusão de um gameta masculino com os dois núcleos polares do gametófito feminino. Essa fusão dá origem ao núcleo triploide do endosperma, que se desenvolve por divisões mitóticas e apresenta, no seu conjunto genômico, duas cópias dos alelos maternos e uma cópia do alelo paterno, sendo, portanto, um tecido triploide (Carvalho e Nakagawa, 2000). O endosperma das sementes do mamoeiro tem coloração branco-leitosa e consistência firme, suas células contêm lipídios, camada proteica de aleurona, sendo desprovidas de amido (Santos et al., 2009).





**Figura 2.** Semente de *Carica papaya* L. Corte longitudinal com esquema. Legenda: mest - mesotesta; ent - endotesta, teg - tégmen, cot - cotilédone, end - endosperma, ex - eixo embrionário hipocótilo radícula (Santos et al., 2009).

Bem aderidos ao endosperma, encontram-se o eixo embrionário e dois cotilédones, que, juntos, formam o embrião (Figura 2). Apesar de bem aderidos ao endosperma e terem a mesma coloração branco-leitosa, o embrião é uma estrutura individualizada (Santos et al., 2009). Essa estrutura se desenvolve a partir de um zigoto, originário da fusão da oosfera com um dos núcleos reprodutivos do grão de pólen. Sendo parte do embrião, o cotilédone é um tecido vivo que forma as primeiras folhas embrionárias. Dispondo de todo um aparato necessário para promover a degradação e o transporte das próprias substâncias de reserva, o cotilédone visa a nutrir o crescimento do eixo embrionário no processo de germinação (Marcos Filho, 2005).

O eixo embrionário é a parte mais importante da semente, pois apresenta a capacidade de se desenvolver, graças à presença de tecido meristemático nas suas duas extremidades. Devido a esse fato, apresenta condições de, através de divisões celulares, promover o crescimento deste eixo nos dois sentidos, o das raízes e das plântulas, e originar uma plântula com condições de se fixar no solo e fotossintetizar as substâncias necessárias para o seu desenvolvimento (Carvalho e Nakagawa, 2000).

### 3.2.2 Aspectos fisiológicos

A germinação das sementes de mamão pode ser lenta e irregular, apresentando dormência, que é atribuída à presença da sarcotesta e também à época de formação/colheita dos frutos (Brasil, 2009). A literatura diverge quanto à classificação do comportamento de sementes de mamão. Ellis et al. (1991) classificaram a semente de mamão como intermediária, por mostrar queda da viabilidade quando armazenadas a temperatura abaixo de 15°C para teores de água entre 8,0% e 9,5%. Althoff e Carmons (1999) verificaram que sementes de mamão podem ser dessecadas até teor de água de 15% b.u. e armazenadas em temperatura ambiente sem perder o poder germinativo, não mostrando resistência ao armazenamento em baixas temperaturas (5°C e -18°C). Berbert et al. (2008) observaram que sementes armazenadas a 15°C com umidade relativa de 7,7% apresentaram germinação significativamente maior que a germinação observada para as sementes que não foram armazenadas, ou seja, imediatamente após a secagem. Os mesmos autores concluíram que a classificação das sementes de mamão se aproxima mais das ortodoxas, apesar de terem observado uma queda significativa no poder germinativo quando o período de armazenamento foi aumentado de 4 para 8 meses.

A propagação seminífera do mamoeiro é feita por semeadura em ambiente protegido. Dependendo do genótipo e das condições ambientais, a emergência é iniciada entre 10 e 20 dias, havendo estabilização entre 35 e 40 dias. Considerando o início da semeadura, uma muda estará pronta para ser levada ao campo com 30 a 50 dias (Dantas et al., 2013). A utilização de sementes de alta qualidade é fundamental para o estabelecimento de mudas vigorosas e saudáveis. A expressão do vigor de sementes durante a germinação depende de fatores externos como água e temperatura e de fatores internos como a constituição bioquímica e a mobilização dos compostos de reservas das sementes (Marcos Filho, 2005).

Os fatores genéticos também influenciam na qualidade das sementes, havendo para a cultura do mamoeiro elevada divergência genética para atributos relacionados à germinação e ao vigor (Cardoso et al., 2009; Macedo et al., 2013b). As sementes de cada genótipo apresentam especificidade com relação

às características morfoanatômicas, à constituição química, assim como às respostas fisiológicas (Marcos Filho, 2005).

### **3.4. Genotipagem em sementes**

Genotipagem é o processo que permite a identificação de pequenas regiões do DNA denominadas marcadores moleculares. Herdados geneticamente de forma simples e previsível, sem apresentar influência por efeitos ambientais, os marcadores são características que diferenciam dois ou mais indivíduos. No melhoramento genético de plantas, têm sido desenvolvidos marcadores moleculares ligados a diferentes características de importância econômica, permitindo a seleção indireta do caráter desejável em gerações segregantes precoces (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Essa técnica fornece uma ferramenta útil para mapear o *locus* de determinação do sexo no genoma do mamoeiro. Diversos tipos de marcadores foram desenvolvidos para a cultura, tornando possível a obtenção de mudas de mamão já sexadas (Tabela 1).

A extração de DNA é o primeiro passo para a genotipagem. Neste aspecto, a qualidade e a integridade do DNA são fundamentais para o sucesso nas etapas posteriores. Existem diferentes protocolos de extração de DNA, que variam em função da espécie e do tecido a ser utilizado (Costa e Moura, 2001). Para a cultura do mamão, assim como para a maioria das plantas, a extração de DNA é feita nas folhas. Dessa forma, um gerenciamento de um grande número de mudas se faz necessário, sendo cada planta numerada e ordenada até o fim das análises moleculares. Crescer e manter plantas na estufa ou no campo requer mais espaço, coordenação do tempo e outros recursos (Chunwongse et al., 1993).

**Tabela 1.** Marcadores moleculares desenvolvidos para a identificação do sexo em mudas jovens de mamão.

<b>Tipo de marcador</b>	<b>Tamanho do fragmento</b>	<b>Identificação</b>	<b>Referência</b>
SSR	5 kb	Masculino	Parasnis et al., 1999
SCAR	800 pb	Masculino	Parasnis et al., 2000
RAPD	438 pb	Hermafrodita	Lemos et al., 2002
SCAR	800 pb	Masculino e Hermafrodita	Deputy et al., 2002
SCAR	450 pb	Masculino e Hermafrodita	Urasaki et al., 2002
SCAR	900 pb	Masculino	Chaves-Bedoya e Nuñez, 2007
ISSR	-	Feminino e Hermafrodita	Gangopadhyay et al., 2007
SCAR	1.7 kb 0.4 kb 2.18 kb	Masculino e Hermafrodita	Niroshini et al., 2008
ISSR	500 pb	Feminino e Hermafrodita	Costa et al., 2011
SCAR	800 pb	Masculino e Hermafrodita	Chaturvedi et al., 2014
SNPs	585 pb 548 pb	Masculino	Liao et al, 2017

Nesse contexto, a genotipagem feita em tecidos de sementes surgiu como uma alternativa para seleção de indivíduos antes do plantio. Esta metodologia já foi desenvolvida para algumas culturas, como arroz (Chunwongse et al., 1993; Kang et al., 1998), cevada (Post et al., 2003), soja (Kamiya e Kiguchi, 2003), milho (Sangtong et al., 2001; Gao et al., 2008; Martin et al., 2009), amendoim

(Chenault et al., 2007), castanhas (Akkak et al., 2008), melancia (Meru et al., 2013) e algodão (Zheng et al., 2015).

As principais diferenças entre a genotipagem baseada em DNA de sementes e genotipagem de tecido foliar são a coleta das amostras, a extração de DNA e o gerenciamento de planta em campo ou em casa de vegetação. Ambas as abordagens compartilham procedimentos de genotipagem comuns, fazendo uso dos mesmos marcadores moleculares. Tendo como referência as diferenças das duas genotipagens, Gao et al. (2008) mostraram que, para a cultura do milho, o custo total da genotipagem em sementes é 24,6% menor do que a genotipagem à base de DNA foliar.

Para que a genotipagem em sementes tenha maior aplicabilidade, deve-se retirar uma amostra de tecido da semente de modo a não afetar o potencial de germinação do embrião. Além disso, o DNA extraído deve ser de quantidade e qualidade suficientes para permitir a análise genotípica e também estar desprovido de contaminação com tegumento, o que pode levar a erros de genotipagem. Os tecidos de sementes que podem ser utilizados para a extração de DNA incluem endosperma e cotilédone (Gao et al., 2008).

Sementes com corte podem apresentar taxas de germinação reduzidas, uma vez que o endosperma é fonte de nutrição durante o crescimento inicial das mudas. Outro problema da retirada de tecido da semente é o aumento da infecção por patógenos, principalmente por fungos. Por consequência o tratamento das sementes com fungicida auxilia na germinação das sementes com corte (Chunwongse et al., 1993; Zheng et al., 2015).

Pesquisas já comprovaram a possibilidade de utilizar um pequeno pedaço de endosperma ou cotilédone para extração de DNA, minimizando a influência da amostragem na germinação da semente. Para sementes de milho, 8 mg de tecido do endosperma já são suficientes (Gao et al., 2008). Em sementes de algodão, aproximadamente 3,5 mg de cotilédone foram obtidos de sementes maiores, sendo que para sementes menores, retirou-se cerca de 1,5 mg de tecido para genotipagem (Zheng et al., 2015). A amostragem da metade do tamanho total de sementes de melancia reduziu a porcentagem de germinação e o vigor de cultivares com sementes pequenas, indicando que a retirada de grandes porções de genótipos com sementes menores pode esvaziar as reservas de energia necessárias para germinação e crescimento. Já a remoção de 1/3 da porção distal

da mesma semente de melancia não influenciou a germinação, assim como a retirada de metade do tecido de sementes com maior tamanho (Meru et al., 2013).

Nem todas as espécies de planta permitem a extração de DNA de forma a não afetar a germinação da semente, sendo para algumas necessário mais trabalho para otimização de um protocolo. A anatomia e o tamanho da semente são fatores importantes para o sucesso do processo (Chunwongse et al., 1993). Sementes de espécies de brássicas e de algumas espécies de solanáceas, por exemplo, são muito pequenas e difíceis de cortar. As sementes de milho e feijão contêm grandes quantidades de amido, o que reduz a qualidade do DNA extraído (Chunwongse et al., 1993).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

As sementes de mamoeiro foram provenientes da empresa Caliman Agrícola S/A, já secas e sem sarcotesta. Dois genótipos da espécie foram utilizados em todos os experimentos, cujas características são representadas a seguir.

1. Golden - Linhagem do grupo Solo selecionada pela Caliman Agrícola S/A no município de Linhares – ES, proveniente de seleção massal feita nos campos de produção de ‘Sunrise Solo’. Esse genótipo apresenta frutos e plantas de coloração verde-clara, os frutos são piriformes, com polpa vermelho-alaranjada e peso médio em torno de 0,45kg. A casca é lisa e contém certa tolerância à mancha fisiológica do mamoeiro, tornando-a uma cultivar aceitável no mercado externo.

2. UENF-CALIMAN 01 (UC-01) - Híbrido desenvolvido pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro em parceria com a empresa Caliman Agrícola S/A. Esse híbrido foi desenvolvido para as Regiões Norte e Noroeste Fluminense, além da porção Norte do litoral do Espírito Santo. Esse genótipo é resultante do cruzamento de ‘Sunrise Solo 72/12’ com o ‘JS12’, ou seja, um genitor do grupo Solo e um genitor do grupo Formosa. As características fenotípicas são equivalentes às plantas do grupo Formosa, com frutos alongados nas plantas hermafroditas e peso médio de 1,25 kg de polpa firme e vermelha, além do alto teor de sólidos solúveis, sabor e aroma bastante agradáveis.

## 4.2 Germinação de sementes com corte (Experimento 1)

O experimento foi conduzido no Laboratório de Tecnologia de Sementes (LFIT), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes/RJ. O teste de germinação foi feito em rolos de papéis Germitest embebidos em água, mantidas em BOD com temperatura controlada de 20-30° C e fotoperíodo de oito horas. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo cada tratamento formado por quatro repetições de 25 sementes. As avaliações foram feitas mediante teste de vigor, estimado pela contagem de plântulas normais fortes aos 15 dias e teste padrão de germinação, estimado pela contagem de plântulas normais aos 30 dias (Brasil, 1992). Foram classificadas como plântulas normais fortes as que se apresentavam vigorosas, com parte aérea e sistema radicular bem desenvolvido.

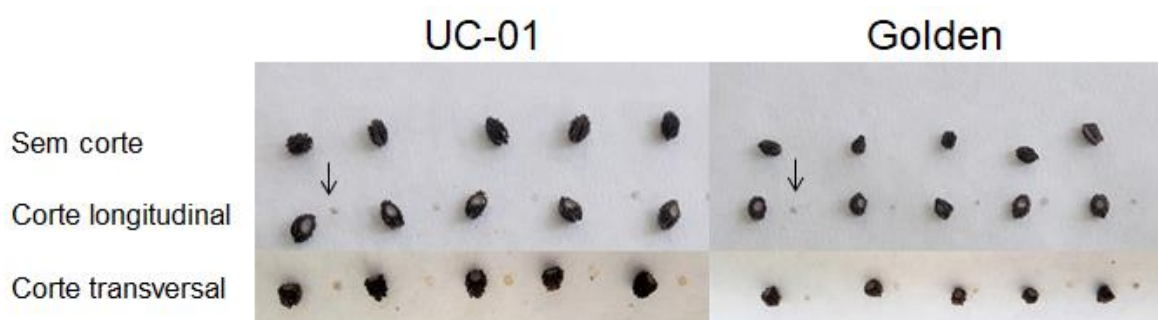
Tendo como objetivo testar a capacidade de germinação das sementes após o corte, o melhor tipo de corte e o melhor tratamento para desinfestação, o experimento foi formado por um fatorial 3x3, variando o tipo de corte (sem corte, corte transversal e corte longitudinal) e o tipo de desinfestação (sem desinfestação, NaOCl e fungicida) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Descrição dos tratamentos do experimento 1.

<b>Tratamento</b>	<b>Corte</b>	<b>Desinfestação</b>
T1	Sem corte	Sem desinfestação
T2	Sem corte	NaOCl
T3	Sem corte	Fungicida
T4	Corte transversal	Sem desinfestação
T5	Corte transversal	NaOCl
T6	Corte transversal	Fungicida
T7	Corte longitudinal	Sem desinfestação
T8	Corte longitudinal	NaOCl
T9	Corte longitudinal	Fungicida



A retirada parcial do endosperma e do tegumento foi feita por cortes dirigidos, com o auxílio de uma lâmina, sem atingir o embrião. Dois tipos de corte foram realizados: corte transversal, retirando tecido da parte distal da semente, oposta ao eixo embrionário; e corte longitudinal, do meio da semente até sua parte distal, oposta ao eixo embrionário (Figura 3). Para os dois cortes, o endosperma foi utilizado como amostra para a análise molecular, tendo as partes do tegumento também sido retiradas com o corte e descartadas. O endosperma retirado de cada semente foi armazenado em placas de PCR de 96 poços e mantido em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a data da extração do DNA. A amostra do endosperma foi identificada assim como sua respectiva semente, que foi cortada para posterior validação da sexagem molecular e fenotípica.



**Figura 3.** Cortes (longitudinal e transversal) realizados nas sementes de mamão (UC-01 e Golden) para retirada de endosperma. A amostra de endosperma retirada está identificada pela seta.

Para determinar a melhor forma de controlar a contaminação das sementes cortadas, foram testadas três tipos de desinfestação. A primeira utilizou uma solução de  $2 \text{ g L}^{-1}$  de fungicida Cercobin no primeiro umedecimento do papel Germitest. O segundo tratamento foi caracterizado pelo tratamento das sementes com NaOCl, em solução 0,5% por 10 minutos. Ao final do experimento, as plântulas e a amostra do endosperma, provenientes do melhor tratamento, foram utilizadas para a sexagem molecular e fenotípica.

### 4.3 Testes de germinação em casa de vegetação

Os experimentos foram conduzidos em bandeja de plástico contendo 96 tubetes, utilizando substrato comercial Bioplant® com adição de adubo de liberação lenta Basacote®. A condução dos experimentos foi feita em delineamento inteiramente casualizado (DIC), cada tratamento formado por quatro repetições de 25 sementes.

#### 4.3.1 Germinação de sementes com corte (Experimento 2)

Foi testado o desenvolvimento das sementes com corte em condições normais de germinação. O tipo de corte e o método de desinfestação utilizados foram aqueles com melhor resposta obtida com o experimento 1 (Tabela 3).

**Tabela 3.** Descrição dos tratamentos do experimento 2.

<b>Tratamento</b>	<b>Corte</b>	<b>Desinfestação</b>
T1	Sem corte	Sem desinfestação
T2	Sem corte	Fungicida
T3	Longitudinal	Sem desinfestação
T4	Longitudinal	Fungicida

#### 4.3.2 Armazenamento de sementes com corte (Experimento 3)

Para avaliar a tolerância ao armazenamento das sementes com corte, elas foram cortadas para retirada do tecido do endosperma e, posteriormente, armazenadas em câmara de germinação a 4°C até o dia da sementeira (Dantas et al., 2013). Foram testados 5 tratamentos, sendo o primeiro representado pelo tratamento controle (sem corte) e os próximos variando o tempo de armazenamento (sementeira direta após o corte, 3 dias após o corte, 6 dias após o corte e 12 dias após o corte) (Tabela 4). As condições do experimento (tipo de corte e desinfestação) foram idênticas às do melhor tratamento obtido no experimento 2.

**Tabela 4.** Descrição dos tratamentos do experimento 3.

Tratamento	Semeadura
T1	Controle
T2	Direto após o corte
T3	3 dias após o corte
T4	6 dias após o corte
T5	12 dias após o corte

#### 8.4 Análises estatísticas

Os resultados obtidos ao final dos experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade. Os dados também passaram por análise de regressão. Todas as análises estatísticas foram feitas pelo programa estatístico GENES (CRUZ, 2008).

Para os experimentos 1 e 2, a análise de variância empregada foi em esquema fatorial, conforme modelo apresentado abaixo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad \left\{ \begin{array}{l} i = 1, 2, \dots, a, \\ j = 1, 2, \dots, b, \\ k = 1, 2, \dots, n, \end{array} \right.$$

Em que:

$\mu$ : representa a média global;

$\alpha_i$ : representa o efeito do nível  $i$  do fator A;

$\beta_j$ : representa o efeito do nível  $j$  do fator B;

$\gamma_{ij}$ : representa o efeito da interação dos factores A e B; e

$\varepsilon_{ijk}$ : representa um erro aleatório de cada observação, sendo estes erros independentes entre si.

Considerando os factores A e B de efeitos fixos, tem-se o Quadro 1 da ANOVA.

**Quadro 1.** Quadro com esquema da ANOVA para esquema fatorial em DIC.

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
<b>Tratamento</b>	ab - 1	SQTrat	QMTrat	F <sub>Trat</sub>
<b>Fator A</b>	a - 1	SQA	QMA	F <sub>A</sub>
<b>Fator B</b>	b - 1	SQB	QMB	F <sub>B</sub>
<b>Interação</b>	(a - 1) (b - 1)	SQA x B	QMA x B	F <sub>AXB</sub>
<b>Resíduos</b>	ab(n - 1)	SQRes	QMRes	
<b>Total</b>	abn - 1	SQTot		

Os cálculos das somas de quadrados são estabelecidos por:

$$SQTot = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (y_{ijk} - \bar{y}_{...})^2$$

$$SQRes = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (y_{ijk} - \bar{y}_{ij.})^2$$

$$SQA = bn \sum_{i=1}^a (\bar{y}_{i.} - \bar{y}_{...})^2$$

$$SQB = an \sum_{j=1}^b (\bar{y}_{.j} - \bar{y}_{...})^2$$

$$SQA \times B = n \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b (\bar{y}_{ij.} - \bar{y}_{i.} - \bar{y}_{.j} - \bar{y}_{...})^2$$

Para o experimento 3, foi utilizado o modelo de análise de variância simples, representado abaixo:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Em que:

$Y_{ij}$  é o valor observado na unidade experimental que recebeu o tratamento  $i$  ( $i = 1, 2, \dots, t$ ) na repetição  $j$  ( $j = 1, 2, \dots, r$ );

$\mu$  representa a média geral;

$\alpha_i$  representa o efeito do tratamento  $i$ ; e

$\varepsilon_{ij}$  é o erro experimental observado na unidade experimental, que recebeu o tratamento  $i$  na repetição  $j$ .

**Quadro 2.** Quadro com esquema da ANOVA em DIC.

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamento	t-1	SQTrat	QMTrat	F <sub>Trat</sub>
Resíduo	r - 1	SQRes	QMRes	
<b>Total</b>	(t.r) - 1	SQTot		

Os cálculos das somas de quadrados são estabelecidos por:

$$SQ_{Trat} = \frac{\sum_{i=1}^t y_i^2}{r} - \frac{y_{..}^2}{t.r}$$

$$SQ_{Res} = SQ_{Tot} - SQ_{Trat}$$

$$SQ_{Tot} = \sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^r y_{ij}^2 - \frac{y_{..}^2}{t.r}$$

## 8.5 Sexagem fenotípica

As plântulas provenientes do melhor tratamento do experimento 2 foram transplantadas em bandeja de plástico contendo 96 tubetes, utilizando substrato comercial Bioplant®, com adição de adubo de liberação lenta Basacote®. As plântulas permaneceram em câmara de crescimento para aclimação, sendo depois transferidas para casa de vegetação. Após a formação de mudas, os genótipos foram transplantados para a área experimental do Colégio Agrícola Antônio Sarlo, localizado no município de Campos dos Goytacazes/RJ. O espaçamento utilizado foi de 3,0 m entre linhas e de 1,0 m entre plantas. O

processo de sexagem foi feito com base na identificação visual pelo formato dos botões florais.

## 8.6 Sexagem molecular

Seis métodos para extração do DNA genômico das amostras de endosperma foram testados:

1. Kit DneasyPlant Mini – Qiagen, seguindo protocolo do fabricante;
2. Método CTAB (Doyle; Doyle, 1990), com algumas modificações sugeridas por Daher et al. (2002);
3. Método de extração descrito por Meru et al.(2013); e
4. Método CTAB com ajustes descritos abaixo:
  - As amostras de endosperma foram maceradas diretamente no tampão de extração;
  - Foi feita apenas uma lavagem com 400 µl de clorofórmio álcool isoamílico (24:1), sendo ele adicionado diretamente sobre tampão de extração; e
  - O pellet foi lavado apenas uma vez em 400 µL de etanol 70% gelado.
5. Extração de DNA de acordo com protocolo descrito por Zheng et al. (2015).
6. Extração de DNA com tampão do kit comercial Phire™ PlantDirect PCR Master Mix (ThermoScientific™), seguindo protocolo do fabricante.

Após a extração, o DNA foi quantificado por um equipamento de espectrofotometria (NanoDrop 2000C – ThermoScientific) e, posteriormente, as amostras foram diluídas para a concentração de trabalho de 5 ng/µL.

Os marcadores moleculares utilizados nas análises foram: 71E, que amplifica em todos os tipos sexuais (Liao et al., 2017); SCAR W11, que amplifica apenas plantas hermafroditas e masculinas (Deputy et al., 2002), e mais 2 marcadores (PS2 e PS4) desenvolvidos pela equipe de melhoramento do mamoeiro da UENF, que geram uma banda para plantas femininas e duas para plantas hermafroditas (Dado não publicado) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Marcadores moleculares ligados ao sexo no mamoeiro utilizados para sexagem.

<b>Primer</b>	<b>Amplificação/ Fragmentos</b>	<b>Referência</b>
71E	XY/XX/XY <sup>h</sup> - 1000pb	Liao et al., 2017
W11	XY/XY <sup>h</sup> - 792pb	Deputy et al., 2002
PS2	XX - 242pb / XY - 172pb + 242pb	Dado não publicado
PS4	XX - 160pb / XY - 160pb + 213pb	

Para a amplificação dos marcadores citados acima, foram testados dois métodos:

1. O mix de reagentes utilizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas (LMGV) da UENF tem volume final de 13 µL, contendo 10 ng de DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100µM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 2 pM de cada *primer* (F e R) e 1 U de Taq DNA polimerase. As amplificações foram feitas de acordo com o seguinte programa: um ciclo de 5 minutos a 94°C para desnaturação inicial do DNA, seguido de 35 ciclos com 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto com a temperatura (°C) ideal para o anelamento dos iniciadores e 2 minutos a 72°C para a extensão dos *primers* e, posteriormente, um ciclo de 7 minutos a 72°C para a extensão final, com uma redução a 4°C no final da amplificação.
2. Foi utilizado o kit comercial Phire™ Plant Direct PCR Master Mix (Thermo Scientific™), cujo volume final do mix de PCR foi de 10 µL, contendo 2,0 µL de DNA 5ng/ µL, 1 µL do *primer* 5µM, 5 µL de 2X Phire Plant Direct PCR Master Mix e 2 µL de H<sub>2</sub>O para completar o volume final. As amplificações foram feitas de acordo com o seguinte programa: um ciclo de 5 minutos a 98°C para desnaturação inicial do DNA, seguido de 35 ciclos com 10 segundos a 98°C para desnaturação, 10 segundos com a temperatura (°C) ideal para o anelamento dos iniciadores e 40 segundos a 72°C para a extensão dos *primers* e, posteriormente, um ciclo de 2 minutos a 72°C para a extensão final, com uma redução a 4°C no final da amplificação.

Para os protocolos de extração 1, 2, 3 e 4, foram testados os dois métodos de PCR, já para a extração 5, foi utilizado apenas o kit comercial Phire™

Plant Direct PCR Master Mix durante todo o processo. As ampliações foram feitas no termociclador Gradiente, da marca Applied Biosystems. Após serem corados com a mistura de Gel Red e Blue Juice (1:1), os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% e submetidos a 0,30 A por 2h. Para a captura da imagem, foi utilizado o sistema de fotodocumentação Mini Bis Pro (Bio-Imaging Systems).

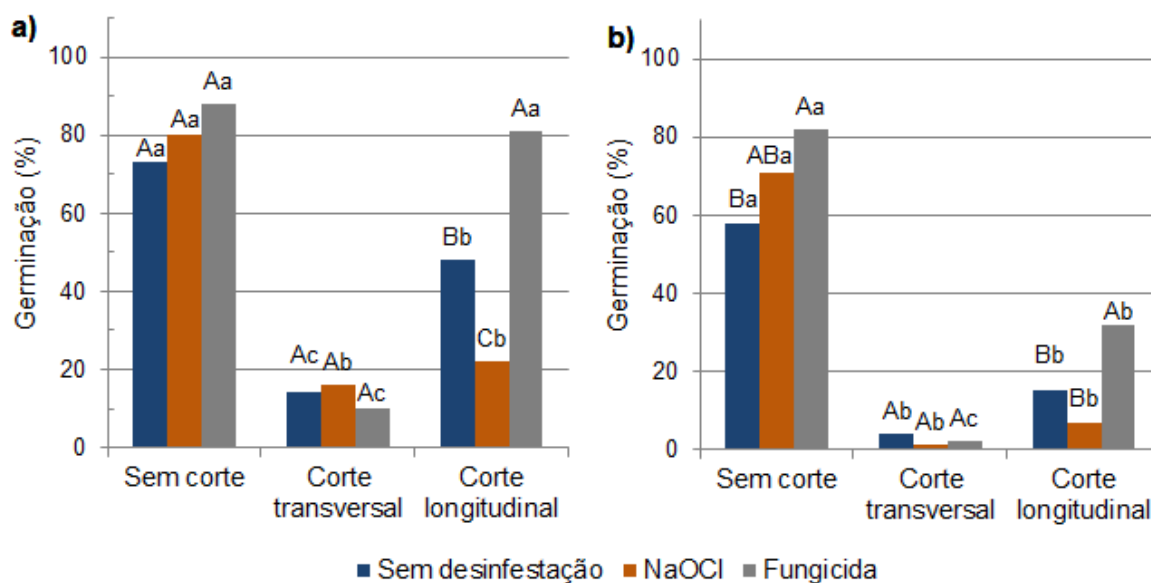


## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Germinação de sementes com corte

O corte longitudinal apresentou melhores taxas de germinação em relação ao corte transversal para as sementes dos dois genótipos analisados. A associação do corte longitudinal com fungicida permitiu uma alta porcentagem de germinação (81%) para o genótipo UC-01, tendo a germinação não diferido estatisticamente do controle (88%). O genótipo Golden também apresentou melhor germinação no corte longitudinal com fungicida (32%), mas o corte levou a uma germinação inferior ao tratamento controle (82%) (Figura 4). A diferença entre os dois genótipos é devida ao tamanho das sementes. O genótipo Golden, por ser padrão Solo, apresenta sementes menores, o que torna a retirada de tecido mais danosa à germinação. Meru et al. (2013) relataram maior dificuldade na retirada de tecido de cultivares de melancia com sementes menores, sendo necessário um corte menor para não comprometer o embrião e não esgotar as reservas de energia necessárias para sua germinação e crescimento.

O corte transversal foi mais danoso para as sementes, pois o desenvolvimento da parte aérea ocorreu sem um enraizamento prévio da semente. Como o corte foi oposto ao eixo embrionário, o cotilédone emergiu pela abertura do corte com a pressão exercida na semente em razão do desenvolvimento do eixo embrionário. Em condições normais, a radícula, parte do embrião que irá formar a raiz, deve ser a primeira parte da semente a emergir durante a germinação



**Figura 4.** Porcentagem de germinação de sementes a) UC-01 e b) Golden submetidas a diferentes tipos de corte (sem corte, corte transversal e corte longitudinal) combinados com diferentes métodos de desinfestação (sem desinfestação, NaOCl e fungicida).

\*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tipo de corte não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro de cada método de desinfestação não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados mostraram que a utilização de um método de desinfestação é indispensável na germinação de sementes com corte. A retirada de tecido torna a semente mais exposta ao meio, facilitando a infestação por micro-organismos, principalmente fungos (Chunwongse et al., 1993; Zheng et al., 2015). O fungicida Cercobin foi eficiente na prevenção da contaminação das sementes com corte, permitindo uma melhor germinação do embrião. Por outro lado, o tratamento das sementes em solução de NaOCl antes do corte afetou negativamente a germinação. Mesmo a desinfestação sendo feita antes do corte, a posterior exposição da semente ao meio permitiu que o NaOCl fosse tóxico ao embrião.

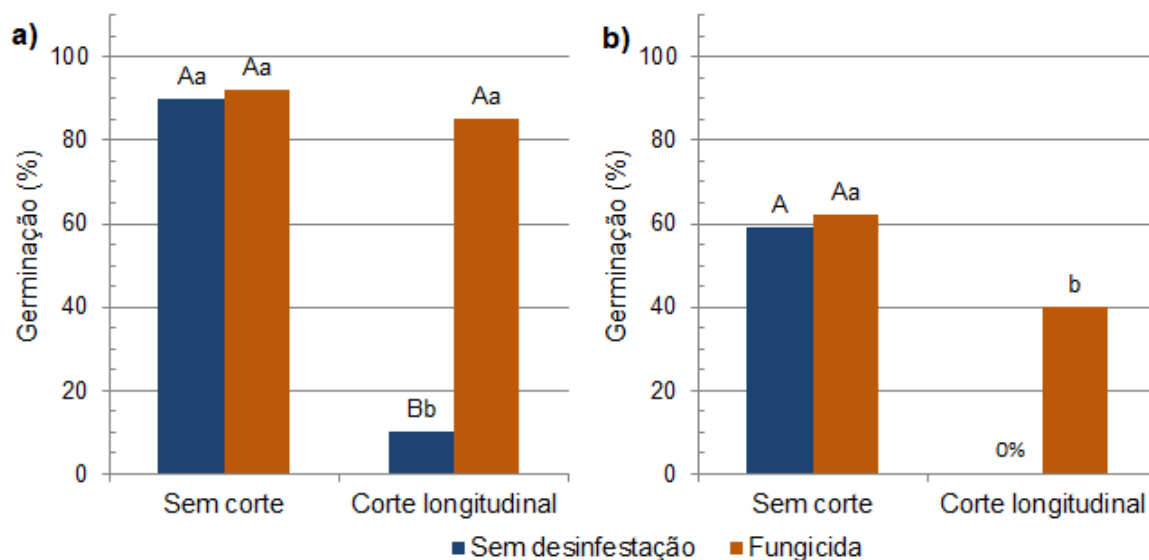
Como o corte longitudinal associado à desinfestação com fungicida permitiu a melhor taxa de germinação, esse protocolo foi utilizado para o teste de germinação em condições normais de propagação de semente de mamão. O experimento foi primeiramente conduzido aplicando o fungicida Cercobin apenas no dia do semeio, tendo a germinação das sementes com corte sido praticamente nula. Percebeu-se que as sementes após 15 dias de semeio estavam com alta taxa de contaminação por fungos.

Em razão das regas diárias, o fungicida aplicado foi cada vez mais diluído, o que não permitiu uma desinfestação satisfatória das sementes. No experimento em laboratório, as condições são mais controladas, tendo uma aplicação de fungicida sido suficiente. Em razão desse resultado negativo, o experimento foi repetido, aumentando o número de vezes de aplicação do produto. O fungicida Cercobin foi aplicado quatro vezes: a primeira aplicação no dia do semeio e as outras aplicações com dois dias de intervalo entre cada uma. Dessa forma, obteve-se uma boa germinação das sementes UC-01 com corte longitudinal, não diferindo estatisticamente das sementes controle que não receberam corte. Por outro lado, assim como no experimento anterior, sementes Golden com corte longitudinal apresentaram germinação inferior ao controle (Figura 5).

Para que a sexagem em sementes seja viável, é necessário fazer a amostragem em sementes que apresentem alta taxa de germinação. Pode-se observar que a taxa de germinação das sementes Golden foi bem inferior à germinação das sementes UC-01 (Figura 5). Além de o corte prejudicar o desenvolvimento do embrião, a semente em si apresenta menor germinação. Em razão dessa diferença entre os genótipos, geralmente, são semeadas em condições normais. Para genótipos Formosa, uma semente por tubete e para as variedades do grupo Solo, duas ou mais sementes por tubete, que, após a germinação, são desbastadas, permanecendo uma muda por tubete (Costa et al., 2003b). Dessa forma, para obter uma quantidade de plantas sexadas antes do semeio, seria necessário fazer a sexagem em um número bem maior de sementes Golden, levando em consideração cerca de 60% de perda, resultante da menor taxa de germinação (natural para essa variedade) da semente e do prejuízo gerado pelo corte.

Apesar de as sementes Golden com corte não apresentarem boa porcentagem de germinação, obter um protocolo para sementes padrão Formosa já é um grande avanço. É importante resaltar que o genótipo pertencente ao grupo Formosa utilizado no presente estudo (UC-01) é um híbrido, sendo nesse caso a sexagem precoce mais vantajosa. A proporção de plantas femininas obtida com sementes híbridas (50%) é maior, quando comparada com sementes de linhagens (30%). Para garantir pomares com plantas hermafroditas, plantam-se geralmente 4 mudas por cova para híbridos e 3 mudas para linhagens. Além do

maior gasto com mudas de híbridos, suas sementes têm maior valor no mercado. A obtenção de sementes híbridas é mais trabalhosa, uma vez que é feita polinização controlada de parentais não disponibilizados (Dantas et al., 2013). A produção de sementes para linhagens pode ser feita pelo próprio produtor, obtendo as sementes de frutos provenientes de flores autopolinizadas (plantas hermafroditas) (OECD, 2005).

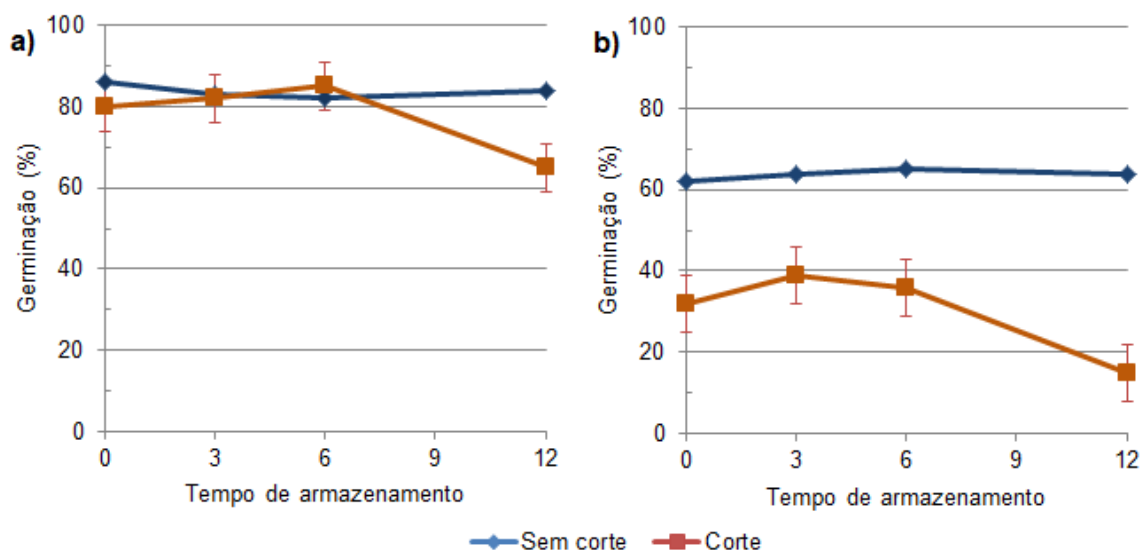


**Figura 5.** Porcentagem germinação de sementes a) UC-01 e b) Golden submetidas a diferentes tipos de corte (sem corte, corte transversal e corte longitudinal) combinados com diferentes métodos de desinfestação (sem desinfestação, NaOCl e fungicida).

\*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada corte não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas entre cada método de desinfestação não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 5.2 Armazenamento de sementes com corte

As sementes com corte armazenadas por até 6 dias a 4°C não apresentaram redução na taxa de germinação. Por outro lado, o tempo de armazenamento prolongado para 12 dias afetou negativamente a germinação para os dois genótipos (Figura 6).



**Figura 6.** Porcentagem de germinação de sementes UC-01 (a) e Golden (b) armazenadas a 4°C em câmara de germinação, por diferentes períodos (0, 3, 6 e 12 dias).

Como o objetivo do trabalho é o semeio apenas após a sexagem molecular, é necessário armazenar as sementes com corte pelo menos durante as análises moleculares. O prazo de 6 dias é suficiente para a extração de DNA, reação de PCR e posterior visualização dos resultados por eletroforese. Assim, os resultados mostram que é possível fazer o semeio com as sementes já sexadas.

Apesar de 6 dias serem suficientes para a sexagem molecular, armazenar as sementes por um período maior permitiria um cronograma mais flexível. Sementes de algodão perfuradas para amostragem de endosperma não apresentaram viabilidade afetada quando armazenadas por pelo menos um ano em placas de PCR modificadas, sendo mantidas em temperatura ambiente em um laboratório convencional com ar condicionado (Zheng et al., 2015). Para a cultura do milho, sementes submetidas a cortes foram armazenadas por até 30 dias a 4°C sem afetar sua germinação (Gao et al., 2008). As sementes de algodão e de milho, diferentemente das sementes de mamão, são classificadas como ortodoxas, portanto, resistentes à dessecação e ao armazenamento em baixas temperaturas.

A classificação das sementes de mamão, de acordo com sua sensibilidade à dessecação ainda é conflitante, pois a literatura apresenta resultados indicando a conservação do seu potencial fisiológico sob ampla

variação do teor de água (Marcos Filho, 2005). Ellis et al. (1991) classificaram as sementes de mamão como intermediárias, mostrando que quanto mais secas e resfriadas, menor seu potencial germinativo. Sendo assim, sementes de mamão em condições normais necessitam de um maior cuidado durante o armazenamento, o que não seria diferente para as sementes com cortes. As sementes com corte ficam mais susceptíveis ao ambiente, podendo ter sua umidade comprometida, além de serem mais suscetíveis a infestações por fungos e bactérias.

O revestimento de sementes é uma técnica promissora que, entre suas vantagens, possibilita a incorporação de nutrientes, fungicidas e inseticidas às sementes, protege de danos mecânicos e estresses abióticos, melhorando, desse modo, a sanidade e o estabelecimento de plântulas (Rao et al., 2017). Estudos envolvendo essa técnica em sementes de mamão com corte podem ser uma alternativa para melhorar seu armazenamento, bem como aumentar seu potencial germinativo. Com essa melhoria, não haveria necessidade de semente logo após as análises moleculares, o que possibilitaria o transporte das sementes com corte e até mesmo sua comercialização.

### **5.3 Sexagem molecular**

Todos os métodos de extração de DNA testados geraram quantidade suficiente de DNA para posterior genotipagem com marcadores moleculares que permitem diferenciação sexual das amostras. Os protocolos de extração variaram na concentração de DNA obtida, sendo que o protocolo 3 (Meru et al. 2013) gerou em média menor concentração de DNA, cerca de 4,2 ng/ $\mu$ l. Com maior concentração de DNA destacou-se o protocolo 5 (Zheng et al. 2015), com média de 28,7 ng/ $\mu$ l. Em relação às médias das relações entre as absorbâncias 260:280 e 260:230, não houve variação relevante entre os protocolos testados (Tabela 7).

Para avaliar a amplificação com o DNA extraído de endosperma a partir de diferentes métodos de extração, o primer constitutivo 71E foi utilizado. Apenas as extrações realizadas com os métodos 1, 3 e 4 foram amplificadas através do protocolo de amplificação utilizado pelo grupo de pesquisas do LMGV (Figura 7A). No entanto, o método de extração 1 apresentou bandas mais claras e a amplificação não ocorreu em todas as amostras. Melhores padrões de amplificação foram obtidos utilizando-se o kit comercial Phire™ PlantDirect PCR

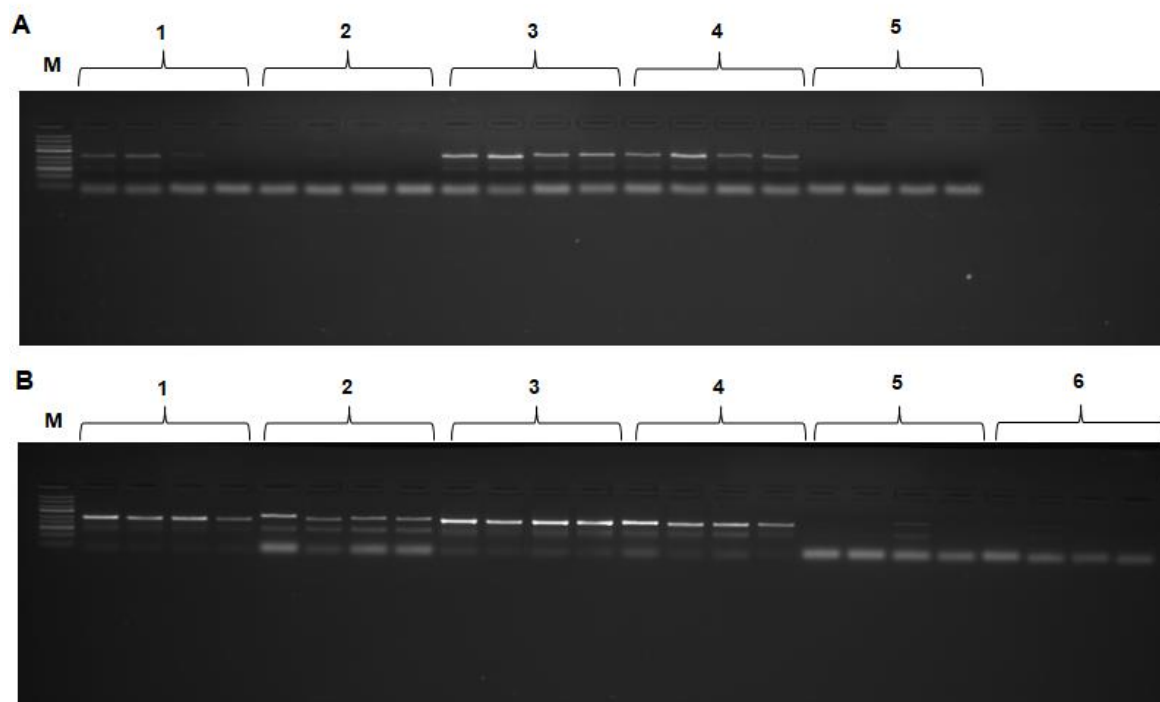
Master Mix. Tendo este método como referência, todas as amostras extraídas pelos métodos 1, 2, 3 e 4 apresentaram bom padrão de amplificação, com clara identificação da banda de interesse (Figura 7B).

**Tabela 7.** Características do DNA extraído de amostras de endosperma de sementes de mamão utilizando diferentes protocolos de extração.

Método de extração	Concentração de DNA (ng/μl)*	Absorbância	
		A260:A280	A260:A230
1.Kit DneasyPlant Mini	5,5±2,5	1,7 ±0,07	0,41±0,04
2.CTAB	7,2±1,2	1,6 ± 0,2	0,46 ± 0,05
3.Meruet al. (2013)	4,3±1,4	1,9 ± 0,4	0,39 ± 0,13
4.CTAB + ajustes	8,3±1,3	2,1 ± 0,6	0,43± 0,07
5.Zhenget al. (2015)	28,7±9,25	1,7 ± 0,05	0,35± 0,13

\*O volume de diluição final das amostras foi de 50 μl.

Como a quantidade de DNA obtida pelos métodos de extração foi satisfatória, a amplificação malsucedida para alguns protocolos pode ter ocorrido pela contaminação por substâncias inibitórias da semente. A PCR é uma reação enzimática, portanto, sensível aos inibidores. A principal consequência de uma inibição parcial ou total da PCR é uma sensibilidade diminuída ou resultados falso negativos, respectivamente (Abd-Elsalam et al., 2011). O endosperma utilizado como amostra é um tecido complexo, pois sua função é garantir a nutrição do embrião em desenvolvimento. Apesar de ser desprovido de amido, suas células são ricas em lipídios e têm uma camada proteica de aleurona (Santos et al., 2009). A presença desses e de outros compostos não conhecidos pode ter reduzido a qualidade do DNA total extraído



**Figura 7.** Amplificação de DNA de endosperma de mamão obtido por vários protocolos de extração utilizando o *primer* 71E. A PCR foi feita por dois métodos: **A.**Mix de reagentes com Taq DNA polimerase; **B.**Kit comercial Phire™ PlantDirect PCR Master Mix. Protocolos de extração testados: **1.** Kit DneasyPlant Mini; **2.** CTAB; **3.**Meru et al. (2013); **4.** CTAB + ajustes; **5.** Zheng et al. (2015); **6.** Tampão Phire™ PlantDirect PCR Master Mix.

As relações entre as absorbâncias de 260/230 e 260/280 são utilizadas como parâmetro de avaliação da qualidade das preparações de ácidos nucleicos. Amostras de DNA extraídas de folha de mamão têm as duas razões próximas a 2. Os valores para a proporção de A260/A230 gerado pelo de endosperma ficaram bem abaixo do esperado, sendo indicativo de contaminação por carboidrato (Gao et al., 2008; Thermo-Scientific, 2009).

Como o DNA extraído de endosperma de mamão apresenta contaminantes que inibem a reação de PCR, é necessário um mix de reagentes mais robusto para a amplificação. O kit comercial Phire™ PlantDirect PCR Master Mix foi mais eficiente na amplificação das amostras. Esse kit utiliza a DNA Polimerase Phire Hot Start II, uma enzima especialmente projetada com um domínio de ligação ao DNA, que aumenta a eficiência da polimerase, além de apresentar resistência extremamente alta a muitos inibidores de PCR encontrados em plantas.



O protocolo 2 (CTAB com ajustes) foi utilizado para extração de DNA das amostras de endosperma referentes às mudas levadas ao campo para a sexagem fenotípica. A escolha do protocolo é devida ao bom resultado obtido com o *primer* 71E e por ser um protocolo de fácil execução, sendo uma simplificação do protocolo CTAB, o qual é utilizado pelo grupo de pesquisado LMGV para extração de DNA de folhas de mamão. Para amplificação das amostras, foi utilizado o kit de PCR Phire™ PlantDirect PCR Master Mix.

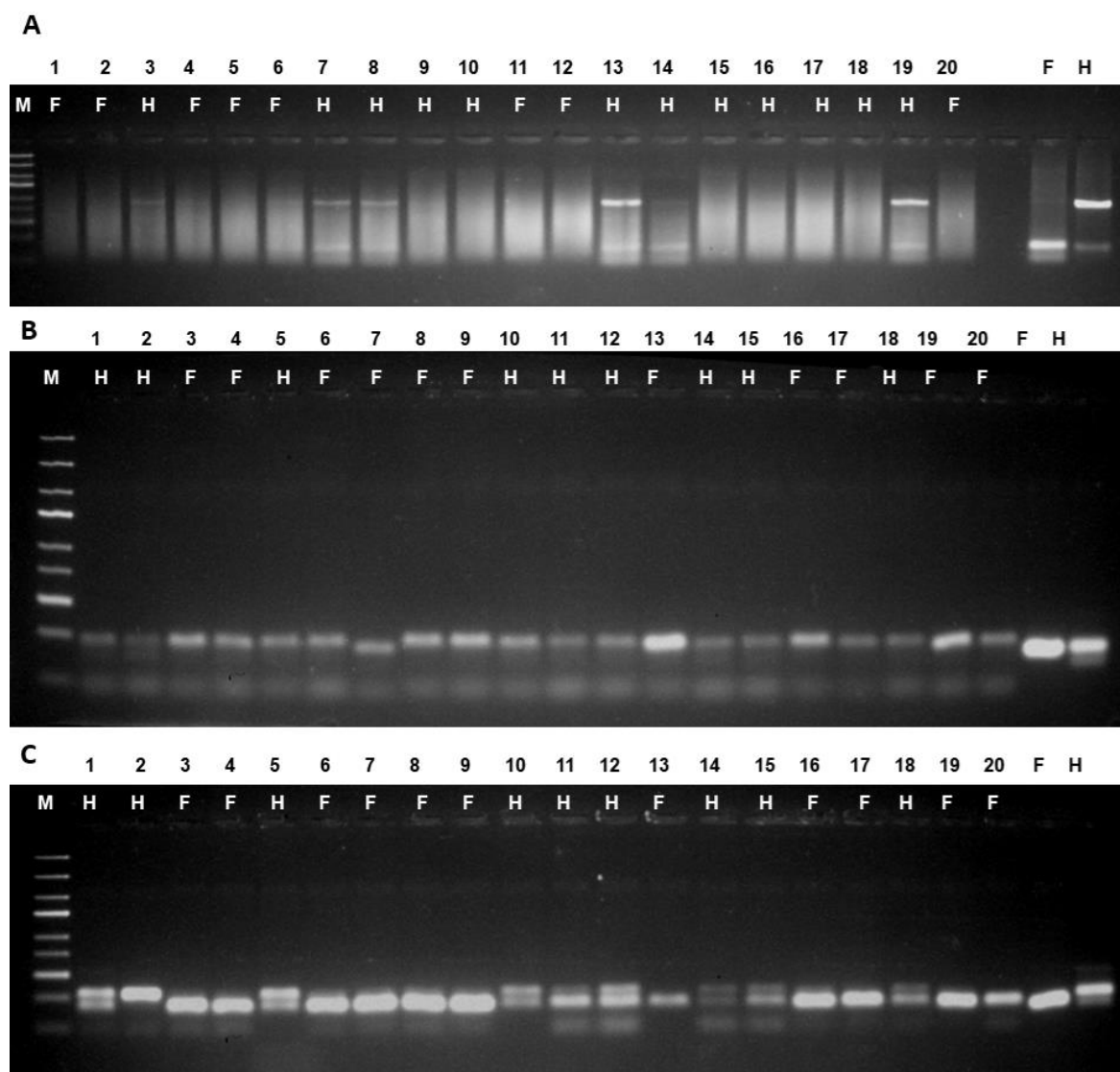
A sexagem molecular foi feita apenas com as amostras das sementes do genótipo UC-01, pois não foi possível fazer a sexagem fenotípica das plantas Golden. Em razão da baixa germinação das sementes Golden submetidas ao corte, obteve-se um pequeno número de mudas que não apresentaram bom desenvolvimento no campo. Esse problema reforça os resultados obtidos com o teste de germinação, mostrando que o corte foi prejudicial para o desenvolvimento das plantas Golden.

Para a sexagem molecular das sementes, foram testados três *primers* distintos. O *primer* W11 não permitiu a diferenciação sexual das amostras de forma eficiente, sendo que das 12 amostras hermafroditas confirmadas pela sexagem em campo apenas 5 apresentaram a banda específica. O *primer* PS2 gerou um resultado de difícil interpretação, visto que não foi possível identificar com precisão a banda específica do hermafroditismo. Por outro lado, o *primer* PS4 foi eficiente na sexagem das amostras, com resultado confirmado pelas plantas sexadas em campo. Todos os *primers* testados foram efetivos com as amostras controle de folha de mamão (Figura 8).

Ausência de amplificação para o marcador W11 em genótipo sabiamente hermafrodita já foi constatada em outros estudos (Deputy et al., 2002; Oliveira et al., 2007; Pirovani et al., 2018). Como a pureza do DNA proveniente de endosperma é menor quando comparado ao DNA de folhas, a proporção de falsos negativos obtidos no presente estudo foi ainda mais significativa.

Os *primers* PS2 e PS4 se anelam em regiões homólogas entre os cromossomos X e Y, mas com diferenças significativas com relação ao tamanho da sequência amplificada em cada tipo cromossômico. A amplificação desses *primers* em plantas femininas gera apenas uma banda homozigota, em razão da presença de duas cópias do cromossomo X no genoma dessas plantas. No entanto, plantas hermafroditas têm cromossomos sexuais heteromórficos a nível

molecular ( $XY^h$ ), o que gera bandas heterozigotas para o loco analisado. Exatamente pela amplificação distinta nos dois sexos, os *primers* se tornam mais vantajosos, pois a chance da ocorrência de falso negativo é menor (Dado não publicado).



**Figura 8.** Sexagem molecular de 20 amostras de DNA de endosperma e duas amostras controle de DNA de folha. Os *primers* 71E (A); PS2 (B) e PS4 (C) foram utilizados para amplificação. O sexo de todas as amostras foi confirmado pela sexagem fenotípica das plantas correspondentes (F- plantas feminais; H-plantas hermafroditas).

O padrão de amplificação dos *primers* PS2 e PS4 em amostras de endosperma foi diferente dos resultados obtidos com folha. Além do problema da

pureza do DNA, esse resultado pode ter ocorrido devido ao tecido triploide das amostras. A banda específica do hermafroditismo gerada pelo *primer* PS2 não ficou nítida nas amostras de endosperma (Figura 8A). Para o *primer* PS4, a banda amplificada do cromossomo X apresentou diferença, sendo que em amostras de endosperma a banda foi mais nítida do que em folhas (Figura 8B). Com o tecido triploide da semente UC-01 é  $XXY^h$ , a amplificação de sequências do cromossomo X fica favorecida. Em sementes de linhagens, a situação poderia ser diferente, pois seu endosperma pode apresentar o cromossomo X ou o  $Y^h$ , com cópia extra. Essa diferença ocorre pelo fato de a natureza triploide do endosperma ser decorrente do saco embrionário, o qual carrega os núcleos polares ( $2n$ ) responsáveis pela formação desse tecido de reserva. O saco embrionário de plantas femininas pode carregar apenas o cromossômico X em suas células, diferentemente de plantas hermafroditas, que apresentam probabilidade igual de carregar o cromossomo X ou o  $Y^h$ . O saco embrionário, correspondente ao gametófito feminino, é formado por sete células e oito núcleos todos de mesma constituição genética (Ferreira e Borghetti, 2004).

O *primer* PS4 permitiu pela primeira vez a diferenciação sexual de sementes de mamão. A contaminação com tecido materno proveniente do pericarpo nas amostras de endosperma não foi problema para as sementes híbridas, visto serem oriundas da polinização controlada de plantas femininas. As sementes de linhagens apresentariam falsos positivos se houvesse tal contaminação, pois nesse caso o tecido materno é hermafrodita.

O protocolo de sexagem molecular apresentado no presente estudo pode ser aplicado em sementes de mamão padrão Formosa, permitindo a obtenção de mudas sexadas antes do semeio, o que diminuirá o gasto com sementes, mudas, irrigação, nutrientes minerais e serviços adicionais nas lavouras no primeiro ano de estabelecimento da cultura. O protocolo também permitirá estudos que necessitam da identificação do sexo em sementes, sem comprometer o desenvolvimento do embrião. Além disso, com o avanço dos estudos, o mesmo protocolo pode ser melhorado para utilização de *primers* que proporcionem a identificação de outras características de interesse além do sexo.

## 6. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu pela primeira vez a sexagem em sementes de mamão padrão Formosa via marcadores moleculares, retirando uma amostra do endosperma para extração de DNA, mantendo o potencial de germinação do embrião.

A extração de DNA de endosperma de sementes de mamão pode ser feita de maneira eficiente, utilizando uma simplificação do protocolo CTAB.

O *primer* PS4 foi eficiente na sexagem das amostras, com resultado confirmado pelas plantas sexadas em campo.

Para sementes padrão Solo, que tem sementes menores, são necessários mais estudos para permitir uma sexagem não destrutiva.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Elsalam, K., Bahkali, A., Moslem, M., Amin, O.E., Niessen, L. (2011) An optimized protocol for DNA extraction from wheat seeds and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) to select *Fusarium graminearum* contamination of wheat grain. *Int J Mol Sci* 12: 3459–3472.
- Akkak, A., Boccacci, P., Botta, R. (2008) An efficient DNA-extraction protocol for nut seeds. *J Food Qual* 31: 549–557.
- Althoff, M., Carmons, R. (1999) Conservação de sementes de mamão (*Carica papaya* L. - Caricaceae). *Rev Bras Sementes* 21: 151–156.
- Arango, L.V., Rezende, C.R. de., Carvalho, S.P. de. (2008) Identificação antecipada do sexo do mamoeiro pelos caracteres físicos das sementes e padrões isoenzimáticos das mudas. *Rev Corpoica – Cienc y Tecnol Agropecu* 9: 22–29.
- Badillo, V.M. (1993) Caricaceae – Segundo esquema. *Rev La Fac Agron La Univ Cent Venez* 43: 1–111.
- Berbert, P.A., Carlesso, V. de O., Silva, R.F. da., Araújo, E.F., Thiébaud, J.T.L., Oliveira, M.T.R. de. (2008) Qualidade fisiológica de semente de mamão em função da secagem e do armazenamento. *Rev Bras Sementes* 30: 40–48.
- Cardoso, D.L., Silva, R.F., Pereira, M.G., Viana, A.P., Araújo, E.F. (2009)

- Diversidade genética e parâmetros genéticos relacionados à qualidade fisiológica de sementes em germoplasma de mamoeiro. *Rev Ceres* 56: 572–579.
- Carvalho, N.M. de., Nakagawa, J. (2000) *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 4.ed. Jaboticabal 588p.
- Chaturvedi, K., Bommisetty, P., Pattanaik, A., Chinnaiyan, V., M. Ramachandra, D., Chennareddy, A. (2014) PCR Detection assay for sex determination in papaya using SCAR marker. *Acta Bot Croat* 73: 291–298.
- Chaves-Bedoya, G., Nuñez, V. (2007) A SCAR marker for the sex types determination in Colombian genotypes of *Carica papaya*. *Euphytica* 153: 215–220.
- Chenault, K.D., Gallo, M., Seib, J.C., James, V.A. (2007) A Non-destructive Seed Sampling Method for PCR-based Analyses in Marker Assisted Selection and Transgene Screening. *Peanut Sci* 34: 38–43.
- Chunwongse, J., Martin, G.B., Tanksley, S.D. (1993) Pre-germination genotypic screening using PCR amplification of half-seeds. *Theor Appl Genet* 86: 694–698.
- Costa, F.R. da., Nair, T., Pereira, S., Paula, A., Gabriel, C., Pereira, M.G. (2011) ISSR markers for genetic relationships in *Caricaceae* and sex differentiation in papaya. *Biotechnology* 11: 1–6.
- Costa, A. de F.S. da., Costa, A.N. da., Santos, F.A.M. dos., Barreto, F.C., Zuffo, V.J. (2003a) *A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção*. Vitória-ES: INCAPER, 497p.
- Costa, A. de F.S. da., Costa, A.N. da., Santos, F.A.M. dos., Barreto, F.C., Zuffo, V.J. (2003b) Plantio, formação e manejo da cultura. *In*: Martins, D. dos S., Costa, A. de F.S. da. (ed) *A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção*. Vitória-ES: Incaper, p. 497 497.
- Costa, M.R.; Moura, E.F. (2001) Manual de extração de DNA. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 27p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 89).
- Cruz CD (2008) Programa GENES: diversidade genética. Viçosa: UFV

- Daher RF, Pereira MG, Pereira A Vander, Amaral Jr. AT do (2002) Genetic divergence among elephantgrass cultivars assessed by RAPD markers in composit samples. *Sci Agric* 59:623–627.
- Damasceno Junior, P.C., Rabelo, F. da C., Pereira, T.N.S., Neto, M.F., Pereira, M.G. (2009) Karyotype determination in three caricaceae species emphasizing the cultivated form (*C. papaya* L.). *Caryologia* 62: 10–15.
- Dantas J.L.L., Castro Neto M.T., (2000) Aspectos botânicos e fisiológicos. In: Mamão produção: aspectos técnicos, Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p.11-14.
- Dantas, J.L.L., Junghans, D.T., Lima, J.F. de. (2013) *O produtor pergunta, a Embrapa responde*. 2.ed. Brasília, DF
- De Melo, A.P.C., Seleguini, A. (2013) Estádio de maturação de frutos e remoção física da sarcotesta na produção de mudas de mamão. *Comun Sci* 4: 20–25.
- Deputy, J., Ming, R., Ma, H., Liu, Z., Fitch, M., Wang, M., Manshardt, R., Stiles, J. (2002) Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). *Theor Appl Genet* 106: 107–111.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small amounts offresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11–15
- Ellis, R.H., Hong, T.D., Roberts, E.H. (1991) Effect of storage temperature and moisture on the germination of papaya seeds. *Seed Sci Res* 1: 69–72.
- FAOSTAT (2017). Crop Production. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 10 de novembro de 2018.
- Ferregueti, G. A. (2008) 01 – O primeiro híbrido de mamão Formosa brasileiro. Disponível: site Caliman Agrícola S/A. [http://www.caliman.com.br/Papaya/Papaya\\_Hibrido.asp](http://www.caliman.com.br/Papaya/Papaya_Hibrido.asp). Consultado em 15 de agosto de 2018.
- Ferreira AG, Borghetti F (2004) Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre
- Gangopadhyay, G., Roy, S.K., Ghose, K., Poddar, R., Bandyopadhyay, T., Basu,

- D., Mukherjee, K.K. (2007) Sex detection of *Carica papaya* and *Cycas circinalis* in pre-flowering stage by ISSR and RAPD. *Curr Sci* 92: 524–526.
- Gao, S., Martinez, C., Skinner, D.J., Krivanek, A.F., Crouch, J.H., Xu, Y. (2008) Development of a seed DNA-based genotyping system for marker-assisted selection in maize. *Mol Breed* 22: 477–494.
- Hofmeyr, J. (1938) Genetical studies of *Carica papaya* L. *South Africa Dep Agric Sci Bull* 187: 64.
- Horovitz, S., Jiminez, H. (1967) Cruzamientos interespecificos e intergenericos en Caricaceas y sus implicaciones fitotecnicas. *Agron Trop* 17: 353–359.
- IBGE. (2018) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acessado em 30 de novembro de 2018.
- Jagtiani, J. (1988) *Tropical fruit processing*. San Diego: Academic Press, 184p.
- Jesus, V.A.M. de., Araújo, E.F., Neves, A.A., Santos, F.L., Dias, L.A. dos S., Silva, R.F. da. (2016) Ratio of seeds and sodium hypochlorite solution on the germination process of papaya seeds. *J Seed Sci* 57–61.
- Kamiya, M., Kiguchi, T. (2003) Rapid DNA Extraction Method from Soybean Seeds. *Breed Sci* 53: 277–279.
- Kang, H.W., Cho, Y.G., Yoon, U.H., Eun, M.Y. (1998) A rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed. *Plant Mol Biol Report* 16: 1–9.
- Lemos, E., Silva, C., Zaidan, H. (2002) Identification of sex in *Carica papaya* L. using RAPD markers. *Euphytica* 179–184.
- Liao, Z., Yu, Q., Ming, R. (2017) Development of male-specific markers and identification of sex reversal mutants in papaya. *Euphytica* 213: 1–12.
- Liu, Z., Moore, P.H., Ma, H., Ackerman, C.M., Ragiba, M., Yu, Q., Pearl, H.M., Kim, M.S., Charlton, J.W., Stiles, J.I., Zee, F.T., Paterson, A.H., Ming, R. (2004) A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature* 427: 348–352.
- Macedo, C.M.P. de., Pereira, M.G., Cardoso, D.L., Silva, R.F. da. (2013a)



- Evaluation of seed physiological quality of papaya elite hybrids, their reciprocal crosses and parents. *J Seed Sci* 35: 190–197.
- Macedo, C.M.P. de., Pereira, M.G., Cardoso, D.L., Silva, R.F. da. (2013b) Evaluation of seed physiological quality of papaya elite hybrids, their reciprocal crosses and parents. *J Seed Sci* 35: 190–197.
- Marcos Filho, J. (2005) *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Fealq. Piracicaba 495p.
- Marin, S.L.D. (2004) *Mamão Papaya: produção, pós-colheita e mercado*. Fortaleza: Instituto Frutal, 82p.
- Martin, A., Troadec, C., Boualem, A., Rajab, M., Fernandez, R., Morin, H., Pitrat, M., Dogimont, C., Bendahmane, A. (2009) A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature* 461: 1136–1139.
- Matsuura, F.C.A.U., Folegatti, M.I. da S. (2003) Processamento de mamão. In: Martins, D. dos S., Costa, A. de F.S. da. (ed) *A cultura do mamoeiro*. Vitória-ES: Incaper, p. 467–492 467–492
- Meru, G., McDowell, D., Waters, V., Seibel, A., Davis, J., McGregor, C. (2013) A non-destructive genotyping system from a single seed for marker-assisted selection in watermelon. *Genet Mol Res* 12: 702–709.
- Ming, R., Yu, Q., Moore, P.H. (2007) Sex determination in papaya. *Semin Cell Dev Biol* 18: 401–408.
- Niroshini, E., Everard, J.M.D.T., Karunanayake, E.H., Tirimanne, T.L.S. (2008) Detection of sequence characterized amplified region (SCAR) markers linked to sex expression in *Carica papaya* L. *J Natl Sci Found Sri Lanka* 36: 145–150.
- OECD (2005). Consensus document on the biology of papaya (*Carica papaya*). OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No 33, France.
- Oliveira, E.J. de., Dantas, J.L.L., Castellen, M.D.S., De Lima, D.S., Barbosa, H.D.S., Motta, T.B.N. (2007) Marcadores moleculares na predição do sexo em plantas de mamoeiro. *Pesqui Agropecu Bras* 42: 1747–1754.

- Parasnis, A.S., Gupta, V.S., Tamhankar, S.A., Ranjekar, P.K. (2000) A highly reliable sex diagnostic PCR assay for mass screening of papaya seedlings. *Mol Breed* 6: 337–344.
- Parasnis, A., Ramakrishna, W., Chowdari, K., Gupta, V., Ranjekar, P. (1999) Microsatellite (GATA) n reveals sex-specific differences in papaya. *Theor Appl Genet* 99: 1047–1052.
- Pirovani, A.A.V., Ramos, H.C.C., Santa-Catarina, R., Vettorazzi, J.C.F., Cortes, D.F.M., Boechat, M.S.B., Bohry, D., Pereira, M.G. (2018) A hermaphrodite genotype in dioecious papaya progeny: sex reversal or contamination?. *Euphytica* 214: 227.
- Post, R. vo., Post, L. vo., Dayteg, C., Nilsson, M., Forster, B.P., Tuveesson, S. (2003) A high-throughput DNA extraction method for barley seed. *Euphytica* 130: 255–260.
- Rao, P.S., Rani, M.S., Ankaiah, R., Rajasri, M., Meena Kumari, K.V.S. (2017) Full research effect of seed coating with polymer, fungicide and insecticide on seed quality in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) during storage. *Int J Bio-Resource Stress Manag* 8: 711–715.
- Rojas, Y., Ramos, R., Salazar, R. (1985) Posible relación del sexo con algunas características morfológicas y agronómicas de la papaya *Carica papaya* L. *Acta agronómica* 35: 20–33.
- Ruggiero, C., Marin, S.L.D., Durigan, J.F. (2011) Mamão, uma história de sucesso. *Rev Bras Frutic* 33: 76–82.
- Sangtong, V., Mottl, E.C., Long, M.J., Lee, M., Scott, M.P. (2001) Serial extraction of endosperm drillings (SEED)—A method for detecting transgenes and proteins in single viable maize kernels. *Plant Mol Biol Report* 19: 151–158.
- Santamaría, G.F. and J.M. (2014) Papaya (*Carica papaya* L.): Origin, Domestication, and Production. *In: Springer. (ed) Genetics and Genomics of Papaya*. New York: p. 3–15 3–15
- Santos, S.A. DOS., Silva, R.F. DA., Pereira, M.G., Alves, E., Machado, J.D.C., Borém, F.M., Guimarães, R.M., Marques, E.R. (2009) Estudos morfo-

- anatômicos de sementes de dois genótipos de mamão (*Carica papaya* L.). *Rev bras sementes* 31: 116–122.
- São José, A.R., Cunha, R.J.P. (1988) Influência da posição da semente no fruto do mamoeiro (*Carica papaya* L.) sobre a percentagem de germinação, expressão do sexo e vigor das mudas. *Científica* 16: 239–241.
- Storey, W.B. (1953) Genetics of the papaya. *Heredity* (Edinb) 44: 70–78.
- Tokuhisa, D., Dias, D.C.F.D.S., Alvarenga, E.M., Hilst, P.C., Demuner, A.J. (2007) Compostos fenólicos inibidores da germinação em sementes de mamão (*Carica papaya*). *Rev Bras Sementes* 29: 180–188.
- Tsai, C.C., Shih, H.C., Ko, Y.Z., Wang, R.H., Li, S.J., Chiang, Y.C. (2016) Direct LAMP Assay without Prior DNA Purification for Sex Determination of Papaya. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms17101630.
- Urasaki, U., 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.). *Theor Appl Genet* 104: 281–285.
- Van Droogenbroeck, B., Breyne, P., Goetghebeur, P., Romeijn-Peeters, E., Kyndt, T., Gheysen, G. (2002) AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (*Caricaceae*) from Ecuador. *Theor Appl Genet* 105: 289–297.
- Vanburen, R., Zeng, F., Chen, C., Zhang, J., Wai, C.M., Han, J., Aryal, R., Gschwend, A.R., Wang, J., Na, J., Huang, L., Zhang, L., Miao, W., Gou, J., Arro, J., Guyot, R., Moore, R.C., Wang, M., Zee, F., Charlesworth, D., Moore, P.H., Yu, Q., Ming, R. (2015) Origin and domestication of papaya Y h chromosome. *Genome Res* 25: 524–533.
- Vashistha, P., Yadav, A., Dwivedi, U.N., Yadav, K. (2016) Genetics of sex chromosomes and sex-linked molecular markers in papaya (*Carica papaya* L.). *Mol Plant Breed* 7: 1–18.
- Wang, J., Na, J., Yu, Q., Gschwend, A.R., Han, J., Zeng, F., Aryal, R., VanBuren, R., Murray, J.E., Zhang, W., Navajas-Pérez, R., Feltus, F.A., Lemke, C., Tong, E.J., Chen, C., Wai, C.M., Singh, R., Wang, M.-L., Min, X.J., Alam, M.,

- Charlesworth, D., Moore, P.H., Jiang, J., Paterson, A.H., Ming, R. (2012) Sequencing papaya X and Y chromosomes reveals molecular basis of incipient sex chromosome evolution. *Proc Natl Acad Sci* 109: 13710–13715.
- Yu, Q., Hou, S., Hobza, R., Feltus, F.A., Wang, X., Jin, W., Skelton, R.L., Blas, A., Lemke, C., Saw, J.H., Moore, P.H., Alam, M., Jiang, J., Paterson, A.H., Vyskot, B., Ming, R. (2007) Chromosomal location and gene paucity of the male specific region on papaya Y chromosome. *Mol Genet Genomics* 278: 177–185.
- Zheng, X., Hoegenauer, K.A., Maeda, A.B.V., Wang, F., Stelly, D.M., Nichols, R.L., Jones, D.C. (2015) Non-destructive high-throughput dna extraction and genotyping methods for cotton seeds and seedlings. *Biotechniques* 58: 234–243.