

ANÁLISE DE MARCADORES SSR-ESTs RELACIONADOS À
FIRMEZA DO FRUTO EM MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

THÁBATA NÁGIME MENDES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
ABRIL – 2017

ANÁLISE DE MARCADORES SSR-ESTs RELACIONADOS À
FIRMEZA DO FRUTO EM MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

THÁBATA NÁGIME MENDES

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

Orientadora: Prof^a. Helaine Christine Cancela Ramos

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL – 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCH / UENF**

058/2017

M538 Mendes , Thábata Nágime.

Análise de marcadores SSR-ESTs relacionados a firmeza do fruto em mamoeiro (*Carica papaya* L.) / Thábata Nágime Mendes – Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.

110 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2017.

Orientadora: Helaine Christine Cancela Ramos.

Bibliografia: f. 75 - 94.

1. Mamoeiro - Melhoramento Genético. 2. QTL (Quantitative Trait Loci) .
3. Marcadores Moleculares. 4. Seleção Assistida por Marcadores (SAM). I.
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 634.651233

ANÁLISE DE MARCADORES SSR-ESTs RELACIONADOS A
FIRMEZA DO FRUTO EM MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

THÁBATA NÁGIME MENDES

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

Aprovada em 27 de abril de 2017.

Comissão examinadora:



Prof.^a. Marilene Hilma dos Santos (D.Sc em Genética e Melhoramento de Plantas)
UFRRJ



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



Prof. Messias Gonzaga Pereira (Ph.D., Plant Breeding) – UENF



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

Aos meus pais, Maria Matildes e Romar Mendes, pelo apoio, amor e ensinamentos ao longo destes anos; às minhas irmãs, Thamara e Thuanny, por todo carinho e amor.

Dedico esta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre auxiliando e guiando meus passos.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, pela oportunidade de ter realizado o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa e apoio financeiro ao Projeto de Pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Helaine Christine Cancela Ramos, pela doutrina, atenção e convívio amigável prestado durante a orientação.

Aos Profs. Drs. Messias Gonzaga Pereira e Telma Nair Santana Pereira, pela coorientação e colaboração no ensino e na pesquisa.

À técnica Marcela Santana Bastos Boechat e à pós-doutoranda Fernanda Abreu Santana Arêdes, do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal do Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuária da UENF (LMGV/CCTA/UENF), pela boa vontade e pela capacidade de não medirem esforços para estarem sempre prontas a colaborar.

A todos os colegas de curso, Samuel, Valter, Larissa, Paola, Dieimes, Adriana, pelo convívio amigável durante esta caminhada e pelos momentos de descontração.

Às amigas, Amanda, Daniela, Manuela, Dalianny, por estarem sempre me apoiando e torcendo pelo meu sucesso.

Ao meu esposo, Felipe, aos meus filhos Liz e Lorenzo, pelo amor e apoio de sempre.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desta dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Aspectos gerais da cultura do mamoeiro.....	4
2.2. Importância econômica da cultura.....	5
2.3. Melhoramento do mamoeiro.....	7
2.4. Firmeza do fruto em mamoeiro.....	9
2.5. Marcadores moleculares em mamoeiro.....	12
2.6. Desenvolvimento de marcadores SSR-ESTs.....	14
2.7. Mapeamento genético.....	17
2.8. Seleção assistida por marcadores.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Material vegetal.....	24
3.2. Extração de DNA.....	25
3.3. Seleção de locos SSR-ESTs.....	26
3.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	29
3.5. Eletroforese.....	29
3.6. <i>Screening</i> dos iniciadores SSR-ESTs nos genótipos parentais Sekati e JS-12.....	35
3.7. <i>Screening</i> de SSR-ESTs via BSA (<i>Bulk Segregant Analysis</i>).....	35

3.8. Genotipagem da população de mapeamento (F ₂)	36
3.9. Inserção de marcas SSR-ESTs ao mapa de ligação do mamoeiro.....	38
3.10. Mapeamento de QTL.....	38
3.11. Análise da diversidade funcional.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1. Análise dos locos SSR-ESTs.....	41
4.2. <i>Screening</i> nos genótipos parentais e caracterização dos iniciadores SSR-ESTs.....	43
4.3. <i>Screening</i> via BSA.....	47
4.4. Análise dos SSR-ESTs na população de mapeamento.....	50
4.5. Inserção das marcas no mapa genético.....	51
4.6. Mapeamento de QTLs.....	57
4.7. Análise da diversidade genética funcional entre indivíduos da população F ₂	66
5. CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma apresentando as etapas de avaliação referentes ao projeto de mapeamento genético do mamoeiro e identificação de QTL, destacando as etapas realizadas previamente e as etapas executadas no presente trabalho.....	25
Figura 2. Distribuição dos 54 iniciadores SSR-ESTs de acordo com a localização genômica e motivos.....	42
Figura 3. Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA referentes ao <i>screening</i> nos pais. A seta vermelha indica os <i>primers</i> que foram polimórficos.....	44
Figura 4. <i>Primers</i> que apresentaram polimorfismo e bom padrão de amplificação entre os genitores Sekati e JS-12. (A) Localização genômica dos <i>primers</i> polimórficos (íntrons e éxons). (B) Função dos <i>primers</i> polimórficos (SE e CPC); (C) Constituição alélica dos <i>primers</i> polimórficos (homozigose e heterozigose)	46
Figura 5. Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA referentes ao <i>screening</i> nos <i>bulks</i> . A seta vermelha indica os <i>primers</i> que foram polimórficos. A seta em azul indica a ordem das amostras (P1 – parental 1; P2 – parental 2; B1 – <i>bulk</i> 1; B2 – <i>bulk</i> 2; B3 – <i>bulk</i> 3; e B4 – <i>bulk</i> 4)	48
Figura 6. Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA referentes ao <i>screening</i> da população de mapeamento (geração F ₂). A	

imagem corresponde ao <i>screening</i> com o <i>primer</i> polimórfico Cpa_SSR_018504. P1 = Sekati; P2 = JS-12.....	51
Figura 7. Grupo de Ligação GL2 de <i>C. papaya</i> L. com a inserção das marcas SSR-ESTs utilizando o programa <i>JoinMap</i> versão 4.0 (Van Ooijen, 2006). Os marcadores são indicados do lado direito de cada grupo e a distância genética em cM, do lado esquerdo. Grupo de ligação GL2 com a inserção das marcas Cpa_SSR_001783, Cpa_SSR_018898, Cpa_SSR_018504, Cpa_SSR_003539 e Cpa_SSR_004871 nas posições 0, 100,06, 141,09, 688,57 e 854,22 cM, respectivamente.....	53
Figura 8. Grupo de Ligação GL3 de <i>C. papaya</i> L. com a inserção das marcas SSR-ESTs utilizando o programa <i>JoinMap</i> versão 4.0 (Van Ooijen, 2006). Os marcadores são indicados do lado direito de cada grupo e a distância genética em cM, do lado esquerdo. Grupo de ligação GL3 com a inserção da marca Cpa_SSR_005019 na posição 0.0.....	54
Figura 9. Grupo de Ligação GL6 de <i>C. papaya</i> L. com a inserção das marcas SSR-ESTs utilizando o programa <i>JoinMap</i> versão 4.0 (Van Ooijen, 2006). Os marcadores são indicados do lado direito de cada grupo e a distância genética em cM, do lado esquerdo. Grupo de ligação GL6 com a inserção da marca Cpa_SSR_000818 na posição 572.0.....	55
Figura 10. Histograma para as características de Firmeza do Fruto (FF) e Firmeza da Polpa (FP) de 186 plantas F ₂ de uma população derivada do cruzamento Sekati x JS-12. As setas indicam os valores fenotípicos para os genótipos Sekati (P1) e JS-12 (P2); W = teste de normalidade de Shapiro-Wilk.....	58
Figura 11. Identificação dos QTLs para a característica de Firmeza do Fruto (FF) (QTLs 3 e 4) no grupo de ligação GL2 (posições 0.0 e 852.5). As marcações na área indicam as posições mais prováveis dos QTLs	62
Figura 12. Identificação dos QTLs para a característica de Firmeza de Polpa (FP) (QTLs 1 e 2) no grupo de ligação GL2 (posições 187.5 e 850.0). As marcações na área indicam as posições mais prováveis dos QTLs	64
Figura 13. Dendograma obtido pelo método UPGMA baseado na análise de 186 indivíduos da população F ₂ de mamoeiro (<i>C. papaya</i> L.), considerando sete locos SSR-ESTs	69
Figura 14. Análise das Coordenadas Principais, considerando os 186	

indivíduos da população F ₂ de mamoeiro mais os dois parentais Sekati e JS-12 (identificados pelas setas) utilizando dados de sete locos SSR-ESTs.....	72
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização dos 54 <i>primers</i> SSR-ESTs relacionados com a Síntese de Etileno (SE) e Componentes da Parede Celular (CPC), com os respectivos Grupos de Ligação (GL), funções e localização gênica.....	27
Tabela 2. Quantidade dos componentes dos mixes de PCR utilizados na otimização dos 54 <i>primers</i>	30
Tabela 3. Dados fenotípicos dos genótipos da geração F ₂ que compõe os <i>bulks</i> para as características de Firmeza de Fruto (FF) e Firmeza de Polpa (FP).....	37
Tabela 4. Características dos pares de iniciadores microssatélites SSR-ESTs quanto ao polimorfismo entre os genitores Sekati e JS-12, entre os <i>bulks</i> e na análise da população F ₂	45
Tabela 5. Médias das características FF e FP para a população F ₂ e parentais (Sekati e JS-12).....	59
Tabela 6. Localização e efeitos dos QTLs para as características de Firmeza de Fruto e Firmeza de Polpa.....	61
Tabela 7. Análise descritiva da diversidade dos marcadores SSR-ESTs analisados na presente pesquisa.....	68
Tabela 8. Agrupamento de 186 indivíduos da população F ₂ de <i>C. papaya</i> L. baseado na dissimilaridade genética obtida pelo complemento aritmético do índice de Jaccard e no agrupamento pelo método UPGMA.....	69

RESUMO

MENDES, Thábata Nágime; M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, abril de 2017. Análise de marcadores SSR-ESTs relacionados à firmeza do fruto em mamoeiro (*Carica papaya* L.). Orientadora: Helaine Christine Cancela Ramos; Conselheiros: Telma Nair Santana Pereira e Messias Gonzaga Pereira.

A avaliação das características relacionadas à qualidade de frutos do mamoeiro, como a Firmeza do Fruto (FF) e a Firmeza da Polpa (FP), é uma etapa importante para os programas de melhoramento, a fim de selecionar genótipos superiores. Porém, esta avaliação é feita manualmente – uma atividade que demanda tempo e trabalho intensivo –, reduzindo a precisão na avaliação das plantas em uma mesma época. Com o propósito de melhorar a seleção de características de difícil mensuração, pesquisadores têm buscado utilizar a Seleção Assistida por Marcadores Moleculares (SAM), um procedimento empregado para aumentar o ganho por seleção artificial, mas que ainda tem sido pouco utilizado para a análise de características quantitativas. O objetivo deste trabalho foi identificar marcadores moleculares SSR-ESTs associados às características de FF e FP, integrá-los ao mapa genético do mamoeiro, para posterior identificação de *Quantitative Trait Loci* (QTLs), além de aplicar tais marcadores na análise de diversidade funcional, a fim de confirmar a eficiência dos marcadores em agrupar os indivíduos de acordo com os seus valores fenotípicos para ambas as características. Para tal, foram selecionados 54 *primers* SSR-ESTs potencialmente relacionados com a Síntese de Etileno (SE) e Componentes da

Parede Celular (CPC). Após, foi realizada uma triagem dos *primers* utilizando os genótipos parentais (Sekati e JS-12), para a identificação de marcadores polimórficos. Dos 54 *primers* testados nos parentais, 16 foram polimórficos, os quais foram então analisados via BSA (*Bulked Segregant Analysis*), para verificar quais marcadores estavam potencialmente associados às características em estudo. Logo após selecionados, os marcadores que segregaram nos *bulks* foram analisados nos 186 indivíduos da população F₂; a seguir, realizou-se a investigação de mapeamento e identificação dos QTLs ligados a essas características. Na análise do mapa, três grupos de ligação (GL) tiveram marcas inseridas (GL2, GL3 e GL6), entretanto, em apenas um grupo de ligação (GL2) ocorreu o mapeamento dos QTLs. Foram detectados três QTLs, sendo: um QTL associado à FP (QTL 1 – Cpa_SSR_018504), um QTL associado à FF (QTL 3 – Cpa_SSR_001783) e um QTL associado às duas características (QTL 2/QTL 4 – Cpa_SSR_004871). A variação fenotípica explicada pelos QTLs variou de 1,97 a 9,66% e de 1,49 a 7,42% para as características de FP e FF, respectivamente. Para a diversidade funcional, foram analisados 186 indivíduos e mais os genótipos parentais (Sekati e JS-12) de mamão utilizando sete iniciadores SSR-ESTs associados à FF e à FP. Para tal, foi utilizado o método *Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average* (UPGMA), que agrupou os indivíduos em três principais grupos. Os resultados possibilitaram verificar que há variabilidade genética entre os genótipos avaliados e que os marcadores foram efetivos em agrupar os indivíduos de acordo com os seus valores fenotípicos. A construção de mapas genéticos e a identificação de QTLs por meio dos marcadores SSR-ESTs representam um grande avanço nos programas de melhoramento genético do mamoeiro por possibilitarem que seja realizada, com sucesso, a seleção assistida por marcadores. Apesar dos QTLs identificados serem de pequena magnitude, os mesmos são úteis em um programa de seleção assistida, uma vez que podem ser utilizados como ponto de referência na espécie para detecção de QTLs de maior efeito. Esses resultados contribuem para futura implementação da SAM nos programas de melhoramento do mamoeiro, com a expectativa de obter maior eficiência na seleção de genótipos superiores.

ABSTRACT

MENDES, Thábata Nágime; M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, April 2017. Analysis of EST-SSRs markers related to fruit firmness in papaya (*Carica papaya* L.). Research advisor: Helaine Christine Cancela Ramos; Research coadvisors: Telma Nair Santana Pereira and Messias Gonzaga Pereira.

The evaluation of characteristics related to the quality of papaya fruits, such as Firmness of Fruit (FF) and Firmness of Pulp (FP), is a major step for breeding programs in order to select superior genotypes. However, this evaluation is done manually, which consumes time and requires intensive work, reducing the accuracy in the assessment of plants at the same time. In order to improve the selection of hard-to-measure characteristics, researchers have sought to use Molecular Marker Assisted Selection (MAS), a procedure employed to increase the gain by artificial selection; however, it has been little used to analyze the quantitative characteristics. The objective of this work was to identify EST-SSR molecular markers associated with FF and FP characteristics, to integrate them into the genetic map of papaya tree, to further identify Quantitative Trait Loci (QTLs), and to apply such markers in the analysis of functional diversity, in order to confirm the efficiency of the markers in grouping the individuals according to their phenotypic values for both characteristics. For this, 54 EST-SSR primers potentially related to the Ethylene Synthesis (ES) and Cell Wall Components (CWC) were selected. Afterward, the primers were screened using parental genotypes (Sekati and JS-12) for the identification of polymorphic markers. Among

the 54 primers tested in the parental genotypes, 16 were polymorphic, which were then analyzed by Bulk Segregant Analysis (BSA) to verify which markers were potentially associated with the characteristics under study. After being selected, the markers that segregated the bulks were analyzed in the 186 individuals of the F₂ population, followed by the mapping analysis and identification of the QTLs linked to these characteristics. In the analysis of the map, three linkage groups (LG) had inserted marks (LG2, LG3 and LG6); however, the mapping of QTLs occurred in only one linkage group (LG2). Three QTLs were detected: one QTL associated with PF (QTL 1 - Cpa_SSR_018504), one QTL associated with FF (QTL 3 - Cpa_SSR_001783), and one QTL associated with the two characteristics (QTL 2/QTL 4 - Cpa_SSR_004871). The phenotypic variation explained by the QTLs varied from 1.97 to 9.66%, and from 1.49 to 7.42% for the characteristics of FP and FF, respectively. For functional diversity, 186 individuals plus parental genotypes (Sekati and JS-12) of papaya were analyzed using seven EST-SSRs primers associated with FF and FP. For that, the Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average (UPGMA) method was used, which grouped the individuals into three main groups. The results allowed verifying that there is genetic variability among the evaluated genotypes and that the markers were effective in grouping the individuals according to their phenotypic values. The construction of genetic maps and the identification of QTLs by the EST-SSRs markers represent a major advance over the breeding programs of papaya tree once they allow marker-assisted selection to be successfully carried out. Although the QTLs identified are of small magnitude, they are useful in an assisted selection program since they can be used as a reference point in the species to detect QTLs of greater effect. These results contribute to the future implementation of the MAS in breeding programs of the papaya tree, with the expectation of obtaining greater efficiency in the selection of superior genotypes.

1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das fruteiras mais cultivadas e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Chen et al., 1991). O Brasil é o segundo maior produtor de mamão em nível mundial, ficando atrás apenas da Índia (IBGE, 2013), destacando a grande importância econômica da cultura. Devido à sua relevância comercial, a produção de mamão é atualmente classificada como a terceira maior do mundo entre as fruteiras tropicais (FAO, 2013).

Nos programas de melhoramento genético do mamoeiro para a análise da qualidade dos frutos, convencionou-se adotar alguns parâmetros, sejam físicos (peso, comprimento, diâmetro, forma, cor e firmeza), sejam químicos (sólidos solúveis totais, pH, acidez titulável entre outros). No entanto, essas características são fortemente influenciáveis por fatores como condições edafoclimáticas, genéticas, época, tratamentos culturais e manuseio na colheita, variando em função do destino do fruto e das exigências do mercado consumidor (Fagundes; Yamanishi, 2001).

Um atributo quantitativo, muito importante, ligado à qualidade do fruto, é a firmeza. O estágio de maturação dos frutos, bem como os fatores genéticos, pode influenciar nas características de Firmeza da Polpa (FP) e Firmeza do Fruto (FF), interferindo na comercialização e no tempo de prateleira do fruto. Assim, frutos com baixa firmeza apresentam baixa resistência física ao transporte, ao

armazenamento e ao manuseio, causando perdas quantitativas e qualitativas (Chitarra; Chitarra, 2005).

Entretanto, um dos fatores limitantes é a dificuldade de seleção dessas características agronômicas de importância para o melhoramento do mamoeiro, por apresentar uma herança genética complexa e com forte influência ambiental, dificultando a realização do processo de seleção e mensuração dos genótipos em uma única avaliação (Alves, 2003). O estudo dessas características morfológicas desejáveis em frutos para fins comerciais é feita manualmente, devendo ser mensurada em três frutos por planta, sendo uma atividade demorada que requer trabalho intenso e limita a avaliação de um grande número de frutos, pois nem sempre a planta apresenta todos os seus frutos no mesmo estágio de maturação, o que reduz a possibilidade de identificação de genótipos superiores (Marinho et al., 2008).

O programa de melhoramento genético do mamoeiro, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), tem buscado aumentar a eficiência dos métodos, para facilitar a seleção de variedades agronomicamente superiores trabalhando com a fenotipagem digital, que aumenta a precisão na mensuração de características agronômicas de importância, reduzindo a mão de obra necessária para realizar essa atividade. Porém, o uso do *software* para a mensuração e avaliação das características de FF e FP, ainda não tem sido empregada (Cortes, 2017).

Uma das alternativas para melhorar a eficiência na seleção de características agronômicas importantes tem sido a Seleção Assistida por Marcadores (SAM), um procedimento bem estabelecido, empregado em programas de melhoramento para aumentar o ganho por seleção artificial, para seleção de características desejáveis, reduzindo o tempo necessário para o desenvolvimento de novos materiais para o cultivo e aumentando a precisão da seleção. Além disso, é uma ferramenta barata e confiável, que tem sido amplamente utilizada para a melhoria de qualidade de fruto e resistência contra doenças (Alzate-Marin et al., 2005).

Porém, a realização da SAM envolve a obtenção de marcadores moleculares associados a características fenotípicas e à validação dessa associação antes da aplicação dos marcadores na seleção. No entanto, existem alguns fatores que dificultam a aplicação da SAM, como a existência de mapas

genéticos com baixa saturação, os modelos disponíveis para o mapeamento de *Quantitative Trait Loci* (QTL) considerarem apenas um QTL, a existência de efeitos epistáticos entre os locos e a ocorrência de interação QTLs x ambiente. Todos esses fatores afetam a precisão do mapeamento de QTLs e, conseqüentemente, a utilização dessas informações na SAM (Falconer; Mackay, 1996; Stuber, 1994; Guimarães et al., 2006; Ender; Terpstra; Kelly, 2008; Maroof et al., 2008; Xu; Crouch, 2008).

Durante a última década, os microssatélites derivados de Etiquetas de Sequências Expressas (SSR-ESTs) surgiram como uma alternativa viável para a SAM, em que apenas os genes expressos pelo organismo são sequenciados (Kantety et al., 2002). O EST representa uma sequência parcial do cDNA de um gene que foi expresso em um tecido, num determinado momento (Sterky; Lundeberg 2000). Além disso, as sequências codificadoras desses marcadores são mais informativas do que as dos marcadores intergênicos, ou 'anônimos', porque eles são mais propensos a serem funcionais (Coulibaly et al, 2005; Varshney et al, 2005). Em mamoeiro, Vidal et al. (2014) desenvolveram e validaram um atlas de marcadores de repetição de sequência simples baseados em sequências expressas (SSR-EST), sendo 883 marcadores SSR-ESTs potencialmente envolvidos na maturação do fruto.

O objetivo da presente pesquisa foi identificar marcadores moleculares SSR-ESTs associados às características de firmeza da polpa e firmeza do fruto e integrá-los ao mapa genético do mamoeiro para posterior identificação de QTLs; além disso, aplicar tais marcadores na análise de diversidade funcional, a fim de confirmar a eficiência dos marcadores em agrupar os indivíduos de acordo com os seus valores fenotípicos para ambas as características.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais da cultura do mamoeiro

A família Caricaceae compreende seis gêneros (Badillo, 2000), quais sejam, *Cylicomorpha*, representado por espécies originárias da África Equatorial, *Jarilla* e *Horovitzia*, com espécies restritas à América Central, e *Jacaratia*, *Vasconcellea* e *Carica*, com espécies predominantes da América do Sul e América Central. O gênero *Carica* corresponde apenas à espécie cultivada, *C. papaya* (Badillo, 2000). A importância econômica da família Caricaceae reside grandemente na produção de frutos por parte de sua principal espécie, *C. papaya*, amplamente cultivada na região dos trópicos (Damasceno Junior et al., 2015).

A espécie *C. papaya* L., que tem seu centro de origem na América Central ao noroeste da América do Sul, é a mais importante comercialmente, apresentando maior diversidade no México e na Bacia Amazônica Superior (Badillo, 1993). Nesta região, a diversidade genética é máxima, o que caracteriza o mamoeiro como uma planta tipicamente tropical, que produz frutos o ano inteiro (Trindade, 2000; Dantas et al., 2002).

O mamoeiro é uma espécie típica de regiões tropicais e subtropicais, suas plantas apresentam caule cilíndrico (10-30 cm de diâmetro) de coloração verde-clara no ápice e verde acinzentada na base, suas folhas são grandes, variando de 20-60 cm, aproximadamente. Apresenta populações de plantas do tipo dióicas, ginóica-andromonóicas e andromonóico-trióicas, possuindo suas inflorescências

do tipo: flor pistilada ou feminina típica, flor hermafrodita e flor estaminada. Os frutos possuem uma forma característica para cada tipo de flor, podendo ser ovoide, esférica ou periforme, com casca lisa e fina, variando entre as cores amarela, alaranjada ou avermelhada (Martins; Costa, 2003). As sementes são pequenas, redondas, rugosas e recobertas por uma camada mucilaginosa.

No Brasil, devido ao formato, os frutos piriformes produzidos pelas plantas hermafroditas são preferidos em relação aos frutos esféricos produzidos pelas plantas femininas, destinando-se aos mercados interno e externo (Marin et al., 2003). Segundo Costa e Pacova (2003), os frutos podem ser classificados, conforme o tamanho e a origem, em dois grupos diferentes: Solo ou Formosa.

Os materiais do grupo Solo são geneticamente uniformes, consistindo de linhagens fixadas por sucessivas gerações de autofecundação. A cultivar 'Golden', do grupo Solo, é descrita por Marin e Gomes (2000) como tendo plantas e frutos de coloração verde-clara e acentuadamente aclorofilada, com superfície do fruto bastante lisa; é uma cultivar muito tolerante à mancha fisiológica do mamoeiro.

Genótipos do grupo Formosa são híbridos comerciais, sendo que o mais cultivado no Brasil é o Tainung nº 1, que é importado da Estação Experimental de Fengshan, em Kaohsiung (Taiwan) (Marin et al., 2006). O alto custo da semente tem incentivado os produtores brasileiros a utilizarem as próprias sementes dos híbridos F₁ nas sucessivas gerações (F₂, F₃, F₄ e assim por diante), o que tem levado à perda das características originais, havendo a produção de frutos com qualidade inferior e fora do padrão comercial (Costa; Pacova, 2003).

2.2. Importância econômica da cultura

O mamoeiro (*C. papaya* L.) é uma cultura com importância social e econômica, conhecida por seus benefícios nutricionais, por ser rico em vitamina A, vitamina C, potássio, folato, niacina, tiamina, riboflavina, ferro e cálcio, bem como fonte de energia, auxiliando nos processos digestivos. Além disso, pode ser utilizado em variáveis aplicações medicinais (Malabadi et al., 2011), inclusive para a extração de papaína, que é uma enzima proteolítica valiosa (Souza et al., 2005; Ming et al., 2008).

A espécie *C. papaya* é a mais cultivada mundialmente pelo grande aproveitamento dos seus frutos, que podem ser consumidos maduros, ao natural ou com açúcar, e verdes, em doces ou para extração de papaína e pectina. Na indústria, utiliza-se o fruto maduro para a conservação da polpa, além da utilização do mamão para a fabricação de outros produtos, tais como: purê de mamão, mamão cristalizado, saladas de frutas tropicais, geleias, confeitados, gelatina, coquetéis e aperitivos (Manica, 1982).

Oliveira et al. (1994) ressaltam, que, em vista da grande importância alimentícia do mamoeiro, este possui também uma função social, uma vez que a produção do mamão ocorre durante todo o ano, havendo a necessidade de renovação periódica de seus pomares. Com isso, a sua produção absorve mão de obra regularmente, gerando empregos.

Segundo dados estatísticos fornecidos pelo IBGE, no ano de 2013, o fruto do mamoeiro ocupou um lugar de destaque dentre as mais importantes frutas tropicais atualmente cultivadas no País e no mundo. O mercado produtor de frutas tem-se mostrado dinâmico, pois, há tempos, o País deixou de produzir frutas apenas para atender ao mercado nacional, transformando-se no segundo maior exportador mundial, além de maior produtor do mundo. Devido à boa aceitabilidade do mamão no mercado consumidor e ao grande aproveitamento dos frutos, a cultura vem-se expandindo com perspectivas favoráveis (Mendonça et al., 2006).

A fruticultura no Brasil tem sido uma atividade promissora, devido às condições edafoclimáticas favoráveis do país e da disponibilidade de áreas agriculturáveis, possibilitando o aumento da produtividade e competitividade (FAO, 2013).

A produção mundial de mamão atingiu 12,5 milhões de toneladas em 2013, tendo como principais produtores a Índia, Brasil, Indonésia, Nigéria e México. O Brasil, segundo maior produtor, responde por 12,6% da produção mundial (FAOSTAT, 2015). Apesar da sua produção se dar na maioria dos estados brasileiros, é nos Estados da Bahia e do Espírito Santo que a produção se concentra. Juntos, esses Estados respondem por 71% da produção brasileira (IBGE, 2014). A cultura apresenta grande importância social, gerando empregos o ano inteiro; tem se constituído, também, em uma importante fonte de divisas para o País. O volume exportado de mamão, mundialmente, em 2012, foi de 271,8 mil

toneladas, correspondendo a US\$ 209,4 milhões. O México foi o maior exportador da fruta, sendo responsável por aproximadamente 40% das exportações. O Brasil ocupa a segunda posição, com 9,6%, seguido da Guatemala, com 8,2% (FAOSTAT, 2015). Entre as frutas da pauta de exportação brasileira de 2013, o mamão está entre as oito primeiras, com uma participação de 6,4% (Santos et al., 2013); o volume exportado neste ano representou menos de 2% da produção nacional da fruta.

Os principais países importadores de mamão brasileiro são Estados Unidos, Cingapura, Canadá, El Salvador, Emirados Árabes, Holanda, entre outros (Galeano; Martins, 2015). No Brasil, o Estado da Bahia ocupa a primeira posição em relação à produção, com aproximadamente 718,726 mil toneladas, seguido do Espírito Santo (404,720 t), Minas Gerais (126,849 t), Ceará (118,372 t) e Rio Grande do Norte (69,925 t), Paraíba (37,959 t), dentre outros (PAM-IBGE, 2015).

2.3. Melhoramento do mamoeiro

Os primeiros estudos relacionados ao melhoramento genético do mamoeiro foram desenvolvidos por Hofmeyr (1938), Storey (1938) e Horovitz (1954), que abordaram questões sobre o estudo de herança do sexo na cultura. No Brasil, o melhoramento genético do mamoeiro teve início a partir de 1982, pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), com estudos dos genótipos do grupo Solo, com o objetivo de atender à demanda nacional e internacional por frutos de qualidade. Desde então, foram introduzidas variedades comerciais, no mercado nacional, a partir dos trabalhos realizados por entidades públicas e privadas envolvidas no agronegócio do mamoeiro (Ruggiero et al., 2011).

Um incentivo para a cultura do mamoeiro ocorreu entre os anos de 1972/1973, quando o Brasil importou do Havaí – EUA as primeiras sementes da variedade ‘Sunrise Solo’. Esta cultivar foi introduzida no Nordeste do Pará, demonstrando elevada estabilidade e adaptação às condições da região (quente e úmida), sendo facilmente aceita no comércio nacional e internacional (Ruggiero et al., 2011). Nesse mesmo período, iniciaram-se, também, as importações de sementes híbridas dos mamoeiros do grupo Formosa, oriundas de Taiwan (Serrano; Cattaneo, 2010).

As cultivares comercialmente mais importantes são pertencentes ao grupo Solo, agregando a maior parte das cultivares de mamão plantado no mundo, e ao grupo Formosa, com híbridos comerciais que conquistaram tanto o mercado interno quanto o externo, com um forte crescimento nas vendas principalmente para a Europa, Canadá e Estados Unidos (Dantas; Oliveira, 2009). As variedades do grupo Solo possuem frutos menores e são preferidos para exportação com predomínio da variedade 'Sunrise Solo' e 'Golden', e as do grupo Formosa, são híbridos com tamanho médios, com destaques para Tainung n° 1, Tainung n° 2 e Caliman 01.

Entretanto, há uma necessidade dos programas de melhoramento de utilizar variedades disponíveis para a obtenção de outras variedades com maior produtividade e melhor qualidade de frutos (Dias et al., 2011). Outro fato a ser considerado é a existência de poucas linhagens melhoradas, ou mesmo consideradas como variedades definidas, em função da propagação de plantas por sementes, durante sucessivas gerações, sem o devido controle das polinizações. A melhoria de determinadas características agrônômicas depende do conhecimento básico sobre a herança dos caracteres, a variabilidade genética disponível para o melhoramento e as estimativas dos parâmetros genéticos, pois estas informações indicam quais as melhores estratégias de seleção para maximizar os ganhos genéticos (Silva et al., 2008).

Dentre as características agrônômicas desejáveis do mamoeiro, buscam-se linhagens vigorosas, que apresentem alta produção, resistência às doenças e tolerância aos ataques de pragas, além de serem hermafroditas¹, com frutificação precoce, com maturação dos frutos uniforme, possuindo uma cobertura abundante que permita boa capacidade fotossintética, com tronco firme que suporte a carga dos frutos, sem ramificações laterais, casca lisa e sem manchas, polpa vermelho-alaranjada, cavidade ovariana pequena e em formato estrela, sólidos solúveis acima de 12^o Brix, com porte baixo para facilitar a colheita e maior longevidade pós-colheita. Para a análise de qualidade dos frutos, leva-se em consideração o tamanho, formato, casca, cor, sabor, quantidade de papaína, látex e teor de sólidos solúveis, em que as características desejáveis variam de

¹ De modo geral, os consumidores da fruta *in natura* preferem frutos provenientes de flores hermafroditas, que possuem um formato mais alongado e cilíndrico, com polpa firme, macia, de coloração alaranjada, com sabor doce e menor quantidade de papaína, que não é desejável para o consumo da fruta *in natura*, e sim para fins industriais (Manica, 1982).

acordo com a finalidade e a demanda de mercado (Manica, 1982; Dantas et al., 2002).

Nas últimas décadas, a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) tem estabelecido um programa de melhoramento de mamoeiro em parceria com a Empresa Caliman Agrícola S/A, sediada em Linhares/Espírito Santo, que vem realizando vários trabalhos de melhoramento genético da cultura, visando a ampliar a base genética dos genótipos de mamoeiro cultivados no Brasil, bem como a oferecer opções de linhagens e híbridos superiores. Bons resultados têm sido obtidos dessa parceria, possibilitando, em 2002, o registro de nove híbridos de mamoeiro (UENF/CALIMAN 01 a UENF/CALIMAN 09), com destaque para UENF/CALIMAN 01, também conhecido pelo nome comercial de Calimosa, sendo o primeiro híbrido nacional a ser lançado para os produtores, intermediário entre o grupo Solo e o grupo Formosa. Esse híbrido tem mostrado superioridade em relação ao híbrido 'Tainung 01', do grupo 'Formosa', quanto às características do fruto, apresentando elevado teor de sólidos solúveis, aroma intermediário e ótima qualidade de mesa. Mais recentemente, no ano de 2014, outros quatro novos híbridos foram registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (Pereira et al., 2015).

É notável que os programas de melhoramento genético da cultura do mamoeiro têm contribuído com o desenvolvimento de cultivares. Entretanto, evidencia-se a necessidade do fortalecimento desses programas, visando à obtenção de cultivares de mamão que atendam às exigências dos mercados e dos consumidores (Ruggiero et al., 2011).

2.4. Firmeza do fruto em mamoeiro

A textura das frutas envolve diversos atributos, tais como firmeza, crocância, suculência, sendo estes, determinantes para a qualidade dos frutos percebida pelo consumidor. Para cultivares que apresentam estágio de maturação precoce, uma boa textura é necessária, principalmente, para frutos que são consumidos "*in natura*". A textura também atribui um caráter de resistência ao armazenamento e transporte das frutas, que, em instalações modernas, podem ficar armazenadas durante um longo período, sem perder a qualidade (Johnston

et al., 2002). Além disso, a capacidade da fruta de suportar o armazenamento está intimamente ligada à resistência a doenças, principalmente fúngicas, afetando positivamente a economia, especialmente na produção orgânica, onde fungicidas químicos são proibidos (Blazek et al., 2007).

A Firmeza do Fruto (FF) constitui-se de um parâmetro físico, sendo, geralmente, influenciada pelos seguintes fatores: condições edafoclimáticas, genótipos, época e local de colheita, tratos culturais e manuseio na colheita e pós-colheita; variam também em função do destino do fruto e das exigências do mercado consumidor. Além disso, a FF é um atributo de qualidade que pode indicar o seu estágio de maturação ou ponto de colheita e que influencia na sua comercialização. Assim, frutos com baixa firmeza apresentam menor resistência ao transporte, ao armazenamento e ao manuseio (Fagundes; Yamanishi, 2001).

O mamão é classificado como fruto climatérico, cujas características são aumento da taxa respiratória, produção autocatalítica de etileno e alterações organolépticas substanciais durante o seu amadurecimento, tais como cor, sabor, amaciamento e produção de compostos voláteis aromáticos (Cereda et al., 1995). Frutos climatéricos² possuem a perda de firmeza durante a armazenagem fisiologicamente relacionada com os níveis internos de etileno. Um efeito direto do etileno no amaciamento da fruta é a regulação da degradação enzimática das paredes celulares e lamela média no fruto. Uma dessas enzimas é a poligalacturonase, que está envolvida na desmontagem da pectina, levando ao amolecimento do tecido rico em pectina, afetando os frutos durante o amadurecimento (Wakasa et al., 2006; Mann et al., 2008; Costa et al., 2010). Outra enzima que está envolvida na firmeza dos frutos são as expansinas, que desempenham um importante papel na despolimerização de diferentes polissacarídeos nas paredes celulares durante o amolecimento da fruta (Nybom et al., 2012).

A Firmeza da Polpa (FP) em frutos, apesar de ser um parâmetro físico, está relacionada com a solubilização de substâncias pécticas, as quais, segundo Chitarra e Chitarra (2005), quando em grande quantidade, conferem textura frágil aos frutos. Frutos considerados com boa conservação apresentam valores elevados para FP. A perda de FP, aliada à mudança da cor da casca, é a transformação mais característica que ocorre durante o amadurecimento do

² São considerados frutos climatéricos aqueles que apresentam um aumento da atividade respiratória durante o seu amadurecimento (Rhodes, 1980).

mamoeiro. O amolecimento da polpa do mamoeiro é atribuído às atividades das pectinases, em especial à poligalacturonase (PG) e pectinametilesterase (PME). Outra enzima que tem sido associada ao amaciamento da polpa do mamão é a β -galactosidase, que, provavelmente, completa a ação da PG (Lazan et al., 1989).

Sañudo et al. (1997) afirmaram que, com a maturação do fruto, existe a degradação do amido, que é paulatinamente convertido em açúcares solúveis, tornando a firmeza do fruto e da polpa menores, e os frutos, menos resistentes. Durante o amadurecimento do fruto, ocorre a solubilização das protopectinas em pectinas ou ácido péctico, que são polímeros de baixo peso molecular e que, conseqüentemente, não conseguem manter a firmeza do fruto ou da polpa (Sigrist, 1992).

Apesar da firmeza da polpa e do fruto serem atributos mensuráveis por meio de abordagens sensoriais ou instrumentos simples, como o penetrômetro, essas características são complexas quanto à sua natureza genética, por serem governadas por vários genes (King et al., 2001; Mann et al., 2005; Jönsson; Nybom, 2007; McKay et al., 2011; Gálvez-López et al., 2012). Além disso, a herdabilidade destes parâmetros depende do tipo de população que está sendo avaliada, podendo ser baixa, média ou alta, conforme relatado pelas avaliações de firmeza por Dias et al. (2011) – avaliando 27 genótipos de mamoeiro entre cultivares, variedades melhoradas, variedades locais e linhagens; Macedo (2012) – avaliando o desempenho agrônômico de híbridos de mamoeiro; e Pinto et al. (2012) – com população de retrocruzamento em mamoeiro, sendo os valores encontrados de herdabilidade para a firmeza da fruta correspondentes a 60%, 79-84% e 22-46%.

A herdabilidade reflete a proporção da variação fenotípica que pode ser herdada, ou seja, quantifica a confiabilidade do valor fenotípico como guia para o valor genético. Somente o valor fenotípico de um indivíduo pode ser mensurado, porém, é o valor genético que influencia a próxima geração; sendo assim, a herdabilidade mede o quanto da variação fenotípica é atribuída à variação genotípica (Falconer; Mackay, 1996).

Macedo (2012), trabalhando com o mamoeiro, realizou um cruzamento entre os genitores Sekati e JS-12; após a obtenção do híbrido, foram avaliados diversos parâmetros quantitativos, dentre os quais, Firmeza Externa da Polpa (FIRMex) e Firmeza Interna da Polpa (FIRMin). Os resultados obtidos em relação

à herdabilidade, para as características de FIRMex e FIRMin, corresponderam a 79,67 e 84,58, respectivamente. As estimativas de herdabilidade para ambas as características morfológicas e de qualidade dos frutos foram de média a alta magnitude para o cruzamento entre os genitores Sekati e JS-12. Estas características são de grande importância nas avaliações, em razão de estas estarem diretamente relacionadas ao interesse do consumidor, além de serem atributos de grande relevância também para os pesquisadores, que almejam acréscimos nas médias dos frutos de híbridos e variedades de importância comercial.

Por tais características estarem sob controle multigênico (Soglio et al., 2009), a capacidade de detectar polimorfismos no nível do DNA em populações de mapeamento possibilitou a identificação de vários locos de características quantitativas (QTL), que estão associados à firmeza dos frutos em diversas culturas (King et al., 2000; King et al., 2001; Liebhard et al., 2003; Kenis et al., 2008; McKay, 2010; Longhi et al., 2012).

Em adição à firmeza inicial, a quantidade de firmeza mantida após armazenamento é crucial para a escolha de variedades. A boa capacidade que a fruta tem de suportar o armazenamento, além de permitir que o consumidor tenha mais tempo para adquiri-la e consumi-la, também mostra uma forte associação com o nível de resistência a doenças fúngicas (Blazek et al., 2007; Jönsson; Nybom, 2007).

2.5. Marcadores moleculares em mamoeiro

Atualmente, com a evolução da genética molecular, os marcadores moleculares têm permitido a identificação direta dos genótipos em termos de DNA, superando grande parte das limitações das análises fenotípicas (Alzate-Marin et al., 2005). Assim, os marcadores moleculares têm ganhado espaço nos programas de melhoramento genético de mamoeiro, e o seu uso pode auxiliar nos métodos clássicos de melhoramento genético em diversos aspectos.

Dentre as principais aplicações, as técnicas moleculares têm sido utilizadas em mamoeiro para a introgressão gênica em programas de retrocruzamento monitorado por marcadores (Silva et al., 2008; Ramos, 2010), seleção assistida por marcadores (Oliveira et al., 2010a), análise de divergência

genética (Cattaneo, 2001; Damasceno Junior et al., 2015), mapeamento genético (Sondur et al., 1996; Ma et al., 2004; Chen et al., 2007; Blas et al., 2012), DNA *fingerprinting* para a caracterização de cultivares (Vitória et al., 2004), melhoramento genético visando à resistência a doenças (Vivas et al., 2013), desenvolvimento de novas linhagens de mamoeiro (Oliveira et al., 2012), sexagem (Urasaki et al., 2002), dentre outros. A equipe de melhoramento do mamoeiro vem desenvolvendo, na UENF, vários estudos ao longo dos anos, associando o melhoramento clássico com marcadores moleculares microssatélites (SSR) para o desenvolvimento, avaliação e condução de populações segregantes com o objetivo principal de identificação e seleção de genótipos agronomicamente superiores (Pereira et al., 2015).

Um dos primeiros trabalhos em mamoeiro com marcadores microssatélites foi realizado por Parasnis et al. (1999), os quais empregaram sondas de microssatélites e minissatélites altamente informativas para identificar diferenças sexo-específica em *C. papaya*. Segundo eles, somente a sonda de microssatélite (GATA)₄ demonstrou diferenças sexo-específica em todas as cultivares analisadas, identificando o sexo masculino. O diagnóstico potencial desses marcadores microssatélites foi explorado para determinação do sexo de plantas de mamoeiro ainda no estágio inicial de desenvolvimento (plântulas).

Santos et al. (2003), com o objetivo de observar a frequência dos sexos nas progênes de plantas hermafroditas autopolinizadas, obtiveram 32 locos de microssatélites com o uso de bibliotecas genômicas enriquecidas. Contudo, esses microssatélites não apresentaram polimorfismos nos acessos de mamoeiros analisados. Baseados nesta mesma metodologia, Pérez et al. (2006), com a finalidade de confirmar a divergência genética entre os gêneros *Vasconcellea* e *Carica*, desenvolveram 45 microssatélites, dos quais 24 se mostraram polimórficos em acessos de *C. papaya*.

Uma vez que trabalhar com microssatélites se torna um processo demorado e de trabalho intensivo, a identificação de novos marcadores SSRs tornou-se cada vez mais possível, com a melhoria das técnicas em biologia molecular. Durante a última década, SSRs derivados de etiquetas de sequências expressas (SSR-EST) surgiram como uma alternativa que apresenta vantagens sobre os métodos tradicionais, pois implica a utilização de sequências EST depositadas em bancos de dados, minimizando, portanto, os custos de geração

de dados (Kantety et al., 2002; Vidal et al., 2014). A utilização desses marcadores moleculares fornece informações diretas a respeito da variabilidade genética, permitindo o entendimento genético da espécie. Isso possibilita, por exemplo, indicar genitores para a produção de híbridos específicos a serem utilizados em futuros programas de melhoramento genético visando ao aumento da divergência genética nas próximas gerações (Caixeta et al., 2003).

2.6. Desenvolvimento de marcadores SSR-ESTs

As pesquisas em biotecnologia têm gerado um grande impacto sobre a agricultura e a indústria alimentícia em todo o mundo. A identificação dos genes tornou-se um dos requisitos primordiais para o uso das novas ferramentas biotecnológicas. As tecnologias genômicas são utilizadas para a análise, em larga escala, da estrutura e da função dos genes, proporcionando uma enorme produção de informações, além da geração de bancos de dados de sequências de DNA, possibilitando a identificação dos fatores genéticos determinantes e ou associados com características de interesse agrônomo (Sterky; Lundeberg, 2000).

O sequenciamento de um genoma total é uma tarefa difícil e de custo elevado, devido à complexidade e ao tamanho. Por isso, vários projetos de sequenciamento de plantas vêm optando pelo método de Etiquetas de Sequências Expressas ou EST, no qual apenas os genes expressos pelo organismo são sequenciados. O banco de dados obtido pelos pesquisadores é o resultado do sequenciamento de várias bibliotecas de cDNA, ou seja, sequências de DNA correspondentes aos genes expressos nos vários tecidos da planta (folhas, raízes, frutos, flores e ramos - sadios e submetidos a estresses bióticos e abióticos como pragas, doenças, frio, calor, seca) e em diversos estágios de desenvolvimento (Rudd, 2003).

Uma estratégia alternativa para a identificação de locos SSR utiliza a informação disponível em Bancos de Sequências de DNA. Os SSRs podem ser identificados nestes bancos de dados mediante algoritmos específicos, encurtando tempo e custos requeridos para seu desenvolvimento. Com o aumento da disponibilidade de sequências de genes expressos de diversas

espécies vegetais, uma estratégia tem sido a busca por SSR *in silico*, com resultados de projetos de sequenciamento em larga escala (Pinto, 2006).

Segundo Rudd (2003), por meio do uso de aplicativos computacionais, sequências correspondentes tanto a EST quanto a clones de cDNA podem ser identificadas e copiadas dos bancos de dados para análise e caracterização de SSRs. A estratégia básica de obtenção de EST constitui um método rápido e eficiente de amostragem do genoma para sequências ativas de genes. O EST representa uma sequência total ou parcial de um gene que foi expresso em um tecido, em um momento determinado (Sterky; Lundberg, 2000).

O desenvolvimento destes marcadores é relativamente fácil e barato, por serem bioprodutos das sequências de genes disponíveis publicamente nos bancos de dados. Neste contexto, a utilização de SSRs baseados em genes expressos tem sido relatada para muitas espécies incluindo uvas (Scott et al., 2000), cana-de-açúcar (Cordeiro et al., 2001), trigo duro (Eujayl et al., 2001), centeio (Hackauf; Wehling, 2002), mamão (Vidal et al., 2014), dentre outros.

Diversos estudos já utilizam a estratégia de busca de SSR em bancos de ESTs, como descrito por Cato et al. (2001). Os autores descrevem algumas vantagens da utilização destas sequências expressas com marcadores genéticos. Primeiro, se um marcador EST estiver geneticamente associado a uma característica de interesse, é provável que ele afete diretamente a característica. Segundo, os ESTs que apresentam homologia com genes candidatos podem ser utilizados de forma específica para mapeamento genético.

Mulato et al. (2010) investigaram a variação genética de 79 acessos de soja (*Glycine max*) de diferentes regiões, para agrupar os acessos com base na sua similaridade e testar a correlação entre os dois tipos de marcadores utilizados. Para tal, foram utilizados 30 marcadores, sendo 20 SSRs e 10 SSR-ESTs, com base na sua distribuição nos 20 grupos de ligação genética da soja. Todos os locos analisados foram polimórficos e foram encontrados 259 alelos. O número de alelos por loco variou de 2-21, com uma média de 8,63. A diversidade genética observada foi elevada e permitiu a formação de cinco grupos e vários subgrupos, apresentando um nível moderado entre divergência genética e origem geográfica dos acessos. A utilização de marcadores microssatélites genômicos e funcionais permitiram uma cobertura mais completa da variação genética existente em soja.

Missio et al. (2011) pesquisaram a diversidade genética entre diferentes genótipos de cafeeiro do programa de melhoramento genético da UFV/EPAMIG, por meio de marcadores SSR-ESTs. Foram avaliados 17 pares de *primers* SSR desenhados a partir das seqüências EST do Projeto Brasileiro do Genoma Café. A diversidade genética foi avaliada mediante análise de agrupamento UPGMA, gerado pela matriz de distância e similaridade genética de Jaccard. Os genótipos também foram agrupados, para avaliar a distância e a diversidade entre e dentro das populações. Os 17 pares de *primers* SSR-ESTs apresentaram 100% de polimorfismo entre todos os genótipos avaliados, com um número médio de alelos por loco de 5,1. Os marcadores SSR-ESTs apresentaram um elevado grau de polimorfismo entre os genótipos, tornando-os eficientes para o estudo da diversidade genética do cafeeiro. A utilização desta classe de marcadores possibilitou distinguir os diferentes genótipos estudados, inclusive dentro das populações de *Coffea arabica*, a qual possui baixa variabilidade genética.

A equipe de melhoramento do mamoeiro, na UENF, direcionou esforços para o desenvolvimento de um banco de dados (Atlas) de marcadores microssatélites, baseado em seqüências expressas (SSR-ESTs), potencialmente relacionados com a maturação do fruto. O trabalho desenvolvido em parceria com a equipe de bioinformática da UENF permitiu a identificação de 160.318 SSRs com uma densidade de 656 SSR/Mb, utilizando a versão mais recente do genoma do mamão (Vidal et.al, 2014).

Para alcançar o objetivo de encontrar genes potencialmente relacionados à maturação do fruto – uma característica de alto interesse agrônômico para a cultura do mamoeiro –, foram utilizados dados de genes ortólogos encontrados em tomate. O tomate é o fruto carnoso e climatérico mais próximo do mamão com dados disponíveis sobre a sua expressão genética (Sato et al., 2012). Foram encontrados 175 genes ortólogos de parede celular e 319 genes de transcrição relacionados ao etileno (Tabela S7, Tabela S8; Vidal et al., 2014). O Atlas desenvolvido pela equipe da UENF inclui SSRs com pares de iniciadores para 113 genes relacionados à parede celular e 187 genes relacionados ao etileno. Estes dois grupos compreendem muito bem o processo de amaciamento da polpa e estão envolvidos no controle da pigmentação do fruto (Li et al., 2013). Ao integrar essas informações no Atlas, há um fornecimento de uma lista de

marcadores para o estudo da variabilidade genética e funcional em processos de amadurecimento do fruto.

De acordo com Pereira et al. (2015), foram detectados 160.318 SSRs não redundantes. Depois de integrar os SSRs com as coordenadas dos genes, descobriu-se que 36% dos genes de mamão (9.992/27.769) têm pelo menos 1 SSR. Um total de 21.231 SSRs foram identificados em regiões gênicas, enquanto 139.087 foram identificados em regiões intergênicas. Como esperado, a maioria dos SSRs são intergênico (86,8%), seguidos por intrônicos (9,9%) e exônicos (3,3%); apenas 73 (0,04%) dos SSRs foram encontrados em regiões limítrofes exon-íntron.

2.7. Mapeamento genético

Um mapa de ligação de uma determinada espécie pode ser definido como um arranjo linear de um grupo de genes ou marcadores adjacentes. Constitui-se no ordenamento e no estabelecimento da distância entre marcadores genéticos. Dois locos marcadores são considerados ligados sempre que possuam menos de 50% de recombinação entre os marcadores consecutivos (Schuster; Cruz, 2004).

A construção de mapas genéticos detalhados com alto nível de cobertura do genoma possui inúmeras finalidades para o melhoramento de plantas (Tanksley, 1993), como i) cobertura e análise do genoma; ii) viabilização do mapeamento comparativo entre as diferentes espécies, a fim de avaliar a semelhança entre os genes, ordens e função na expressão de um fenótipo; iii) predição de descendências de cruzamentos controlados; iv) decomposição de caracteres complexos em seus componentes mendelianos; e v) identificação de marcas relacionadas a regiões-chave do genoma para a expressão de características quantitativas (QTL) (Semagn et al., 2006).

Segundo Lorieux et al. (2000), um mapa de ligação deve seguir critérios técnicos e metodológicos, tais como simplicidade, robustez, transferência e relação custo-eficácia. A metodologia de construção de um mapa genético integra uma série de procedimentos que incluem: a escolha de genitores contrastantes; o desenvolvimento de uma população segregante apropriada ao mapeamento (População F₂, Retrocruzamento, entre outras); a escolha do tipo de marcador para genotipar a população; a verificação do padrão mendeliano de segregação

de cada loco marcador; a análise da ligação entre todos os pares de marcadores para a formação dos grupos de ligação; e a estimação da ordem e da distância dos locos marcadores adjacentes ou marcadores flanqueadores dentro dos grupos de ligação (Liu, 1998; Carneiro; Vieira, 2002; Wu et al., 2007; Toledo et al., 2008).

O desenvolvimento de mapas genéticos é de grande utilidade no auxílio a programas de melhoramento de plantas, possibilitando o mapeamento de locos que controlam características quantitativas, poligênicas ou de herança complexa, denominados QTLs (*Quantitative Trait Loci*) (Tanksley, 1993). QTLs são regiões do genoma responsáveis pela variação de um caráter quantitativo, e seu estudo permite a identificação e o mapeamento de características agrônômicas de maior interesse dos melhoristas (Toledo et al., 2008). O mapeamento de QTLs pode levar a um melhor entendimento da interação entre genótipo e fenótipo. Segundo Bernardo (2008), o mapeamento de QTLs tem como objetivo aumentar o conhecimento da herança genética dos caracteres e identificar marcadores moleculares que podem ser utilizados na seleção assistida para características fenotípicas relevantes, tais como produção e resistência a doenças.

Sondur et al. (1996), usando marcadores *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) em uma população F₂ de mamoeiro proveniente do cruzamento entre as linhagens havaianas UH 356 x Sunrise, construíram um mapa de ligação genética com 11 grupos de ligação, compreendendo 999.3 cM do genoma do mamoeiro, de um total estimado em 1350 cM. O *screening* de 596 *primers* possibilitou a identificação de 96 *primers* polimórficos. Aproximadamente 80% dos marcadores segregaram de acordo com as leis básicas de Mendel. De acordo com os autores, os resultados demonstraram a utilidade dos marcadores RAPD para o desenvolvimento de um mapa de ligação genética em *papaya*. Esse estudo também possibilitou o mapeamento do loco ligado ao sexo do mamoeiro (SEX 1).

Ma et al. (2004) construíram um mapa genético de alta densidade para o mamoeiro (*C. papaya* L.), utilizando 54 plantas da geração F₂ derivadas das cultivares Kapoho e SunUp, empregando 1501 marcadores, incluindo: 1498 marcadores *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), marcadores de proteína de revestimento, marcadores ligados ao sexo e à cor da polpa da fruta. Estes marcadores foram mapeados em 12 grupos de ligação, com uma

pontuação LOD de 5,0 e frequência de recombinação de 0,25. Os 12 principais grupos de ligação abrangiam um comprimento total de 3294,2 cM, com uma distância média de 2,2 cM entre marcadores adjacentes. Este mapa revelou uma supressão severa da recombinação em torno do loco para determinação sexual com um total de 225 marcadores co-segregantes para o sexo. As bases de citosina foram altamente metiladas nesta região com base na distribuição de marcadores sensíveis e não sensíveis à metilação. Este mapa genético de alta densidade é essencial para a clonagem de genes específicos de interesse, tais como o gene de determinação do sexo, e para a integração de mapas genéticos e físicos do mamoeiro.

Chen et al., (2007) construíram um mapa genético de alta densidade para o mamoeiro (*C. papaya* L.), usando marcadores microssatélites derivados de sequências finais BAC e de sequências *shotgun* de todo o genoma, para mapear uma progênie composta por 54 plantas de uma população F₂ derivada das variedades AU9 x SunUp. Foram utilizados 707 marcadores, incluindo 706 locos microssatélites e o marcador morfológico para a cor da fruta, sendo mapeados em nove maiores e três menores grupos de ligação. O mapa resultante teve um comprimento total de 1069.9 cM, com uma distância média de 1,5 cM entre marcadores adjacentes. Os nove principais grupos de ligação (GLs) deste mapa representam os nove cromossomos haploides do mamoeiro, sendo o GL1 correspondente ao maior cromossomo, ligado à determinação do sexo. Este mapa validou a supressão da recombinação na região específica masculina do cromossomo Y (MSY) mapeado no GL1 e em potenciais regiões centroméricas de outros GLs e está sendo usado para integrar mapas genéticos e físicos e para atribuir sequências do genoma para cromossomos de mamão.

Nesse sentido, devido à importância dos estudos de caracteres quantitativos para o melhoramento do mamoeiro e considerando o inexpressivo número de trabalhos que visam à identificação de regiões cromossômicas que controlam tais características, a equipe de melhoramento do mamoeiro da UENF tem desenvolvido um mapa genético com alto grau de saturação, utilizando-se, para tanto, marcadores *Singles Nucleotides Polymorphisms* (SNPs) desenvolvidos a partir de bibliotecas *RAD-sequencing* para posterior identificação de QTLs associados às principais características avaliadas em programas de melhoramento do mamoeiro (Pereira et al., 2015).

Um conjunto de 1.370 SNPs foram submetidos à análise de cosegregação para construção do mapa genético de ligação utilizando o programa *JoinMap*. Um total de 1.235 marcadores SNPs foram agrupados em 10 grupos de ligação (GL), estando o cromossomo 1 dividido em dois subgrupos pequenos (GL9 e GL10). O número de marcadores por GL variou de 39 (GL10) a 223 (GL5), e o comprimento dos GLs, de 164,6 (GL10) a 573,5 (GL2). O mapa construído apresentou um tamanho total de 3.442,3 cM e uma densidade de marcadores de 1 SNP a cada 2,8 cM. Apesar de preliminar, a expectativa é que, com a adição de um novo conjunto de marcadores SNPs ao mapa genético, consiga-se unir os dois subgrupos do cromossomo 1 e, assim, construir um mapa genético com alto grau de saturação, com o número de grupos de ligação igual ao número de cromossomos da espécie (Pereira et al., 2015).

2.8. Seleção assistida por marcadores

A Seleção Assistida por Marcadores (SAM), basicamente, é um método em que um fenótipo é selecionado mediante o genótipo pela utilização dos marcadores moleculares (Collard et al., 2005). Vários programas de melhoramento têm utilizado as técnicas moleculares visando à SAM (Benchimol et al., 2005; Alzate-Marin et al., 2005). Tal seleção tem sido utilizada como uma ferramenta para a perfeita associação entre o melhoramento convencional e as modernas técnicas de biologia molecular disponíveis (Fronza, 2003), além de ser bastante utilizada em várias culturas. Federizzi (1998) enfatiza que esta é possivelmente a área que possui maior impacto dentro dos programas de melhoramento, pela sua utilização na identificação de genótipos superiores em populações segregantes. As principais implicações deste avanço no conhecimento se refletem no poder, na precisão e na rapidez na manipulação da variabilidade genética (Faleiro, 2007).

No entanto, os marcadores identificados em estudos preliminares de mapeamento genético são raramente adequados para a SAM. Marcadores que não são adequadamente testados antes da sua utilização em programas de SAM podem não ser confiáveis para prever o fenótipo e, portanto, inúteis. Geralmente, as etapas necessárias para o desenvolvimento de marcadores na utilização da SAM incluem o mapeamento de alta resolução, a identificação de marcadores

associados à característica de interesse, a validação dos marcadores e, possivelmente, a conversão do marcador (Collard et al., 2005).

Para que seja possível o uso da SAM no processo de melhoramento genético, é necessário que, primeiramente, o gene/QTL responsável pelo controle do fenótipo de interesse tenha sido identificado ou mapeado e que existam marcadores que permitam observar a presença dos alelos de interesse em um dado indivíduo (Caixeta; Borém, 2009). Outros aspectos também devem ser levados em conta, como a natureza genética da característica (quantitativa ou qualitativa), o modo de ação gênica, o efeito do gene na expressão do fenótipo, a complexidade da avaliação fenotípica e a eficiência do marcador para discriminar a característica (Morris et al., 2003). A SAM tem sido recomendada em casos nos quais a determinação do fenótipo é complexa, ou possui custos elevados, e em situações em que é necessária a destruição das plantas.

De acordo com Collard e Mackill (2008), dois passos devem ser tomados antes da utilização de determinados QTLs em programas de seleção assistida: a confirmação e a validação do QTL. A confirmação do QTL é necessária, pois a posição deste e os seus efeitos podem ser imprecisos devido a fatores como problemas de amostragem. A etapa de validação corresponde basicamente à verificação do efeito de determinado QTL em populações diferentes daquela utilizada para a sua identificação, para, desse modo, determinar a sua utilidade em programas de seleção assistida.

Uma alternativa para caracteres de baixa herdabilidade é realizar uma análise de associação entre característica-marcador, utilizando a seleção indireta, que poderá ser intensamente explorada desde que os genes de interesse estejam fortemente ligados aos marcadores moleculares. A seleção indireta possibilita a escolha de alelos com efeitos positivos provenientes dos dois ou mais progenitores envolvidos na geração da população segregante (Lande; Thompson, 1990).

O procedimento conhecido como *Bulked Segregant Analysis* (BSA – Análise de Conjunto de Amostras) (Michelmore et al., 1991), em conjunto com a PCR (, é uma alternativa eficiente de mapear genes específicos e selecionar indiretamente genótipos desejados. O método envolve a comparação de dois *pools* de amostras de DNA dos indivíduos de uma população segregante originária de um único cruzamento. Dentro de cada *pool* ou *bulk*, os indivíduos

são identificados para características ou genes de interesse, mas são arbitrários para todos os outros genes. Dois *pools* contrastantes para uma característica são analisados, a fim de identificar marcadores que possam distingui-los. Marcadores que forem polimórficos entre os *pools* serão geneticamente ligados ao loco, que determina a característica considerada para construir os *bulks* (Ferreira; Grattapaglia, 1998).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), o BSA permite estimar o valor da frequência de recombinação entre o marcador e o loco genético que controla o caráter. Basicamente, esta técnica utiliza uma seleção genômica prévia, para reduzir drasticamente o esforço necessário para a identificação de ligação gênica, e focaliza a análise diretamente na região do genoma associada ao caráter de interesse.

As vantagens da Seleção Assistida por Marcadores moleculares (SAM) foram analisadas por Lee (1995). Ele considerou que devem ser avaliados o custo e o tempo para o desenvolvimento de cultivares e para a seleção dos caracteres de interesse. O autor ressaltou que o uso dos marcadores moleculares será vantajoso quando o loco de resistência e o marcador estiverem fortemente ligados e ainda quando forem usadas as primeiras gerações de segregação para evitar a erosão da ligação entre o loco e a marca. O sucesso da SAM depende do grau de associação entre o marcador e a característica de interesse: quanto maior for essa associação, menor a chance de ocorrer recombinação entre o marcador e o gene que controla a característica, sendo maior a eficiência da seleção (Alzate-Marin et al., 2005).

A utilização da SAM em relação aos caracteres quantitativos é eficiente quando a herdabilidade do caráter é baixa e quando os marcadores explicam alta proporção da variância aditiva dos caracteres (Lande; Thompson, 1990). Em relação à característica de firmeza do fruto em mamoeiro, este é um caráter que, geralmente, dependendo da população avaliada, apresenta baixa herdabilidade e é controlado por grande número de genes de pequeno efeito, tornando-se importante a identificação de um grupo de marcadores que explique uma maior proporção da variação fenotípica, sendo necessário utilizar grande número de marcadores ligados a QTLs dispersos no genoma (Lande; Thompson, 1990; Bernardo, 2002; Xu; Crouch, 2008).

Segundo Collard et al. (2005), o aumento dos estudos utilizando a SAM incentivam os pesquisadores a desenvolverem marcadores moleculares mais confiáveis. No entanto, Young (1999) enfatizou que, para o desenvolvimento de marcadores mais confiáveis, os cientistas devem trabalhar com tamanhos populacionais maiores, dados fenotípicos mais precisos, diferentes origens genéticas, dentre outros. O mesmo autor acredita que vários outros fatores afetarão significativamente a eficiência da SAM no futuro, tais como: novas melhorias na tecnologia de marcadores, integração da genômica funcional com mapeamento de QTLs, e disponibilidade de mais mapas de alta densidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

O material vegetal analisado foi obtido por meio do cruzamento dos genitores Sekati e JS-12, provenientes do grupo Formosa, procedentes do banco de germoplasma UENF/Caliman, na empresa Caliman Agrícola S/A, localizada em 19°15'S e 39°51'70" W, na cidade de Linhares – ES. Deste cruzamento, obteve-se o indivíduo F₁, que, autofecundado, originou a população F₂, utilizada para tal estudo. A geração F₂ foi utilizada como a população de mapeamento constituída por 186 indivíduos, para a subsequente estimativa dos QTLs.

A linhagem Sekati apresenta seus frutos com uma boa firmeza e um baixo teor de sólidos solúveis (°Brix) (Yamanishi et al., 2006). É também conhecida como *Hong Kong Papaya*, sendo a principal do grupo Formosa cultivado na Malásia.

O genitor JS-12 apresenta firmeza moderada dos frutos e um alto teor de sólidos solúveis (°Brix) (Cardoso et al., 2015). Segundo Vivas et al. (2014), além do Sekati, o JS-12 é também considerado um genótipo com potencial para a obtenção de cultivares com maiores níveis de resistência a mancha-de-phoma.

Vale ressaltar que algumas etapas importantes já haviam sido realizadas pela equipe de melhoramento da UENF, permitindo por em prática os passos previstos no presente trabalho (Figura 1).

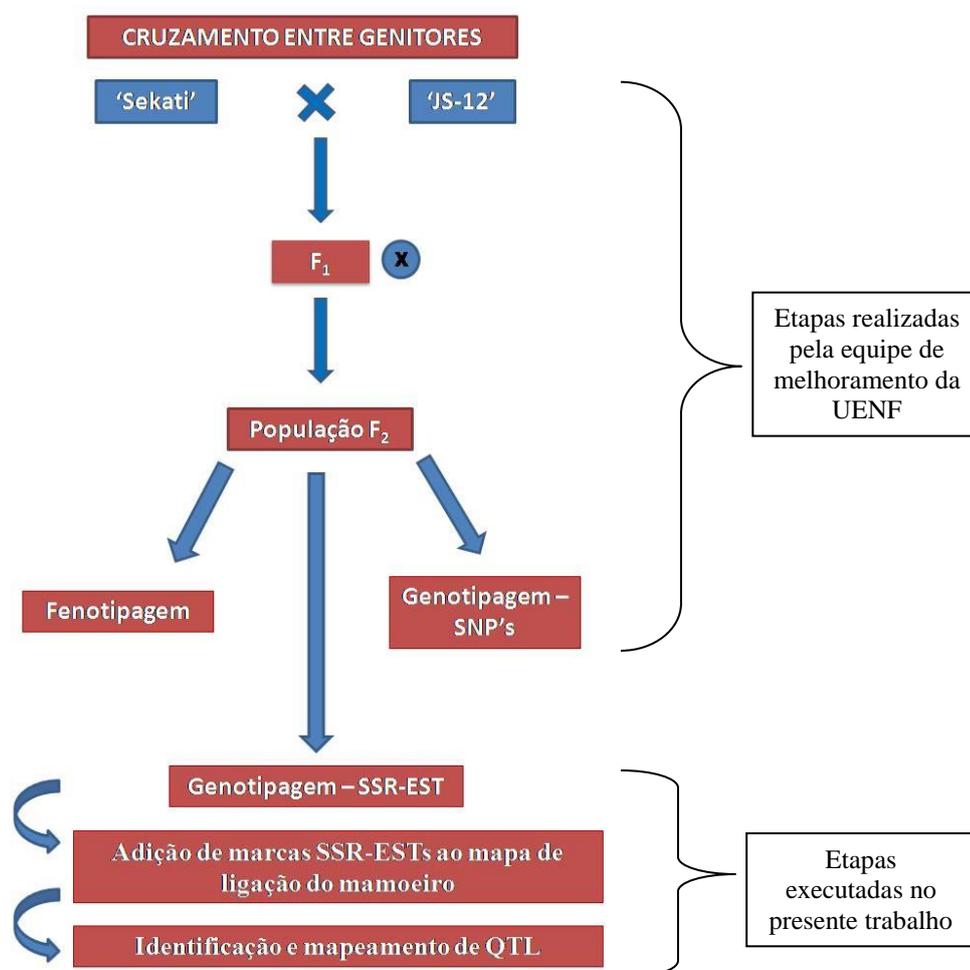


Figura 1. Fluxograma apresentando as etapas de avaliação referentes ao projeto de mapeamento genético do mamoeiro e identificação de QTL, destacando as etapas realizadas previamente e as etapas executadas no presente trabalho.

3.2. Extração de DNA

A extração, quantificação do DNA genômico, bem como a genotipagem dos indivíduos foram realizadas no Setor de Marcadores de DNA no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (LMGV/CCTA/UENF), em Campos dos Goytacazes – RJ. O DNA foi extraído do material vegetal utilizando o Kit *DNeasy Plant Mini* da Qiagen, seguindo a metodologia descrita pelo seu fabricante. Após a extração, o DNA foi submetido à quantificação no aparelho espectrofotômetro *NanoDrop® 2000c* (*Thermo Scientific®*) para mensurar a concentração de DNA genômico, com leitura das

absorbâncias no comprimento de onda de 260 nm. Posteriormente, as amostras do *screening* dos pais, dos *bulks* e da população F₂ foram padronizadas na concentração de 5 ng/μl e mantidas no freezer a -20 °C.

3.3. Seleção de locos SSR-ESTs

Foram selecionados 54 *primers* SSR-ESTs distribuídos em todos os nove cromossomos da espécie, potencialmente relacionados às funções de Síntese de Etileno (SE) e Componentes da Parede Celular (CPC), com base no trabalho de Vidal et al. (2014), buscando manter uma distância genética mínima de 30 cM ao longo de cada cromossomo, evitando-se a seleção de *primers* localizados na extremidade de cada braço. O critério de seleção dos *primers* consistiu em: 1º - selecionar os *primers* entre os diferentes grupos de ligação; 2º - escolher os *primers* que divergiam entre os *supercontigs*; e 3º - eleger os *primers* com diferentes descrições e funções biológicas entre os nove grupos de ligação do mamoeiro (Tabela 1).

Após a síntese, os *primers* foram suspensos em água ultrapura de acordo com as indicações do fabricante. Posteriormente, os tubos foram identificados e em seguida, misturados em um único tubo às sequências *Forward* e *Reverse* de cada *primer*.

Tabela 1. Caracterização dos 54 *primers* SSR-ESTs relacionados com a Síntese de Etileno (SE) e Componentes da Parede Celular (CPC), com os respectivos Grupos de Ligação (GL), funções e localização gênica.

Número do primer	Identificação do primer ^a	GL	Localização	Função	Descrição do gene
1	Cpa_SRR_014764	GL1	ÍNTRON	CPC	Síntase de Celulose
2	Cpa_SRR_011106	GL1	ÉXON	CPC	Beta-galactosidase
3	Cpa_SRR_004376	GL1	ÍNTRON	SE	Fator de transcrição MADS-box
4	Cpa_SRR_018233	GL1	ÍNTRON	SE	Proteína do tipo Homeobox-leucina zipper
5	Cpa_SRR_006236	GL1	ÉXON	SE	Fator de transcrição (Fragmento)
6	Cpa_SRR_007690	GL1	ÉXON	SE	Fator de transcrição em resposta ao etileno
7	Cpa_SRR_017515	GL2	ÍNTRON	CPC	Endoglucanase
8	Cpa_SRR_012406	GL2	ÉXON	CPC	Expansina
9	Cpa_SRR_003647	GL2	ÉXON	SE	Proteína em resposta a auxina
10	Cpa_SRR_015669	GL2	ÍNTRON	SE	Proteína do tipo Homeobox-leucina zipper
11	Cpa_SRR_004443	GL2	ÉXON	SE	Resposta fototrópica
12	Cpa_SRR_006894	GL2	ÍNTRON	SE	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase – Aminotransferase, classes I e II
13	Cpa_SRR_008019	GL3	ÍNTRON	CPC	Beta-galactosidase
14	Cpa_SRR_008397	GL3	ÉXON	CPC	Proteína da família das Pectinesterases
15	Cpa_SRR_014173	GL3	ÉXON	SE	Fator de transcrição MADS-box
16	Cpa_SRR_007958	GL3	ÉXON	SE	Síntase de Antocianidina
17	Cpa_SRR_008528	GL3	ÍNTRON	SE	Fator de transcrição MADS-box
18	Cpa_SRR_013274	GL3	ÍNTRON	SE	Giberelina 3-beta-hydroxylase
19	Cpa_SRR_011577	GL4	ÍNTRON	CPC	Poligalacturonase
20	Cpa_SRR_013449	GL4	ÉXON	CPC	Proteína tipo pectate lyase
21	Cpa_SRR_014064	GL4	ÍNTRON	SE	Fator de transcrição nuclear
22	Cpa_SRR_003539	GL4	ÍNTRON	SE	Síntase de Antocianidina
23	Cpa_SRR_001783	GL4	ÉXON	SE	Fator de transcrição do tipo WRKY
24	Cpa_SRR_013432	GL4	ÉXON	SE	Fator de transcrição de alongamento
25	Cpa_SRR_016537	GL5	ÉXON	CPC	Endo-1 4-beta-glucanase
26	Cpa_SRR_005019	GL5	ÍNTRON	CPC	Beta-galactosidase

Tabela 1 – Cont.

Número do primer	Identificação do primer^a	GL	Localização	Função	Descrição do gene
27	Cpa_SRR_003381	GL5	ÍNTRON	SE	Proteína em resposta a auxina
28	Cpa_SRR_005088	GL5	ÍNTRON	SE	Proteína rica em cisteína e glicina
29	Cpa_SRR_017850	GL5	ÉXON	SE	Pseudoregulador de resposta
30	Cpa_SRR_003150	GL5	ÉXON	SE	Fator de transcrição da família GRAS
31	Cpa_SRR_015851	GL6	ÍNTRON	CPC	Endoglucanase
32	Cpa_SRR_009172	GL6	ÉXON	CPC	Pectinesterase
33	Cpa_SRR_015939	GL6	ÍNTRON	SE	Histidina quinase
34	Cpa_SRR_008665	GL6	ÉXON	SE	Fator de transcrição em resposta ao etileno
35	Cpa_SRR_009912	GL6	ÉXON	SE	Proteína da família indicadora de zinco
36	Cpa_SRR_010514	GL6	ÍNTRON	SE	Proteína em resposta a auxina
37	Cpa_SRR_018504	GL7	ÉXON	CPC	Xyloglucan endotransglucosylase_hydrolase
38	Cpa_SRR_006695	GL7	ÍNTRON	CPC	Síntase de celulose
39	Cpa_SRR_005968	GL7	ÍNTRON	SE	Giberelina 3-beta-hydroxylase (Fragmento)
40	Cpa_SRR_018898	GL7	ÍNTRON	SE	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
41	Cpa_SRR_006565	GL7	ÉXON	SE	Proteína do fator de transcrição do domínio NAC
42	Cpa_SRR_012018	GL7	ÉXON	SE	Proteína do tipo GAI
43	Cpa_SRR_014538	GL8	ÍNTRON	CPC	Expansina
44	Cpa_SRR_001162	GL8	ÉXON	CPC	Pectinesterase
45	Cpa_SRR_014366	GL8	ÉXON	SE	Fator de transcrição GRAS
46	Cpa_SRR_004871	GL8	ÍNTRON	SE	Proteína do tipo Homeobox-leucina zipper
47	Cpa_SRR_001072	GL8	ÍNTRON	SE	Fator de transcrição MADS box
48	Cpa_SRR_001548	GL8	ÉXON	SE	Fator de transcrição da família TCP
49	Cpa_SRR_000742	GL9	ÉXON	CPC	Expansina
50	Cpa_SRR_008989	GL9	ÍNTRON	CPC	Glicosil transferase
51	Cpa_SRR_000224	GL9	ÍNTRON	SE	Fator intensificador específico de miócitos
52	Cpa_SRR_000700	GL9	ÉXON	SE	Fator de transcrição GRAS
53	Cpa_SRR_000818	GL9	ÍNTRON	SE	Proteína do tipo acetiltransferase
54	Cpa_SRR_010019	GL9	ÉXON	SE	Fator em resposta a auxina

^aVidal et al., (2014) – Tabelas S7 e S8.

3.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Após determinar a concentração de trabalho, bem como a temperatura de anelamento de cada *primer*, as reações foram montadas seguindo os mixes apresentado na Tabela 2. O programa utilizado para a reação de PCR consistiu em um ciclo de quatro minutos a 94°C para a desnaturação inicial do DNA, seguido de 35 ciclos de um minuto a 94°C para desnaturação, um minuto a Y°C para o anelamento dos *primers* e três minutos a 72°C para a extensão dos *primers* e, posteriormente, um ciclo de sete minutos a 72°C para a extensão final. As amplificações foram feitas em um termociclador *Applied Biosystems/Veriti 96 well*, onde: Y= Temperatura de anelamento específica para cada *primer*.

As reações de PCR foram realizadas para cada *primer* no *screening* dos pais, dos *bulks* e na análise da população F₂, de acordo com a Tabela 2.

3.5. Eletroforese

Primeiramente, os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose *Metaphor* a 4% para verificar o padrão de amplificação dos *primers*. Posteriormente, ajustou-se a diluição com base nas imagens obtidas pelo gel, tendo sido visualizados pelo sistema de fotodocumentação *MiniBis Pro*. Em seguida, foram feitas as diluições do produto da amplificação, utilizando 5 µL de material amplificado para 19 µL de tampão. As amostras foram distribuídas em placas específicas contendo 96 poços para eletroforese capilar no aparelho *Fragment Analyser* (AATI), que permite detectar com segurança as diferenças de pares de bases entre os alelos analisados. Utilizou-se também o marcador DNA *Ladder* com uma variação de 35 a 450 pb durante as corridas para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados. O material contido nas placas foi transportado para os capilares, onde foi submetido à corrida de 110 minutos em uma corrente de 8,0 Kw. Após esta etapa, as imagens resultantes da eletroforese capilar foram analisadas.

O procedimento de eletroforese, tanto em gel de agarose *Metaphor* a 4% quanto em sistema de eletroforese capilar, foi realizado para o *screening* dos pais, dos *bulks* e na análise da população F₂.

Tabela 2. Quantidades dos componentes dos mixes de PCR utilizados na otimização dos 54 *primers*.

Identificação do <i>primer</i>	Sequência FxR (5' -> 3')	GL	Ta (°C)	DNA (µL)	<i>Primer</i> (µL)
Cpa_SRR_014764	AGAGCAAAGACCCCAACATGA TCCGAGTTCTGGTTGTGTGA	GL1	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_011106	TGGAAAGCTGGTGA ACTTCCA TGACCGTCGATCACCAACG	GL1	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_004376	GCGTCTGTGCTGTGAGAGA AGAAGGAGAAAGCTTTGACACA	GL1	62	2,5	1,3
Cpa_SRR_018233	TGTAGTAACGGTTTGTCTATGGT ACCAAGTAGAGCGGGAGTCT	GL1	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_006236	ACCGAAAAGCAGCCACCT TTTGTGAGCCGGGGTAGTG	GL1	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_007690	CGGCGACTGTAACCCATCA TCCCCATCACTCCTTCCA	GL1	55	2,0	0,5
Cpa_SRR_017515	GCTGGGGGACTGACTTCAT CGCTGCCTGGTGAAGTAGA	GL2	55	2,0	0,5
Cpa_SRR_012406	AGGGTGGTGGGGTTATCGT CGACAACCGCGTAAAGGA	GL2	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_003647	CGACCCAGCAACAGCCTTA CAAGGCCACCGAGTTGAGA	GL2	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_015669	TGCTTCTGTTTGGACACCGA TCTTCCTTCTCCGGCGGTA	GL2	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_004443	CGGTTGCAACAAACCGA CCGCGTTGTTCAAGCGTT	GL2	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_006894	CCTTGTCTGGTCCGGGCAA AGCATTCTCCGCAAGCCA	GL2	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_008019	CACTGCTCCTGGTACCAAGG CGAATCTGCGCAACCATCG	GL3	60	2,0	0,5

Tabela 2 - Cont.

Identificação do primer	Sequência FxR (5' -> 3')	GL	Ta (°C)	DNA (µL)	Primer (µL)
Cpa_SRR_008397	TGCGGTTTCAGGTTCCCAA CACCACCACCATCATTCCCA	GL3	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_014173	CGTGGGCGTAATATGCTTGG CAGTGTTGGTGGATGGCT	GL3	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_007958	ACCCAGATGTATGATGAGTGCA ATGAGAGAGGTGGCGGAGA	GL3	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_008528	ACCTCTCGAAAAAGCTAACCA ACGCCGAGACATTCACCA	GL3	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_013274	GCTATGCAACTTTGGCCAGAG TGAGATATCAAGTGCGGCTGA	GL3	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_011577	TGGTGGGCAGATTCTTGCA GGCTGTTTTGGATGGTCAGC	GL4	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_013449	AGTCACGAATCAGGAGACACT AGGATTAGGATGCGGAGTGG	GL4	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_014064	TCAGGTCGATGAACCTTCTCT GCTCAGCATCACAAAGAGAATAGA	GL4	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_003539	ACCGCAAAGTTCTTTATTACAATGC TGCACTGAGTAACCAAAACGC	GL4	60	2,5	1,3
Cpa_SRR_001783	CGGCATTGCTGGATTGGA AGTCTCCAAAAGTAGCACTCAACT	GL4	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_013432	TCGTCCATGCCCTCAAAGA TGGACAACCTGCACTTACTCTTGA	GL4	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_016537	AGGCAGGTGGAGTGGTAGA CGGGTAATGCAGGTCTGGT	GL5	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_005019	GCCTTTGCCAGTCCTTGT CCTGGGCCTGTTGAAATTGT	GL5	62	2,0	0,5

Tabela 2- Cont.

Identificação do primer	Sequência FxR (5' -> 3')	GL	Ta (°C)	DNA (µL)	Primer (µL)
Cpa_SRR_003381	<u>GTTCTTCGCCGGAATCCCA</u> CGGCCATCCTACCACTTGT	GL5	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_005088	<u>TGGTGCTTGCAGTAGAGGAC</u> CCCAAGACAAATGTGCCACT	GL5	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_017850	<u>CCCATCTTTTCCTGCATCTGG</u> AGCTGTGAAAGTCCCTGCA	GL5	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_003150	<u>GGTTCCTCCTTCCATGCCA</u> GGGTTTTGGCCTGTGAAGG	GL5	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_015851	<u>AACCTCTTGCCTGCCAT</u> CGTCTAAAAAGAGGCATGCGT	GL6	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_009172	<u>AGGCTACTGTGTTTCATGGCA</u> GGCCCCAGATCGAGTTACA	GL6	60	2,5	0,5
Cpa_SRR_015939	<u>TGGAAGTAAGCTCAAACTGAAGT</u> CTGGGGGATTGGGGTTGTT	GL6	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_008665	<u>TCCCTCAGCGACTCCTCAA</u> GCTCTACGGCCTAATCGCA	GL6	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_009912	<u>TCCGGAATCTAGCCACGT</u> CGGTCATTTTCGCATCGCA	GL6	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_010514	<u>TGCAATGGTGAGTGTACATGA</u> TCGCCAACCAACATCCAGT	GL6	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_018504	<u>GGATTGAAACCCGGAGCCA</u> CCCATGAATGCCCCCTTCA	GL7	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_006695	<u>TAGCGGCCTGTACTCCTGT</u> ATCACCGGCGGCTCTATTG	GL7	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_005968	<u>AGACAAGGAGGCTGTTCCG</u> TGACCACCCAACAACCTTGCA	GL7	60	2,0	0,5

Tabela 2 - Cont.

Identificação do primer	Sequência FxR (5' -> 3')	GL	Ta (°C)	DNA (µL)	Primer (µL)
Cpa_SRR_018898	TGCCGGAGAAGAGCTTGAG TGCCGGCTTCTCTCGAGTA	GL7	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_006565	AGCTCGACGATTGGGTGT AGCCGGCTTTGAGGTTGA	GL7	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_012018	CAAGCCACGCCTAATCCCA TGACTCGGAATTATGCCAGCT	GL7	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_014538	GCTACCCTGCAATTTACAAGTT GCTAGTAGAGTATGAGTCTGAATGC	GL8	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_001162	ACGCCATTGTCGTCAGTG ACCTCCTGCAACGCTTCT	GL8	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_014366	AGTCCCAGCCTGCTCAAGA GCCGATGCCGTCTCCATTA	GL8	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_004871	AACGGCTCCCCTAAAACCC TCAGCTAGCCAAGGACCT	GL8	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_001072	TGTAGTTATGGGGCACAAGGA GTAGCTCTGCATCCCACGA	GL8	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_001548	ACGACCCAAGAATTGAAGCTCT TGTTGCTGCCAGACCCAT	GL8	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_000742	TCTGCTGCTATTTTCGTGCAC AGAAAGGCATGTGAGGAGCT	GL9	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_008989	ACCGTATCCGCCGACAAA GCATCCCCTTCTTGGTCCA	GL9	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_000224	ATGGCAATGCAGGACCCA AGAGAGCAGAGAGTTGAAGCT	GL9	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_000700	AACGTGGTGGCATGCGAA ACGAGCACATTGACAGCCA	GL9	60	2,0	0,5

Tabela 2 - Cont.

Identificação do primer	Sequência FxR (5' -> 3')	GL	Ta (°C)	DNA (µL)	Primer (µL)
Cpa_SRR_000818	CCCAGCCGATCGAGTCTTT GCCACCTGCGCATAACAAC	GL9	60	2,0	0,5
Cpa_SRR_010019	GGTGGGGCAGCATGATCAA AGATGCGGGTTCCACAAC	GL9	60	2,0	0,5

GL = Grupo de Ligação; Ta = Temperatura de Anelamento.

3.6. Screening dos iniciadores SSR-ESTs nos genótipos parentais Sekati e JS-12

Foi utilizado para as amplificações o DNA dos genótipos parentais Sekati e JS-12. Cada *primer* foi testado primeiramente com os genótipos parentais, em diferentes reações de amplificação, nos quais foram testados diferentes concentrações de DNA, MgCl₂ e *primers*. Todas as reações testes foram completadas com água ultrapura até o volume de 13 µL. As amplificações foram feitas em termociclador *Applied Biosystems/Veriti 96 well*. Os *primers* que não apresentaram amplificação satisfatória foram submetidos a um protocolo de *touchdown*, em que a temperatura de anelamento inicial variou de 55-62°C, conforme a Tabela 2 apresentada no tópico 3.4.

Para todos os produtos de PCR, foram retirados 6µL de reação, para serem revelados em gel de agarose *Metaphor* a 4% imerso em tampão TAE [Tris-Acetato 90 mM (pH 8,0) +EDTA 10 mM], corado com *GelRed™* e *Blue Juice* (proporção de 1:1), à amperagem de 350 a 400 mA e visualizado pelo sistema de fotodocumentação *MiniBis Pro (Bio-Imaging Systems)* para análise do padrão de bandas amplificadas. Entretanto, o gel de eletroforese é regularmente pouco sensível e requer longo tempo para separação, o que limitou a total eficiência para uma análise rápida e específica. Portanto, todos os *primers* que amplificaram foram submetidos à análise em eletroforese capilar no aparelho *Fragment Analyser (AATI)*, para uma melhor visualização das bandas. Utilizou-se também o marcador DNA *Ladder*, com uma variação de 35 a 450 pb durante as corridas, para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados. Após o *screening* dos pais, foram contabilizados os *primers* considerados polimórficos.

3.7. Screening de SSR-ESTs via BSA (*Bulk Segregant Analysis*)

Após o *screening* dos *primers* nos genótipos parentais, foi adotada a estratégia de análise de *bulks* segregantes (*Bulked Segregant Analysis - BSA*), como descrito originalmente por Michelmore et al. (1991). Nesta etapa da análise, para a realização do *screening* das regiões SSR-ESTs, foram selecionados somente os *primers* que obtiveram bom padrão de amplificação e que foram polimórficos no *screening* dos genótipos parentais.

Para o preparo dos *bulks*, foram selecionados os genótipos da população F₂, utilizando os dados obtidos na fenotipagem, anteriormente mensurados pela equipe do melhoramento do mamoeiro da UENF (Tabela 3). Foram montados quatro *bulks* contrastantes, para a FF e a FP, compostos por doze genótipos cada, sendo o 1º *bulk* - composto por doze genótipos de maior firmeza de fruto; o 2º *bulk* – composto por doze genótipos de menor firmeza de fruto; o 3º *bulk* – composto por doze genótipos de maior firmeza de polpa; e o 4º *bulk* – composto por doze genótipos de menor firmeza de polpa.

Cada *bulk* foi representado por uma alíquota de 10 µL de DNA na concentração de 5 ng/µL de cada indivíduo selecionado para compor cada *bulk*. Quantidades equimolares do DNA desses doze indivíduos foram utilizadas para a preparação de cada *bulk*.

Somente os *primers* que foram polimórficos entre os genótipos das amostras agrupadas (*bulks*) foram selecionados para genotipar os 186 indivíduos da população F₂. Além disso, foi observada a segregação nos *bulks* para a identificação das marcas com forte ligação com QTLs para a FF e a FP.

3.8. Genotipagem da população de mapeamento (F₂)

Foram analisados os genótipos dos parentais e as plantas da geração F₂ – constituída por 186 indivíduos e utilizada como a população de mapeamento –, aplicando os *primers* SSR-ESTs selecionados no *screening* dos *bulks*. As reações de amplificação foram realizadas conforme descrito no tópico 3.4., e a eletroforese, feita em sistema capilar conforme descrito no tópico 3.5.

Após a eletroforese dos iniciadores SSR-ESTs na população F₂, foi realizado um *score* dos fragmentos de DNA amplificados, seguido pela codificação alélica (específica para o programa *JoinMap*) para análise de ligação e inserção dos locos analisados no mapa genético.

Tabela 3. Dados fenotípicos dos genótipos da geração F₂ que compõem os *bulks* para as características de Firmeza de Fruto (FF) e Firmeza de Polpa (FP).

	Genótipos	Dados Fenotípicos
		FF (N)
Bulk 1	2	141,42
	17	157,81
	21	150,63
	24	154,60
	25	138,74
	36	147,03
	65	143,30
	89	140,69
	92	147,83
	115	147,98
	118	144,76
	192	141,58
Bulk 2	6	73,46
	97	78,75
	133	61,28
	147	82,23
	150	72,86
	165	76,07
	171	67,08
	182	74,58
	200	84,02
	202	77,44
	204	80,87
	208	73,47
	Genótipos	FP (N)
Bulk 3	2	98,66
	17	102,95
	21	114,01
	24	98,69
	25	107,54
	36	104,97
	38	97,97
	39	98,16
	78	102,19
	103	100,65
	122	97,81
	179	100,92
Bulk 4	33	54,77
	58	52,56
	93	47,55
	133	37,19
	147	50,21
	148	51,76
	150	33,38
	171	48,72
	200	54,25
	202	48,69
	204	51,45
	208	42,82

Bulk 1 - composto por doze genótipos de maior firmeza de fruto; *Bulk 2* – composto por doze genótipos de menor firmeza de fruto; *Bulk 3* – composto por doze genótipos de maior firmeza de polpa; *Bulk 4* – composto por doze genótipos de menor firmeza de polpa.

3.9. Inserção de marcas SSR-ESTs no mapa de ligação do mamoeiro

O software *JoinMap* versão 4.0 (Van Ooijen, 2006) foi utilizado para adicionar as marcas dos marcadores SSR-ESTs com padrão de segregação mendeliana esperada considerando a classe de marcadores codominantes (1:2:1), para inserção no mapa de ligação do mamoeiro, que vem sendo desenvolvido pela equipe de melhoramento da UENF. Os grupos de ligação foram formados e ordenados utilizando um LOD score mínimo de 5,0 e máximo de 40% de recombinação. As frequências de recombinação foram convertidas em distâncias genéticas (centiMorgans) utilizando a função de Kosambi (1944). O Teste Qui-quadrado [X^2 ($p < 0,05$, $GL=1$)] foi usado para testar as hipóteses de segregação mendeliana na proporção de 1:2:1 para os marcadores SSR-ESTs. Com o intuito de facilitar a apresentação dos dados, os marcadores foram numerados de 1 a 54 e referidos apenas pelo número.

3.10. Mapeamento de QTL

Os dados fenotípicos estabelecidos para as duas características quantitativas (FF e FP), juntamente com as marcas SSR-ESTs analisadas neste estudo e com os marcadores SNPs que compõem o mapa genético do mamoeiro (desenvolvido previamente pela equipe de melhoramento do mamoeiro da UENF), foram utilizados para a análise de associação característica-marcador visando à identificação de QTLs.

A análise de QTL foi realizada utilizando o pacote R/qtl do programa R (www.r-project.org). O valor de LOD *threshold* foi determinado para cada característica considerando o teste de permutação, com erro de 0,05 sobre 1000 permutações por dado. Inicialmente, os QTLs foram identificados utilizando a análise por intervalo simples (*Interval Mapping*), a cada 2,5 cM, a fim de encontrar regiões com potenciais QTLs.

Na região dos potenciais QTLs, os marcadores com os maiores valores de LOD foram tomados como cofatores, e os dados reanalisados usando a função de mapeamento MQM (*Multiple QTL Model*).

A estatística W (Shapiro-Wilk) testou os dados fenotípicos da população F_2 quanto ao seu ajuste à distribuição normal (Shapiro; Wilk, 1965). Os valores

considerados para que os dados se enquadrassem em uma distribuição normal, variou entre $W = 0,97-0,99$.

Os efeitos gênicos (a = efeito aditivo, Equação 1; d = efeito de dominância, Equação 2) e a porcentagem de variação individual fenotípica atribuível a um QTL foram estimados nos picos (posição de QTL de máxima verossimilhança). O nível médio de dominância para um QTL foi calculado como a razão d/a . A ação gênica foi determinada de acordo com as diretrizes apresentadas por Stuber et al (1987): ação gênica Aditiva (A) = 0 a 0,20; Dominância Parcial (DP) = 0,21 a 0,80; Dominância (D) = 0,81 a 1,20; e Sobredominância (OD) = $>1,20$. O sinal do componente aditivo do efeito do alelo B (de JS-12) definiu o pai contribuinte para cada QTL: se positivo, o alelo para o aumento da média da característica veio do genótipo JS-12; se negativo, o alelo veio do genótipo Sekati.

$$a = \frac{(\mu_{BB} - \mu_{AA})}{2} \quad (\text{Equação 1})$$

$$d = \mu_{AB} - \frac{(\mu_{AA} + \mu_{BB})}{2} \quad (\text{Equação 2})$$

3.11. Análise da diversidade funcional

Para análise de diversidade funcional, com base nas características de FF e FP, foram avaliados os 186 genótipos da geração F_2 utilizando os 8 iniciadores SSR-ESTs (Cpa_SSR_003539, Cpa_SSR_001783, Cpa_SSR_005019, Cpa_SSR_018504, Cpa_SSR_018898, Cpa_SSR_004871, Cpa_SSR_001072 e Cpa_SSR_000818) selecionados após a triagem nos genótipos parentais e nos *bulks*, conforme os tópicos 3.6 e 3.7.

Os dados obtidos a partir da amplificação dos iniciadores SSR-ESTs foram convertidos em código numérico para cada alelo por loco. Tal matriz numérica foi desenvolvida atribuindo-se as codificações 11 e 22 para as formas homozigotas, e 12 para os heterozigotos. A partir dessa matriz numérica, foi calculada a distância genética entre os genótipos estudados, com o auxílio do programa Genes (Cruz, 2008) utilizando o Índice Ponderado. A análise de

agrupamento dos genótipos via dendograma foi feita por meio do método hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*), com auxílio do programa Mega versão 7, e a dispersão gráfica dos genótipos foi realizada com base no método da Análise das Coordenadas Principais (PcoA), utilizando o programa Genalex 6.3 (Peakall; Smouse, 2009), além de realizar uma análise descritiva utilizando o programa Genes.

A eficiência do dendograma oriundo da matriz de distância genética molecular foi avaliada por meio do Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC), o qual observa a concordância entre as matrizes de dissimilaridade original e o agrupamento UPGMA (Sokal; Rolf, 1962) e para a estimativa da significância das correlações entre as matrizes foi utilizado o teste de Mantel (Mantel, 1967) com 1000 permutações. Para o agrupamento, foi considerada a média geral das distâncias genéticas entre os genótipos do dendograma, como ponto de corte.

As estimativas que caracterizam os locos, como a frequência de alelos por loco, heterozigosidade e o conteúdo informativo de polimorfismo (PIC - *Polymorphic Information Content*) foram obtidos com o auxílio do programa Genes (Cruz, 2008).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise dos locos SSR-ESTs

Com base no mapeamento genômico realizado por Vidal et al. (2014), os 54 locos SSR-ESTs selecionados neste trabalho foram categorizados de acordo com a sua localização em regiões gênicas, sendo 50% dos locos dentro de *éxons* e 50% dentro de *íntrons*. De acordo com os motivos, dos locos identificados em regiões de *íntrons*, os dinucleotídeos foram mais abundantes (48,15%), enquanto que os tri-hexanucleotídeos foram uniformemente distribuídos nessa região. Por outro lado, os locos identificados nos limites exônicos foram enriquecidos em tri- (70,37%) e hexanucleotídeos (18,52%), o que é esperado devido à pressão seletiva contra mutações em regiões codificantes (Figura 2). O Atlas desenvolvido por Vidal et al. (2014), fornece uma análise dos genes envolvidos na maturação dos frutos, onde foram identificados marcadores SSR-ESTs potencialmente envolvidos com a Síntese do Etileno (SE) e Componentes da Parede Celular (CPC). No presente trabalho, foram selecionados 33,33% dos *primers* com a função de CPC e 66,66% com a função de SE, distribuídos entre nove grupos de ligação do mamoeiro.

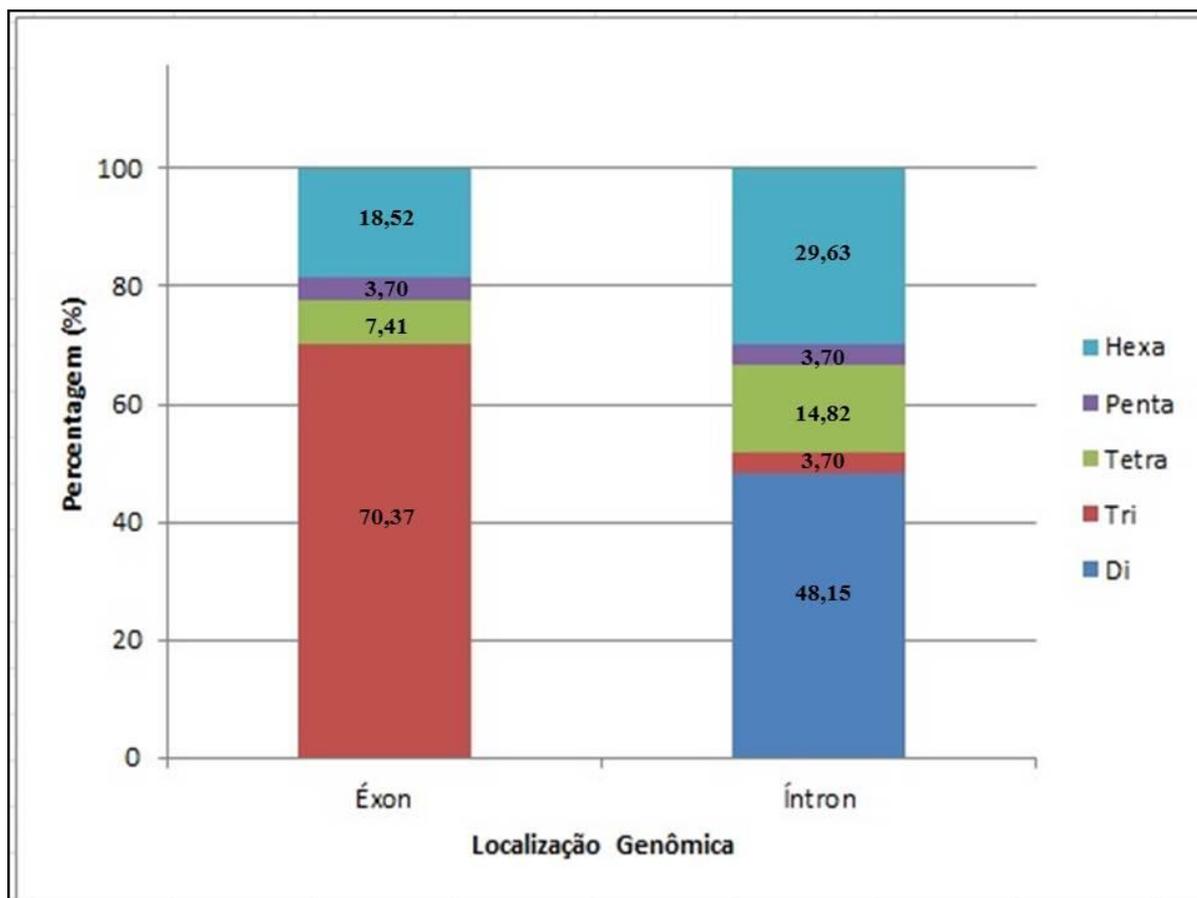


Figura 2. Distribuição dos 54 iniciadores SSR-ESTs de acordo com a localização genômica e motivos.

Buscou-se com a seleção destes *primers*, encontrar genes potencialmente relacionados ao amadurecimento do fruto, uma característica de alto interesse agrônomo na cultura do mamoeiro. Em frutos climatéricos, como o mamão, o processo de amadurecimento está intimamente ligado ao aumento da produção de etileno, que é responsável por coordenar e complementar este processo (Giovannoni, 2001).

A diminuição da firmeza do fruto e da polpa, durante o amadurecimento, é também função da perda da integridade da parede celular. A degradação das moléculas poliméricas constituintes da parede celular, como celulose, hemicelulose e pectina, gera alterações na parede que leva ao amolecimento do fruto (Tucker, 1993).

Segundo Vidal et al. (2014), a seleção de pares de iniciadores SSR-ESTs relacionados a genes com função de degradação da parede celular e com o etileno compreendem muito bem o processo de amaciamento da polpa e do fruto.

A maturação dos frutos é um processo de desenvolvimento caracterizado por mudanças notáveis relacionadas ao sabor, ao metabolismo do açúcar, à cor, ao aroma, à textura, ao amolecimento e ao conteúdo nutricional (Giovannoni, 2004). Estas alterações metabólicas e físicas são conduzidas por perfis de expressão geneticamente coordenados em várias vias metabólicas, tais como desmontagem da parede celular, hidrólise do açúcar, biossíntese de etileno e pigmentação. Ao integrar essas informações na construção de um mapa, pode-se fornecer uma lista de marcadores para estudar a variabilidade genética e funcional de processos ligados ao amadurecimento do fruto (Vidal et al., 2014).

4.2. Screening nos genótipos parentais e caracterização dos iniciadores SSR-ESTs

Após seleção dos 54 locos SSR-ESTs do trabalho realizado por Vidal et al. (2014), realizou-se uma triagem nos genótipos parentais Sekati e JS-12, a fim de selecionar para os testes complementares somente os *primers* que proporcionaram melhores resultados e, já nesta etapa, descartar os *primers* não promissores. Dos 54 marcadores analisados quanto ao polimorfismo entre os pais, através da realização de amplificação via PCR, 16 *primers* apresentaram polimorfismo e um bom padrão de amplificação entre os genitores, visto que amplificaram dois fragmentos, correspondentes a dois diferentes alelos – que apresentaram uma diferença de até cinco pares de bases, diferindo entre os genótipos estudados (Figura 3). Em relação aos demais *primers* testados, 33 amplificaram e foram monomórficos (2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 34, 35, 36, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 48, 49), e 3 (50, 51 e 54) amplificaram, mas não apresentaram um bom padrão de amplificação, ou seja, baseado no padrão de bandas dos marcadores em ambos os genitores, a população apresentou bandas inespecíficas. Na Tabela 4, pode-se verificar as características dos 16 pares de iniciadores microssatélites SSR-ESTs polimórficos entre os genitores Sekati e JS-12.

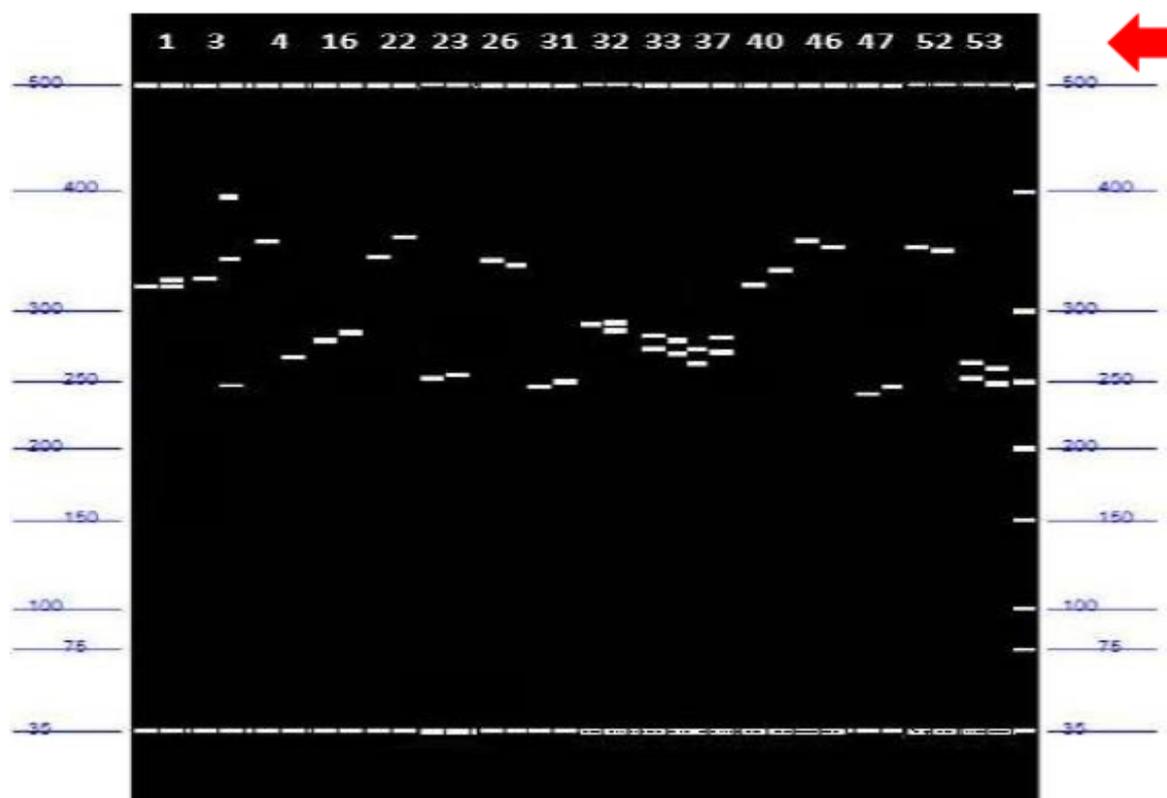


Figura 3. Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA referentes ao *screening* nos pais. A seta vermelha indica os *primers* que foram polimórficos.

Após a análise via PCR e eletroforese capilar dos locos SSR-ESTs, constatou-se que dos 16 *primers* (29,6%) que apresentaram polimorfismo e um bom padrão de amplificação entre os genitores Sekati e JS-12, onze (68,7%) estão localizados em *íntrons* e cinco em *éxons* (31,3%) (Figura 4a); onze possuem função relacionada com a SE (68,7%) e cinco com a CPC (31,3%) (Figura 4b; Tabela 4).

Tabela 4. Características dos pares de iniciadores microssatélites SSR-ESTs quanto ao polimorfismo entre os genitores Sekati e JS-12, entre os bulks e na análise da população F₂.

<i>Primers</i>	<i>Função</i>	<i>GL</i>	<i>TO</i>	<i>Na</i>	<i>Análise quanto ao polimorfismo</i>		
					<i>Genitores</i>	<i>Bulks</i>	<i>População F₂</i>
Cpa_SSR_014764	CPC	1	321-327	2	SIM	NÃO	NÃO
Cpa_SSR_004376	SE	1	338-346/360	3	SIM	NÃO	NÃO
Cpa_SSR_018233	SE	1	258-268	2	SIM	NÃO	NÃO
Cpa_SSR_007958	SE	3	280-285	2	SIM	NÃO	NÃO
Cpa_SSR_003539	SE	4	345-362	2	SIM	SIM	SIM
Cpa_SSR_001783	SE	4	242-253	2	SIM	SIM	SIM
Cpa_SSR_005019	CPC	5	343-339	2	SIM	SIM	SIM
Cpa_SSR_015851	CPC	6	247-251	2	SIM	NÃO	NÃO
Cpa_SSR_009172	CPC	6	293-286/292	3	SIM	NÃO	NÃO
Cpa_SSR_015939	SE	6	274-272/281	3	SIM	NÃO	NÃO
Cpa_SSR_018504	CPC	7	266-275	2	SIM	SIM	SIM
Cpa_SSR_018898	SE	7	324-336	2	SIM	SIM	SIM
Cpa_SSR_004871	SE	8	360-355	2	SIM	SIM	SIM
Cpa_SSR_001072	SE	8	241-247	2	SIM	SIM	NÃO
Cpa_SSR_000700	SE	9	354-351	2	SIM	NÃO	NÃO
Cpa_SSR_000818	SE	9	259-263	2	SIM	SIM	SIM

CPC – Componentes da Parede Celular; SE – Síntese do Etileno; GL – Grupo de Ligação; TO – Tamanho do alelo observado; Na – Número de alelos.

De acordo com Vidal et al. (2014) a maior proporção de *primers* associados com a SE relaciona-se às várias vias metabólicas que envolvem o amadurecimento da fruta e pelo fato de que frutos climatéricos possuem a perda de firmeza fisiologicamente relacionada com os níveis de etileno. *Primers* intrônicos foram mais polimórficos devido a menor pressão por seleção, além de segregarem com os genes associados à função bioquímica ou ao fenótipo de interesse.

Em relação à constituição alélica dos locos, treze *primers* encontra-se em homozigose (81,3%) e três em heterozigose (18,7%). Para compor o mapa, os locos selecionados devem estar em homozigose entre os pais, pois os mesmos são linhagens contrastantes para as características de estudo, onde o máximo de alelos possíveis a ser encontrado, corresponde ao número de alelos divergentes entre os genótipos parentais, sendo assim, apenas treze marcadores foram selecionados para as próximas etapas do trabalho (Figura 4c).

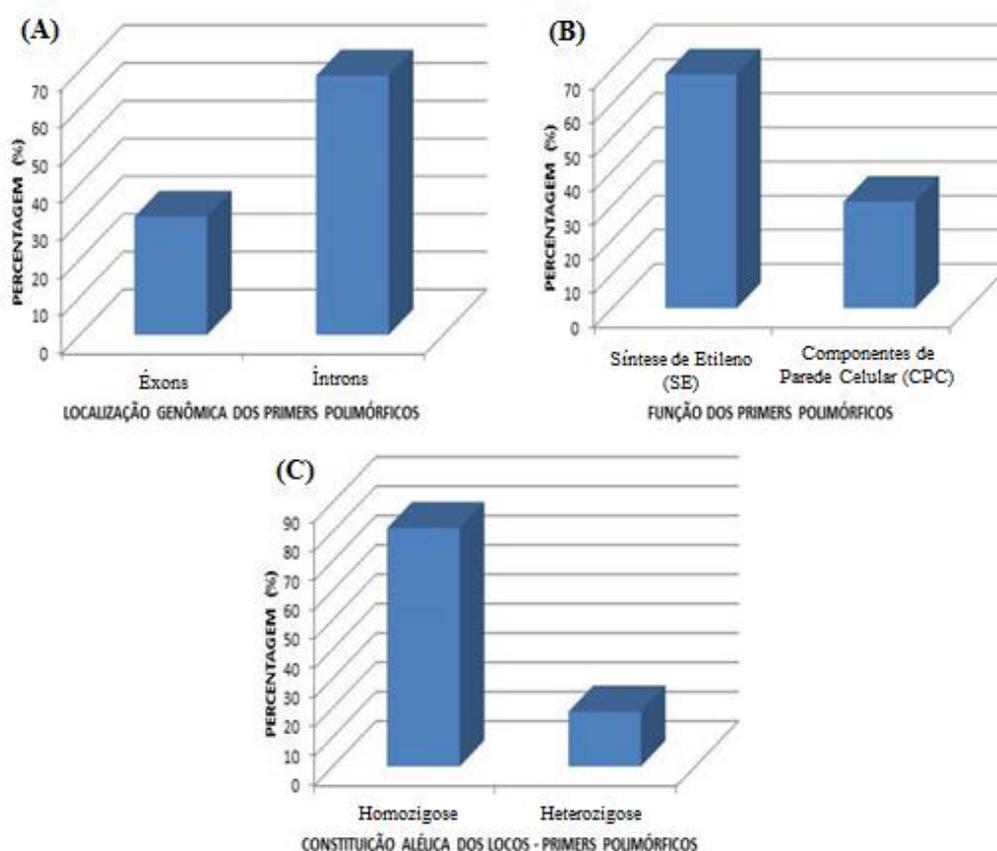


Figura 4. *Primers* que apresentaram polimorfismo e bom padrão de amplificação entre os genitores Sekati e JS-12. (A) Localização genômica dos *primers* polimórficos (íntrons e éxons). (B) Função dos *primers* polimórficos (SE e CPC); (C) Constituição alélica dos *primers* polimórficos (homozigose e heterozigose).

4.3. Screening via BSA

Para a construção de um mapa genético e para o mapeamento de QTLs é importante à identificação de marcadores que revelem polimorfismo entre os genitores e que, portanto, segregarão na população proveniente do cruzamento entre eles. Para isso, o DNA dos genitores é analisado com diferentes marcadores. Esta análise, embora revele polimorfismos, não fornece informações sobre qual dos polimorfismos encontrados está ligado a genes de interesse (Arnheim et al., 1985; Rezende, 2004). Esta associação pode então ser realizada através da análise de *bulks* segregantes (BSA), que foi proposta na presente pesquisa para verificar a possibilidade de associação dos marcadores SSR-ESTs analisados, com as características agronômicas de estudo.

Dos 13 marcadores em homozigose testados nos *bulks*, 8 revelaram polimorfismo (Cpa_SSR_003539, Cpa_SSR_001783, Cpa_SSR_005019, Cpa_SSR_018504, Cpa_SSR_018898, Cpa_SSR_004871, Cpa_SSR_001072, Cpa_SSR_000818) entre os conjuntos agrupados e foram selecionados para análise dos indivíduos da população F₂ (Figura 5). O polimorfismo apresentado foi interpretado de acordo com a presença dos alelos de ambos os genótipos parentais, comparando o tamanho dos alelos presentes em cada *bulk* com o tamanho dos alelos obtidos no *screening* dos pais.

A análise via BSA trata-se de um método introduzido por Michelmore et al. (1991), que se baseia na constituição de *bulks* (ou misturas) de amostras de DNA de indivíduos com fenótipos extremos pertencentes à população segregante. É um método rápido para identificar marcadores ligados a qualquer gene específico ou região do genoma que poderá facilitar uma seleção baseada em marcadores moleculares (Ferreira; Grattapaglia, 1998).

A combinação de marcadores SSR-ESTs com a técnica de BSA é aplicável na identificação de genes de interesse para espécies em estudo, mesmo não possuindo um mapa genético disponível. Vale ressaltar também, que o baixo polimorfismo encontrado no procedimento via BSA pode estar relacionado à estreita base genética, já que os genitores do cruzamento pertencem ao mesmo grupo heterótico. Torna-se importante destacar, que para se obter um número significativo de polimorfismo entre os *bulks*, deve-se procurar trabalhar com uma

margem acima de 30% de *primers* polimórficos (validados para a espécie em estudo e, preferencialmente, mapeados) (Costa et al., 2010).

Após essa triagem, os marcadores SSR-ESTs que foram polimórficos entre os *bulks*, foram utilizados para genotipar a população de mapeamento (F₂). Essas ações possibilitam a integração de marcas ao mapa genético do mamoeiro e a identificação de QTLs para FF e FP, contribuindo para a futura implementação da SAM nos programas de melhoramento do mamoeiro e a identificação de genótipos superiores para tais características com maior precisão e menor tempo (Bered; Barbosa Neto; Carvalho, 1997; Carneiro; Vieira, 2002).

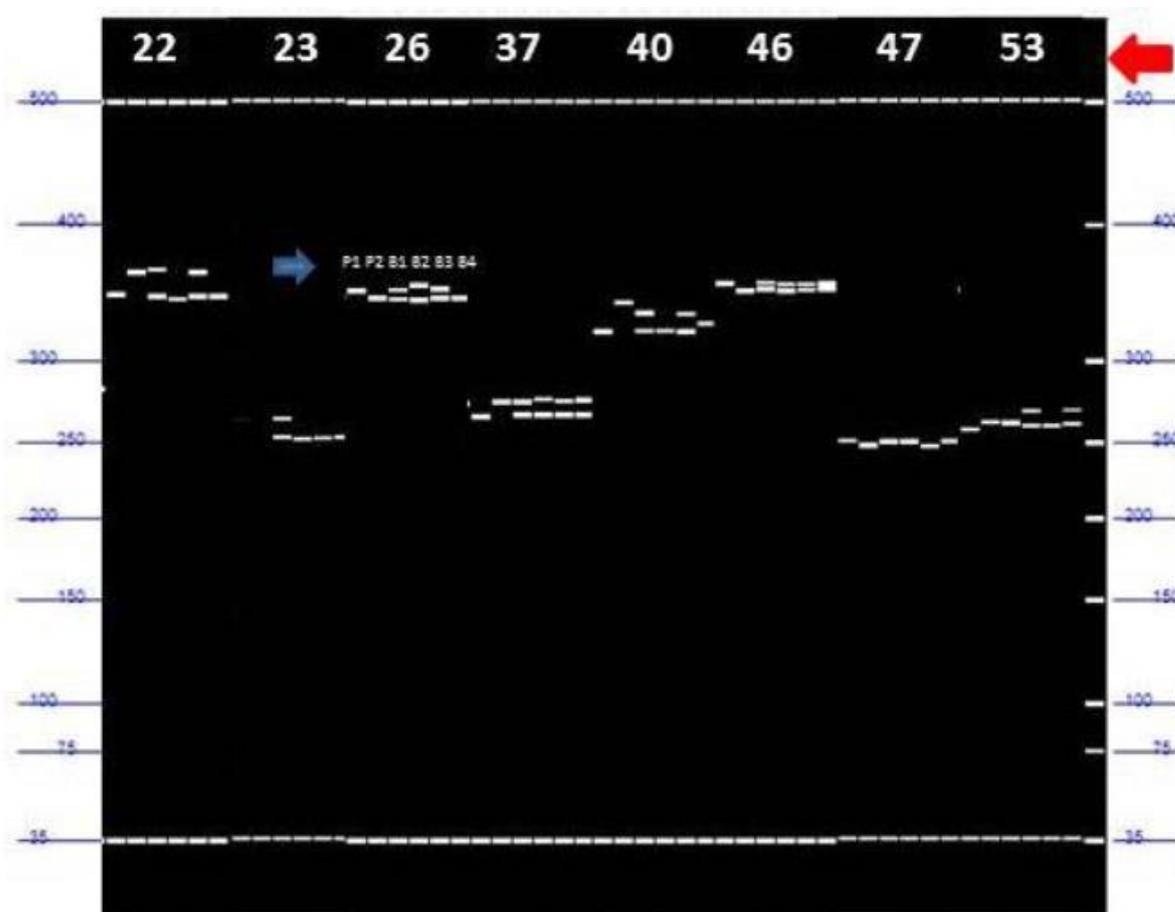


Figura 5. Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA referentes ao *screening* nos *bulks*. A seta vermelha indica os *primers* que foram polimórficos. A seta em azul indica a ordem das amostras (P1 – parental 1; P2 – parental 2; B1 – *bulk* 1; B2 – *bulk* 2; B3 – *bulk* 3; e B4 – *bulk* 4).

A técnica BSA foi adotada na cultura do mamoeiro para a identificação de marcadores moleculares ligados ao gene de resistência PRSV-P (*Papaya*

Ringspot Virus type P) em espécies relacionadas ao gênero *Vasconcellea* e para a seleção de genótipos superiores para resistência, visando uma fonte de genes de resistência para a espécie *C. papaya*. O marcador Psilk4 mostrou-se eficaz na identificação correta de genótipos resistentes (99%) quando aplicado à progênie F₂ interespecífica segregando para o caráter de resistência, sendo potencial para a aplicação em programas de melhoramento visando integrar o gene de resistência a PRSV-P de *V. cundinamarcensis* em *C. papaya* (Dillon et al., 2006).

Para a identificação de QTLs, a metodologia BSA foi adotada em um estudo realizado com arroz, para avaliar o efeito genético de QTLs que conferem tolerância ao calor no estágio de floração. Para tal, utilizou-se uma população composta por 279 indivíduos F₂, resultantes do cruzamento entre uma cultivar tolerante e cultivar sensível ao calor. Para identificar o efeito principal do QTL para tolerância ao calor, realizou-se uma triagem nos genótipos dos pais com 200 pares de *primers* SSR, revelando 30% de polimorfismo entre os pais. A fim de detectar a principal associação do QTL com a característica de tolerância ao calor, foi adotada a estratégia de BSA. Os resultados revelaram que marcadores SSR mostraram associação significativa com a tolerância ao calor. A tolerância ao calor durante o estágio de floração no arroz foi controlada por múltiplos genes (Zhang et al., 2009).

Estudo realizado por Zhang et al. (2016) em melão utilizou a metodologia BSA, a fim de localizar e mapear importantes genes relacionados as características de sabor doce e azedo no melão Fengwei (o híbrido F₁ das variedades Shouxing e Xinguowei). Para tal, utilizaram uma combinação de marcadores SLAF e a metodologia BSA para identificar as regiões genômicas que afetam essas características em *pools* de fenótipos extremos da população F₂ (melão Fengwei autofecundado). Foram identificadas seis regiões relacionadas com a característica de doçura (13 marcadores SLAF) e vinte e três regiões relacionadas a característica azedo (48 marcadores SLAF). As características foram mapeadas em diferentes regiões genômicas, sendo para o doce os cromossomos 6, 10, 11 e 12, e para o azedo 2, 3, 4, 5, 9 e 12. O estudo forneceu uma base para a utilização da seleção assistida por marcadores (SAM) para as características doce e azedo em melões Fengwei.

4.4. Análise dos SSR-ESTs na população de mapeamento

A partir da análise de amostras de DNA dos 186 indivíduos da população F_2 , foram obtidos dados genotípicos de oito marcadores moleculares do tipo SSR-ESTs (Cpa_SSR_003539, Cpa_SSR_001783, Cpa_SSR_005019, Cpa_SSR_018504, Cpa_SSR_018898, Cpa_SSR_004871, Cpa_SSR_001072 e Cpa_SSR_000818), selecionados no procedimento BSA, de acordo com o tópico 4.3. A genotipagem na população F_2 com os *primers* resultou em sete locos com segregação dentro do esperado para serem utilizados para o mapeamento desta população (Cpa_SSR_003539, Cpa_SSR_001783, Cpa_SSR_005019, Cpa_SSR_018504, Cpa_SSR_018898, Cpa_SSR_004871 e Cpa_SSR_000818) (Figura 6). As informações alélicas dos marcadores foram convertidas no código a (homozigoto para o genitor Sekati), b (homozigoto para o genitor JS-12) e h (heterozigoto) para as análises moleculares.

Foi observada a presença de marcadores monomórficos na população segregante (Cpa_SSR_001072). A ocorrência desse monomorfismo pode ser justificada, pelos erros inerentes ao sistema de eletroforese capilar, o qual pode ter revelado um falso polimorfismo para esse loco durante as etapas anteriores. Outra justificativa, seria o fato de que as plantas correspondentes aos genótipos Sekati e JS-12 utilizadas para o *screening* com os *primers*, não foram às mesmas utilizadas no cruzamento inicial que gerou a população.

Populações F_2 são desenvolvidas por autofecundação do híbrido F_1 , derivado do cruzamento dos dois pais, estas são as mais fáceis e rápidas de serem obtidas, sendo que o máximo de informação genética é alcançado quando se usa uma população F_2 e marcadores codominantes (Staub et al., 1996).

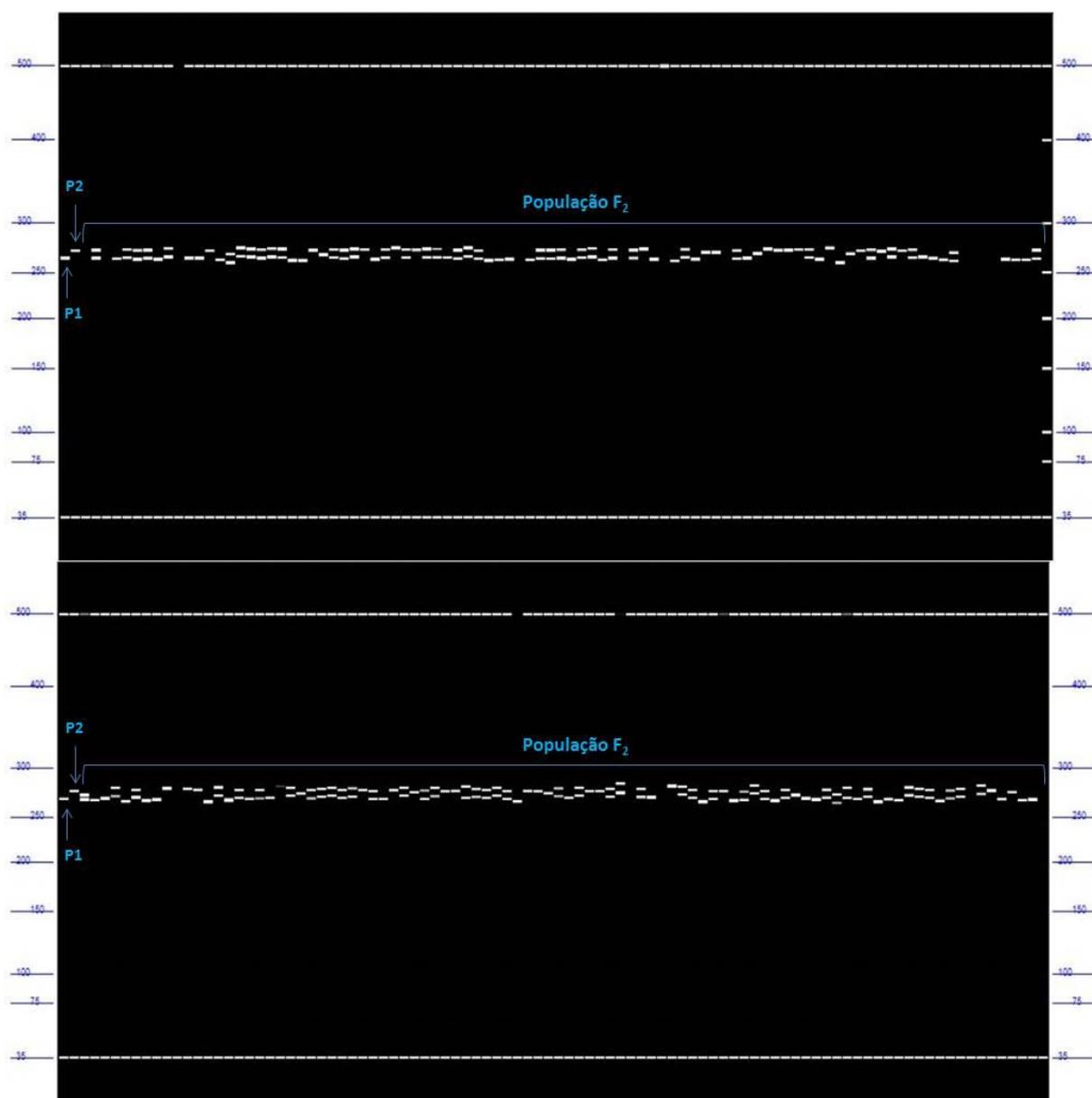


Figura 6. Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA referentes ao *screening* da população de mapeamento (geração F_2). A imagem corresponde ao *screening* com o *primer* polimórfico Cpa_SSR_018504. P1 = Sekati; P2 = JS-12.

4.5. Inserção das marcas no mapa genético

Entre os 54 marcadores SSR-ESTs testados neste trabalho, apenas oito apresentaram segregação de alelos de ambos os genitores na população F_2 . Desses, sete marcadores apresentaram segregação mendeliana dentro do esperado (1:2:1) e foram empregados na análise de mapa, juntamente com o conjunto de marcadores SNPs que integra o mapa que vem sendo construído

pela equipe de melhoramento do mamoeiro na UENF com a mesma população utilizada no presente estudo (Pereira et al., 2015).

Após inserção das marcas SSR-ESTs identificadas, o mapa ficou baseado em 1207 marcadores (entre SNPs, SSR e SSR-EST), cobrindo 3991,13 cM do genoma da espécie. As marcas SSR-ESTs geradas neste trabalho foram mapeadas nos grupos de ligação GL2, GL3 e GL6. O número de marcadores por grupo de ligação variou de cinco para o GL2 (Cpa_SSR_001783; Cpa_SSR_018898; Cpa_SSR_018504; Cpa_SSR_003539; Cpa_SSR_004871; Figura 7) a um para o GL3 (Cpa_SSR_005019; Figura 8) e um para o GL6 (Cpa_SSR_000818) (Figura 9). O comprimento dos grupos de ligação foi de 854,2 cM, 569 cM e 571,9 cM para os grupos de ligação GL2, GL3 e GL6, respectivamente. O total de marcas individuais por grupo de ligação foi de 113, 156 e 149 para os grupos GL2, GL3 e GL6, respectivamente.

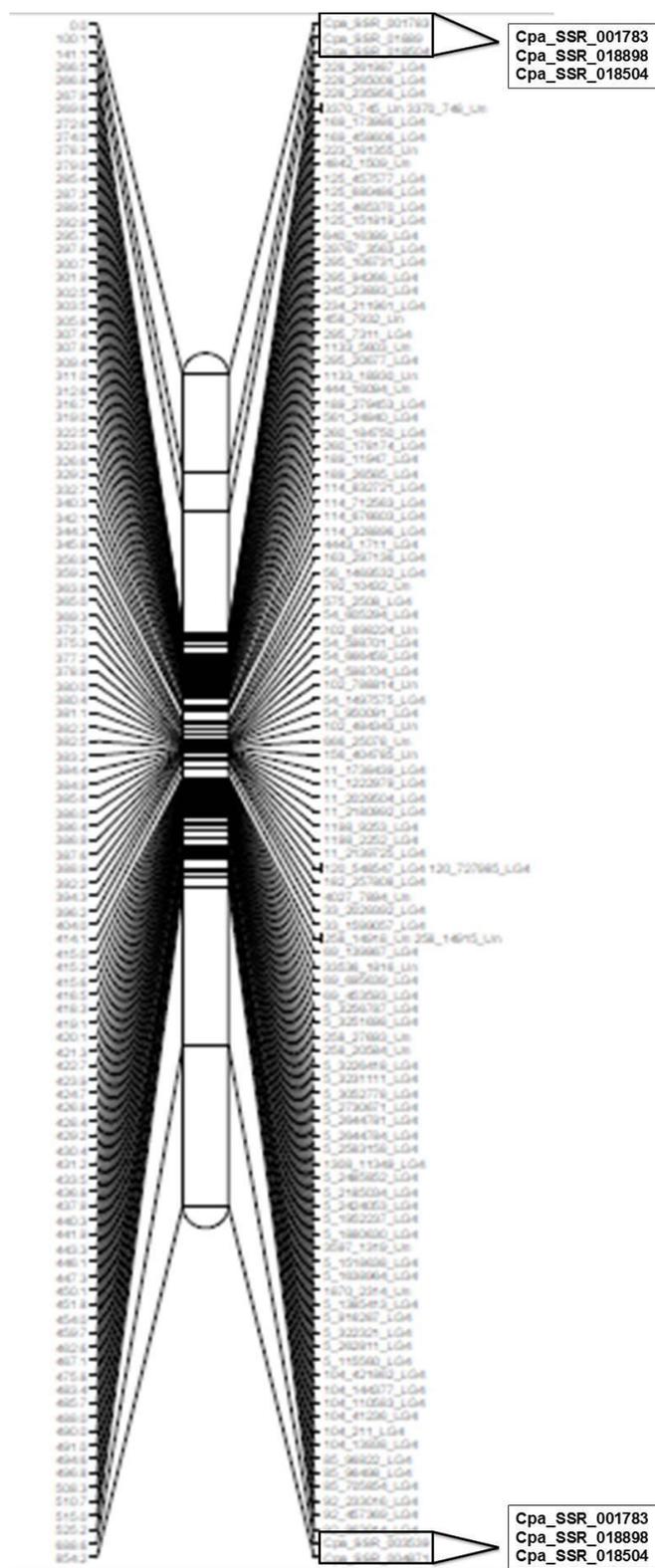


Figura 7. Grupo de Ligação GL2 de *C. papaya* L. com a inserção das marcas SSR-ESTs utilizando o programa *JoinMap* versão 4.0 (Van Ooijen, 2006). Os marcadores são indicados do lado direito de cada grupo e a distância genética em cM, do lado esquerdo. Grupo de ligação GL2 com a inserção das marcas Cpa_SSR_001783; Cpa_SSR_018898; Cpa_SSR_018504; Cpa_SSR_003539; e Cpa_SSR_004871 nas posições 0; 100,06; 141,09; 688,57; e 854,22 cM, respectivamente.

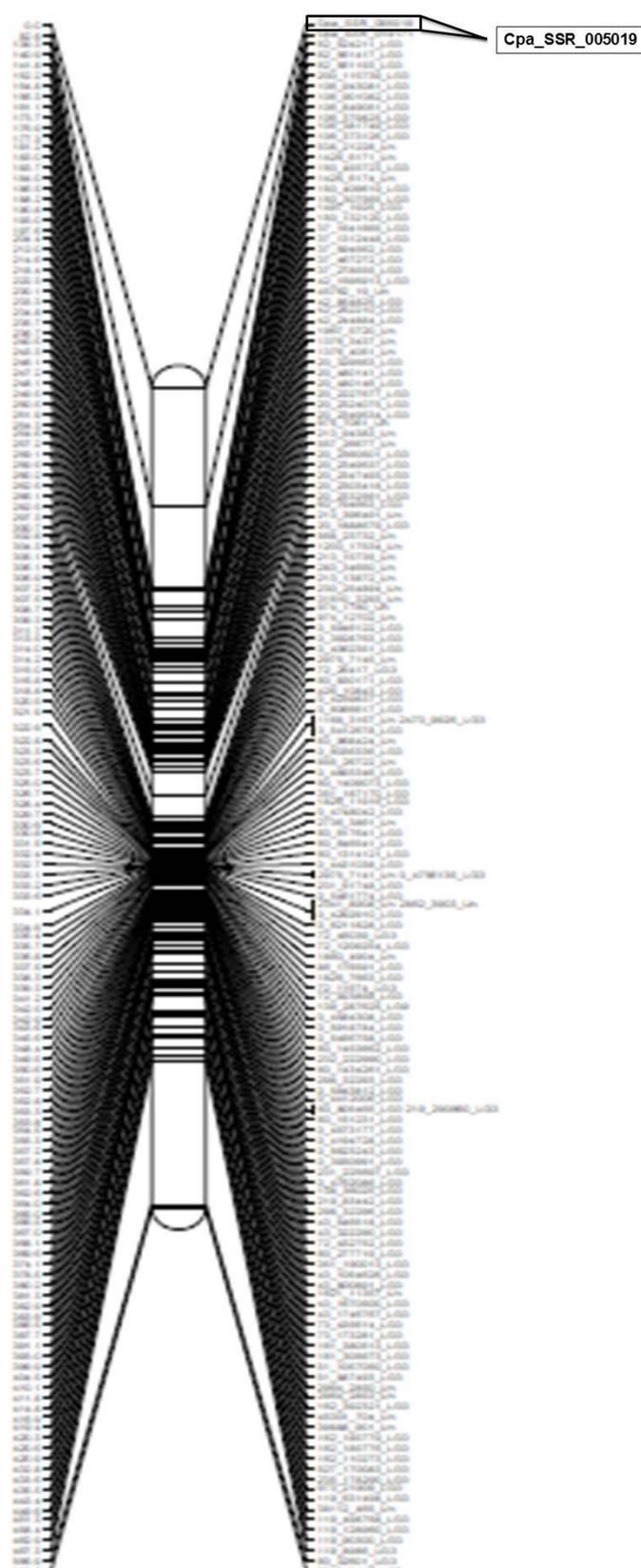


Figura 8. Grupo de Ligação GL3 de *C. papaya* L. com a inserção das marcas SSR-ESTs utilizando o programa *JoinMap* versão 4.0 (Van Ooijen, 2006). Os marcadores são indicados do lado direito de cada grupo e a distância genética em cM, do lado esquerdo. Grupo de ligação GL3 com a inserção da marca Cpa_SSR_005019 na posição 0.0.

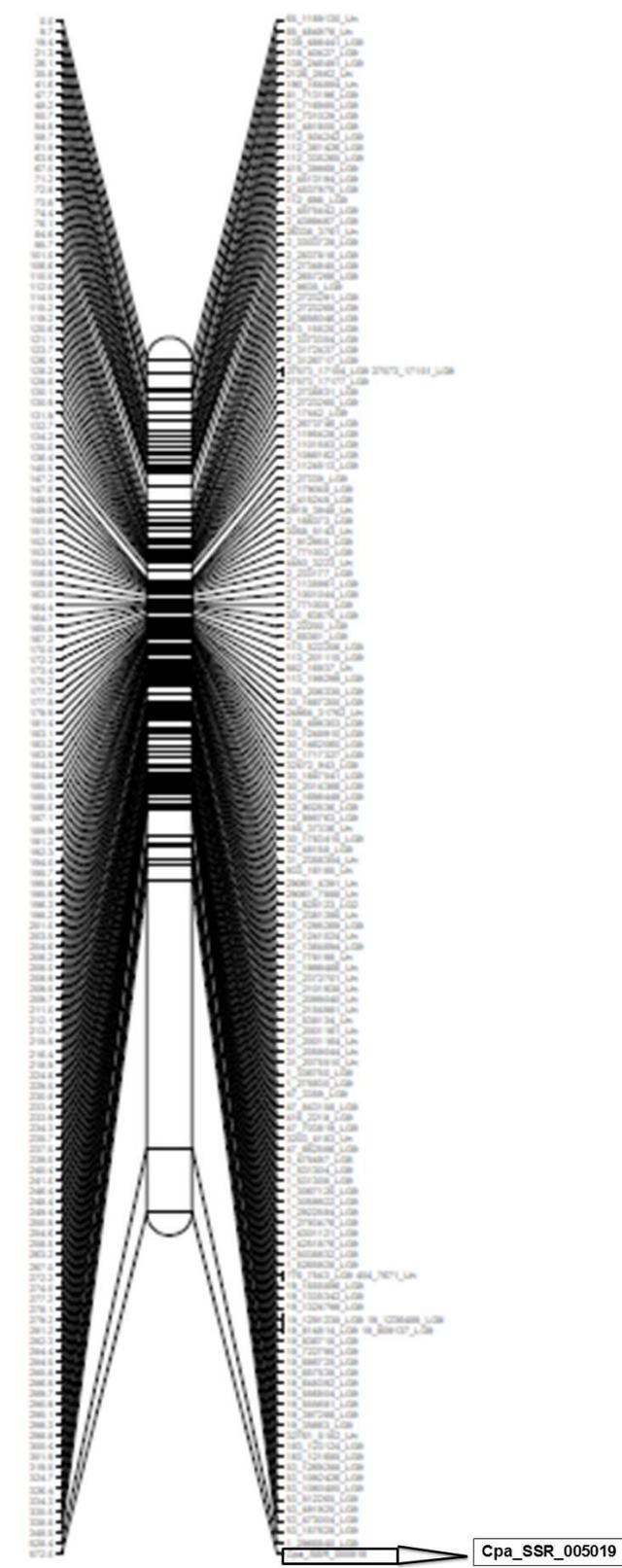


Figura 9. Grupo de Ligação GL6 de *C. papaya* L. com a inserção das marcas SSR-ESTs utilizando o programa *JoinMap* versão 4.0 (Van Ooijen, 2006). Os marcadores são indicados do lado direito de cada grupo e a distância genética em cM, do lado esquerdo. Grupo de ligação GL6 com a inserção da marca Cpa_SSR_000818 na posição 572.0.

Os resultados encontrados no presente trabalho, em relação à posição dos marcadores, ou seja, sua localização nos grupos de ligação, foram compatíveis aos dados apresentados por Vidal et al. (2014), exceto para a marca Cpa_SSR_005019. No trabalho dos referidos autores, esta marca está mapeada no grupo de ligação GL5. Segundo Souza (2010) uma justificativa para essa diferenciação seria pelo fato de não terem sido utilizados os mesmos dados de segregação (mesma população) e critérios para o mapeamento. Outra observação importante, é que esta marca, no presente trabalho, foi mapeada na extremidade do grupo de ligação GL6 (posição 572.0) sugerindo que a ligação pode não ter sido forte ou específica, podendo esta marca pertencer a outro grupo de ligação.

A distância média dos marcadores foi de 7,56, 3,65 e 3,84 cM/marcador para os grupos de ligação GL2, GL3 e GL6, respectivamente. A maior diferença entre dois indicadores foi de 166 cM no GL2, 99,6 cM no GL3 e 180 cM no GL6. As extremidades dos grupos de ligação GL2, GL3 e GL6 foram estendidas neste estudo em comparação com o mapa de referência (Pereira et al., 2015). Apesar da inserção destas marcas terem aumentado os grupos de ligação, as mesmas representam com precisão as características de interesse, visto que os marcadores SSR-ESTs são baseados em ESTs presentes em porções sequenciadas de cDNA. Sendo assim, uma forte associação entre genótipo e fenótipo pode ser observada com esses marcadores, os quais vêm sendo bastante utilizados em programas de melhoramento de plantas (Sakiyama et al., 2014).

Estudos com a espécie *C. papaya* já resultaram na construção de alguns mapas genéticos (Chen et al., 2007; Ma et al., 2004; Liu et al., 2004; Sondur et al., 1996), porém, nenhum deles utilizando marcadores SSR-ESTs. Em relação à saturação, o mapa com maior número de marcadores co-segregantes foi desenvolvido e publicado por Chen et al. (2007), o qual agrupou mais de 700 marcadores do tipo microssatélites em 10 grupos de ligação.

A equipe de melhoramento do mamoeiro na UENF vem desenvolvendo um mapa genético com a mesma população utilizada no presente estudo (Pereira et al., 2015), baseado em 1235 marcadores SNPs, distribuídos em 10 grupos de ligação (sabendo-se que os grupos de ligação 9 e 10 pertencem ao mesmo

cromossomo), abrangendo 3442,3 cM, com a distância média entre marcadores de 2,78 cM.

Apesar de preliminares, os resultados obtidos até o momento referentes à identificação tanto de marcadores SNPs, quanto de marcadores SSR-ESTs, além da construção do mapa genético indicam que será possível obter um mapa com nível de saturação maior do que dos mapas desenvolvidos para o mamoeiro até a presente data. Isso cria uma expectativa de realizar uma precisa identificação dos QTLs, o que possibilitará no futuro implementar nos programas de melhoramento do mamoeiro a seleção assistida por marcadores, além de permitir o conhecimento mais aprofundado dos aspectos genéticos e genômicos das características estudadas (Pereira et al., 2015).

4.6. Mapeamento de QTLs

As médias das características da população F_2 e dos pais estão indicadas na Tabela 5. Para a característica de FP, o genitor Sekati apresentou a média de 75,13, enquanto o genitor JS-12 apresentou a média de 103,73. O valor médio para a população F_2 foi de 78,40, apresentando valor mínimo e máximo de 33,38 e 116,18, respectivamente. Para a característica de FF, os genitores Sekati e JS-12 apresentaram médias de 105,79 e 137,31, respectivamente. A média da população F_2 foi de 112,45, apresentando o valor mínimo de 61,28 e máximo de 157,81. Os dados mostram diferenças entre os pais para as duas características estudadas e alta variabilidade genética entre genótipos na população F_2 , o que era esperado porque os pais possuem características contrastantes, em destaque, as características de FF e FP (Figura 10).

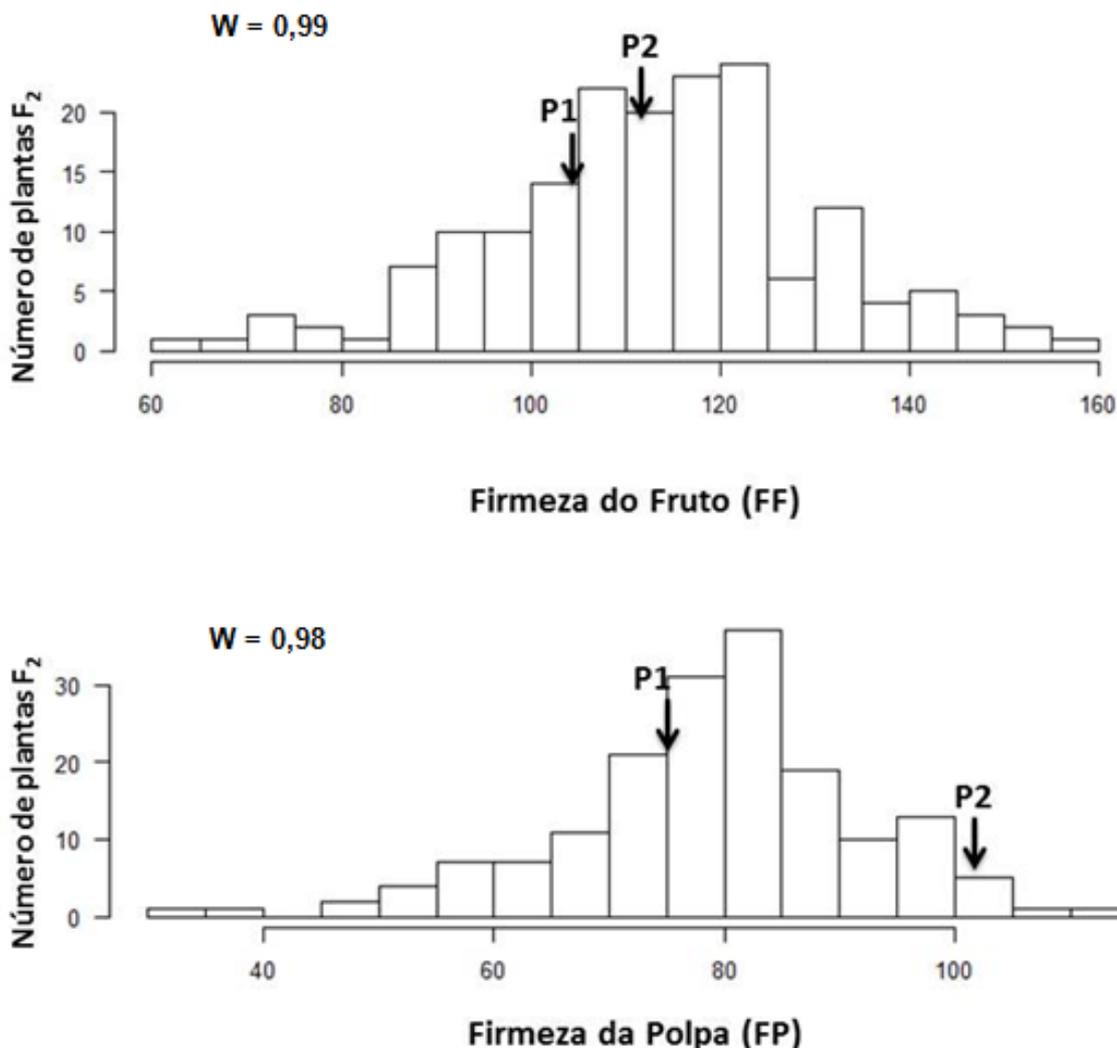


Figura 10. Histograma para as características de Firmeza do Fruto (FF) e Firmeza da Polpa (FP) de 186 plantas F₂ de uma população derivada do cruzamento Sekati x JS-12. As setas indicam os valores fenotípicos para os genótipos Sekati (P1) e JS-12 (P2); W = teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

Em mamoeiro, para que o fruto seja considerado com uma alta firmeza de polpa e de fruto, são atribuídos pesos. Os pesos atribuídos a estas características, de acordo com o trabalho realizado por Cortes (2017) - visando manter na população de melhoramento indivíduos fontes para o aumento destas características -, foi de 120-130 N para FF e de 100-110 N para FP.

A estatística W (Shapiro-Wilk) testou os dados fenotípicos da população F₂ para seu ajuste à distribuição normal (Shapiro; Wilk, 1965; Figura 8). Os dados das características de FF e FP se enquadram em uma distribuição normal para ambas (W = 0,99 e 0,98, respectivamente).

Razali e Wah (2011), utilizando dez mil amostras de vários tamanhos, geradas a partir de cada uma das distribuições simétricas e assimétricas, objetivaram comparar (simulação de Monte Carlo) a eficiência de quatro testes de normalidade: Shapiro-Wilk (SW), Kolmogorov-Smirnov (KS), Lilliefors (LF) e Anderson-Darling (AD). Os resultados mostraram que o teste de Shapiro-Wilk foi o teste de normalidade mais preciso, seguido pelo teste de Anderson-Darling, teste de Lilliefors e teste de Kolmogorov-Smirnov. O mesmo resultado foi obtido por Mendes e Pala (2003) ao comparar o poder dos testes de Shapiro-Wilk, Lilliefors e Kolmogorov-Smirnov.

O percentual de indivíduos com valores médios superiores ao do pai de maior desempenho foi de 6,98% para FF e 1,61% para FP. Este resultado evidencia a ocorrência de segregação transgressiva para os atributos avaliados, indicando que os alelos que condicionam as características de FF e FP nos genitores Sekati e JS-12 são diferentes entre si. Estes alelos podem ser úteis para elevar o conteúdo de FF e FP no desenvolvimento de cultivares (Figura 10).

Tabela 5. Médias das características FF e FP para a população F_2 e parentais (Sekati e JS-12).

Característica	Sekati	JS-12	F_2	Min-Max	SW ^a
Firmeza de Polpa – FP (N)	75,13	103,73	78,40	33,38 – 116,18	0,981
Firmeza de Fruto – FF (N)	105,79	137,31	112,45	61,28 – 157,81	0,995

^a Teste de normalidade de Shapiro-Wilk. FF = Firmeza de Fruto; FP = Firmeza de Polpa.

A localização e os efeitos das regiões que afetam as características de FF e FP, bem como a ação do gene e a origem (contribuição parental) dos alelos que aumentaram a média de cada característica estão resumidos na Tabela 6. Para estudos de ação gênica, a população F_2 é a mais informativa; tanto o efeito aditivo quanto o de dominância da variância genética e, conseqüentemente, o grau de dominância (ação gênica) podem ser diretamente estimados (Pereira, 1993). De forma geral, o mapeamento utilizando o modelo de múltiplos QTLs permitiu a identificação de quatro QTLs controlando estas características, sendo mapeados no grupo de ligação GL2. Para a maioria, os alelos que aumentaram a média das características na população F_2 vêm do genitor JS-12.

Na Tabela 6, estão descritos a localização e os efeitos dos QTLs identificados para as características de FF e FP. Foram reconhecidos três QTLs, sendo um QTL para FP (QTL 1 – Cpa_SSR_018504), um para FF (QTL 3 – Cpa_SSR_001783) e um QTL controlando ambas as características (QTL2/QTL4 – Cpa_004871). Valores positivos para o efeito aditivo dos QTLs para o grupo de ligação GL2 (QTL 2/QTL 4 – Cpa_SSR_004871 para FP e FF, e Cpa_SSR_001783 para FF) indicam que os alelos do parental JS-12 atuam na direção de aumentar a média das características em estudo na população, oposto para o QTL 1 - Cpa_SSR_018504, que apresenta valor negativo. Assim, para este QTL, os alelos do parental JS-12 atuam para diminuir os valores médios apresentados na população para a característica de FP, exibindo frutos com menor firmeza de polpa, mesmo o genitor JS-12 apresentando maior firmeza de polpa e fruto.

Em média, os efeitos genéticos aditivos foram maiores que os efeitos de dominância para todos os QTLs. Os sinais negativos dos efeitos aditivos indicam que os alelos da linhagem Sekati, embora possuindo a menor média para as características de FP e FF, contribuem para aumentar o valor médio da população para ambas as características. Como a avaliação é realizada por meio de valores, quanto maior o valor do caráter, melhor a firmeza tanto do fruto quanto da polpa. Todavia, os alelos favoráveis dos QTLs, mapeados da linhagem parental JS-12, que conferem a característica de maior FF e FP, poderão ser transferidos para outras linhagens em programas de melhoramento via retrocruzamento assistidos por marcadores moleculares, os quais poderão ser úteis para o melhoramento do mamoeiro (Moreira, 2004).

Tabela 6. Localização e efeitos dos QTLs para as características de Firmeza de Fruto e Firmeza de Polpa.

GL	QTLs	Identificação dos locos	%Var.	LOD ^a	Efeito		d/a	Ação gênica	Dir ^b	F
					A	D				
Firmeza de Polpa (FP)										
2	QTL 1 – 2@187.5	Cpa_SSR_018504	1,97	3,29	-0,53	0,30	-0,57	DP	SK	**
2	QTL 2 – 2@850.0	Cpa_SSR_004871	9,66	13,88	3,58	1,72	0,48	DP	JS	***
Int	2@850.0:5@285.7		7,96	11,79						***
Firmeza de Fruto (FF)										
2	QTL 3 – 2@0.0	Cpa_SSR_001783	7,42	12,39	1,96	4,61	2,35	S	JS	***
2	QTL 4 – 2@852.5	Cpa_SSR_004871	1,49	2,85	1,40	1,07	0,76	DP	JS	*
Int	2@0.0:8@160.0		5,24	9,16						***

^a LOD *threshold*= 6,0

^b Direção de resposta é o parental cujo valor aditivo de um alelo marcador aumenta o valor da característica (SK= Sekati; JS= JS-12), podendo ser aditivo (A), dominância (D), dominância parcial (DP) ou sobredominância (S).

***Significante ao nível de 0,1% de probabilidade.

Considerando as duas características avaliadas, foram identificados três QTLs de pequeno efeito (QTL 1 - Cpa_SSR_018504 para FP; e QTL 4 – Cpa_SSR_004871 para FF), e dois QTLs de efeito médio (Cpa_SSR_004871 para FP; e Cpa_SSR_001783 para FF) foram detectados nos grupos de ligação.

Para a característica de FF, foram reconhecidos dois QTLs no grupo de ligação GL2 (QTL 3 - Cpa_SSR_001783; e QTL 4 - Cpa_SSR_004871) (Figura 11). Para ambos os QTLs, os alelos do genótipo parental JS-12 aumentaram a média da característica na população F₂, na qual a variação fenotípica contabilizada pelos QTLs variou de 1,49 a 7,42%. A ação gênica desta característica envolve primeiramente a sobredominância e a dominância parcial.

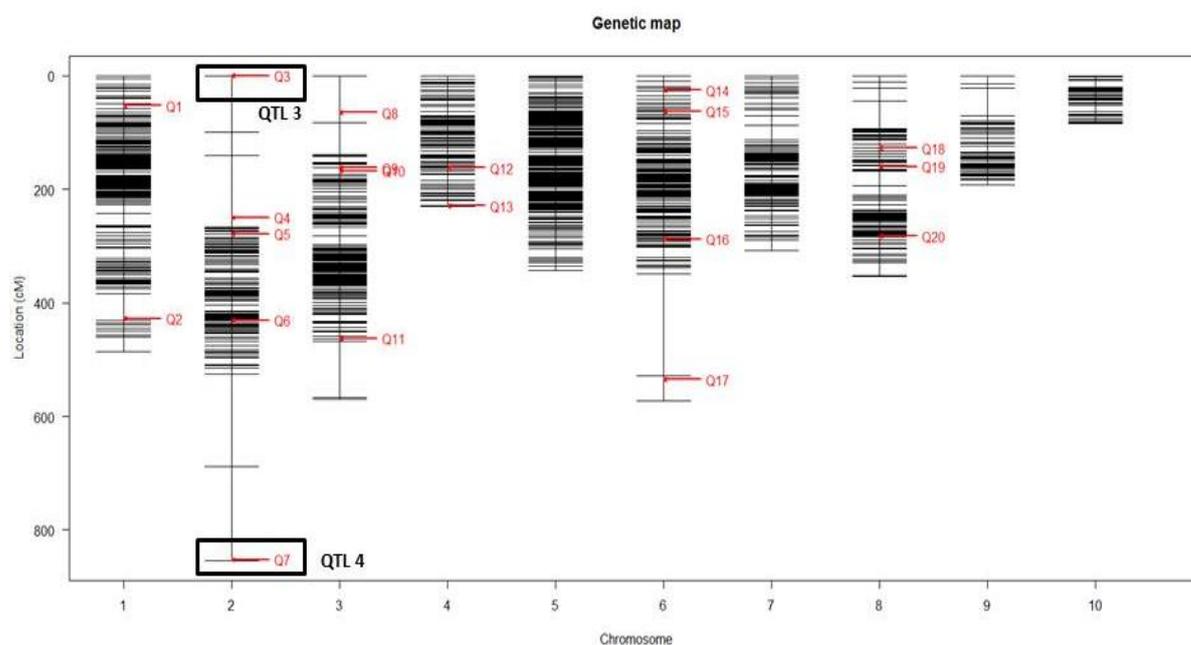


Figura 11. Identificação dos QTLs para a característica de Firmeza do Fruto (FF) (QTLs 3 e 4) no grupo de ligação GL2 (posições 0.0 e 852.5). As marcações na área indicam as posições mais prováveis dos QTLs.

De acordo com as funções do loco marcador para FF, Cpa_SSR_001783, potencialmente relacionado com a síntese de etileno, identificado no grupo de ligação GL2, o mesmo possui seu gene com a função relacionada ao fator de transcrição WRKY-like (WRKY). As proteínas WRKY (que compreendem uma grande família de fatores de transcrição), primeiramente caracterizadas em batata doce (Ishiguro; Nakamura, 1994), estão relacionadas a estresses ambientais causados pela baixa temperatura, que interrompe a homeostase celular e prejudica severamente o crescimento e o desenvolvimento das plantas,

experimentado pela maioria das frutas e dos legumes durante o armazenamento e o transporte pós-colheita. Estas proteínas contêm um ou dois domínios de ligação ao DNA altamente conservados, conferindo à planta uma maior tolerância ao frio (Ye et al., 2016).

O armazenamento a frio é a prática mais comum aplicada para manter a qualidade pós-colheita e prolongar a vida de prateleira de muitas frutas. No entanto, muitas frutas tropicais e subtropicais são altamente sensíveis à refrigeração, o que reduz significativamente a qualidade comercial e a aceitação pelo consumidor (Zhao et al., 2013). Estudos demonstram a aplicação de ésteres metílicos de jasmonato, como o metil-jasmonato (MeJA), relacionados ao fator de transcrição WRKY, que aumenta a tolerância ao frio em muitas culturas (Cao et al., 2009; Zhang et al., 2012; Jin et al., 2013; Sibozza; Bertling; Odindo, 2014). O alívio da lesão causada pelo resfriamento em frutos tem sido implicado no aumento da atividade enzimática e do estado energético, aumento da arginina, acúmulo de lignina, solubilização de polissacarídeos na parede celular, maior proporção de ácidos graxos insaturados/saturados e aumento da produção de fenólicos totais (Cao et al., 2009; Zhang et al., 2012; Jin et al., 2013; Sibozza; Bertling; Odindo, 2014), causando um retardo no amolecimento do fruto.

Estudo realizado por Huang et al., (2014) comprova o envolvimento de genes relacionados a hormônios vegetais, tais como etileno, com o fator de transcrição WRKY, envolvidos na firmeza de frutos climatéricos de pera chinesa (*Pyrus ussuriensis*). Foram analisados os transcriptomas de frutos de *P. ussuriensis* nos estágios pré e pós-climatérico. Diversos hormônios vegetais, incluindo o etileno, e alguns fatores de transcrição, incluindo o WRKY, foram expressos diferencialmente entre frutas pré e pós-climatéricas. Outros fatores, como as enzimas relacionadas à metilação do DNA e genes da proteína do citoesqueleto, mostraram expressão diferencial durante a maturação do fruto de pera chinesa.

Para a característica de FP, foram detectados dois QTLs no grupo de ligação GL2 (Tabela 6; Figura 12). O alelo do genitor Sekati contribuiu para o aumento da média da característica na população F₂ para o QTL Cpa_SSR_018504, e o alelo do genitor JS-12 colaborou para o aumento da média para o QTL Cpa_SSR_004871. Os QTLs nos grupos de ligação GL2, Cpa_SSR_018504 e Cpa_SSR_004871 representaram 1,97 e 9,66% da variação

fenotípica, respectivamente. A ação gênica de dominância parcial foi exibida em ambos os QTLs, mas em direções opostas.

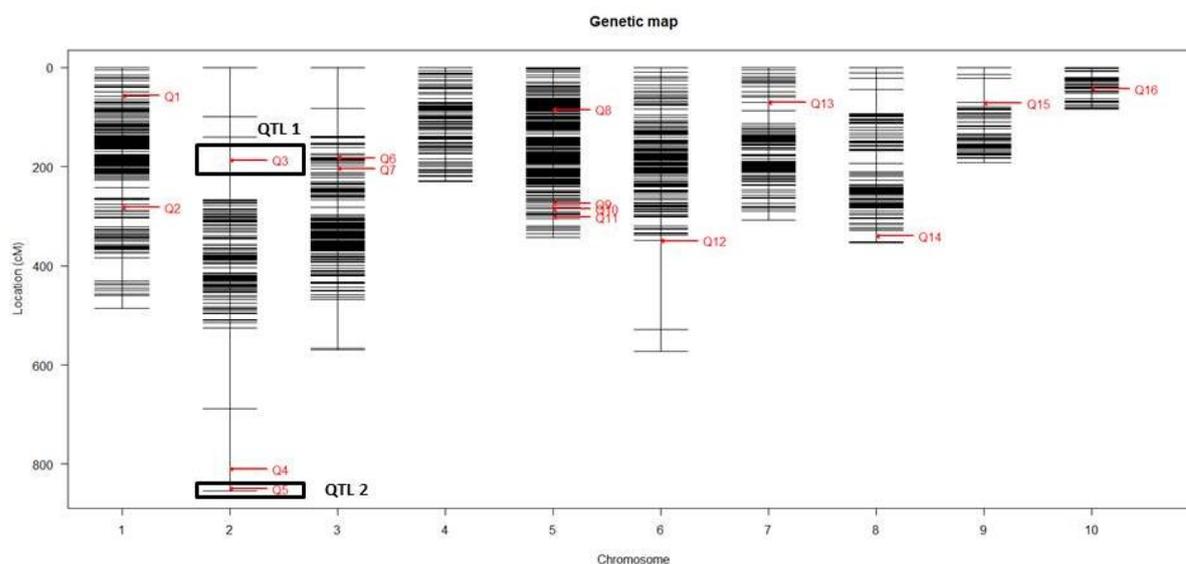


Figura 12. Identificação dos QTLs para a característica de Firmeza de Polpa (FP) (QTLs 1 e 2) no grupo de ligação GL2 (posições 187.5 e 850.0). As marcações na área indicam as posições mais prováveis dos QTLs.

De acordo com a função do loco marcador *Cpa_SSR_018504*, que mapeou o QTL relacionado à FP, presente no grupo de ligação GL2, o mesmo possui sua localização em regiões de éxons e a principal função relacionada a componentes de parede celular. Na descrição do loco marcador, o mesmo está envolvido com a expressão do gene *Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase* (XTH), que tem desempenhado um papel na remodelação de hemiceluloses de parede celular, que pode reforçar sua rigidez, formando uma rede esquelética com fibrilas de celulose (Schröde et al., 1998).

Porém, estudos comprovam que os XTHs também podem estar associados à desmontagem da matriz de celulose, contribuindo para o amaciamento pós-colheita dos frutos, conforme relatado em alguns estudos com frutos de kiwis, maçã, morango e tomate (Atkinson et al., 2009; Nardi et al., 2014; Li C-r et al., 2009; Catala et al., 2000). Além disso, demonstrou-se que a atividade de XTH promove a expansão celular em células de crescimento rápido (Atkinson et al., 2009; Nishitani; Tominaga, 1992; Thompson; Smith; Fry, 1997). Nos frutos de tomateiro e de maçã, a atividade da enzima não ocorre apenas paralelamente ao amolecimento do fruto e na pós-colheita, também ocorre em vários estágios de

desenvolvimento do fruto, o que indica sua importância na expansão do fruto (Da Silva et al., 1994; Maclachlan; Brady, 1994; Percy et al., 1996). Assim, as enzimas codificadas por XTHs podem ser críticas tanto no cultivo de frutos, como na maturação.

Han et al. (2016), com o objetivo de investigar o papel das XTHs em frutos de caqui durante o seu desenvolvimento e amolecimento, encontraram resultados, os quais comprovaram que a expressão do gene poderia estar envolvida no rápido crescimento do fruto e na manutenção da firmeza durante o armazenamento, sendo responsável pela indução do amolecimento pós-colheita. Estas enzimas apresentaram diferentes características enzimáticas com padrões distintos de expressão, conferindo suas respectivas funções na modificação da parede celular.

Um mesmo loco marcador Cpa_SSR_004871 mapeou um QTL que estava presente no controle das duas características em estudo (QTL 2/QTL 4 – Cpa_SSR_004871), sendo, particularmente, para ambas as características, inseridos no grupo de ligação GL2.

Segundo o trabalho desenvolvido por Vidal et al. (2014), o loco marcador encontrado, responsável pelo controle das duas características, possui sua localização em regiões de íntrons, e a principal função, relacionada com a síntese de etileno. Na descrição do loco marcador o mesmo está envolvido com a expressão do gene Homeobox-leucine zipper protein (HD-Zip). Genes Homeobox foram originalmente descobertos em *Drosophila*, com a função de regulação no controle da morfogênese embrionária, e têm sido relatados em estudos por desempenhar um papel no controle de hormônios em plantas (Sakamoto et al., 2001; Susa et al., 2007). Estão também envolvidos no controle do ácido giberélico (GA), citoquinina (Hay et al., 2002; Jasinski et al., 2002; Ori et al., 1999; Sakamoto et al., 2001), ácido abscísico (ABA) (Ditzer; Bartels, 2006; Lee et al., 2001), Lesina (Baima et al., 1995; Plesch et al., 1997), bem como por efeitos abióticos (Carabelli et al., 1996; Steindler et al., 1999; Wang et al., 2003).

Estudo desenvolvido por Lin et al. (2008) fornece evidências de que um gene HD-Zip em tomate (LeHB-1) desempenha papel importante na organogênese floral e no amadurecimento do fruto. Os autores demonstraram que o silenciamento do gene LeHB-1 previne a maturação do tomate, e a sua inibição também provoca amadurecimento tardio e senescência foliar, tornando-se menos

sensível ao etileno. A identificação do gene LeHB-1 gera uma nova percepção do controle hormonal de órgãos florais e no desenvolvimento precoce dos frutos.

Os QTLs identificados representam importantes estimativas de localização de QTLs com maiores efeitos responsáveis pelas características de interesse para a espécie *C. papaya*. De acordo com Asins et al., (2004), muitos QTLs de pequeno efeito são responsáveis por menos de 10% da variação fenotípica, e muitos destes tipos já foram detectados em trabalhos cuja herança das características em estudo era poligênica ou quantitativa. Possivelmente, uma maior saturação do mapa de ligação irá possibilitar que os QTLs obtidos neste trabalho tenham sua magnitude aumentada e realocação no mapa de ligação para explicação de um determinado caráter; ou, ainda, à medida que mais QTLs forem identificados, índices de eficiência maiores poderão viabilizar a seleção assistida por marcadores (Moulin et al., 2015).

Para os caracteres avaliados neste trabalho não há informações na literatura quanto à identificação dos QTLs associados, nem mesmo para *C. papaya*, que é a espécie mais estudada. Neste contexto, não foram encontrados artigos publicados para que pudesse ser efetuada comparação com os dados obtidos neste trabalho. Para características envolvendo a identificação de QTLs associados à firmeza dos frutos em mamoeiro, não foi possível realizar comparações com outros trabalhos.

De acordo com Schuster e Cruz (2004), a determinação do número e dos efeitos dos QTLs pode proporcionar aos melhoristas conhecimento sobre o controle genético dessas características e permitir o desenvolvimento de estratégias de seleção mais eficientes.

4.7. Análise da diversidade genética funcional entre indivíduos da população F₂

A análise da divergência genética funcional foi realizada para todos os 186 indivíduos pertencentes à geração F₂ e para os dois genótipos parentais (Sekati e JS-12), com base nas informações obtidas pelos sete marcadores moleculares polimórficos SSR-ESTs (Cpa_SSR_003539, Cpa_SSR_001783, Cpa_SSR_005019, Cpa_SSR_018504, Cpa_SSR_018898, Cpa_SSR_004871 e Cpa_SSR_000818), conforme análise da população no tópico 4.4. (Tabela 7).

Na Tabela 7, são apresentados os valores de heterozigosidade (H) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC). Quanto ao PIC, observou-se que os valores variam entre 0,294 e 0,3749, sendo inferiores aos valores de H. Ott (1992) relata que os valores de PIC estimados devem ser sempre inferiores aos estimados para heterozigosidade (H) e que o valor máximo de PIC esperado para locos com dois alelos é de 0,375, corroborando com os resultados apresentados. Segundo Botstein et al. (1980), o PIC dos marcadores deve estar entre 0,25 e 0,50, para que seja considerado moderadamente polimórfico e superior a 0,50 para altamente polimórfico.

Analisando o PIC, foi possível quantificar o polimorfismo genético de cada loco na população. Neste estudo, de sete locos de microssatélites analisados, 100% podem ser considerados moderadamente informativos. O PIC máximo foi de 0,3749 para o loco Cpa_SSR_005019, enquanto o valor mais baixo (0,294) foi observado para o loco Cpa_SSR_000818, e o PIC médio foi de 0,3521 (Tabela 7). Este valor médio de PIC indica níveis moderados de polimorfismo dos locos analisados, embora alguns estudos tenham relatado níveis de polimorfismo baixos a médios para SSR-ESTs (Zhang et al., 2014).

Segundo Ott (1992), um loco será considerado polimórfico quando sua heterozigosidade observada for maior do que 10% (situação em que o alelo mais frequente tem frequência menor do que 95%) e altamente polimórfico quando sua heterozigosidade observada for maior do que 70%.

Portanto, verificou-se que, para todos os locos de microssatélites selecionados, a heterozigosidade encontrada foi média (Oliveira et al., 2010b; Ocampo Pérez et al., 2006). Este valor médio indica a ocorrência de heterozigotos na proporção esperada, visto que a análise foi realizada em uma população F_2 (50% de homozigotos e 50% de heterozigotos). Sendo assim, observa-se que tanto para as estimativas de PIC obtidos quanto para as de heterozigose observada, os valores estão de acordo com o esperado para uma população F_2 , corroborando a condição de Equilíbrio de Hardy Weinberg e de desequilíbrio de ligação dos locos analisados. Estas são condições imprescindíveis para a construção de mapas de ligação e de identificação de QTLs.

Tabela 7. Análise descritiva da diversidade dos marcadores SSR-ESTs analisados na presente pesquisa.

Loco	Marcador	A1	A2	H	PIC
1	Cpa_SSR_003539	0,5804	0,4196	0,4871	0,3685
2	Cpa_SSR_001783	0,3389	0,6611	0,4481	0,3477
3	Cpa_SSR_005019	0,4918	0,5082	0,4999	0,3749
4	Cpa_SSR_018504	0,5607	0,4393	0,4926	0,3713
5	Cpa_SSR_018898	0,4659	0,5341	0,4977	0,3738
6	Cpa_SSR_004871	0,3059	0,6941	0,4246	0,3345
7	Cpa_SSR_000818	0,7663	0,2337	0,3582	0,2940
Média		0,5014	0,4985	0,4583	0,3521

A1 – frequência do alelo 1; A2 – frequência do alelo 2; H – Heterosigiosidade; PIC – Índice de Conteúdo Polimórfico.

O ajustamento das matrizes de dissimilaridade e de agrupamento foi avaliado por meio do Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC), o qual apresentou valor de 0,88, o que indica que houve uma boa concordância entre a matriz de dissimilaridade e a matriz resultante da simplificação devido ao método de agrupamento UPGMA. Quando os valores da correlação cofenética se aproximam da unidade, estas são tomadas como ideais, pois representam maior acurácia na formação do dendrograma. Os valores de coeficiente de correlação cofenética obtidos neste trabalho foram maiores do que os observados em outros trabalhos para a mesma cultura (Silva et al., 2007; Ramos et al., 2011).

A diversidade pôde ser constatada pela formação de grupos contendo acessos similares nas análises de agrupamento pelo método hierárquico UPGMA (Figura 13). Definindo como ponto de corte a região onde ocorreu a maior coerência na formação dos grupos, foram formados dois grandes grupos que reuniram a maior parte dos genótipos, além de outros nove grupos contendo de um a três genótipos, demonstrando a variabilidade genética presente entre os genótipos analisados (Tabela 8).

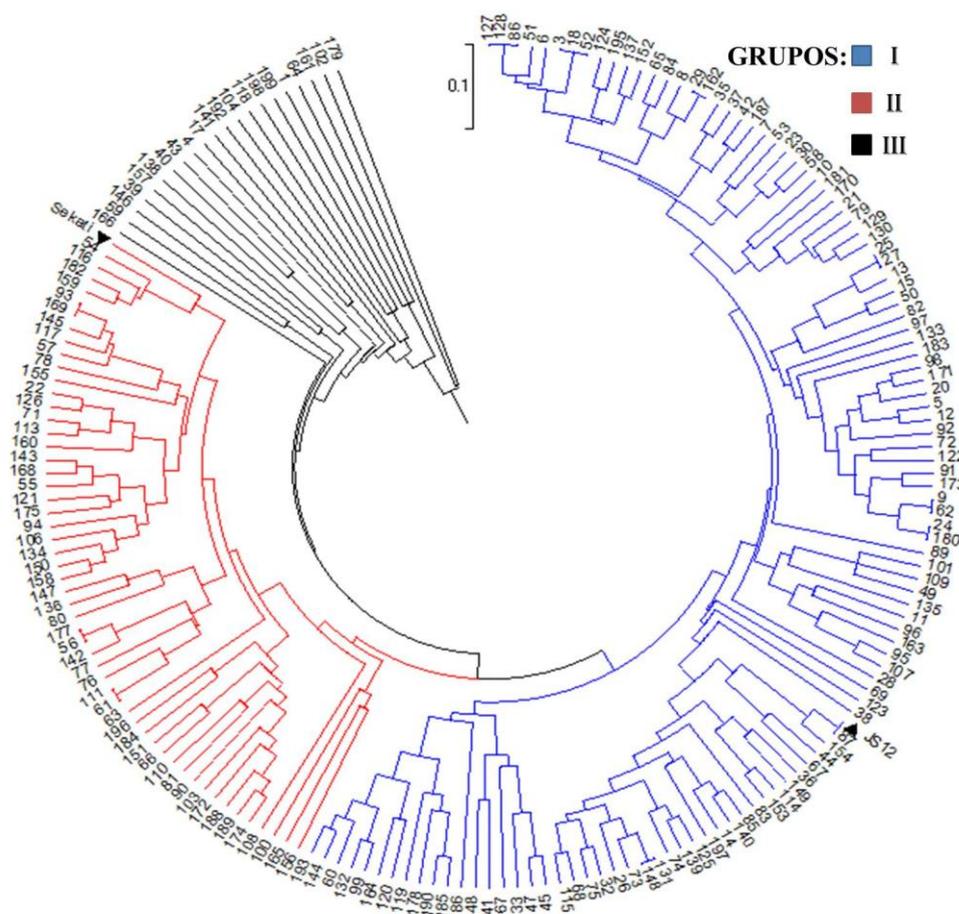


Figura 13. Dendrograma obtido pelo método UPGMA baseado na análise de 186 indivíduos da população F_2 de mamoeiro (*C. papaya* L.), considerando sete locos SSR-ESTs.

Tabela 8. Agrupamento e médias fenotípicas de 186 indivíduos da população F_2 de *C. papaya* L. baseado na dissimilaridade genética obtida pelo complemento aritmético do índice de Jaccard e no agrupamento, pelo método UPGMA.

Grupo s	Indivíduos	Médias Fenotípicas	
		FF	FP
I	3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 41, 42, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 58, 60, 62, 65, 67, 68, 69, 72, 73, 74, 75, 79, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 91, 92, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 107, 109, 114, 115, 119, 120, 122, 123, 124, 125, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 135, 137, 139, 140, 144, 148, 149, 152, 153, 154, 162, 163, 164, 167, 170, 171, 173, 178, 180, 181, 183, 185, 186, 187, 190, 193, 195, 197.	106,53	73,75
II	22, 54, 55, 56, 57, 61, 63, 66, 71, 76, 77, 78, 80, 81, 90, 93, 94, 100, 103, 106, 108, 110, 111, 113, 116, 117, 121, 126, 134, 136, 142, 143, 145, 147, 150, 151, 155, 156, 158, 159, 160, 165, 168, 169, 172, 174, 175, 177, 182, 184, 188, 189, 196.	94,45	67,40
III – XI	1, 4, 17, 39, 40, 43, 59, 64, 102, 104, 118, 138, 141, 146, 157, 161, 166, 179, 192, 198, 199.	100,97	70,48

O grupo I, representado no dendograma pela cor azul (Figura 13), reuniu o maior conjunto de genótipos, totalizando 112 indivíduos, ou seja, 60,21% dos genótipos F₂ estudados, além do genótipo parental JS-12. Analisando os valores fenotípicos para a característica de FF entre os genótipos do grupo I, pode-se observar que este grupo foi formado por plantas que apresentaram a média fenotípica igual a 106,53 (Tabela 8), sendo o valor mínimo de 61,28 e o máximo de 154,60. Para a característica de FP, o valor médio apresentado pelos indivíduos deste grupo foi de 73,75 (Tabela 8), sendo o valor mínimo e o máximo de 37,19 e 114,01, respectivamente. O genitor presente neste grupo, JS-12, apontou média fenotípica de 137,31 e 103,73 para FF e FP, respectivamente. Para a FF, 77,67% dos genótipos exibiram valores fenotípicos classificados como médio-alto; observou-se, também, que, para a característica de FP, a maioria dos genótipos (83,92%) retrataram valores fenotípicos de médio-alto. O valor fenotípico médio indicado pelos indivíduos deste grupo em relação à característica de FF foi ligeiramente maior do que o valor fenotípico apresentado pelo genitor JS-12 (103,73).

O grupo II, representado no dendograma pela cor vermelha, foi o segundo grupo com maior número de genótipos (53), ou seja, o grupo está representado por 28,49% dos genótipos F₂, além do genótipo parental Sekati. Analisando os valores fenotípicos para a característica de FF entre os indivíduos do grupo II, pode-se observar que este grupo foi formado por plantas que apresentaram a média fenotípica igual a 94,45 (Tabela 8), sendo o valor mínimo de 72,86 e o máximo de 133,65. Para a característica de FP, o valor médio demonstrado pelos indivíduos deste grupo foi de 67,40 (Tabela 8), sendo o valor mínimo e o máximo de 33,38 e 102,19, respectivamente. O genitor presente neste grupo, Sekati, apresentou média fenotípica de 105,79 para FF e de 75,13 para FP. Neste, tanto para a FF quanto para a FP, os mesmos indivíduos (88,67%) registraram valores fenotípicos classificados como médio-alto. Apesar dos genótipos deste grupo terem mostrado bons valores fenotípicos para as características em estudo, quando comparados aos genótipos do grupo I, notou-se que os mesmos apresentam baixos valores fenotípicos para as características de FF e FP.

O grupo III ao XI (representados no dendograma pela cor preta) foram os grupos pequenos com os genótipos geneticamente mais divergentes, apresentando somente de um a três genótipos, constituídos por 100% dos

indivíduos indicando valores fenotípicos medianos para ambas as características em estudo, quando comparados com os grupos I e II.

O agrupamento dos indivíduos da população F_2 também foi investigado a partir da dispersão gráfica baseada na análise da coordenada principal (PcoA), conforme apresentada na Figura 14. Observa-se que os indivíduos não formaram grupos exatamente como no agrupamento obtido pelo método UPGMA. Pode-se verificar a formação de dois *clusters* distintos (marcados pelos balões pretos), os indivíduos que se agruparam nos grupos I e do III ao XI no método UPGMA, na análise de PcoA, foram alocados no mesmo *cluster* (correspondente ao primeiro balão), juntamente com o genótipo JS-12, sugerindo que o método não tenha conseguido detectar diferenças entre os indivíduos dos grupos, pelo fato de estar explicando baixa porcentagem da variabilidade total (25,74%), como consequência do pequeno número de locos analisados. Já o segundo *cluster* agrupou todos os genótipos do grupo II do dendrograma obtido pelo método UPGMA.

Pelos resultados obtidos, foi possível observar que os marcadores foram satisfatórios em diferenciar os genótipos, porém, não é possível observar a formação de classes bem definidas, ou seja, com a formação de grupos com indivíduos e possuíssem somente valores altos, médios ou baixos para FF e FP, pois os marcadores utilizados possuem pequeno efeito na expressão dessas características, além de se tratar de atributos quantitativos analisados em uma população segregante, do qual se espera a observação de várias classes fenotípicas para ambas as características avaliadas.

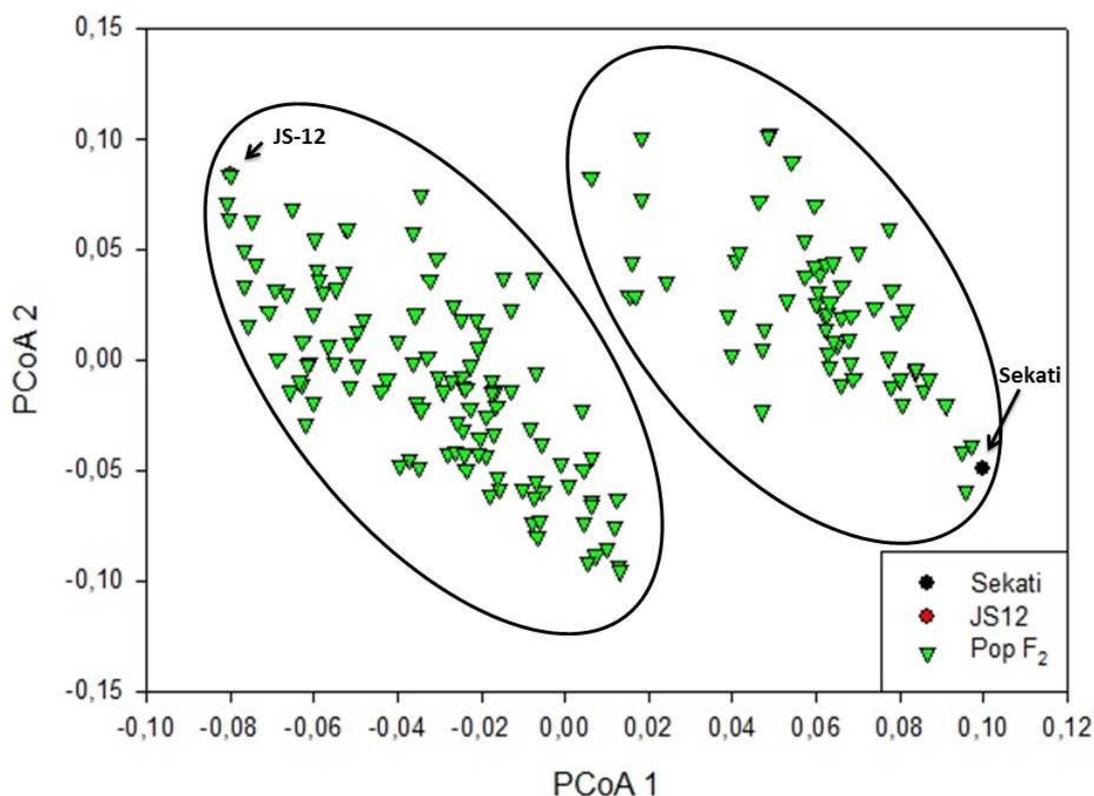


Figura 14. Análise das Coordenadas Principais considerando os 186 indivíduos da população F_2 de mamoeiro mais os dois parentais Sekati e JS-12 (identificados pelas setas) utilizando dados de sete locos SSR-ESTs.

Majaju et al. (2013) utilizaram marcadores moleculares SSR-ESTs para um estudo de diversidade com o objetivo de avaliar coleções de bancos de genótipos de melancia do Zimbabwe para fornecer informações a respeito do nível potencial de diversidade genética funcional em variedades locais pertencentes a esta cultura. Para tal, foram utilizadas quinze repetições de sequência simples e expressa (SSR-ESTs), para investigar a diversidade genética em 139 plantas obtidas de sementes de 35 acessos de melancia recolhidas em todas as províncias geográficas do Zimbabwe. Além disso, 15 plantas, representando três variedades comerciais desenvolvidas nos Estados Unidos (EUA), foram analisadas para comparação. Foi detectado um total de 65 alelos entre todos os acessos de melancia. Para os 13 locos polimórficos de SSR-ESTs, o número de alelos por loco variou de 2 a 13, com uma média de 5 alelos por loco. Os valores para o conteúdo de informação polimórfico aumentaram à medida que o número de alelos aumentou e variaram de 0,15 a 0,77, com uma média de 0,54, sugerindo um poder discriminatório suficiente. A estimação da variação genética no material zimbabuano usando a análise de variação

molecular (AMOVA) revelou 64% de variação entre melancia doce e *cow-melon*. Os marcadores de SSR-ESTs revelaram uma grande diversidade entre acessos de melancia doce, resultados estes contrários aos encontrados em estudos anteriores usando marcadores SSR. Os autores afirmam que os marcadores SSR-ESTs foram úteis para elucidar a diversidade genética de acessos de melancia no Zimbábue. Melancias doces e *cow-melons* (melões de vaca) foram fortemente diferenciados. A triagem de materiais de bancos de genes com estes marcadores tem o benefício adicional de identificar associações com caracteres fenotípicos.

Para Leal et al. (2010), a utilização de marcadores SSR-ESTs contribui para uma maior cobertura do genoma e também para uma maior consistência nos resultados relativos à similaridade ou à divergência genética intra e inter-populacionais. Segundo Fu (2003), o uso de marcadores moleculares funcionais permite o acesso direto à diversidade da população em genes de interesse agrônômico, facilitando a associação entre o genótipo e o fenótipo.

5. CONCLUSÕES

A construção de mapas genéticos e, conseqüentemente, a identificação de regiões genômicas, que controlam características de interesse agrônomo mediante os marcadores SSR-ESTs, representam um grande avanço nos programas de melhoramento genético do mamoeiro por possibilitarem que seja realizada, com sucesso, a seleção assistida por marcadores.

Neste estudo, foi realizada uma análise genética a respeito da localização de QTLs e sua importância para cada um dos caracteres (FF e FP). Portanto, apesar desses QTLs serem de pequena magnitude, são úteis em um programa de seleção assistida, uma vez que podem ser utilizados como ponto de referência na espécie para detecção de QTLs de maior efeito.

Por meio do estudo de divergência, foi possível verificar que houve variabilidade genética entre os genótipos avaliados, porém, os marcadores não foram efetivos em agrupar os indivíduos de acordo com os seus valores fenotípicos, ou seja, grupos separados com indivíduos que possuísem somente alta, média ou baixa FF e FP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, F. L. (2003). A cultura do mamão *Carica papaya* L. no mundo, no Brasil e no estado do Espírito Santo. In: Martins, D. S.; Costa, A. F. S. (ed.) A cultura do mamoeiro: tecnologias da produção. Vitória, ES: INCAPER, 497p.
- Alzate-Marin, A. L.; Cervigni, G. D. L.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. (2005). Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. *Fitopatologia Brasileira*, v.30, p.333-342.
- Arnheim, N.; Strange, C.; Elrich, H. (1985). Use of pooled DNA samples to detect linkage disequilibrium of polimorfic restriction fragments and human disease: studies of HLA class II loci. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.82, p.6970-6974.
- Asins, M. J.; Bernet, G. P.; Ruiz, C.; Cambra, M.; Guerri, J.; Carbonell, E. A. (2004). QTL analysis of citrus tristeza vírus-citradia interaction. *Theoretical and Applied Genetics*, v.108, p.603-611.
- Atkinson, R. G.; Johnston, S. L.; Yauk, Y.-K.; Sharma, N. N.; Schroder, R. (2009). Analysis of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) gene families in kiwi fruit and apple. *Postharvest Biol. Technol.* 51, 149–157. doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.06.014
- Badillo, V. M. (1993). Caricaceae. *Revista de la Facultad de Agronomía-Alcance*, 43:1-111.

- Badillo, V. M. (2000). *Carica* L. vs. *Vasconcella* St. Hil. (Caricaceae): con la rehabilitación de este último. *Ernstia*, v. 10, p. 74-79.
- Baima, S.; Nobili, F.; Sessa, G.; Lucchetti, S.; Ruberti, I.; Morelli, G. (1995). The expression of the Athb-8 homeobox gene is restricted to provascular cells in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 121(12):4171–4182.
- Benchimol, L. L.; Lanza, L. L. B.; Souza, J. R.; Souza, A. P. (2005). Microsatellite-assisted backcross selection in maize. *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, n. 4, p. 789-797.
- Bered, F.; Barbosa Neto, J. F.; Carvalho, F. I. F. de. (1997). Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.27, n.3, p. 513-520.
- Bernardo, R. (2002). *Breeding for quantitative traits in plants*. Minnesota: Stema Press, p.369.
- Bernardo, R. (2008). Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. *Crop Science*. 48:1649-1664.
- Blas, A.; Yu, Q.; Veatch, O.; Paull, R.; Moore, P.; Ming, R. (2012). Genetic mapping of quantitative trait loci controlling fruit size and shape in papaya. *Mol Breed*, 29:457–466.
- Blazek, J.; Opatová, H.; Goliás, J.; Homutová, I. (2007). Ideotype of apples with resistance to storage diseases. *Hort Sci (Prague)* 34:107–113.
- Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, M.; Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, v.32, n.3, p.314.
- Caixeta, E. T.; Borém, A. (2009). *Marcadores Moleculares*. 2.ed. Viçosa: Editora da UFV.
- Caixeta, R. P.; Carvalho, D. de; Rosado, S. C. S.; Trugilho, P. F. (2003). Variações genéticas em populações de *Eucalyptus* spp. detectadas por meio de marcadores moleculares. *Revista Árvore*, v. 27, n. 3, p. 357-363.
- Cao, S. F.; Zheng, Y. H.; Wang, K. T.; Jin, P.; Rui, H. J. (2009). Methyl jasmonate reduces chilling injury and enhances antioxidant enzyme activity in postharvest loquat fruit. *Food Chem*. 115(4), 1458–1463.

- Carabelli, M.; Morelli, G.; Whitelam, G.; Ruberti, I. (1996). Twilight-zone and canopy shade induction of the Athb-2 homeobox gene in green plants. *PNAS*. 284(1):133–141.
- Cardoso, D. L.; Vivas, M.; Amaral Junior, A. T. do; Pereira, M. G. (2015). Análise dialéctica de Hayman de características relacionadas à produção e a qualidade de frutos em mamoeiro. *Melhoramento Genético Vegetal*. Bragantia, Campinas, v. 74, n. 4, p.394-399.
- Carneiro, M. S.; Vieira, M. L. C. (2002). Mapas genéticos em plantas. *Bragantia*, Campinas, 61:89-100.
- Catala, C.; Rose, J. K. C.; Bennett, A. B. (2000). Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth. *Plant Physiol.* 122, 527–534.
- Cato, S. A.; Gardner, R. C.; Kent, J.; Richardson, T. E. (2001). A rapid PCR-based method for genetically mapping ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, v.102, p.296-306.
- Cattaneo, L. F. (2001) Avaliação da divergência genética e análise de gerações em mamoeiro (*Carica papaya* L.). Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF, Campos dos Goytacazes, RJ.
- Cereda, M. P.; Bertolini, A. C.; Silva, A. P.; Oliveira, M. A.; Evangelista, R. M. (1995). Películas de almidón para la preservación de frutas. CONGRESO DE POLÍMEROS BIODEGRADABLES: AVANCES Y PERSPECTIVAS, Buenos Aires. *Anais...* Buenos Aires, 1995.
- Chen, C.; Yu, Q.; Hou, S.; Li, Y. J.; Eustice, M.; Skelton, R. L.; Veatch, O.; Herdes, R. E.; Diebold, L.; Saw, J.; Feng, Y.; Qian, W.; Bynum, L.; Wang, L.; Moore, P. H.; Paull, R. E.; Alam, M.; Ming, R. (2007). Construction of a sequence-tagged high-density genetic map of papaya for comparative structural and evolutionary genomics in Brassicales. *Genetics*, v.177, p.2481-2491.
- Chen, M. H.; Chen, C. C.; Wang, D. N.; Chen, F. C. (1991). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Carica papaya* x *Carica cauliflora* cultured in vitro. *Canadian Journal of Botany*, v. 69, p. 1913-1918.

- Chitarra, M. I. F.; Chitarra, A. B. (2005). Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: Editora da Universidade Federal de Lavras, v.1, 785p.
- Collard, B. C. Y.; Jahufer, M. Z. Z.; Brouwer, J. B.; Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142: 169-196.
- Collard, B. C. Y.; Mackill, D. J. (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, Londres, v.363, n.1491, p. 557-572.
- Cordeiro, G. M.; Casu, R.; McIntyre, C. L.; Manners, J. M.; Henry, R. J. (2001). Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) EST cross transferable to erianthus and sirghum. *Plant Science*.v.160, p.1115-1123.
- Cortes, D. F. M. (2017). Desenvolvimento de linhagens de mamoeiro assistido por imagens digitais. Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, RJ.
- Costa, A. F. S.; Pacova, B. E. V. (2003). Caracterização de cultivares, estratégias e perspectivas do melhoramento genético do mamoeiro. In: Martins, D.S.; Costa, A. F. S. A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção. Vitória: Incaper. cap 3, p. 59-102.
- Costa, F.; Peace, C. P.; Stella, S.; Serra, S.; Musacchi, S.; Bazzani, M.; Sansavini, S.; Van de Weg, W. E. (2010). QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *J Expt Bot*, 61:3029–3039.
- Coulibaly, I.; Gharbi, K.; Danzmann, R. G.; Yao, J.; Rexroad, C. E. (2005). Characterization and comparison of microsatellites derived from repeat-enriched libraries and expressed sequence tags. *Animal Genetics*, v.36, p. 309–315.
- Cruz, C. D. (2008). Programa Genes: Aplicativo computacional em genética estatística. Versão para Windows. Viçosa: Editora UFV.

- Da Silva, J.; Arrowsmith, D.; Hellyer, A.; Whiteman, S.; Robinson, S. (1994). Xyloglucan endotransglycosylase and plant growth. *Journal of Experimental Botany*, 45, 1693-1701.
- Damasceno Junior, P. C.; Pereira, T. N. S.; Silva, F. F. da; Reis, M. V. M.; Pereira, M. G. (2015). Diversidade genética em duas espécies de Caricáceas e suas relações genéticas com *Carica papaya* L. *Revista Ciência Agronômica*. Fortaleza/CE, v. 46, n. 4, p. 733-739.
- Dantas, J. L. L.; Dantas, A. C. V. L.; Lima, J. F. (2002). Mamoeiro. In: *Melhoramento de fruteiras tropicais*. 1 ed. Viçosa – MG: UFV, p. 309-349.
- Dantas, J. L. L.; Oliveira, E. J. (2009). O melhoramento genético do mamoeiro: avanços, desafios e perspectivas. In: *I Simpósio nordestino de genética e melhoramento de plantas*, Fortaleza - CE. O melhoramento genético 63 no contexto atual. Fortaleza – CE. *Anais...* Embrapa Agroindústria Tropical. v. 1. p. 151-180.
- Dias, N. L. P.; Oliveira, E. J. de; Dantas, J. L. L. (2011). Avaliação de genótipos de mamoeiro com uso de descritores agronômicos e estimação de parâmetros genéticos. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.46, n.11, p.1471-1479.
- Dillon, S. et al. (2006). Development of a codominant CAPS marker linked to PRSV-P resistance in highland papaya. *Theor. Appl. Genet.*, 113 (6), 1159-1169.
- Ditzer, A.; Bartels, D. (2006). Identification of a dehydration and ABA-responsive promoter regulation and isolation of corresponding DNA binding proteins for the group 4 LEA gene CpC2 from *C. plantagineum*. *Plant Mol. Biol.* 61(4–5):643–663.
- Ender, M.; Terpstra, K.; Kelly, J. D. (2008). Marker-Assisted Selection for white mold resistance in commonbean. *Mol Breeding*, 21:149-157.
- Eujayl, I.; Sorrells, M. E.; Baum, M.; Wolters, P.; Powell, W. (2001). Assessment of genotypic variation among cultivated durum wheat based on EST-SSRs and genomic SSRs. *Euphytica*, v.119, p.39-43.
- Fagundes, G. R.; Yamanishi, O. K. (2001). Características físicas e químicas de frutos de mamoeiro do grupo 'solo' comercializados em 4 estabelecimentos de Brasília-DF. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 23, n. 3, p. 541-545.

- Falconer, D. S.; Mackay, T. F. C. (1996). *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th edn, Longman Group Ltd, England.
- Faleiro, F. G. (2007). *Marcadores genético-moleculares aplicados a programa de conservação e uso de recursos genéticos*. Planaltina/DF. Embrapa Cerrados.
- FAO. (2013). Food and agriculture organization of the United Nations. Statistical Databases. Disponível em: <http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_en.asp> Acesso em: 25 de novembro de 2015.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/e>>. Acesso em: 25 de novembro de 2015. Dados do ano de 2015.
- Federizzi, L. C. (1998). Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: Milach, S.C.K. *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: UFRGS. p.3-15.
- Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. (1998). *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3.ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN. p.220.
- Fronza, V. (2003). *Genética da reação da soja a Fusarium solani f. sp. glycines*. 166f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Fu, Y. B. (2003). Applications of bulking in molecular characterization of plant germplasm: a critical review. *Plant Genetic Resources*, v.1, p.161-167.
- Galeano, E. V.; Martins, D. dos S. (2015). Evolução da produção e comércio mundial de mamão. VI Simpósio do Papaya Brasileiro. Tecnologia de produção e mercado para o mamão brasileiro. *Anais...* Vitória, ES.
- Gálvez-López, D.; Laurens, F.; Devaux, M. F.; Lahaye, M. (2012). Texture analysis in an apple progeny through instrumental, sensory and histological phenotyping. *Euphytica* 185:171–183.
- Giovannoni, J. (2001). Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 52, p. 725-749.

- Giovannoni, J. J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* (Suppl) 16: S170–S180.
- Guimarães, C. T.; Schuster, I.; Magalhães, J. V.; Souza Júnior, C. L. (2006). Marcadores moleculares no melhoramento de plantas. In: Borém, A. e Caixeta, E. T. Marcadores moleculares. Viçosa: UFV, p.107-144.
- Hackauf, B.; Wehling, P. (2002). Identification of microsatellite polymorphisms in an expressed portion of the ryebgenome. *Plant Breeding*, v.121, p.17-25.
- Han, Y.; Ban, Q.; Hou, Y.; Meng, K.; Suo, J.; Rao, J. (2016). Isolation and Characterization of Two Persimmon Xyloglucan Endotransglycosylase/Hydrolase (XTH) Genes That Have Divergent Functions in Cell Wall Modification and Fruit Postharvest Softening. *Plant Science*. 7:634. doi: 10.3389/fpls.2016.00624
- Hay, A.; Kaur, H.; Phillips, A.; Hedden, P.; Hake, S.; Tsiantis, M. (2002). The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr. Biol*. 12:1557–1565.
- Hofmeyr, J. D. J. (1938). Genetical studies of *Carica papaya*. *South African Journal of Science*, v.35, p.300-304.
- Horovitz, S. (1954). Determinación del sexo en *Carica papaya* L. Estructura hipotética de los cromossomas sexuales. *Agronomía Tropical*, v.3, p.229-249.
- Huang, G.; Li, T.; Li, X.; Tan, D.; Jiang, Z.; Wei, Y.; Li, J.; Wang, A. (2014). Comparative transcriptome analysis of climateric fruit of Chinese pear (*Pyrus ussuriensis*) reveals new insights into fruit ripening. *Plos one*. vol.9.
- IBGE. (2013). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estados. Disponível em <www.ibge.gov.br>. Acesso em 15-12-2015 página mantida pelo IBGE.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. (2014). Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias – GCEA/IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – LSPA.
- Ishiguro, S.; Nakamura, K. (1994). Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream

regions of genes coding for sporamin and β -amylase from sweet potato. *Mol. Gen. Genet.* 244(6), 563–571.

- Jasinski, S.; Piazza, P.; Craft, J.; Hay, A.; Woolley, L.; Rieu, I.; Phillips, A.; Hedden, P. T.; Tsiantis, M. (2002). KNOX action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr. Biol.* 15(17):1560–1565.
- Jin, P. et al. (2013). Effect of methyl jasmonate on energy metabolism in peach fruit during chilling stress. *J. Sci. Food Agric.* 93(8), 1827–1832.
- Johnston, J. W.; Hewett, E. W.; Hertog, M. L. A. T. M.; Harker, F. R. (2002). Harvest date and fruit size affect postharvest softening of apple fruit. *J Hort Sci Biotechnol*, 77:355–360.
- Jönsson, Å.; Nybom, H. (2007). Consumer evaluation of scab-resistant apple cultivars in Sweden. *Agr Food Sci*, 15:388–401.
- Kantety, R. V.; Rota, M. L.; Mathews, D. E.; Sorrells, M. E. (2002). Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant.Mol. Biol. Rep.* v. 48, p.501-510.
- Karunakaran, G.; Ravishankar, H.; Dinesh, M. R. (2010). Genetical studies in papaya (*Carica papaya* L.). *Acta Horticulturae*, 851:103-108.
- Kenis, K.; Keulemans, J.; Davey, M. W. (2008). Identification and stability of QTLs for fruit quality traits in apple. *Tree Genet Genomes*, 4:647–661.
- King, G. J.; Lynn, J. R.; Dover, C.; Evans, K. M.; Seymour, G. (2001). Resolution of quantitative trait loci for mechanical measures accounting for genetic variation in fruit texture in apple (*Malus pumila* Mill.). *Theor Appl Genet*, 102:1227–1235.
- King, G. J.; Maliepaard, C.; Lynn, J. R.; Alston, F. H.; Durel, C. E.; Evans, K. M.; Griffon, B.; Laurens, F.; Manganaris, A. G.; Schrevers, E.; Tartarini, S.; Verhaeg, J. (2000). Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to fruit flesh firmness in apple (*Malus pumila* Mill.). *Theor Appl Genet*, 100:1074–1084.
- Kosambi, D. D. (1944). The estimation of map distance from recombination values. *Annuaire of Eugenetics*, 12:172-175.

- Lande, R.; Thompson, R. (1990). Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*, v.124, p.743-756.
- Lazan, H.; Ali, Z. M.; Liang, K. S.; Yee, K. L. (1989). Polygalacturonase activity and variation in ripening of papaya fruit with tissue depth and heat treatment. *Physiologia Plantarum*, 77, 93–98.
- Leal, A. A. et al. (2010). Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among popcorn lines. *Genetics and Molecular Research*, v. 9, n. 01, p. 9-18.
- Lee, M. (1995). DNA markers and plant breeding programs. *Advances in Agronomy*, v.55, p.265-343.
- Lee, Y. H.; Oh, H. S.; Cheon, C. I.; Hwang, I. T.; Kim, Y. J.; Chun, J. Y. (2001). Structure and expression of the Arabidopsis thaliana homeobox gene Athb-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284(1):133–141.
- Li, C.-R.; Shen, W.-B.; Lu, W.-J.; Jiang, Y.-M.; Xie, J.-H.; Chen, J.-Y. (2009). 1-MCP delayed softening and affected expression of XET and EXP genes in harvested cherimoya fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 52, 254–259.
- Li, X.; Zhu, X.; Mao, J.; Zou, Y.; Fu, D.; et al. (2013). Isolation and characterization of ethylene response factor family genes during development, ethylene regulation and stress treatments in papaya fruit. *Plant Physiology and Biochemistry* 70: 81–92.
- Liebhart, R.; Kellerhals, M.; Pfammatter, W.; Jertmini, M.; Gessler, C. (2003). Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Pl Molec Biol*, 52:511–526.
- Lin, Z.; Hong, Y.; Yin, M.; Li, C.; Zhang, K.; Grierson, D. (2008). A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. *Plant J.* 55(2): 301–310.
- Liu, B. H. (1998). *Statistical genomics*. New York: CRC, 610p.
- Liu, Z.; Moore, P. H.; Ma, H.; Ackerman, C. M.; Ragiba, M.; Yu, Q.; Peari, H. M.; Kim, M. S.; Chariton, J. W.; Stiles, J. I.; Zee, F. T.; Andrew, A. H.; Ming, R. (2004). A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature*, v. 427, p. 348-352.

- Longhi, S.; Moretto, M.; Viola, R.; Velasco, R.; Costa, F. (2012). Comprehensive QTL mapping survey dissects the complex fruit texture physiology in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *J Exp Bot*, 63:1107–1121.
- Lorieux, M.; Ndjiondjop, M. N.; Ghesquière, A. (2000). A first interspecific *Oryza sativa* x *Oryza glaberrima* microsatellite-based genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, 100:593–601.
- Ma, H.; Moore, P. H.; Liu, Z.; Kim, M. S.; Yu, Q.; Fitch, M. M. M.; Sekioka, T.; Paterson, A. H.; Ming, R. (2004). High density linkage mapping revealed suppression of recombination at the sex determination locus in papaya. *Genetics*, v.166, p.419-436.
- Macedo, C. M. P. de. (2012). Avaliação de híbridos elites de mamão (*Carica papaya* L.) e seus cruzamentos recíprocos quanto à qualidade fisiológica de sementes e ao potencial agrônômico. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, RJ.
- Maclachlan, G.; Brady, C. (1994). Endo-1,4-b-glucanase, xyloglucanase, and xyloglucan endo-transglycosylase activities versus potential substrates in ripening tomatoes. *Plant Physiology*, 105, 965e974.
- Majaju, C.; Sehic, J.; Nybom, H. (2013). Assessment of EST-SSR Markers for Evaluating Genetic Diversity in Watermelon Accessions from Zimbabwe. *American Journal of Plant Sciences*, 4, 1448-1456.
- Malabadi, R. B.; Kumar, S. V.; Mulgund, G. S.; Nataraja, K. (2011). Induction of somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya*). *Research in Biotechnology*, v. 2, p. 40-55.
- Manica, I. (1982). *Fruticultura tropical: 3. Mamão*. São Paulo: Agronômica Ceres, 276p.
- Mann, H. S.; Alton, J. J.; Kim, S.; Tong, C. B. S. (2008). Differential expression of cell-wall-modifying genes and novel cDNAs in apple fruit during storage. *J Amer Soc Hort Sci*, 133:152–157.
- Mann, H.; Bedford, D.; Luby, J.; Vickers, Z.; Tong, C. (2005). Relationship of instrumental and sensory texture measurements of fresh and stored apples to cell number and size. *Hortscience*, 40:1815–1820.

- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, Birmingham, v. 27, n. 2, p. 209-202.
- Marin, S. L. D. et al. Hibridação de mamão. (2003). In: Martins D. S. Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno. Incaper, Vitória-ES, p. 173-188.
- Marin, S. L. D.; Pereira, M. G.; Amaral Júnior, A. T.; Martelleto, L. A.P.; Ide, C. D. (2006). Heterosis in papaya hybrids from partial diallel of 'Solo' and 'Formosa' parents. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, Viçosa, v. 6, n. 1, p. 24-29.
- Marin, S.L.D.; Gomes, J. A. (2000). Cultura do mamão. In: Semana Internacional de Fruticultura e Agroindústria, 7., Instituto Frutal, Fortaleza, 50p.
- Marinho, A. B.; Bernardo, S.; Sousa, E. F. de; Pereira, M. G.; Monnerat, P. H. (2008). Produtividade e qualidade de frutos de mamão cultivar 'Golden' sob diferentes lâminas de irrigação e doses de potássio no Norte de Espírito Santo. *Eng. Agríc.*, Jaboticabal, v.28, n.3, p.417-426.
- Maroof, M. A. S.; Jeong, S.C.; Gunduz, I.; Tucker, D. M.; Buss, G. R.; Tolin, S. A. (2008). Pyramiding of Soybean Mosaic Virus Resistance Genes by Marker-Assisted Selection. *Crop Science*, 48:517-526.
- Martins, D. dos S.; Costa, A. de F. S. da. (2003). A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção. Vitória-ES: Incaper.
- McKay, S. J. (2010). The genetic dissection of fruit texture traits in the apple cultivar Honeycrisp. Ph D thesis, University of Minnesota, USA.
- McKay, S. J.; Bradeen, J. M.; Luby, J. J. (2011). Prediction of genotypic value for apple fruit texture traits in a breeding population derived from 'Honeycrisp'. *J Amer Soc Hort Sci*, 136:408–414.
- Mendes, M.; Pala, A. (2003). Type I error rate and power of three normality tests. *Pak. J. Inf. Technol.*, Faisalabad, v.2, n.2, p.135-139.
- Mendonça, V.; Abreu, N.A.A.; Gurgel, R.L.S.; Ferreira, E.A.; Orbes, M.Y.; Tosta, M.S. (2006). Crescimento de mudas de mamoeiro 'Formosa' em substratos com utilização de composto orgânico superfosfato simples. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 30, n. 5.

- Michelmore, R. W.; Paran, I.; Kesseli, R. V. (1991). 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 88, p. 9828-9832.
- Ming, R. et al. (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, 452 (7190), 991-996 DOI: 10.1038/nature06856
- Missio, R. F.; Caixeta, E. T.; Ribeiro, A. P.; Moura, E. F.; Zambolim, E. M.; Zambolim, L.; Sakiyama, N. S. (2011). Diversidade genética de cafeeiro por meio de marcadores EST-SSR. Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Embrapa – Café. Anais... Águas de Lindóia, SP.
- Moreira, J. U. V. (2004). Mapeamento de QTLs para reação à doença mancha de *Phaeosphaeria* em milho. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, p.86.
- Morris, M. et al. (2003). Money matters (II): costs of maize inbred line conversion schemes at CIMMYT using conventional and marker-assisted selection. *Molecular Breeding*, Dordrecht, v.11, n.3, p. 235-247.
- Moulin, M. M.; Rodrigues, R.; Bento, C. S.; Gonçalves, L. S. A.; Santos, J. O.; Sudré, C. P.; Viana, A. P. (2015). Genetic dissection of agronomic traits in *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. *Genetics and Molecular Research* 14 (1): 2122-2132.
- Mulato, B. M.; Möller, M.; Zucchi, M. I.; Quecini, V.; Pinheiro, J. B. (2010). Genetic diversity in soybean germplasm identified by SSR and EST-SSR markers. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.45, n.3, p.276-283.
- Nardi, C. F.; Villarreal, N. M.; Opazo, M. C.; Martinez, G. A.; Moya-Leon, M. A.; Civello, P. M. (2014). Expression of FaXTH1 and FaXTH2 genes in strawberry fruit cloning of promoter regions and effect of plant growth regulators. *Sci. Hortic.* 165, 111–122.
- Nishitani, K.; Tominaga, R. (1992). Endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J. Biol. Chem.* 267, 21058–21064.

- Nybom, H.; Ahmadi-Afzadi, M.; Garkava-Gustavsson, L.; Sehic, J.; Tahir, I. (2012). Selection for improved fruit texture and storability in apple. *Acta Hort*, 934(2):849–854.
- OCampo Pérez, J. et al. (2006). Microsatellite markers in *Carica papaya* L.: isolation characterization and transferability to *Vasconcellea* species. *Molecular Ecology Notes*, v.6, p.212-217.
- Oliveira, A. M. G., Farias, A. R. N., Santos, H. P. F., Oliveira, J. R. P., Dantas, J. L. L., Santos, L. B., Oliveira, M. A., Silva, M. J., Almeida, O. A., Nickel, O., Medina, V. M., Cordeiro, Z. J. M. (1994). Mamão para exportação: aspectos técnicos de produção. Brasília: EMBRAPA - SPT, Série Publicações Técnicas Frutex, 9, p. 52.
- Oliveira, E. J. et al. (2010a). Polymorphism of microsatellite markers set for *Carica papaya* L. and its use in molecular-assisted selection. *Euphytica*, v.173, p. 279-287.
- Oliveira, E. J. et al. (2010b). Polymorphism microsatellite markers in papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, v.28, p. 519-530.
- Oliveira, E. J.; Oliveira, G. A. F.; Costa, J. L.; Oliveira, V. J. S.; Dantas, A. C. V. L.; Dantas, J. L. L.; Pádua, J. G. (2012). Genetic diversity and marker-assisted inbreeding in papaya. *Scientia Horticulturae*, v.147, p.20-28.
- Ori, N.; Juarez, M. T.; Jackson, D.; Yamaguchi, J.; Banowitz, G. M.; Hake, S. (1999). Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene knotted1 under the control of a senescence-activated promoter. *Plant Cell*. 11(6):1073–1080.
- Ott, J. (1992). Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *American Journal of Human Genetics*, v.51, n.2, p.283.
- PAM-IBGE. (2015). INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção Agrícola Municipal – PAM. Disponível no Sistema IBGE de Recuperação Automática – Sidra: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/acervo9.asp?e=c&p=PA&z=t&o=11>> Acesso entre dezembro/2015 e abril/2016.

- Parasnis, A. S.; Rama Krishna, W.; Chowdari, K. Y.; Gupta, V. S.; Ranjekar, P. K. (1999). Microsatellite (GATA)₄ reveals sex-specific differences in papaya. *Theoretical and Applied Genetics*, v.99, p.1047-1052.
- Peakall, R.; Smouse, P. (2009). GenAEx Tutorials - Part 1: Introduction to Population Genetic Analysis. Australian National University, Canberra.
- Percy, A. E.; O'Brien, I. E. W.; Jameson, P. E.; Melton, L. D.; MacRae, E. A.; Redgwell, R. J. (1996). Xyloglucan endotransglycosylase activity during fruit development and ripening of apple and kiwi fruit. *Physiologia Plantarum*, 96, 43-50.
- Pereira et al. (2015). Melhoramento genético do mamoeiro: novas cultivares. VI Simpósio do Papaya Brasileiro. Tecnologia de produção e mercado para o mamão brasileiro: *Anais...* Vitória, ES: Incaper, 2015. CD-ROM.
- Pereira, M. G. (1993). Restriction fragment length polymorphism in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). Tese (Doutorado). Iowa State University. Iowa, Estados Unidos.
- Pérez, O. J.; Dambier, D.; Ollitrault, P.; Coppens, D. G.; Brottier, P.; Froelicher, Y.; Risterucci, A. M. (2006). Microsatellite markers in *Carica papaya* L.: isolation, characterization and transferability to *Vasconcellea* species. *Molecular Ecology Notes*, 6: 212-217.
- Pinto, F. de O. (2006). Associação de marcadores EST-SSR à resistência ao bicho-mineiro em cafeeiros. Instituto Agrônomo (Dissertação). Campinas, SP.
- Pinto, F. de O. (2012). Melhoramento populacional do mamoeiro: retrocruzamento assistido e obtenção de genótipos tolerantes à mancha fisiológica. Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, RJ.
- Plesch, G.; Störmann, K.; Torres, J. T.; Walden, R.; Somssich, I. E. (1997). Developmental and auxin-induced expression of the Arabidopsis *prh1* homeobox gene. *Plant J.* 12(3):635–647.
- Ramos, H. C. C. (2010). Retrocruzamento em mamoeiro: avanços de gerações e seleção de linhagens via procedimentos clássicos e moleculares. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Tese). Campos dos Goytacazes/RJ. 134p.

- Ramos, H. C. C.; Pereira, M. G.; Gonçalves, L. S. A.; Amaral Júnior, A. T.; Scapim, C. A. (2011). Comparison of multiallelic distances for the quantification of genetic diversity in the papaya. *Scientia Agricola*, Maringá, 33(1):59-66.
- Razali, M. N.; Wah, Y. B. (2011). Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*. vol.2, n.1, p.21-33.
- Rezende, F. V. (2004). Análise genética da resistência à antracnose foliar em milho. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, SP. p.103.
- Rhodes, M. J. C. (1980). The maturation and ripening of fruits. In: Thimann, K. V.; Delman, R. C.; Rhoth, G. S. (Eds) Senescence in plants. Boca Raton: CRC Press, p.157-205.
- Rocha, G. A. F.; Oliveira, M. S. G.; Good-God, P. I. V.; Matta, L. B.; Pinto, M. O.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. (2008). Segregação transgressiva para conteúdo de ácido oleico em soja. 54^o Congresso Brasileiro de Genética. Anais... Salvador, BA.
- Rudd, S. (2003). Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences? *Trends Plant Science*, v.8, n.7, p.321-329.
- Ruggiero, C., Marin, S. L. D., e Durigan, J. F. (2011). Mamão, uma história de sucesso. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33 (SPE1), p.76-82.
- Sakamoto, T.; Kamiya, N.; Ueguchi-Tanaka, M.; Iwahori, S.; Matsuoka, M. (2001). KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Gene Dev.* 15:581–590.
- Sakiyama, N. S.; Ramos, H. C. C.; Caixeta, E. T.; Pereira, M. G. (2014). Plant breeding with marker assisted selection in Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.14, p. 54-60.
- Santa-Catarina, R.; Cortes, D. F. M.; Ferregueti, G. A.; Vettorazzi, J. C. F.; Pereira, M. G. (2015). Estimativa de características morfológicas em frutos de mamão via análise de imagem digital. Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas – 8^o CBMP. Goiânia – GO.

- Santos, C. E. et al. (2013). Anuário Brasileiro da Fruticultura. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 136p.
- Santos, S. C.; Ruggiero, C.; Silva, C. L. S. P.; Lemos, G. M. (2003). A microsatellite library for *Carica papaya* L. cv Sunrise Solo. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal-SP, 25: 263-267.
- Sañudo, R.; Bustillos, R. J. A.; Garcia, L. P. L.; Molina, E. B.; Nuno, S. O.; Algel, D. N. (1997). Manejo postcosecha del mango. México: EMEX, 92p.
- Sato, S.; Tabata, S.; Hirakawa, H.; Asamizu, E.; Shirasawa, K.; et al. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635–641.
- Schröder, R.; Atkinson, R. G.; Langenkämper, G.; Redgwell, R. J. (1998). Biochemical and molecular characterisation of xyloglucan endotransglycosylase from ripe kiwifruit. *Planta* 204, 242-251.
- Schuster, I.; Cruz, C. D. (2004). Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados. Editora UFV, Viçosa, 568p.
- Scott, K. D.; Eggler, P.; Seaton, G.; Rosseto, M.; Ablett, E. M.; Lee, L. S.; Henry, R. J. (2000). Analyses of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, v.100, p.723-726.
- Semagn, K.; Bjornstad, A.; Ndjioudjop, M. N. (2006). Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology*, 5:2569-2587.
- Serrano, L. A. L.; Catanneo, L. F. (2010). O cultivo do mamoeiro no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 32, n. 3 p.75-95.
- Shapiro, S. S.; Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples), *Biometrika* 52, 591–611.
- Siboza, X. I.; Bertling, I.; Odindo, A. O. (2014). Salicylic acid and methyl jasmonate improve chilling tolerance in cold-stored lemon fruit (*Citrus limon*). *J. Plant Physiol.* 171(18), 1722–1731.
- Sigrist, J. M. M. (1992). Transformações bioquímicas. In: Bleinroth, E. W.; Sigrist, J. M. M.; Ardito, E. F. G.; Castro, J. V.; Spaagnol, W. A.; Neves Filho, L. C.

- Tecnologia de pós-colheita de frutas tropicais. Campinas: ITAL, p.33-38. (Manual Técnico, 9)
- Silva, F. F., Pereira, M. G., Ramos, H. C. C., Damasceno Junior, P. C., Pereira, T. N. S., Gabriel, A. P. C., Viana, A. P., Ferregueti, G. A. (2008). Selection and estimation of the genetic gain in segregating generations of papaya (*Carica papaya* L.). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.8, p.1-8.
- Silva, F. F.; Pereira, M. G.; Ramos, H. C. C.; Damasceno Junior, P. C.; Pereira, T. N. S.; Ide, C. D. (2007). Genotypic correlation of morpho-agronomic traits in papaya and implications for genetic breeding. *Crop Breeding Applied Biotechnology*, Viçosa, 7:345-352.
- Soglio, V.; Costa, F.; Molthoff, J. W.; Weeman-Hendriks, W. M. J.; Schouten, H. J.; Gianfranceschi, L. (2009). Transcription analysis of apple fruit development using DNA microarrays. *Tree Genet Genomes*, 5:685–698.
- Sokal, R. R.; Rohlf, F. J. (1962). The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* 11: 33-40.
- Sondur, S. N.; Manshardt, R. M.; Stiles, J. I. (1996). A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*, v.93, p.547-553.
- Souza, B. S. et al. (2005). Conservação de mamão Formosa minimamente processado armazenado sob refrigeração. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.27, n. 2, p. 273-272.
- Souza, L. B. (2010). Mapeamento genético de híbridos intraespecíficos de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) obtidos por cruzamentos controlados. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências. Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP.
- Staub, J. E.; Serquen, F. C.; Gupta, M. (1996). Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hort Science*. Alexandria, 31:729-740.
- Steindler, C.; Matteucci, A.; Sessa, G.; Weimar, T.; Ohgishi, M.; Aoyama, T.; Morelli, G.; Ruberti, I. (1999). Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development*. 126(19):4235–4245.

- Sterky, F.; Lundeberg, J. (2000). Sequence analysis of genes and genomes. *Journal of Biotechnology*, v.76, p.1-31.
- Storey, W. B. (1938). Segregations of sex types in Solo papaya and their application to the selection of seed. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 35:83–5.
- Stuber, C. W.; Edwards, M. D.; Wendel, J. F. (1987). Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its component traits. *Crop Science*, Madison, v.27, p.639- 648.
- Stuber, C.W. (1994). Enhancement of Grain Yield in Maize Hybrids using Marker-facilitated Introgression of QTLs Proceedings of the symposium: Analysis of molecular marker data, Oregon, ASHS/CSSA, p.44-46.
- Susa, T.; Nakayama, M.; Kitahara, K.; Kimoto, F.; Kato, T.; Kato, Y. (2007). Homeodomain transcription factor Hesx1/Rpx occupies Prop-1 activation sites in porcine follicle stimulating hormone (FSH) β subunit promoter. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 357:712–717.
- Tanksley, S. D. (1993). Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics*, Palo Alto, 27:205-233.
- Thompson, J. E.; Smith, R. C.; Fry, S. C. (1997). Xyloglucan undergoes interpolymeric transglycosylation during binding to the plant cell wall in vivo: evidence from C-13/H-3 dual labelling and isopycnic centrifugation in caesium trifluoroacetate. *Biochem. J.* 327, 699–708.
- Toledo, E. R.; Leandro, R. A.; Souza Júnior, C. L.; Souza, A. P. (2008). Mapeamento de QTLs: uma abordagem bayesiana. *Revista Brasileira de Biometria*, São Paulo, 26:107-114.
- Trindade, A. V. (2000). Mamão. Produção: aspectos técnicos. Brasília: EMBRAPA-CNPMT, p. 11-14.
- Tucker, G. A. (1993). Introduction. In: Seymour, G. B.; Taylor, J. E.; Tucker, G. A. (Ed.). *Biochemistry of fruit ripening*. London: Chapman & Hall, p.2-51.
- Urasaki, N., Tokumoto, M., Tarora, K., Ban, Y., Kayano, T., Tanaka, H., Oku, H., Chinen, I., Terauchi, R. (2002). A male and hermaphrodite specific RAPD

- marker for papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 281-285.
- Van Ooijen. (2006). JoinMap ® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.
- Varshney, R. K.; Graner, A.; Sorrells, M. E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23(1):48-55.
- Vidal, N. M.; Grazziotin, A. L.; Ramos, H. C. C.; Pereira, M. G.; Venancio, T. M. (2014). Development of a Gene-Centered SSR Atlas as a Resource for Papaya (*Carica papaya*) Marker-Assisted Selection and Population Genetic Studies. *PLoS ONE* 9(11): e112654. doi:10.1371/journal.pone.0112654
- Vieira, E. A.; et al. (2006). Mapeamento genético de caracteres quantitativos e sua interação com o ambiente. Planaltina, Embrapa Cerrados. Documentos, 28p.
- Vitória, A. P.; Souza Filho, G. A.; Bressan-Smith, R.; Pinto, F. O.; Paiva, L. B.; Guimarães, P. S.; Oliveira, M. P. A.; Pereira, M. G.; Daher, R. F. (2004). DNA fingerprint of *Carica papaya* L. genotypes by RAPD markers. *Journal of New Seeds*, 6:1-10.
- Vivas, M.; Silveira, S. F. da; Cardoso, D. L.; Amaral Júnior, A. T. do; Pereira, M. G. (2014). Heterose para resistência à mancha-de-phoma em híbridos de mamoeiro obtidos a partir de cruzamentos entre e dentro de grupos heteróticos. *Summa Phytopathol.*, Botucatu, v. 40, n. 4, p. 318-322.
- Vivas, M.; Silveira, S. F. da; Pereira, M. G.; Cardoso, D. L.; Ferreguetti, G. A. (2013). Análise dialélica em mamoeiro para resistência à mancha-de-phoma. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.43, n.6, p.945-950.
- Wakasa, Y.; Kudo, H.; Ishikawa, R.; Akada, S.; Senda, M.; Niizeki, M.; Harada, T. (2006). Low expression of an endopolygalacturonase gene in apple fruit with long-term storage potential. *Postharvest Biol Technol*, 39:193–198.
- Wang, Y.; Henriksson, E.; Söderman, E.; Henriksson, K. N.; Sundberg, E.; Engström, P. (2003). The Arabidopsis homeobox gene, ATHB16, regulates leaf development and the sensitivity to photoperiod in Arabidopsis. *Dev. Biol.* 264(1):228–239.

- Wu, R.; Ma, C.; Casella, G. (2007). *Statistical genetics of quantitative traits: linkage, maps and QTL*. New York. Springer, 365p.
- Xu, Y.; Crouch, J. H. (2008). Marker-Assisted Selection in Plant Breeding: From Publications to Practice. *Crop Science*, 48:391-407.
- Yamanishi, O. K.; Mello, R. M. de.; Martins, V. A.; Lima, L. A. de L.; Fagundes, G. R. (2006). Comportamento do mamoeiro Sekati nas condições do oeste da Bahia. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 1, p. 79-82.
- Ye, Y.-J.; Xiao, Y.-Y.; Han, Y.-C.; Shan, W.; Fan, Z.-Q.; Xu, Q.-G.; Kuang, J.-F.; Lu, W.-J.; Lakshmanan, P.; Chen, J.-Y. (2016). Banana fruit VQ motif-containing protein5 represses cold-responsive transcription factor MaWRKY26 involved in the regulation of JA biosynthetic genes. *Scientific Reports*, 6:23632. DOI: 10.1038/srep23632
- Young, N. D. (1999). A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. *Molecular Breeding*, Dordrecht, v. 5, n. 6, p. 505-510.
- Zhang, G.; Chen, L.; Xiao, G.; Xiao, Y.; Chen, X.; Zhang, S. (2009). Bulked segregant analysis to detect QTL related to heat tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) using SSR markers. *Agricultural Sciences in China*. v.8, p.482-487.
- Zhang, H.; Yi, H.; Wu, M.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Li, M.; Wang, G. (2016). Mapping the flavor contributing traits on 'Fendwei Melon' (*Cucumis melon* L.) chromosomes using parent resequencing and super bulked-segregant analysis. *Plos one*, 11(2): e0148150.
- Zhang, M., Mao, W., Zhang, G., Wu, F. (2014). Development and Characterization of Polymorphic EST-SSR and Genomic SSR Markers for Tibetan Annual Wild Barley (*Hordeum vulgare* L.). *PLOS ONE* 9(4): e94881.
- Zhang, X.; Sheng, J.; Li, F.; Meng, D.; Shen, L. (2012). Methyl jasmonate alters arginine catabolism and improves postharvest chilling tolerance in cherry tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 64(1), 160–167.
- Zhao, M. L. et al. (2013). Induction of jasmonate signalling regulators MaMYC2s and their physical interactions with MalCE1 in methyl jasmonate-induced chilling tolerance in banana fruit. *Plant Cell Environ.* 36(1), 30–51.