

CARACTERIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES ASSOCIADOS À QUALIDADE DE FRUTOS EM
MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

LUCAS DE OLIVEIRA LIMA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO - 2022

CARACTERIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES ASSOCIADOS À QUALIDADE DE FRUTOS EM
MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

LUCAS DE OLIVEIRA LIMA

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

Orientadora: Prof.^a Helaine Christine Cancela Ramos

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

L732

Lima, Lucas de Oliveira.

Caracterização e validação de marcadores moleculares associados à qualidade de frutos em mamoeiro (*Carica papaya* L.) / Lucas de Oliveira Lima. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

88 f. : il.

Bibliografia: 55 - 72.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2022.
Orientadora: Helaine Christine Cancela Ramos.

1. SAM. 2. SNAP. 3. Marcadores gênicos. 4. Associação genética. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

CARACTERIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES ASSOCIADOS À QUALIDADE DE FRUTOS EM
MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

LUCAS DE OLIVEIRA LIMA

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

Aprovado em 23 de fevereiro de 2022.

Comissão Examinadora:



Prof.^a Monique Moreira Moulin (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas)
IFES



Prof.^a Telma Nair Pereira Santana (Ph.D., Plant Breeding) - UENF



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



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

DEDICATÓRIA

A Deus, a meus pais Francisca de Oliveira Lima e Antonio Silva Lima, às minhas irmãs Ligia de Oliveira Lima e Amanda de Oliveira Lima, à minha sobrinha Laysa Emanuelle de Oliveira Boás e à minha gata de estimação Berenice.

Dedico esta conquista!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), pela oportunidade de realizar o curso.

À Caliman Agrícola S/A, pelo suporte e pela infraestrutura para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, professora doutora Helaine Christine Cancela Ramos, pelos ensinamentos, pela confiança e atenção durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), em especial aos meus conselheiros Dr. Messias Gonzaga Pereira e à Dr.^a Telma Nair Santana Pereira, pelas contribuições.

À Dieimes Bohry, por todo suporte, atenção e ensinamentos durante todas as etapas laboratoriais de minha pesquisa.

Ao Renato Santa Catarina, por todo suporte na etapa experimental e estatística do meu trabalho.

À Paola Alvares Bianchi, pelo suporte no momento final e crucial de minha dissertação, obrigado por tudo.

À Laís Neri, por todo apoio, incentivo e desabafos durante todo o mestrado. Obrigado por tudo, pois é muito bom reclamar da vida com você.

Aos meus colegas de laboratório e amigos conquistados na UENF, apesar de todo o momento atípico, Débora Mendes, Rosiele Bispo, Cleidiane Rodrigues, Ana Carolina Melo, Gabriela Tavares, Catiane Braga e Uéliton Alves.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

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

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Geral	4
2.2 Específicos.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Origem, dispersão, aspectos botânicos e reprodutivos do mamoeiro.....	5
3.2 Valor econômico da cultura.....	7
3.3 Qualidade de fruto em mamoeiro.....	8
3.4 Diversidade genética no melhoramento de plantas	10
3.5 Melhoramento genético do mamoeiro.....	11
3.6 Marcadores moleculares no melhoramento genético	12
3.7 Validação de marcadores moleculares	14
3.8 Seleção assistida por marcadores moleculares (SAM).....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Material genético e área experimental	17
4.2 Avaliação fenotípica.....	20
4.2.1 Características avaliadas.....	20

4.3 Análise Molecular.....	22
4.3.1 Isolamento do DNA genômico	22
4.3.2 Análise via reação em cadeia de polimerase (PCR).....	22
4.4 Análise estatística	27
4.4.1 Dados fenotípicos	27
4.4.1.1 Dados fenotípicos ligados aos marcadores moleculares	28
4.4.2 Dados moleculares	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Análise descritiva	30
5.2 Análise de componentes principais (PCA) e dissimilaridade genética para variáveis morfológicas	32
5.3 Análise de componentes principais (PCA) e diversidade genética para as características potencialmente ligadas aos marcadores SNAPs	38
5.4 Análise de diversidade genética com os dados moleculares	43
5.5 Análise conjunta das variáveis morfológicas e moleculares	48
5.6 Análise de Boxplot	50
6. CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Avaliação fenotípica das características ligadas ao fruto, utilizando o programa Image J. Frutos pertencentes aos genótipos BAG 7 (Surinse Solo) e BAG 53. (Grand Golden)21
- Figura 2** Gráfico de dispersão das 11 características estudadas com base na análise de componentes principais. QDT: quadrante; Dim1: componente principal 1; Dim2: componente principal 2; PMF: Peso médio de fruto; FF: firmeza de fruto; FP: firmeza de polpa; BRIX: unidade de medida para teor de sólidos solúveis; CF: comprimentos do fruto; DF: diâmetro do fruto; CCO: comprimento da cavidade ovariana; DCO: diâmetro da cavidade ovariana; EP: espessura da parede de fruto; VP: volume de polpa; %VP: porcentagem do volume de polpa.....34
- Figura 3** Gráfico de dispersão para os 41 acessos disponibilizados no banco de germoplasma UENF/Caliman com base nas características avaliadas, utilizando análise de componentes principais. QDT: quadrante; Dim1: componente principal 1; Dim2: componente principal 2; PMF: Peso médio de fruto; FF: firmeza de fruto; FP: firmeza de polpa; BRIX: unidade de medida para teor de sólidos solúveis; CF: comprimentos do fruto; DF: diâmetro do fruto; CCO: comprimento da cavidade ovariana; DCO: diâmetro da cavidade ovariana; EP: espessura da parede de fruto; VP: volume de polpa; %VP: porcentagem o volume de polpa.....35
- Figura 4** Grupos formados com base nas 11 características analisadas. Dim1: componente principal 1; Dim2: componente principal 2; PMF: Peso médio de fruto;

FF: firmeza de fruto; FP: firmeza de polpa; BRIX: unidade de medida para teor de sólidos solúveis; CF: comprimentos do fruto; DF: diâmetro do fruto; CCO: comprimento da cavidade ovariana; DCO: diâmetro da cavidade ovariana; EP: espessura da parede de fruto; VP: volume de polpa; %VP: porcentagem o volume de polpa.....36

Figura 5 Contribuição das características para a variabilidade de cada componente principal. a) componente principal 1: responsável por 62,5% da variabilidade do banco de germoplasma da UENF/Caliman; b) componente principal 2: responsável por 26,4% da variabilidade do banco de germoplasma da UENF/Caliman. FP: Firmeza de polpa; EP – Espessura de polpa; FF – Firmeza de polpa; e BRIX – Unidade de medida para teor de sólidos solúveis.....39

Figura 6 a) Gráfico de dispersão das características de acordo com sua contribuição. FP: Firmeza de polpa; EP – espessura de polpa; FF – firmeza de polpa; e BRIX – Unidade de medida para teor de sólidos solúveis. B) Dispersão em plano bidimensional dos 41 acessos avaliados do banco de germoplasma para as quatro características morfológicas selecionadas. QDT: quadrante.....40

Figura 7 Grupos formados pelos genótipos do BAG UENF/Caliman com base nos caracteres morfológicos selecionados: FP: Firmeza de polpa; EP – espessura de polpa; FF – firmeza de polpa; e BRIX – Unidade de medida para teor de sólidos solúveis.....41

Figura 8 Dendrograma dos genótipos do BAG UENF/Caliman gerados com base na avaliação morfológica das características selecionadas: FP: Firmeza de polpa; EP – Espessura de polpa; FF – Firmeza de polpa; e BRIX – Unidade de medida para teor de sólidos solúveis.....42

Figura 9 Dendrograma com os genótipos do BAG UENF/Caliman gerados com base na análise dos 12 marcadores SNPs associados às FF: firmeza de fruto; FP: firmeza de polpa EP: espessura de polpa; e TSS: teor de sólidos solúveis.46

Figura 10 Gráfico de pico do ΔK indicando o número ótimo de clusters genéticos para a análise de estrutura genética do BAG UENF/Caliman obtida pelo programa Structure 2.3.4. UENF, Campos dos Goytacazes, 2022.....47

- Figura 11** Estrutura genética do banco de germoplasma BAG-UENF/Caliman. Cada coluna representa um genótipo, sendo a coloração igual para mais de um genótipo indicativo de que eles pertencem à mesma população.....48
- Figura 12** Análise comparativa dos dendrogramas gerados por meio de Dendextend, utilizando os dados gerados pela análise das quatro características ligadas aos marcadores: FP: firmeza de polpa; EP – espessura de polpa; FF – firmeza de polpa; e TSS – teor de sólidos solúveis; e molecular utilizando os dados dos 12 marcadores SNPs utilizados.49
- Figura 13** Gráfico Boxplot da relação genótipo-fenótipo entre os 12 marcadores SNAP e quatro características ligadas à qualidade do fruto (FF, FP, TSS e EP). FF: firmeza de fruto; FP: firmeza de polpa; TSS: teor de sólidos solúveis; e EP: espessura de polpa. 11: loco homocigoto para bandas do parental 1 (Sekati), 22: loco homocigoto para bandas do parental 2 (JS12), 12: heterocigoto para bandas de ambos os parentais.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Banco de germoplasma do mamoeiro – UENF/Caliman, códigos de acessos, denominações estabelecidas no banco, grupo heterótico e categoria da amostra.....	18
Tabela 2 Relação das variáveis analisadas, suas respectivas abreviações nas imagens e discussão e a forma de mensuração de cada uma delas.....	23
Tabela 3 Marcadores selecionados contendo sua definição e suas respectivas características de associação.....	24
Tabela 4 SNAPs sintetizados contendo suas respectivas sequências e origem parental. S alelos oriundos do parental Sekati; J alelos oriundos do JS12.....	31
Tabela 5 Estatística descritiva para 11 características avaliadas em 41 genótipos do banco de germoplasma da UENF/Caliman.....	33
Tabela 6 Componentes principais e suas contribuições para variabilidade.....	43
Tabela 7 Análise descritiva dos 41 genótipos do BAG UENF/Caliman, heterozigosidade observada (H_o), coeficiente de endogamia (f).....	45

RESUMO

LIMA, Lucas Oliveira, M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, fevereiro de 2022. Caracterização e validação de marcadores moleculares associados à qualidade de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). Orientadora: Prof.^a Helaine Christine Cancela Ramos. Conselheiros: Prof. Messias Gonzaga Pereira e Prof.^a Telma Nair Santana Pereira.

Várias características são levadas em consideração para que o mamão seja considerado apto para o mercado, destacando-se, entre elas, firmeza de polpa e de fruto e concentração de sólidos solúveis. O estudo dos atributos que determinam a qualidade do fruto no mamoeiro é complexo, uma vez que se refere à análise de caracteres de herança quantitativa que sofrem elevada influência do ambiente. A utilização de marcadores moleculares pode acelerar o tempo de seleção para essas características em programas de melhoramento genético do mamoeiro por permitir a análise de um grupo maior de progênies em estágio inicial, além de proporcionar o ganho genético. Dessa forma, o presente trabalho visa a caracterizar e a validar marcadores SNAPs (*Single Base Amplified Polymorphism*), associados à qualidade de fruto em mamoeiro, buscando avaliar sua eficiência no processo de seleção de genótipos superiores para futura aplicação em seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) nos programas de melhoramento da cultura. Para tanto, foram analisados 41 genótipos de mamoeiro do Banco Ativo de Germoplasma UENF/Caliman, estabelecido em 2017 no município de Linhares – ES, sem utilização de delineamento experimental. Foram avaliadas as seguintes características: peso

médio de fruto (PMF), firmeza de fruto (FF), firmeza de polpa (FP), comprimento de fruto (CF), diâmetro de fruto (DF), comprimento da cavidade ovariana (CCO), diâmetro da cavidade ovariana (DCO), espessura de fruto (EP), volume de polpa (VP) e porcentagem de volume de polpa (%VP). A extração do DNA genômico das 41 amostras seguiu o protocolo CTAB (*Cetyltrimethylammonium bromide*) descrito por Doyle & Doyle. Estimou-se a dissimilaridade genética pela Distância Euclidiana Média pelo programa GENES. Em seguida, os dendrogramas gerados pelos dados fenotípicos foram obtidos pelo método de ligação média entre os grupos (UPGMA), assim como os dendrogramas dos dados gerados pelos marcadores moleculares. As relações existentes entre os acessos foram determinadas utilizando análise de componentes principais (PCA). O maior coeficiente de variação (CV%) apresentado foi para volume de polpa (78,50%), seguido por peso médio de fruto (75,25%). Percebeu-se que aqueles SNAPs com maiores frequências (AF) são também os com menores conteúdos de informação polimórfica (PIC), como os SNAPs correspondentes ao SNP1, SNP13, SNP6 e SNP8, que apresentaram AF igual ou superior a 0,90. A respeito da comparação dos dendrogramas o que se percebe é um alto nível de emaranhamento, que se dá pela não correspondência dos genótipos em ambos os agrupamentos analisados. Para a análise de boxplot, foi possível observar que marcadores como o SNP5 e o SNP8 estão potencialmente associados ao aumento de FF, FP, TSS e EP em diferentes formas de genótipos possíveis. Assim, conclui-se que os marcadores foram eficientes em caracterizar o banco. Para a comparação dos métodos de dissimilaridade utilizando a análise de dendextend, houve baixa semelhança no agrupamento dos genótipos em razão da avaliação simultânea de diversos caracteres. Todavia, para a análise de Boxplot, foi possível observar a associação dos genótipos de cada marcador individualmente para as quatro características potencialmente ligadas aos genes de interesse.

Palavras-chave: SAM; SNAP; Marcadores gênicos; Associação genética.

ABSTRACT

LIMA, Lucas Oliveira, M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, February 2022. Characterization and Validation of Molecular Markers associated with the quality of papaya fruits (*Carica papaya* L.). Supervisor: Prof. Helaine Christine Cancela Ramos. Counselors: Prof. Messias Gonzaga Pereira and Prof. Telma Nair Santana Pereira.

Several characteristics are taken into account for the fruit to be considered suitable for the market, among them, the following stand out: pulp and fruit firmness and concentration of soluble solids. The study of the attributes that determine the quality of the fruit in papaya is complex, since it refers to the analysis of quantitative inheritance characters that are heavily influenced by the environment. The use of molecular markers can accelerate the selection time for these traits in papaya genetic improvement programs, since it allows the analysis of a larger group of early stage progenies in addition to providing genetic gain. Thus, the present work aims to characterize and validate SNAPs (Single Base Amplified Polymorphism) markers associated with fruit quality in papaya, seeking to evaluate their efficiency in the selection process of superior genotypes for future application in molecular marker-assisted selection (SAM) in crop improvement programs. The planting of the germplasm bank had a total of 41 genotypes and was established in the Linhares city without using an established design. They were evaluated based on the 2017 experiment: average fruit weight (PMF); fruit firmness (FF); pulp firmness (FP); fruit length (CF); fruit diameter (DF); ovarian cavity length (OCC); diameter of the ovarian cavity (OCD); fruit thickness (EP);

pulp volume (VP); and pulp volume percentage (%VP). The extraction of genomic DNA from 41 samples belonging to the UENF/Caliman germplasm bank followed the CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) protocol described by Doyle & Doyle. Existing relationships between accessions were determined using principal component analysis (PCA). The genetic difference is estimated by the Mean Euclidean Distance through the GENES program. Then, the diagrams generated from the phenotypic data were obtained by the method of mean linkage between groups (UPGMA), as well as dendrograms of the data generated from the molecular markers. Existing relationships between accessions were determined by principal component analysis (PCA). The highest coefficient of determination (CV%) presented was for pulp volume (78.50%), followed by average fruit weight (75.25%). It was noticed that those SNAPs with higher frequencies (AF) are also the ones with the lowest polymorphic information content (PIC), such as the SNAPs corresponding to SNP1, SNP13, SNP6 and SNP8, which presented AF equal to or greater than 0.90. Regarding the comparison of the dendrograms, what is perceived is a high level of entanglement, which is due to the non-correspondence of the genotypes in both dendrograms analyzed. And for the Boxplot analysis it was possible to observe that markers such as SNP5 and SNP8 are potentially associated with the increase of FF, FP, TSS and EP in different forms of possible genotypes. Thus, it is concluded that the markers were efficient in characterizing the bank, and for the comparison of dissimilarity methods using dendextend analysis, there was a low similarity in the grouping of genotypes, because several characters were being evaluated simultaneously. However, for the Boxplot analysis, it was possible to observe the association of the genotypes of each marker individually for the four characteristics potentially linked to the genes of interest.

Keywords: MAS; SNAP; Gene markers; Genetic association.

1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma cultura amplamente cultivada nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Chen et al., 1991), sendo apreciada ao redor do globo em razão das características ligadas a seus frutos, incluindo sabor agradável, qualidade nutricional e propriedades digestivas (Aravind et al., 2013). Além disso, o fruto do mamoeiro tem preço acessível e disponibilidade no mercado durante todo o ano, independentemente do clima e da estação (Ahmad et al., 2013).

No Brasil, o cultivo do mamoeiro ocorre em todas as regiões e em quase todos os estados, com destaque para os estados da Bahia e do Espírito Santo, considerados os maiores produtores e exportadores de mamão do país, respectivamente (IBGE, 2017). Atualmente, os principais países produtores de mamão são a Índia, com 6.050.000 milhões de toneladas, seguida pela República Dominicana, com 1.171.336 milhão de toneladas, Brasil, com 1.161.808 milhão de toneladas, e México, com 1.083.133 milhão de toneladas (FAO, 2020).

Várias características são levadas em consideração para que o fruto seja considerado apto para o mercado, entre as quais, podem ser citadas aquelas que mais agregam valor comercial aos frutos como peso, comprimento, diâmetro, forma, cor, firmeza e teor de sólidos solúveis. Destas características, as duas últimas apresentam grande importância, haja vista que são responsáveis pela durabilidade do fruto pós-colheita e pelo paladar adocicado, respectivamente (Luz et al., 2015; Nantawan et al., 2019).

Considerando o alto potencial econômico, principalmente no âmbito da fruticultura (Statista, 2020), o desenvolvimento de estudos relacionados a caracteres de qualidade de fruto em mamoeiro tem sido um dos objetivos dos programas de melhoramento genético da UENF.

No entanto, a determinação da qualidade do fruto é complexa em decorrência da natureza da herança desses caracteres, cuja expressão é altamente influenciada pelo ambiente (Klosin et al., 2017). Desse modo, fatores como regime hídrico, temperatura, incidência de pragas, exposição à luz e maturidade dos frutos na época de colheita podem afetar diretamente sua qualidade (Moretti et al., 2010).

Outro aspecto a ser considerado é o estágio de maturação, uma das principais dificuldades encontradas no processo de avaliação e seleção de genótipos superiores, pois são necessários três frutos por planta no mesmo estágio de maturação na avaliação de populações segregantes ou cinco frutos por parcela quando são avaliados os híbridos (Marinho et al., 2008).

A avaliação de caracteres de frutos, quando feita tradicionalmente se torna demorada, porém eficaz, pois possibilita também a verificação de estrutura genética da população avaliada e a diversidade genética presente, auxiliando, assim, na identificação de genitores promissores e na exclusão de acessos repetidos (Cruz et al., 2014).

A identificação de genes associados a características de interesse econômico na cultura do mamoeiro também possibilita seu conhecimento genômico e a compreensão de sua funcionalidade, tal como a descoberta de variantes SNPs e InDels relacionados a características de qualidade de fruto em mamoeiro (Bohry et al., 2021). O desenvolvimento de marcadores moleculares com base em tais variantes pode acelerar o tempo de seleção em programas de melhoramento genético de fruteiras, permitindo uma análise mais ampla de progênies em estádios iniciais, além de proporcionar ganhos genéticos com a seleção (Xu, 2008).

Os marcadores SNAPs (*Single Base Amplified Polymorphism*), por exemplo, são uma metodologia baseada nos marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e em sua natureza bialélica (Bohry, 2018). Sabe-se que essas ferramentas se referem à genotipagem de uma variação tipo SNP e,

posteriormente, à seleção das sequências desenhadas a partir de regiões vizinhas do marcador, tanto *up* quanto *downstream* (Drenkard et al., 2000).

Os marcadores do tipo SNAP foram desenvolvidos para identificar os diferentes alelos de um SNP via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando desenhos de iniciadores específicos (Drenkard et al., 2000). Embora existam outros tipos de marcadores disponíveis para PCR, os SNAPs oferecem um sistema de detecção mais acessível por usar apenas um ensaio simples à base de gel de agarose e não requerem o uso de enzimas de restrição (Kim et al., 2005).

Outro aspecto relevante é que os marcadores precisam ser efetivos, eficientes e confiáveis. Para isso, é necessário que eles sejam validados, ou seja, deve-se proceder à verificação de sua eficiência para aplicação em estudos posteriores de seleção de genótipos superiores (Alzate-Marin et al., 2005). Como por exemplo, na seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) associada aos métodos tradicionais de melhoramento, o que torna possível a seleção de características desejadas na cultura estudada diretamente no nível de DNA (Idress e Irshad, 2014). Dessa forma, estudos a respeito do fruto e de caracteres que lhe agregam qualidade e valores bem como à sua caracterização molecular têm sido um dos focos dos programas de melhoramento genético da cultura do mamoeiro.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar e validar marcadores SNAPs associados à qualidade de fruto em mamoeiro, buscando avaliar sua eficiência no processo de seleção de genótipos superiores para futura aplicação em seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) nos programas de melhoramento da cultura.

2.2 Específicos

A. Avaliar fenotipicamente o banco de germoplasma com relação a características ligadas qualidade de fruto;

B. Fazer a análise molecular dos genótipos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da UENF/CALIMAN com os marcadores SNAPs para qualidade de fruto;

C. Estimar a diversidade genética do BAG UENF/CALIMAN com os dados fenotípicos e moleculares; e

D. Verificar a associação dos marcadores com os caracteres de qualidade de fruto para validá-los.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Origem, dispersão, aspectos botânicos e reprodutivos do mamoeiro

O mamoeiro, de acordo com a classificação taxonômica de Badillo (2000), pertence à classe das dicotiledôneas, subclasse Chichlamydeae, ordem Violales, subordem Caricineae, família Cariaceae, gênero *Carica*, espécie *Carica papaya* L.

A família Cariaceae está dividida em seis gêneros nos quais são inseridas aproximadamente 35 espécies no total, sendo eles: gênero *Cylicomorpha* (duas espécies), geralmente de grande porte, presentes na África ocidental; *Horvitzia* (uma única espécie), espécie endêmica do México; *Jarilla* (três espécies), que apresenta espécies de porte arbustivo perene, presente no México e na Guatemala; *Jacaratia* (oito espécies), presente desde o sul do Brasil até o México; *Vasconcelea*, com aproximadamente 20 espécies, sendo suas espécies arbóreas e 5% são trepadeiras; e *Carica*, com uma única espécie, *Carica papaya* (Carvalho e Renner, 2012).

A respeito da origem da espécie *C. papaya*, estudos apontam que seu centro de origem é dividido entre as regiões do México, América Central e parte norte da América do Sul (Agarwal et al., 2016). A hipótese mais aceita sugere que essa espécie tenha sido originada na região Noroeste da América do Sul, mais especificamente na porção superior da Bacia Amazônica. Essa hipótese é sustentada pelo fato de que essa região concentra alta diversidade de mamoeiro (Badillo, 1971; Dantas et al., 2013).

Do ponto de vista botânico, o sistema radicular do mamoeiro é pivotante, estendendo-se nos primeiros 30 cm de solo, contudo, em alguns casos, pode alcançar camadas mais profundas do solo de até duas vezes sua altura (Dantas e Castro, 2000). Além disso, o mamoeiro tem crescimento rápido, podendo atingir alturas entre 3 e 8 metros, com caules de até 0,20 m de diâmetro, normalmente, eretos e marcados por grandes cicatrizes foliares (Srivastava e Singh, 2016).

Considerando o conjunto cromossômico, o mamoeiro é uma planta diploide com $2n=2x=18$ cromossomos, caracterizada como trioica, indicando ocorrência de indivíduos com flores estaminados (característica das plantas masculinas e ausência de frutos, a menos que sofra reversão sexual), pistilados (presente em plantas femininas) e flores hermafroditas (decorrente de plantas com estruturas sexuais tanto femininas quanto masculinas) (Medina e Cordeiro, 1994; Damasceno et al., 2010).

A determinação sexual para as plantas do mamoeiro é regulada geneticamente pelo emparelhamento dos cromossomos sexuais. As regiões ligadas à determinação destas características comportam-se como um cromossomo XY (Vanburen et al., 2015). Desse modo, as combinações cromossômicas para as plantas masculinas, femininas e hermafroditas são XY, XX e XYh, respectivamente (Liu et al., 2004; Ma et al., 2004).

A diferenciação morfológica das plantas nas fases juvenil/vegetativa depende da estrutura floral e da composição genômica presente em seus cromossomos sexuais. A existência de diferenças entre os cromossomos X e o cromossomo Yh é responsável pela diferenciação fenotípica entre as plantas femininas e hermafroditas. Por outro lado, os cromossomos Y e Yh têm aproximadamente 99,60% de semelhança, o que torna difícil a explicação de quais diferenças entre estas plantas são responsáveis por seus fenótipos (Wang et al., 2012; Liao et al., 2017). Todavia, há indícios de que entre os cromossomos Y e Yh existem pelo menos dois genes, um responsável pela formação do pedúnculo e o outro, pelo aborto do carpelo nas flores masculinas (Ming et al., 2007).

O desenvolvimento na cultura do mamão é determinante para a produção do fruto e dependente de fatores abióticos como temperatura, por exemplo. O desenvolvimento satisfatório dessas estruturas reprodutivas ocorre em temperaturas na faixa de 22°C a 26°C (Souza et al., 2013), enquanto a

exposição a temperaturas altas (40° C) ou baixas (15° C) causa deformações nos frutos (Tamaki et al., 2011). Esse comportamento da cultura explica o fato de o fruto do mamão ser considerado tipicamente tropical com ampla distribuição pela América (Oliveira et al., 2011), principalmente no Brasil, onde o cenário é favorável para seu desenvolvimento.

Outro aspecto relevante é a reprodução autógama facultativa com cleistogamia do mamoeiro (Damasceno Junior et al., 2009), tornando viáveis o cultivo e a exploração de híbridos e linhagens, conferindo uma grande vantagem para a expansão da cultura.

Entretanto a escolha de cultivares para comercialização de mamoeiro é limitada por conta de sua base genética estreita, o que dificulta a escolha de novas opções de comercialização (Marin, 2001). Por esse motivo, programas de melhoramento genético do mamoeiro têm objetivado a ampliação da base genética da cultura pelo desenvolvimento de híbridos e variedades com características de interesse, incluindo resistência a doenças, tolerância a variações ambientais, além de superioridade agrônômica (Pereira et al., 2015).

3.2 Valor econômico da cultura

O mamoeiro é uma fruteira de grande relevância em razão de suas múltiplas aplicações, sejam elas no consumo *in natura* ou em conservas e doces. Os frutos têm alto teor de vitaminas, minerais e proteínas/enzimas, como a carpaína e a papaína, bastante utilizadas na indústria têxtil e na medicina, respectivamente (Arango et al., 2010). Além disso, o cultivo e a produção do mamoeiro ocorrem durante todo o ano, proporcionando geração de empregos regulares e fixos em todas as fases de manejo (Martins e Costa, 2003).

A produção mundial de mamão está concentrada no Brasil, Indonésia, Índia, Nigéria e México (Araújo, 2017). O mamão vem se tornando cada vez mais popular no mercado, tendo sido considerado, em 2018, a 17^o fruta tropical mais produzida no mundo (Statista, 2020) e a sexta fruta fresca a nível nacional (Mdc/Secex, 2020). A fruticultura brasileira é uma importante fonte de renda para o país, tendo respondido por cerca de R\$ 37 bilhões de reais somente no ano de 2017. Desse total arrecadado, aproximadamente R\$ 927 milhões são oriundos da

cultura do mamoeiro, representando mais de 4% de toda a produção (IBGE, 2020).

No Brasil, o mamoeiro é cultivado em todas as regiões, destacando-se como principais produtores os estados da Bahia (337,151 t.), Espírito Santo (354,405 t.), Ceará (100,033 t.), Rio Grande do Norte (81,258 t.) e Minas Gerais (50,061 t.) (IBGE, 2019). Somente no ano de 2018, a produção nacional alcançou 1,06 milhões de toneladas, conduzindo o Brasil para o patamar de segundo maior produtor e o terceiro maior exportador da fruta (Faostat, 2020).

Apesar de não mais se apresentar como um dos principais locais na produção e exportação do mamoeiro, foi na cidade de Monte Alto – SP, que a produção comercial dessa cultura teve início. A partir do ano de 1967, ocorreu um processo de migração do cultivo da cultura para os estados do Pará, Bahia e Espírito Santo em virtude da incidência do vírus ‘mosaico do mamoeiro’ (Ruggiero et al., 2011).

Atualmente, os estados do Espírito Santo e Rio Grande do Norte são os dois principais exportadores de mamão do país. O estado do Espírito Santo arrecadou o equivalente a US\$ 15.400.000 com a exportação do mamoeiro (CNA, 2017).

3.3 Qualidade de fruto em mamoeiro

Os frutos do mamoeiro são reconhecidos por apresentarem respiração climatérica, ou seja, o processo de amadurecimento dos frutos continua mesmo após a sua colheita (Barros et al., 2019). Essa característica fisiológica viabiliza a identificação do estágio de maturação e a determinação do momento adequado de colheita, auxiliando o trabalho dos produtores (Fabi et al., 2012; Shen et al., 2017; Zucchini et al., 2017). Além disso, a mudança de coloração dos frutos do mamão é um atributo que está diretamente associado à aceitação comercial (Neves, 2019).

Outra característica apreciada pelos consumidores refere-se à firmeza da polpa ou do fruto do mamão (Cuquel et al., 2012). Esses caracteres de qualidade de fruto são importantes na cadeia de produção da cultura, pois estão associados ao amadurecimento dos frutos, o que reduz a vida útil pós-colheita, revelando-se

um grande obstáculo a ser superado nas etapas de armazenamento e transporte da produção a longas distâncias (Hanif et al., 2020).

A firmeza atribuída aos frutos do mamão é decorrente da constituição da sua parede celular composta por polissacarídeos como β -glucanos, galacturonanos, arabinanos e galactanos, além de compostos secundários adicionais como glicoproteínas, enzimas, minerais e compostos fenólicos. A polpa por sua vez é formada por celulosas, hemicelulose e pectinas, principalmente galacturanas. A degradação e a solubilização desses componentes contribuem para redução da adesão entre as células, resultando na perda de consistência, deixando os frutos amolecidos durante o amadurecimento (Shiga et al., 2009).

Para características de firmezas, os alelos recessivos, em sua grande maioria, atuam para o aumento da média dessa variável, enquanto para o teor de sólidos solúveis, os alelos dominantes são os que mais contribuem para este aumento (Cardoso et al., 2015). Quando se trata de regiões genômicas associadas à qualidade de fruto, Bohry et al. (2021) encontraram SNPs e InDels relacionados à qualidade do fruto em, aproximadamente, 143 genes potencialmente associados ao processo de amadurecimento dos frutos, tendo sido 55 deles associados à parede celular.

O teor de sólidos solúveis e a acidez titulável são importantes na avaliação da qualidade do fruto, pois contribuem para o seu sabor mais harmônico (Kader, 1999). Outro aspecto é a variação de pH dos frutos, sendo mais apreciados aqueles que têm baixos valores de acidez e elevada quantidade de teor de sólidos solúveis (Reis et al., 2015), que estão relacionados com a quantidade de açúcar presente na polpa do fruto (Barros et al., 2019), ou seja, quanto maior a concentração de teor de sólidos solúveis, mais adocicada será a polpa (Nunes et al., 2017).

Esse caráter adocicado dos frutos tem herança complexa, regulada por diversas regiões QTLs (*Quantitative Trait Loci*), sendo objeto de estudo em diversas frutíferas como morango e maçã (Lerceteau-Kohle et al., 2006; Guan et al., 2015). No mamão, o mapeamento de regiões gênicas relacionadas ao teor de açúcar do fruto identificou cinco QTLs associados a caracteres de firmeza do fruto (endocarpo, mesocarpo, epicarpo), manchas na casca, largura e comprimento do fruto e doçura da polpa (Nantawan et al., 2019).

3.4 Diversidade genética no melhoramento de plantas

Estudos de diversidade genética são de fundamental importância para a condução dos trabalhos dos melhoristas e para as atividades de conservação em bancos de germoplasma. A obtenção das medidas de dissimilaridade entre os acessos fornece ao curador subsídios em atividades de seleção de genitores promissores para cruzamentos, gerando híbridos com características desejáveis, além de eliminar duplicatas na coleção (Cruz et al., 2014).

A estimativa da diversidade genética fundamenta-se na variação existente entre os acessos analisados. A obtenção de dados geralmente envolve medidas numéricas, distribuições por classes ou combinações de múltiplas variáveis (Mohammadi et al., 2004), incluindo as de natureza quantitativa (altura de planta, peso dos frutos, número de sementes, dias para floração etc.) e qualitativa (cor e formato de fruto, presença ou ausência de característica específica e marcador molecular) (Gonçalves et al., 2009).

Desse modo, diferentes abordagens metodológicas são empregadas para estimar a distância genética entre indivíduos, a exemplo das variáveis canônicas componentes principais, métodos aglomerativos (método de ligação média entre os grupos), Tocher etc. A escolha do método varia de acordo com a organização e a forma de obtenção dos dados, (Cruz et al., 2014), sejam eles morfoagronômicos, morfológicos ou moleculares (Bered et al., 2002).

Na cultura do mamoeiro, estudos de diversidade genética já vêm sendo feitos em acessos pertencentes a banco de germoplasma visando à sua aplicação em programas de melhoramento genético, como, por exemplo: Ramos et al. (2012), que avaliaram a distância genética entre progênies segregantes utilizando marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*); Saran et al. (2015), que verificaram a variabilidade em acessos de um banco de germoplasma na Índia, também utilizando marcadores RAPD, ISSR e caracteres morfoagronômicos; e Vivas et al. (2018), que analisaram a diversidade entre linhagens e sua relação com resistência a doenças.

3.5 Melhoramento genético do mamoeiro

Os primeiros trabalhos genéticos envolvendo a cultura do mamoeiro foram feitos para elucidar o mecanismo de funcionamento da herança do sexo da cultura (Hofmeyr, 1938; Storey, 1938; Horovitz, 1954). A partir de então, estudos foram desenvolvidos com diferentes abordagens, visando à obtenção de genótipos superiores que elevem o valor econômico da cultura, aspecto bastante apreciado em programas de melhoramento de plantas (Borém e Miranda, 2009).

Apesar de o mamoeiro não ser nativo do Brasil, essa cultura representa uma das principais frutíferas no cenário nacional em razão da sua ampla adaptação às condições endofoclimáticas do país. Todavia poucos são os programas de melhoramento genético direcionados ao desenvolvimento de cultivares. Por esta razão, até alguns anos atrás, toda área destinada à produção do Brasil era cultivada com híbridos oriundos da importação de sementes (Pereira et al., 2020).

As principais instituições responsáveis pela pesquisa na área de melhoramento genético do mamoeiro no Brasil são: Instituto Capixaba de Pesquisa e Extensão Rural (INCAPER), no estado do Espírito Santo; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Mandioca e Fruticultura), localizada no estado da Bahia; e Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), localizada no estado do Rio de Janeiro.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF estabeleceu o programa de melhoramento genético do mamoeiro em parceria com a Empresa Caliman Agrícola S/A, em meados de 1996, objetivando o desenvolvimento de genótipos superiores para contribuir com o agronegócio nacional. O programa sustenta-se em seis pilares básicos: melhoramento clássico, utilização de ferramentas citogenéticas, genética molecular, fisiologia pós-colheita, resistência a doenças e bioinformática (Pereira et al., 2020).

Desse modo, foi possível o desenvolvimento de diferentes pesquisas dentro do programa de melhoramento genético da UENF, incluindo pesquisas relacionadas aos aspectos morfo-anatômicos das sementes (Santos et al., 2009), aspectos citogenéticos básicos e aplicados (Damasceno Junior et al., 2008, 2009, 2010; Freitas et al., 2013), conversão sexual (Silva et al., 2007), sexagem molecular (Duarte et al., 2020), diversidade genética (Ramos et al., 2011, 2012),

heterose (Cardoso et al., 2015), seleção recorrente (Santa-Catarina et al., 2020), controle genético (Cardoso et al., 2015), desenvolvimento de linhagens (Cortes et al., 2019), fenotipagem baseada em imagem digital (Cortes et al., 2017; Santa-Catarina et al., 2018), capacidade combinatória (Barros et al., 2017), topcross (Vettorazzi et al., 2021), análise dialélica (Cardoso et al., 2017), identidade genética (Pirovani et al., 2018), fisiologia em pós-colheita (Silva et al., 2015), análise proteômica (Vale et al., 2014, 2016), resistência a doenças (Vivas et al., 2010, 2011, 2014, 2015; Oliveira et al., 2018), identificação de marcadores moleculares ligados à qualidade de frutos (Bohry et al., 2021), entre outros.

Durante os 20 anos de condução do programa de melhoramento genético da UENF, foram desenvolvidos e lançados mais de 21 híbridos, registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Entre esses híbridos, pode ser citado o híbrido 'UENF/CALIMAN 01', também conhecido como 'Calimosa', amplamente comercializado no Brasil. Todos os híbridos obtidos nesse programa de melhoramento representam novas opções de tamanho, qualidade e rendimento dos frutos para os produtores nacionais (Pereira et al., 2015; Pereira et al., 2018). Entre as 63 cultivares disponíveis para os produtores brasileiros no MAPA, 21 são oriundas do programa da UENF em parceria com a Caliman Agrícola S/A (Azevedo, 2019).

3.6 Marcadores moleculares no melhoramento genético

O emprego de marcadores é uma ferramenta útil para detecção de variações no genoma e análise mais detalhada do funcionamento genético das plantas (Borém e Caixeta, 2009). Esses marcadores são subdivididos em dois grandes grupos, os que agem através da hibridação, aqueles que se utilizam da amplificação e os oriundos de sequenciamento (Zolet et al., 2017).

O desenvolvimento dos marcadores moleculares ocorreu em paralelo com os avanços da genômica, possibilitando sua aplicação no melhoramento genético e na obtenção de novas cultivares (Moose e Mumm, 2008). Entre as formas como os marcadores podem ser empregados, uma comumente utilizada é o mapeamento genético ou mapa de ligação, definido como agrupamento estrutural de genes, cuja distância é estabelecida pelos marcadores (Scuster e Cruz, 2004).

Os mapas genéticos podem ser compostos por diferentes tipos de marcadores, desde os baseados em hibridização, como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), até aqueles baseados em PCR, como RAPD, SSR (*Simple Sequence Repeats*), SCAR (*Sequence Charaterized Amplified Region*) e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Este último marcador vem sendo mais utilizado para esta finalidade pela sua abundância nos genomas animais e vegetais (Khlestkina e Salina, 2006), pela rapidez de obtenção e economia de tempo para os programas de melhoramento (Steemers e Gunderson, 2007).

Além disso, os SNPs apresentam elevado polimorfismo, o que permite a geração de um volume considerável de informação genética a cada ensaio realizado (Chagné et al., 2007). São marcadores geneticamente mais estáveis e passíveis de automatização (Vignal et al., 2002). Por esse motivo, vem se tornando cada vez mais frequente a utilização de marcadores SNPs, oriundos de marcadores SNPs, tendo como base as regiões que os circundam.

O marcador mais simples que pode ser desenvolvido utilizando SNP é o polimorfismo de única base amplificado (SNAP) (Pesik et al., 2017). Esses marcadores podem ser aplicados para analisar a diversidade genética, análise de parentesco entre plantas, dispersão polínica (Singh et al., 2013; Larekeng et al., 2015) e mapeamento genético de características de interesse (Xu et al., 2007). É um método rápido, simples, e confiável quando comparado com os métodos tradicionais de caracterização (Drenkard et al., 2000).

Os marcadores SNPs são caracterizados como *primers* que contêm uma única incompatibilidade de base com a extremidade 3' de um alelo (o alelo específico) (Kim et al., 2005). Após a amplificação por PCR, os SNPs podem ser facilmente genotipados pela detecção de presença ou ausência dos produtos de PCR em géis de agarose padrão (Xu et al., 2007).

Com a ampla utilização de mapas genéticos e a contínua descoberta de marcadores ligados a fenótipos importantes dentro dos cruzamentos, uma nova fase da tecnologia de marcadores deve ser levada em consideração: a validação dos marcadores associados a características de interesse. Esse processo de validação se mostra de suma importância para avaliar a utilidade das pesquisas e relatórios publicados (Sharp et al., 2001), além de ser necessário para que uma

seleção assistida por marcadores seja aplicada no programa de melhoramento genético (Silva et al., 2007).

3.7 Validação de marcadores moleculares

Marcadores moleculares têm ampla aplicabilidade no melhoramento genético. Na cultura da goiabeira, marcadores SSR foram utilizados para mediar o acesso a regiões genéticas de interesse em populações oriundas de cruzamentos interespecíficos (Santos et al., 2020). Já no mamoeiro, marcadores moleculares foram empregados para sexar plantas através de sementes (Duarte et al., 2020).

Os SNPs, por sua vez, já foram aplicados em trabalhos de sequenciamento, diversidade genética e estrutura populacional de trigo (Kumar et al., 2020). Além disso, esse marcador possibilitou selecionar regiões gênicas relacionados à produção de glutenina, permitindo a identificação precoce de subunidades que apresentavam alto peso molecular (Ravel et al., 2020).

A utilização de marcadores moleculares oriundos de sequenciamento vem crescendo cada vez mais pela facilidade de automação (Anderle, Guimarães e Kawakami, 2021), abundância no genoma (Khlestkina e Salina, 2006) e especificidade. Todavia, no melhoramento genético, a utilização desses marcadores em seleção de genótipos necessita de maior confiabilidade.

A identificação de marcadores candidatos é iniciada com a criação de mapas de ligação por meio da identificação de QTLs, podendo estes candidatos ser oriundos do sequenciamento de populações segregantes com número de indivíduos variando de 50 a 200 (Mohan et al., 1997). Após a identificação de QTLs, regiões gênicas associadas ou localizadas nesses locos têm suas sequências sintetizadas em *primers*. Por se tratar de pontos únicos no genoma, alterações específicas que interagem com a expressão do gene, normalmente são utilizados os marcadores SNPs (Koebner e Summers, 2003). E então, para que esses marcadores sintetizados sejam considerados adequados para estudos de Seleção Assistida por Marcadores (SAM), é necessário que eles sejam validados (Sharp et al., 2001).

Na etapa de validação, busca-se verificar a especificidade dos marcadores produzidos para diferenciar os genótipos analisados com base no fenótipo associado. Para isso, são necessárias avaliações comparativas de natureza

morfológica e molecular na população na qual os marcadores foram identificados (Trebbi et al., 2019). Em alguns casos, esses marcadores são gerados em populações oriundas de cruzamentos extras (Kim et al., 2018), verificando a complementariedade dos resultados obtidos por ambas, e, assim, observar se os marcadores são realmente relacionados com as características em questão.

Dessa forma, é importante que as etapas utilizadas em um estudo de validação sejam realizadas de forma correta e apresentem resultados fidedignos, tornando possível que, ao obter os padrões moleculares por parte dos marcadores, os resultados fenotípicos sejam então comparados. Tal como pode ser percebido no trabalho de Kim et al. (2018), que estudaram a resistência à murcha bacteriana em tomate e observaram presença de padrões moleculares em plantas avaliadas como resistentes nas análises fenotípicas.

O trabalho de Singh et al. (2015) também validou marcadores utilizando mais de uma população, tendo utilizado três populações ao todo, contando com aquela da qual os marcadores foram identificados e sintetizados. Os pesquisadores deste trabalho identificaram marcadores eficientes na identificação de genótipos resistentes e susceptíveis à ferrugem branca em mostarda indiana (*Brassica juncea* L.). A depender de qual análise se esteja fazendo, a validação pode se dar não somente por comparação molecular-fenotípica, mas também por verificação de padrões cromossômicos já conhecidos e pela presença de marcadores moleculares nesta região, por meio de técnicas fluorescentes (Cseh et al., 2019).

Portanto, etapas de avaliação fenotípica e genotípica são comuns a todo processo de validação. Estudos nessa vertente são importantes, pois é durante essa etapa que é verificada a eficácia dos marcadores na determinação do fenótipo em diferentes origens genéticas e em novas populações, distintas daquela em que a ligação marcador-característica foi originalmente estabelecida (Barr et al., 2000).

Após a realização das etapas de validação, as análises que podem ser feitas para a avaliação conjunta dos resultados, tanto fenotípicos quanto moleculares, são as análises de modelos lineares, como o trabalho de Chen et al. (2021), que utilizaram modelos lineares na avaliação de acessos do gênero *Populus* por intermédio de dados obtidos através de marcadores moleculares SNPs. Outro exemplo é o trabalho de Tolhurst et al. (2019), que fez uso de

modelo linear múltiplo em programa de melhoramento de diversas espécies arborícolas em multiambiente.

3.8 Seleção assistida por marcadores moleculares (SAM)

A avaliação e a classificação de uma planta como comercial ou não comercial são feitas com base na verificação de suas características de interesse agrônomo (Capistrano et al., 2021; Meier et al., 2021). Nesse processo, são considerados os marcadores morfológicos, porém, com o avanço das tecnologias, tem se tornado cada vez mais comum a utilização de marcadores moleculares para avaliar e selecionar plantas superiores.

A Seleção Assistida por Marcadores (SAM) é uma técnica baseada na seleção de genótipos que apresentam caracteres desejáveis pela sua avaliação por marcadores genéticos (Collard et al., 2005). A utilização destas ferramentas no melhoramento de plantas, quando desenvolvidas corretamente, aumenta a eficiência e a eficácia da obtenção de plantas superiores, em comparação com outros métodos convencionais, visto que os marcadores genéticos não sofrem influência do ambiente em sua expressão e podem estar intimamente ligados aos genes ou QTLs de interesse (Ribaut et al., 1997; Collard et al., 2005).

Entre as vantagens apresentadas pela aplicação da SAM, Collard et al. (2005) apontam economia de tempo com substituições e cuidados do campo por análises moleculares que podem ser feitas no estágio inicial das plantas, eliminação de sucessivas avaliações morfológicas feitas em razão dos efeitos ambientais, diminuição do efeito de transferência de genes indesejáveis e deletérios, seleção de características de baixa herdabilidade e rapidez na avaliação por ser feita ainda na fase de plântula.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material genético e área experimental

Foram analisados 41 genótipos pertencentes ao banco ativo de germoplasma da UENF (BAG-UENF/Caliman) (Tabela 1). O plantio do BAG foi estabelecido no município de Linhares – ES, sem utilização de delineamento. O experimento contava com os genótipos semeados em linhas, tendo sido cada genótipo semeado em 10 pontos distintos do experimento, repetidos em sequência numa mesma linha sem aleatorização e sem divisão de blocos.

O banco é montado rotineiramente para renovação das sementes, tendo sido o plantio feito em 2017 e o mais recente, em 2020. Os dados morfológicos utilizados nessa pesquisa foram mensurados segundo avaliação das imagens digitais do banco plantado em 2017 pelo fato de neste ano as condições experimentais terem sido menos agravantes e o número de frutos avaliados por genótipo ter sido mais homogêneo (próximo de cinco frutos por planta), tendo o material genético sido extraído das folhas coletadas no experimento de 2020, ano de realização desta pesquisa.

Foram coletadas folhas das repetições de cada genótipo ao longo das linhas e da junção do material em um único envelope, cerca de três a cinco folhas de cada genótipo, com exceção dos genótipos dioicos, que tiveram folhas coletadas e reservadas separadamente em razão da existência de variação genética entre as diferentes plantas. Após a coleta do material foliar no campo

experimental da empresa Caliman, as folhas foram levadas para a UENF, onde foram mantidas em freezer -80° C no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV).

Tabela 1. Genótipos do banco de germoplasma do mamoeiro – UENF/Caliman, códigos de acessos, denominações estabelecidas no banco germoplasma, grupo heterótico e tipo de população.

Genótipo	Denominação	Grupo	Tipo de população
BAG1	Caliman M5	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG2	Sunrise solo 783	Solo	Ginoico-Andromonoico
BAG3	Costa rica	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG4	Triwa ET	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG5	Diva	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG6	Grampola	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG7	Surinse Solo	Solo	Ginoico-Andromonoico
BAG8	Caliman AM	Solo	Ginoico-Andromonoico
BAG10	Caliman SG	Solo	Ginoico-Andromonoico
BAG13	Kapoho Solo (polpa amarela)	Solo	Ginoico-Andromonoico
BAG14	Baixinho de Santa Amália	Solo	Ginoico-Andromonoico
BAG15	Sunrise Solo TJ	Solo	Ginoico-Andromonoico
BAG16	Tailândia	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG17	São Mateus	Solo	Ginoico-Andromonoico
BAG18	Kapoho Solo (polpa vermelha)	Solo	Ginoico-Andromonoico
BAG19	Sunrise solo (Sel. Caliman)	Solo	Ginoico-Andromonoico

Tabela 1 – Cont.

Genótipo	Denominação	Grupo	Tipo de população
BAG23	Maradol (orig. México)	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG24	Maradol (grande limão)	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG26	Baixinho Super	Solo	Ginoico-Andromonoico
BAG27	Americano	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG29	STZ – 52	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG32	Cariflora 209	Formosa	Dioico
BAG33	Golden tipo Formosa	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG34	STZ-03 pecíolo curto	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG35	Sta Helena III – trat 12aplt07x	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG36	Sta Helena III – trat 11aplt08x	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG38	Sta Helena III –trat 02 plt 01x	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG39	Sta Helena III – trat 14 plt 05x	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG40	Sta Helena III – trat 15 plt 04x	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG41	Sta Helena III – tra 04 plt 02x	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG42	Sta Helena III – trat 12b plt 06x	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG43	Papaya 42 formosa	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG44	Papaya 45 Formosa roxo	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG45	Papaya 46 claro	Formosa	Ginoico-Andromonoico
BAG46	Furto médio verde	-----	Ginoico-Andromonoico
BAG50	Lúcia	-----	Ginoico-Andromonoico
BAG51	Parreitena	-----	Ginoico-Andromonoico

Tabela 1 – Cont.

Genótipo	Denominação	Grupo	Tipo de população
BAG53	Grand golden	Solo	Ginoico- Andromonoico
BAG56	Genótipo 39 plt 03 bl II – Laercio	-----	Ginoico- Andromonoico
BAG58	Cimarron	-----	Dioico
THB	THB	-----	Ginoico- Andromonoico

4.2 Avaliação fenotípica

4.2.1 Características avaliadas

Foram avaliadas a partir de cinco frutos por genótipo as seguintes características: peso médio de fruto (PMF), expresso em gramas; firmeza de fruto (FF), expressa em newton (N); firmeza de polpa (FP), também expressa (N); teor de sólidos solúveis (TSS), expresso em °Brix; comprimento de fruto (CF); diâmetro de fruto (DF); comprimento da cavidade ovariana (CCO); diâmetro da cavidade ovariana (DCO); espessura de fruto (EP), todos estes últimos expressos em centímetros; volume de polpa (VP), expresso em cm³; e porcentagem de volume de polpa (%VP), expressa em porcentagem.

O processo de caracterização se deu por meio de fenotipagem por imagem digital, seguindo o modelo estipulado por Santa-Catarina et al. (2018) para sete das características avaliadas (CF, DF, CCP, DCO, EP, VP e %VP), obtidas por meio de escaneamento digital (Figura 1), através do programa Image J.

As plantas tiveram seus frutos em estágio 1 retirados e levados para o laboratório de avaliação da empresa Caliman Agrícola, onde tiveram uma parte de suas características mensuradas (FF, FP, TSS, PMF) e seus frutos fotografados para avaliação pelo programa computacional Image J. Ao todo, 12 variáveis ligadas aos frutos do mamoeiro foram avaliadas.



Figura 1. Avaliação fenotípica das características ligadas ao fruto, utilizando o programa Image J. Frutos pertencentes aos genótipos BAG 7 (Surinse Solo) e BAG 53 (Grand Golden).

A avaliação fenotípica das variáveis ocorreu com a utilização de aparelhos específicos. Para a mensuração do peso dos frutos foi utilizado uma balança digital. As firmezas de polpa e de fruto foram realizadas com o auxílio de um penetrômetro de bancada (Fruit Tester, Italy; modelo 53205). A utilização desse equipamento baseia-se na perfuração do fruto avaliado em três pontos equidistantes de cada face, sendo que, para a firmeza do fruto, esses pontos apresentavam uma distância de 0,5 cm da casca, e o valor alcançado tem sua unidade de medida em Newton (N), sendo necessário retirar a média das mensurações para cada fruto.

O teor de sólidos solúveis foi mensurado utilizando um refratômetro portátil ATAGO N1, que tem leituras na faixa de 0 a 32°, equipamento no qual ocorre a mensuração indireta da quantidade de açúcares contida no suco do fruto, a unidade de medida dessa variável é dada em °Brix. E as demais características avaliadas nesse estudo foram todas estipuladas.

4.3 Análise Molecular

4.3.1 Isolamento do DNA genômico

A extração do DNA genômico das 41 amostras pertencentes ao banco de germoplasma da UENF/Caliman ocorreu no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) e seguiu o protocolo CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide), descrito por Doyle & Doyle (1990). As amostras foram coletadas no campo experimental da Caliman agrícola, em Linhares – ES, e encaminhadas para o LMGV em recipiente térmico especializado, com identificações de cada genótipo em seus respectivos envelopes de alumínio.

O DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%, sob amperagem constante de 0,40 para averiguação da qualidade por meio de perfil eletroforético das bandas obtidas e, em seguida, foi feita a quantificação das amostras utilizando o software GelQuant. Após quantificado, o DNA foi diluído para uma concentração de $5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ para compor a solução trabalho.

4.3.2 Análise via reação em cadeia de polimerase (PCR)

Os 12 marcadores moleculares utilizados nesta pesquisa (Tabela 2) foram selecionados com base no trabalho de Bohry et al. (2021), levando em consideração as características a que eles estavam associados, priorizando aqueles que estavam associados à qualidade de fruto em mamoeiro. Ao todo, foram selecionados sete marcadores SNPs associados a genes relacionados com a constituição da parede celular, dois marcadores relacionados com genes de vias de transdução de sinal e a hormônios vegetais, dois pertencentes a famílias de proteases e um relacionado a fatores de transcrição envolvidos nesses processos.

A identificação e análise dessas regiões ocorreu pela identificação de mutações de base únicas (SNPs), localizadas dentro ou próximo aos genes em questão. Para a análise desses SNPs, foi utilizada a verificação das regiões circunvizinhas da mutação pela síntese e análise de marcadores SNPs relacionados (Bohry, 2022).

Tabela 2. Marcadores selecionados contendo sua definição e suas respectivas características de associação.

Marcador	Característica relacionada	Definição
1	Parede Celular	Pectate lyase
5	Parede Celular	Polygalacturonase 1 (FJ007644.1)
6	Parede Celular	Beta-galactosidase (EU650664.2)
8	Parede Celular	Endoglucanase [DB3] 8-like
10	Parede Celular	Beta-fructofuranosidase
12	Parede Celular	Beta[DB4] -D-xylosidase 5
13	Parede Celular	Beta glucosidase
14	Hormônios de sinalização	Ethylene-insensitive 4-like protein
15	Fator de Transcrição	NAC [DB26] domain protein
16	Família de protease	Subtilisin[DB20] -like serine endopeptidase family protein
17	Família de protease	Cysteine [DB21] proteinases superfamily protein
20	Hormônios de sinalização	Ethylene receptor (AF311942.1)

Fonte: Bohry et al. (2021).

Para isso, foi verificada a sequência genômica da região onde o SNP se encontra e feita a síntese dos marcadores, com base em iniciadores *forward* e *reverse* para cada alelo do loco. Os SNPs foram identificados pela análise de variantes entre dois genótipos parentais de uma população de mapeamento (P1 = Sekati; P2 = JS12) (Bohry et al., 2021.), a partir dos quais foram desenvolvidos os marcadores SNAPs. Assim, os SNAPs designados como “s” são aqueles identificados no genótipo Sekati, enquanto os designados como “j” são oriundos do genótipo JS-12 (Tabela 3).

Tabela 3: Marcadores SNAPs analisados contendo suas respectivas sequências, tamanho do amplicon e alelo específico.

Nome do marcador	Alelos S		Sequência do <i>primer</i>	NB	Tamanho do amplicon	Temperatura de anelamento
1s	T	F	AATGTACAAAATCAGGAATCA	21	421	48°
		R	ATCCACCCCTAAATAAATAA	20		
1j	G	F	AACAAGTAGAACCTGTAAAGAG	22	269	48°
		R	AAATTAGAAGTGAGGTTGGT	20		
5s	G	F	AGTTTCATATATAAAAAAAAAAAGAG	26	145	51°
		R	ACGAATGAGAAATAATCAAATA	23		
5j	C	F	TTCCTTTTAGATAATATTCTTTTAAG	26	266	50°
		R	CCGAATCACGTTGCTTATA	19		
6s	T	F	TACTTTTAACGCACCCGT	18	278	51°
		R	AAGCAGCTTTGTTAAACACA	20		
6j	C	F	AAAGCTAATGGATCATTACATG	22	135	55°
		R	CATTTGGTACAAGGTGAGG	19		
8s	T	F	ATATATGCTACATCACGTGCTT	22	449	58°
		R	ATTTGACCGTTGATGACCT	19		
8j	C	F	ACAAAATCACAAGTGTCTGAAG	22	315	51°
		R	CTAAAACTAGGGTCCAACAT	21		
10s	G	F	TGAATGAAAGCAGAATTCATATG	23	414	55°
		R	TGATCAAATCACGTTTGTATCAT	23		

Tabela 3 – Cont.

Nome do marcador	Alelos S		Sequência do <i>primer</i>	NB	Tamanho do amplicon	Temperatura de nelamento
10j	C	F	GCGAAGGTTAAAGTTTCGG	19	108	55°
		R	ACAGTAGGCTCCGTTGTTGT	20		
12s	T	F	CATCGGTCCGTTGTTTCTT	19	266	55°
		R	AGACATGACCATGAGACCAAAC	22		
12j	G	F	TTGACCTCGTTATCGGAATC	20	432	55°
		R	ATTGTCAGTCCATTTTCTGTCTT	23		
13s	G	F	CATTTTATTAATTAACCGCCC	21	494	55°
		R	TGTTTGTTTGCTTACCGCTA	20		
13j	A	F	TTGGATGAGGTATGAAGCCA	20	380	55°
		R	GGTCGTCTTGATCTGAAATGAT	22		
14s	T	F	CCTTATCCCTTTATGGGTTGTAT	23	145	55°
		R	TTTTAGGAGGAAAGAAAAGAAA	23		
14j	C	F	TTCCCCAAATTCGAGAG	18	499	53°
		R	TGGATGCAGGAGAGAAGGTA	20		
15s	G	F	TATAGAATTTTTCATTTGTAGGC	23	447	51°
		R	CTTTTGCAGATTCACATGTT	20		
15j	A	F	TTCTTCTCCTTCCCTACCTA	20	315	51°
		R	TGATGGTTTTTGTAGTGGATGA	20		
16s	T	F	AACTCTATCTTAGGATTTTCGGT	22	357	55°
		R	GTTTTGTTTCTTAAGTTTCCC	21		

Tabela 3 – Cont.

Nome do marcador	Alelos S		Sequência do <i>primer</i>	NB	Tamanho do amplicon	Temperatura de nelamento
16j	C	F	TGAAAATGTTGAATCATTAGTG	23	183	51°
		R	GCGGAATACTAGAGTTAATC	21		
17s	T	F	TAGAGGTTCCCTTATGGGTAGTA	22	217	51°
		R	CCTATATAAAAACACGTTTACTTAG	25		
17j	C	F	CCTTATATATTACATTACATATTTGC	26	119	51°
		R	ATATAGGGAAATGAAGATAAGAGA	24		
20s	A	F	AGCTTATGGAGCAGAATATT	20	398	48°
		R	GTAACAGGTGAGTGATGTGA	20		
20j	T	F	ACGAGCCAAATTTAAGACT	19	326	48°
		R	TGTGAGAATAGCGTCTGTAG	20		

S: alelos oriundos do genótipo Sekati; J: alelos oriundos do genótipo JS12.

As reações de amplificação via PCR foram feitas com um volume final de 13 μL , contendo 10ng de DNA, 1X de Tri-base, 0,2 mM de dNTPs, MgCl_2 variando entre concentrações de 1 e 1,5 μL , 1 μL de cada *primer*, 0,75 U de Taq DNA polimerase. As amplificações foram feitas em termociclador Gradiente Eppendorf®, conforme o seguinte programa: desnaturação de 94°C por 5 minutos, seguido de 28 a 35 ciclos de 94°C por 1 minuto de desnaturação, anelamento do *primer* por 30 segundos a temperaturas variando de acordo com cada *primer* (Tabela 3), e 72°C por 3 minutos para extensão, seguido de uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

Os produtos da amplificação foram corados com mix de GelRed + Blue juice (1:1) e separados por eletroforese em gel de agarose de alta resolução a 4% em tampão de corrida TAE 1X, sob amperagem fixa de 0,40 A e voltagem variando entre 100 e 116 V. Posteriormente, os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e as imagens, capturadas pelo sistema MiniBis Pro de fotodocumentação.

4.4 Análise estatística

4.4.1 Dados fenotípicos

Foram estimados a média, os valores máximos e mínimos, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV%). As relações existentes entre os acessos foram determinadas utilizando análise de componentes principais (PCA). O PCA bidimensional nos genótipos do banco foi criado utilizando os dois primeiros componentes principais (Dim 1 e Dim 2).

Estimou-se a distância genética euclidiana média e obteve-se a matriz de dissimilaridade através do programa GENES (Cruz, 2006). Em seguida, os dendrogramas gerados pelos dados fenotípicos foram obtidos pelo método de ligação média entre os grupos (UPGMA). Para o estabelecimento dos grupos, foi utilizado o método de mojena (Mojena, 1977), assumindo o valor constante de k igual ao valor do coeficiente de correlação cofenético. Tal método se baseia na seleção do número de grupos no estágio j que, primeiramente, satisfaz à inequação $\alpha_j > \theta_k$, em que α_j é o valor de distâncias dos níveis de fusão correspondentes ao estágio j ($j = 1, 2, \dots, n$) e θ_k é o valor referencial de corte,

expresso por $\theta_k = \bar{\alpha} + k\sigma\alpha$, em que $\bar{\alpha}$ e $\sigma\alpha$ são, respectivamente, as estimativas não visadas da média e do desvio padrão dos valores de α , e k é uma constante. Dessa forma, o método não necessita do conhecimento prévio da conformação dos grupos.

As análises estatísticas foram feitas no software R, utilizando os pacotes `factoextra` e `FactoMineR` (Irnawati et al., 2021), `ggplot2` (Hamilton & Ferry, 2018), `ggcorrplot` (Deng et al., 2021), `psych`, `ape`, `cluster`, `dendextend`, `circlize` e `magrittr` (R Development Core Team, 2018).

4.4.1.1 Dados fenotípicos ligados aos marcadores moleculares

Foram feitas análises estatísticas de agrupamento e dissimilaridade genética, considerando apenas quatro das 11 características avaliadas (FF, FP, EP, TSS). O critério utilizado para escolha de tais características foi sua potencial associação com os marcadores SNAPs que se deseja validar neste trabalho.

A realização das análises, considerando esse grupo de características, permite a verificação dos agrupamentos do banco sem a forte influência que características ligadas aos grupos heteróticos, como PMF, têm sobre a distribuição dos acessos nos grupos.

4.4.2 Dados moleculares

Os dados obtidos pela amplificação dos 12 locos foram convertidos em uma matriz numérica, tendo os SNAPs sido verificados inicialmente como marcadores dominantes, de maneira que uma tabela binária com códigos de 0 (para ausente) ou 1 (para presente) foi preenchida para os alelos oriundos de cada parental (Sekati e JS12). Após a obtenção de todos os dados referentes aos SNAPs, as tabelas foram cruzadas para montar uma nova tabela com os dados codominantes referentes aos SNP.

Essa nova tabela contou com códigos de 11 para aqueles genótipos que apresentaram presença apenas da banda oriunda do pai 1 (Sekati), 22 para aqueles que apresentaram apenas a banda do pai 2 (JS12) e 12 para os que obtiveram as duas bandas. A partir desta tabela, foram estimadas a matriz de

dissimilaridade e a distância genética pelo Índice Ponderado, utilizando o programa GENES. Em seguida, foram gerados os dendrogramas pelo programa R.

Foi feita também análise de powermarker com os dados para caracterizar os marcadores moleculares pela estimacão dos parâmetros de diversidade. Além disso, utilizou-se o programa *Structure* para a análise da estrutura genética através do agrupamento bayesiano dos dados (Prithcard; Stephens; Donnelly, 2000). Utilizando o pacote Dendextend no programa R (2020) (<http://www.r-project.org>), foram comparadas as matrizes de distâncias geradas pela análise fenotípica das quatro principais características ligadas à qualidade de fruto com a matriz gerada com os dados dos marcadores moleculares.

Além da análise comparativa conjunta, a possível associacão genótipo-fenótipo foi verificada pela análise das médias fenotípicas de cada grupo de genótipos, sendo cada marcador analisado de forma individual. Para tanto, os dados foram plotados em gráficos Boxplot, os quais foram obtidos utilizando o programa R e o pacote Ggplot2.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise descritiva

O maior coeficiente de variação (CV%) foi observado para volume de polpa (78,50%), seguido por peso médio de fruto (75,25%). As outras duas variáveis com maior CV% apresentaram valores menores que os dois primeiros, sendo eles comprimento da cavidade ovariana (49,07%) e comprimento de fruto (43,05%). Todas as demais variáveis analisadas tiveram CV% menores que 25%, sendo a menor delas a porcentagem de volume de polpa (4,53%) (Tabela 4).

Essa variabilidade é também percebida quando se observa a diferença entre os valores máximo e mínimo encontrados para cada característica. Para VP, por exemplo, que foi a característica que apresentou maior CV%, pode-se observar valor máximo de 2970,24 cm³, apresentado pelo genótipo BAG23 (Maradol Ori México), e mínimo de 220,84 cm³, apresentado pelo BAG58 (Cimarron).

Outras características que agregam valor econômico à cultura, como, por exemplo, FF, FP, TSS e EP, que tiveram como valores máximos 144,87 N, 118,6 N, 15,3° Brix e 3,16 cm, respectivamente. Para cada característica, os genótipos que apresentaram tais médias foram: BAG41 (Sta Helena III – Tra – 04A, Plt 02), BAG53 (Gran Golden), BAG15 (Surinse Solo TJ) e BAG40 (Sta Helena III – Tra 15A, Plt 04), respectivamente. Os valores mínimos para essas características foram de 72,07 N, 54,55 N, 9,22 Brix e 1,21 cm, para FF, FP, TSS

e EP, respectivamente. Os acessos do banco que apresentaram esses valores para cada característica foram: BAG16 (Tailândia) para FF; BAG8 (Caliman Amarelinho) para FP; BAG 16 (Tailândia) para TSS; e THB para EP.

O coeficiente de variação (CV%), quando elevado, indica uma grande dispersão dos dados analisados e com isso a existência de um grande espectro de seleção para tais características. Segundo Costa et al. (2002), os frutos podem ser classificados de acordo com o seu CV%, ou seja, o quão divergente os genótipos são geneticamente uns dos outros, e, para eles, características que exibem valor superior a 14% são passíveis de apresentar um médio ou elevado nível de variação entre os indivíduos estudados.

Tabela 4. Estatística descritiva para 11 características avaliadas em 41 indivíduos do banco de germoplasma da UENF/Caliman.

Variáveis	Max	Min	Média	DP	CV%
PMF	2341	183,667	749,765	564,175	75,25
FF	144,867	72,073	110,646	17,548	15,86
FP	118,606	54,548	82,458	15,425	18,71
TSS	15,3	9,225	11,941	1,627	13,63
CF	38,374	8,288	17,114	7,367	43,05
DF	12,864	6,193	8,939	1,924	21,52
CCO	27,229	5,557	11,346	5,568	49,07
DCO	7,185	2,628	4,513	1,025	22,71
EP	3,163	1,218	2,135	0,492	23,04
VP	2970,242	220,849	937,611	736,032	78,50
%VP	89,693	70,475	83,098	3,766	4,53

DP: diâmetro de polpa; CV: coeficiente de variação; PMF: Peso médio dos frutos; FF: firmeza de fruto; FP: firmeza de polpa; TSS: teor de sólidos solúveis; CF: comprimentos do fruto; DF: diâmetro do fruto; CCO: comprimento da cavidade ovariana; DCO: diâmetro da cavidade ovariana; EP: espessura da parede de fruto; VP: volume de polpa; %VP: porcentagem do volume de polpa.

O conhecimento destes valores é importante para dar ao melhorista uma percepção da grandeza relativa das mudanças que podem ser obtidas pela seleção em um programa de melhoramento, uma vez que se trata de uma

estimativa diretamente proporcional à variabilidade dos acessos (Silva et al., 2012). Os valores médios encontrados para duas das características ligadas aos marcadores aqui avaliados foram de 110,64 N para FF e 82,45 N para FP, valores estes maiores que os encontrados no trabalho de Barros et al. (2017), que avaliaram genótipos de mamoeiro oriundos de retrocruzamento para conversão sexual e encontraram médias de 100,03 N para FF e 82,69 N para FP.

5.2 Análise de componentes principais (PCA) e dissimilaridade genética para variáveis morfológicas

Neste estudo, dois dos cinco componentes principais gerados contribuíram para 78,3% da variabilidade genética acumulada entre os 41 genótipos do banco de germoplasma – UENF/Caliman, quando avaliadas as 11 variáveis relacionadas à qualidade de fruto em mamoeiro (Tabela 5).

O primeiro componente principal apresentou 64,3% de contribuição para a variabilidade entre os acessos. Nesse primeiro componente, as variáveis que obtiveram maior peso na contribuição das diferentes características foram: peso médio de fruto (PMF), com 0,97 de contribuição; volume de polpa (VP), com 0,97; diâmetro de fruto (DF), com 0,93; espessura da polpa (EP), com 0,92; comprimento de fruto (CF), com 0,91; e comprimento da cavidade ovariana (CCO), com 0,90 (Tabela 6).

O segundo componente principal, por sua vez, apresentou 14% de contribuição para a variabilidade, que se refletiu principalmente em decorrência das características porcentagem do volume de polpa (%VP) com 0,85, firmeza de fruto (FF) com 0,51, diâmetro da cavidade ovariana (DCO) com -0,50 e firmeza de polpa (FP) com 0,43 (Tabela 6).

A utilização do padrão de componentes para análise de variabilidade se baseia no fato de eles serem ortogonais, obtidos pela recombinação linear das variáveis originais que discriminam e maximizam o entendimento da estrutura de correlação que existe entre as características morfológicas avaliadas na cultura (Abdi e Willians, 2010; Silva e Sbrissia, 2010).

Tabela 5. Tabela de componentes principais e suas contribuições para variabilidade dos acessos do banco de germoplasma da UENF/Caliman.

	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.4	Dim.5
PMF	0,9735	-0,0626	-0,1091	0,1219	0,0714
FF	0,38284	0,51709	0,71206	-0,1417	0,1024
FP	0,74301	0,43927	0,37851	-0,1507	-0,0064
TSS	-0,7105	0,17865	0,27397	0,54041	0,30296
CF	0,91542	0,02591	-0,2483	-0,0754	0,29701
DF	0,93877	-0,1388	0,14364	0,18858	-0,1955
CCO	0,90858	-0,0387	-0,2477	-0,0738	0,31772
DCO	0,75668	-0,5033	0,34525	0,1284	-0,1718
EP	0,92609	0,20063	-0,0611	0,1813	-0,2053
VP	0,97302	-0,0424	-0,1208	0,12253	0,06567
%VP	0,04879	0,8502	-0,4617	0,12852	-0,1939

PMF: Peso médio dos frutos; FF: firmeza de fruto; FP: firmeza de polpa; TSS: teor de sólidos solúveis; CF: comprimentos do fruto; DF: diâmetro do fruto; CCO: comprimento da cavidade ovariana; DCO: diâmetro da cavidade ovariana; EP: espessura da parede de fruto; VP: volume de polpa; %VP: porcentagem o volume de polpa.

Em uma análise de componentes principais, a variação presente nos dois primeiros componentes será sempre maior quando o número de características avaliadas for menor e quando essas características forem mais pontuais (Pereira et al., 1992), como, por exemplo, no trabalho de Singh et al. (2010), quando avaliados os componentes principais na cultura do mamoeiro, os três primeiros juntos obtiveram 99,51% da variação apresentada.

O gráfico de dispersão foi gerado com base nos dois componentes principais que refletem a distinguibilidade entre os acessos do banco de germoplasma UENF/Caliman, em termos de características morfológicas ligadas à qualidade do fruto em mamoeiro (Figura 2). Observa-se que as características que mais contribuíram para a variabilidade do componente principal 1 (Dim1) são aquelas situadas no quarto quadrante. Essas características também apresentam colorações mais próximas de vermelho, o que indica maior contribuição para a variação total nesse primeiro componente.

Dessa forma, é possível observar que peso médio dos frutos (PMF), volume de polpa (VP), diâmetro de fruto (DF), espessura de polpa (EP) e comprimento de fruto (CF) estão contribuindo significativamente para a variabilidade encontrada no componente principal 1. O componente principal 2

(Dim2), por sua vez, contou com ambas as firmezas, de polpa (FP) e de fruto (FF), comprimento da cavidade ovariana (CDO) e porcentagem do volume de polpa (%VP), que são as características encontradas no segundo quadrante da Figura 2.

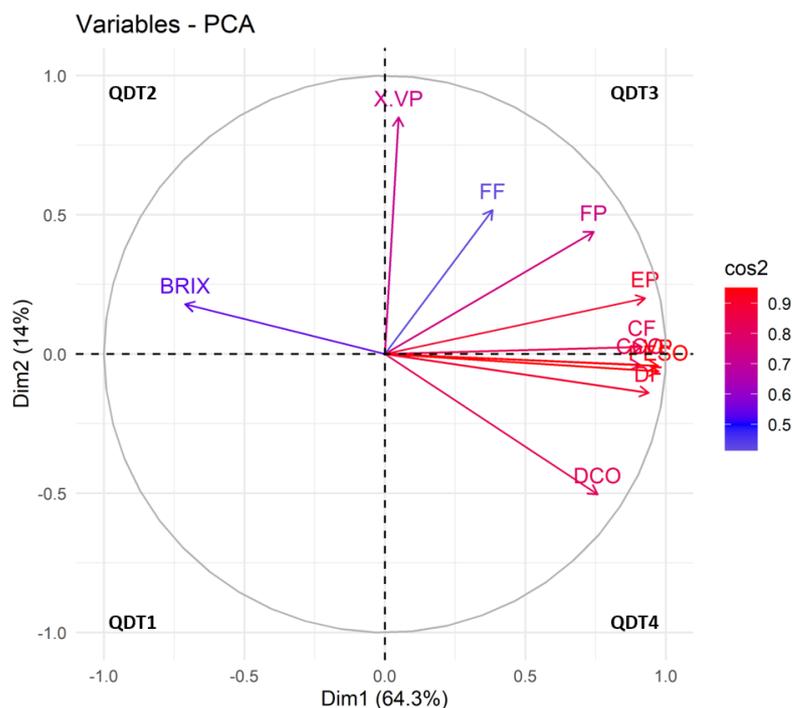


Figura 2. Gráfico de dispersão das 11 características estudadas com base na análise de z ; CF: comprimentos do fruto; DF: diâmetro do fruto; CCO: comprimento da cavidade ovariana; DCO: diâmetro da cavidade ovariana; EP: espessura da parede de fruto; VP: volume de polpa; %VP: porcentagem do volume de polpa.

É comum utilizar os componentes principais como base para representar graficamente a dispersão genética existente na população em que se está realizando o estudo. Em alguns casos, podem ser utilizados o terceiro e/ou quarto componente principal para verificar essa dispersão, como feito por Barbosa (2010), todavia, normalmente essa distribuição dos genótipos é feita com os dois primeiros componentes principais.

A Figura 3 mostra a dispersão dos acessos pertencentes ao BAG UENF/Caliman. Essa posição no gráfico de dispersão aponta semelhanças genéticas e possíveis agrupamentos. O grupo mais perceptível se dá com o aglomerado de genótipos na região do primeiro e segundo quadrante. Esse grupo assim como os demais são mais bem visualizados na Figura 4.

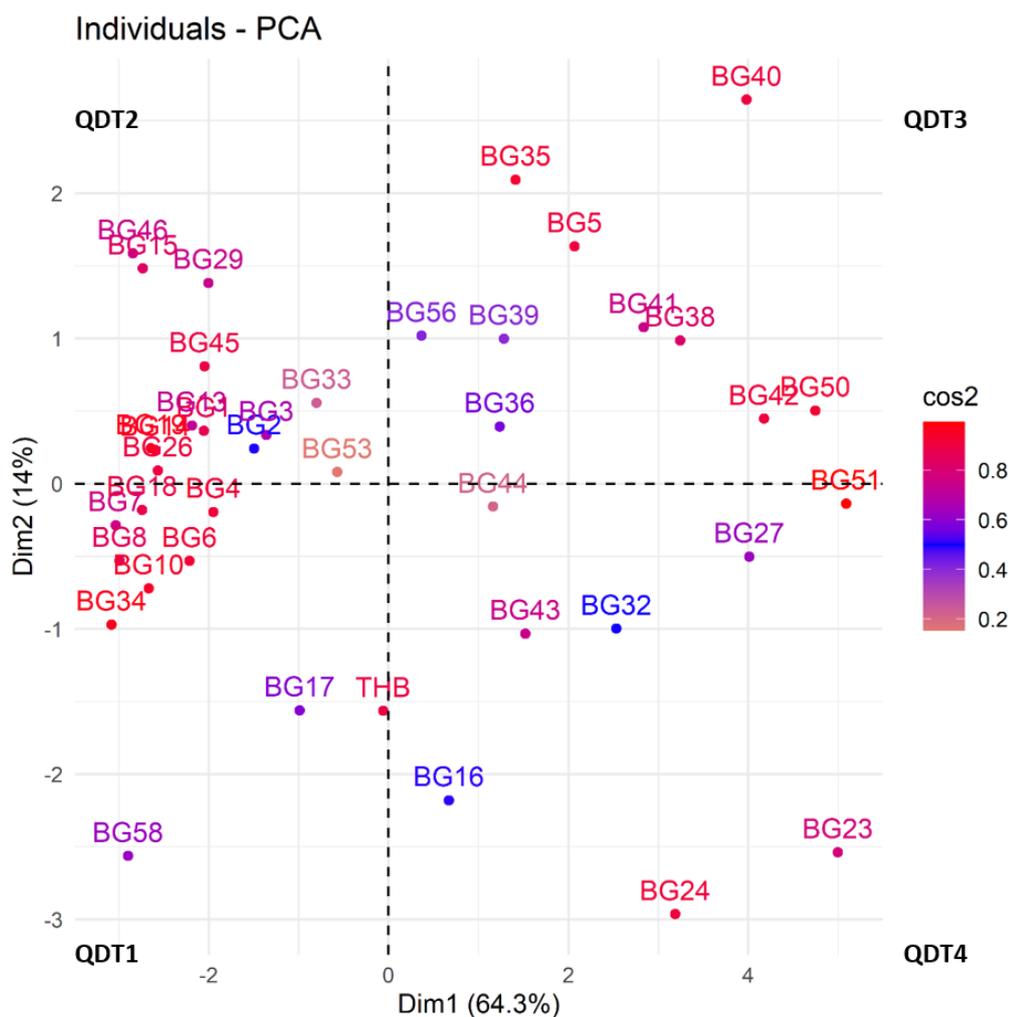


Figura 3. Gráfico de dispersão para os 41 acessos disponibilizados no banco de germoplasma UENF/Caliman com base nas características avaliadas, utilizando análise de componentes principais. QDT: quadrante; Dim1: componente principal 1; Dim2: componente principal 2; PMF: Peso médio de fruto; FF: firmeza de fruto; FP: firmeza de polpa; BRIX: unidade de medida para teor de sólidos solúveis; CF: comprimentos do fruto; DF: diâmetro do fruto; CCO: comprimento da cavidade ovariana; DCO: diâmetro da cavidade ovariana; EP: espessura da parede de fruto; VP: volume de polpa; %VP: porcentagem o volume de polpa.

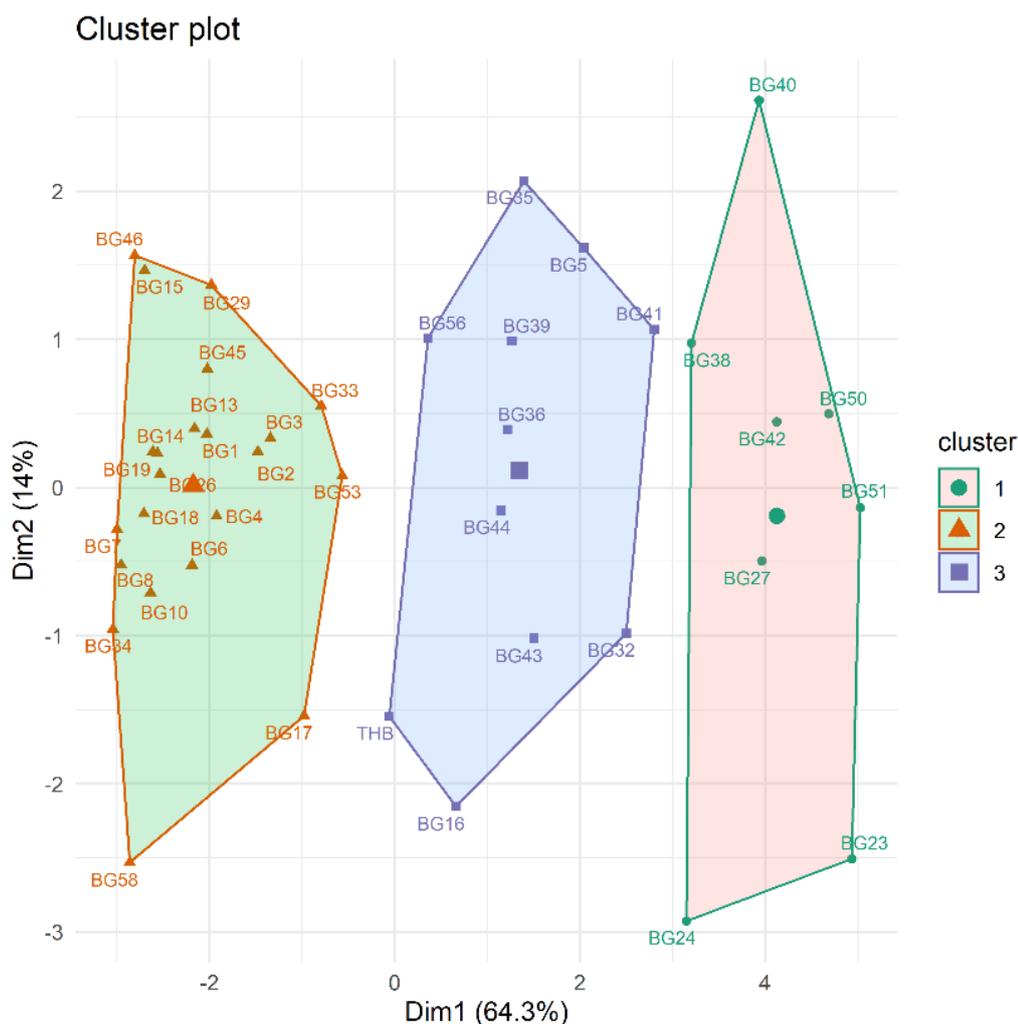


Figura 4. Grupos formados com base nas 11 características analisadas. Dim1: componente principal 1; Dim2: componente principal 2; PMF: Peso médio de fruto; FF: firmeza de fruto; FP: firmeza de polpa; BRIX: unidade de medida para teor de sólidos solúveis; CF: comprimentos do fruto; DF: diâmetro do fruto; CCO: comprimento da cavidade ovariana; DCO: diâmetro da cavidade ovariana; EP: espessura da parede de fruto; VP: volume de polpa; %VP: porcentagem o volume de polpa.

É possível observar, através da análise de agrupamento, que o genótipo BAG23 foi isolado dos demais. Essa separação se deu pela presença das maiores médias para as principais características que contribuíram para a diversidade nesse estudo, que incluem peso médio do fruto (2341g), volume de polpa (2970,24 cm³), diâmetro de fruto (12,86cm), espessura da polpa (2,82cm), comprimento de fruto (31,51cm) e comprimento da cavidade ovariana (23,21cm).

O segundo grupo reuniu sete acessos, sendo eles BAG24, BAG27, BAG38, BAG40, BAG42, BAG50 e BAG51. Esses genótipos apresentaram os seguintes valores médios para as características que mais contribuem para a diversidade no banco de germoplasma: 1608,88g para peso médio de fruto, 2058,41 cm³ para volume de polpa, 11,38cm para diâmetro de fruto, 2,78cm para espessura de fruto, 27,90 cm para comprimento de fruto e 19,31cm para cavidade ovariana.

Todos os genótipos que compõem o grupo dois são pertencentes ao grupo 'Formosa' (Quintal, 2012), o que explica o tamanho elevado dos frutos e as características relacionadas ao tamanho e peso. São eles: Maradol grande limão; Americano; Sta Helena III, tratamento 02A, Plt 01; Sta Helena III, tratamento 15A, Plt 04; Sta Helena III, tratamento 12, Plt 06; Lúcia; e Parritena. O peso médio de fruto acima de 600g, característico do grupo Formosa, realçado aqui por valores médios acima de 1000g, elevou a média final do grupo dois para 1608,88g para PMF.

Para a firmeza de fruto, a média apresentada pelo grupo dois como um todo foi de 121,95N, relativamente alto em comparação com o valor máximo alcançado nesse experimento para tal característica, que foi de 144,86N. Para firmeza de polpa também, foi encontrada uma média relativamente alta para o grupo, alcançando 102,45N, quando o valor máximo de todo o banco foi de 118,60N.

O terceiro agrupamento do dendrograma conta com 33 acessos, sendo eles: BAG17, BAG53, BAG3, BAG2, BAG33, BAG1, BAG4, BAG29, BAG45, BAG46, BAG58, BAG26, BAG8, BAG6, BAG 14, BAG13, BAG15, BAG34, BAG10, BAG19, BAG7, BAG18, BAG16, BAG39, BAG44, BAG56, BAGTHB, BAG5, BAG41, BAG35, BAG36 e BAG43. Entre os acessos, 19 pertencem ao grupo Formosa e 14 ao grupo Solo. Para esse agrupamento, os valores médios das características foram 519,31g para o peso médio do fruto, 638,27cm³ para o volume de fruto, 1,98cm para espessura de polpa, 8,3cm para diâmetro de fruto e para comprimento de fruto e de cavidade ovariana, 14,39cm e 9,29cm, respectivamente.

O grupo três não apresentou uma uniformidade do grupo heterótico de seus acessos agrupados, uma vez que apresentou, tanto acessos do grupo Solo,

quanto do grupo Formosa. É comum, em estudos envolvendo caracteres morfológicos, que aqueles voltados para o tamanho do fruto sejam os responsáveis pela maior parte da variação para a classificação dos genótipos, como é possível observar no trabalho de Reis et al. (2015). O trabalho de Singh et al. (2010) apontou resultados em que tal característica também contribuiu fortemente para a distribuição dos genótipos nos grupos. Além disso, Zou et al. (2019), verificando a eficiência de seleção recorrente em Aquébia (*Akebia quinata*), indicaram que a divergência genética relacionada a caracteres morfológicos tem bastante influência no agrupamento dos genótipos da população.

5.3 Análise de componentes principais (PCA) e diversidade genética para as características potencialmente ligadas aos marcadores SNAPs

Para a seleção das características, levou-se em consideração a associação que os marcadores moleculares apresentaram em suas marcas. Sete dos 12 marcadores utilizados nessa pesquisa estão ligados a genes que contribuem para a expressão da parede celular, dois marcadores para sinais de hormônio vegetal, dois para famílias de proteínas e somente um para fator de transcrição. Diante disso, as características selecionadas foram firmeza de polpa (FP), firmeza de fruto (FF), espessura de polpa (EP) e teor de sólidos solúveis (TSS).

Assim como na análise de componentes principais para todas as variáveis, a avaliação das características selecionadas apresentou dois componentes principais, explicando, aproximadamente, 90% da variabilidade genética do banco.

Para o componente principal 1 (62,5%), as características que mais contribuíram para a dispersão dos acessos com base em suas diferenças foram FP e EP (Figura 5a). Já para o componente principal 2, as características que mais contribuíram para a dispersão foram TSS e FF (Figura 5b).

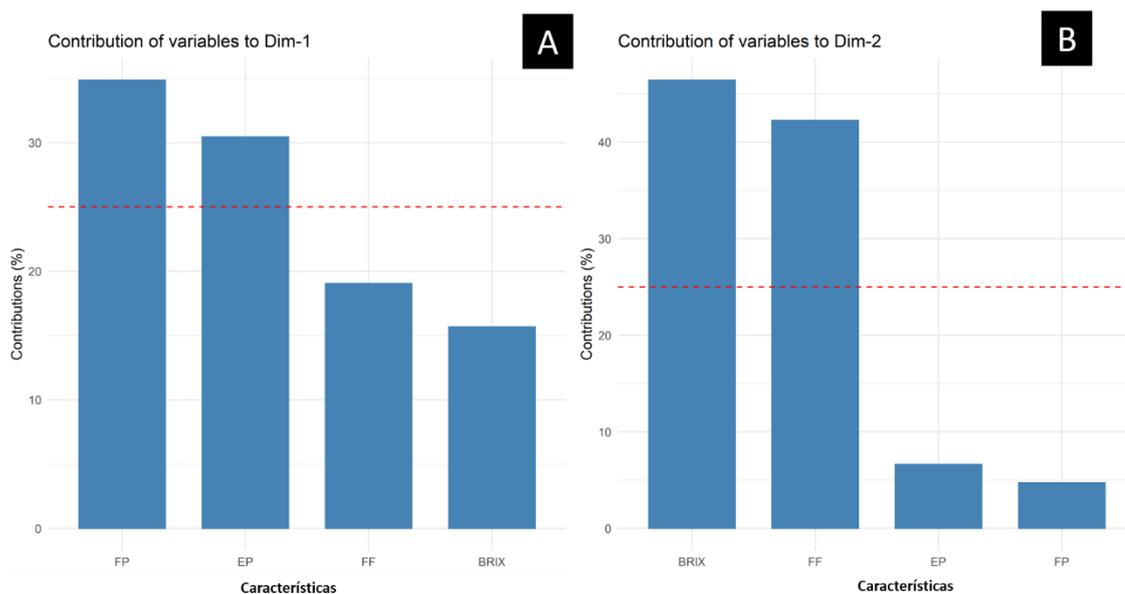


Figura 5. Contribuição das características para a variabilidade de cada componente principal. a) componente principal 1: responsável por 62,5% da variabilidade do banco de germoplasma da UENF/Caliman; b) componente principal 2: responsável por 26,4% da variabilidade do banco de germoplasma da UENF/Caliman. FP: Firmeza de polpa; EP – Espessura de polpa; FF – Firmeza de polpa; e BRIX – Unidade de medida para teor de sólidos solúveis.

A contribuição das características para variabilidade dentro dos componentes principais encontradas no presente trabalho está de acordo com o que é apontado pela literatura, uma vez que Singh et al. (2010) apresentam características relacionadas ao fruto como responsáveis pela maior parte da variação usada para classificar os genótipos de mamoeiro. Os autores acrescentam ainda que, em outras culturas, como amoreira e aquébia, as características ligadas aos seus frutos também explicam a maior parte da divergência existente entre os genótipos (Farahani et al., 2019; Zou et al., 2019).

Tendo como referência os gráficos de dispersão dos acessos, quando avaliadas somente as quatro características ligadas aos marcadores moleculares, é possível visualizar a contribuição de cada uma em ambos os componentes principais (Figura 6a). Observa-se também diferença na forma como os acessos do banco foram agrupados quando se compara uma análise que avalia todas as características e quando foram filtradas apenas aquelas associadas aos marcadores. (Figura 6b).

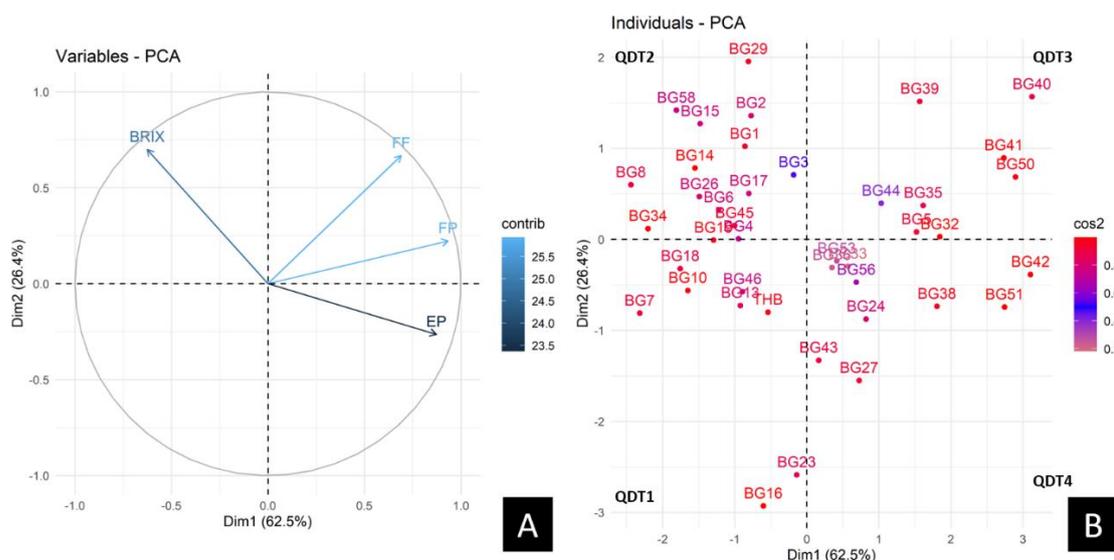


Figura 6. a) Gráfico de dispersão das características de acordo com sua contribuição. FP: Firmeza de polpa; EP – espessura de polpa; FF – firmeza de polpa; e BRIX – Unidade de medida para teor de sólidos solúveis. B) Dispersão em plano bidimensional dos 41 acessos avaliados do banco de germoplasma para as quatro características morfológicas selecionadas. QDT: quadrante.

A Figura 6b mostra a formação de grupos entre os acessos e isso se torna claro principalmente quando se avalia a região do segundo quadrante, mais especificamente a região “negativa” para ambos os componentes principais (Dim 1 e 2). A formação desses grupos é mais bem visualizada na Figura 7.

Diferentemente da análise de dendrograma com o conjunto total de características, a mesma análise feita apenas com as quatro características potencialmente associadas aos marcadores moleculares resultou na formação de dois grupos, quando considerado o método de mojena para determinação do corte: Grupo I contendo 12 genótipos e Grupo II com 29 genótipos (Figura 8).

É perceptível que, apesar de ter apresentado maiores médias de firmeza, o grupo 1 teve menor média em TSS, isso ocorrendo pelo fato de FF e TSS geralmente se apresentarem de forma inversamente proporcional (Oliveira et al., 2011; Souza et al., 2014). Essa correlação negativa entre as médias de FF e TSS ocorre pelo processo de amadurecimento do fruto do mamoeiro, sendo possível observar decréscimo das firmezas na medida em que ocorre um aumento linear no TSS (Basulto et al., 2009), decorrente da síntese de açúcares da galactose degradada da parede celular (Gomez et al., 2002).

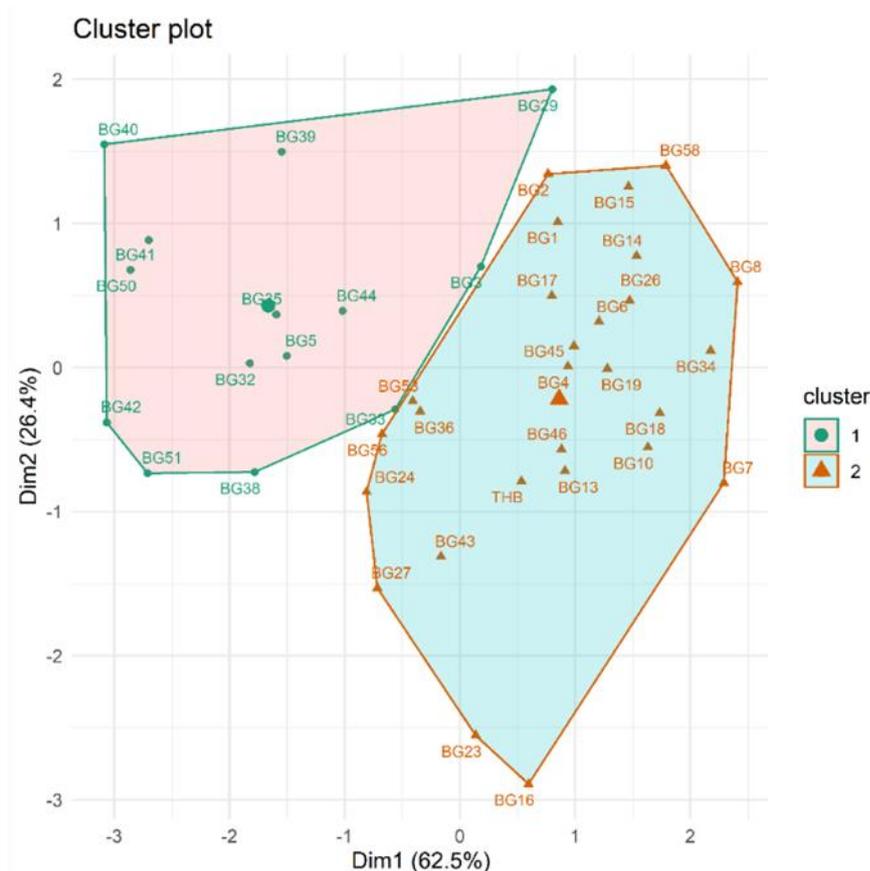


Figura 7. Grupos formados pelos genótipos do BAG UENF/Caliman com base nos caracteres morfológicos selecionados: FP: Firmeza de polpa; EP – espessura de polpa; FF – firmeza de polpa; e BRIS – Unidade de medida para teor de sólidos solúveis.

O grupo 2 assim como o grupo 1 contaram com genótipos de ambos os grupos heteróticos e também com relação inversamente proporcional entre as médias das características de firmezas e teor de sólidos solúveis.

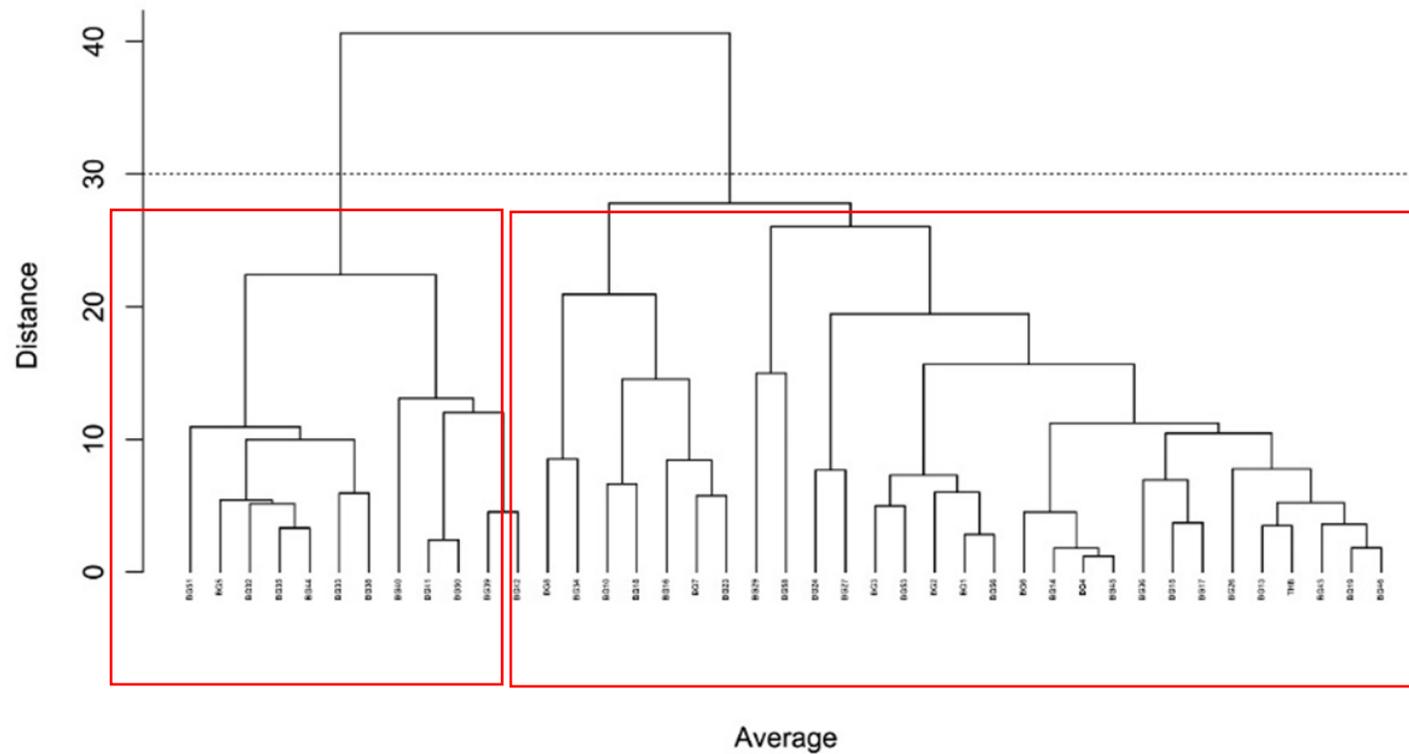


Figura 8. Dendrograma dos genótipos do BAG UENF/Caliman gerado pela avaliação morfológica das características selecionadas: FP: Firmeza de polpa; EP – Espessura de polpa; FF – Firmeza de polpa; e BRIX – Unidade de medida para teor de sólidos solúveis.

5.4 Análise de diversidade genética com os dados moleculares

A avaliação dos marcadores foi feita verificando o número de alelos amplificados por cada marcador, cujo valor fixo para todos os marcadores foi 2, uma vez que o marcador analisado tem natureza bialélica, além também do alelo mais frequente (AF), cujos valores variaram de 0,54 para o SPN15 e de 0,97 para o SNP1, com média de 0,75 para tal variável. A heterozigosidade observada (Ho) mínima foi de 0,00 para o SNP1 e máxima de 0,58 para o SNP14, com média de 0,22 para esta variável. Para diversidade genética (DG) por locos, foram obtidos mínima de 0,05 para o SNP1, máxima de 0,50 para o SNP12 e valor médio de 0,33 para a variável. E para o conteúdo de informação polimórfica (PIC), o valor mínimo foi de 0,05 para o SNP1, máximo de 0,37 para os SNPs 5, 12, 15 e 20, com média de 0,26 para esta variável (Tabela 6).

Tabela 6: Número de alelos (NA); alelo mais frequente (AF); heterozigosidade observada (Ho); diversidade genética por locos (DG); conteúdo de informação polimórfica (PIC). Avaliação descritiva dos 12 locos analisados pelos marcadores SNPs associados a características de qualidade de fruto em mamoeiro (*C. papaya*).

Primers	NA	AF	Ho	DG	PIC
SNP1	2	0,97	0,00	0,05	0,05
SNP5	2	0,56	0,29	0,49	0,37
SNP6	2	0,92	0,05	0,15	0,13
SNP8	2	0,90	0,21	0,18	0,17
SNP10	2	0,76	0,25	0,36	0,30
SNP12	2	0,55	0,17	0,50	0,37
SNP13	2	0,94	0,12	0,11	0,11
SNP14	2	0,61	0,58	0,48	0,36
SNP15	2	0,54	0,24	0,50	0,37
SNP16	2	0,76	0,13	0,37	0,30
SNP17	2	0,86	0,09	0,24	0,21
SNP20	2	0,57	0,56	0,49	0,37
Média	2	0,75	0,22	0,33	0,26

Percebe-se que aqueles SNPs com maiores frequências (AF) são também os SNPs com menores conteúdos de informação polimórfica (PIC), tais como o SNP1, SNP13, SNP6 e SNP8, que apresentaram AF igual ou superior a 0,90. Em contrapartida, o SNP15, que apresentou o maior valor de PIC, foi também o que

apresentou o menor AF. Essa relação inversa entre estes parâmetros ocorre pelo fato de todos os SNPs analisados terem apresentado apenas dois alelos, dessa forma, sempre que um alelo é posto em evidência, ou seja, apresenta maior frequência na população analisada, o conteúdo de informação polimórfica diminui.

Já em relação à avaliação molecular para os genótipos, a heterozigosidade (H_o) observada mínima foi de 0,00 para BAG8, BAG23, BAG38, BAG42, BAG44 e BAG53; e H_o média de 0,23 e máxima de 0,50 para BAG7, BAG10 e BAG 58. E em relação ao coeficiente de endogamia, o valor máximo foi de 1,00 para os genótipos BAG38, BAG42 e BAG53, com média de 0,54 (Tabela 7).

Os genótipos que apresentaram maior coeficiente de endogamia são linhagens, sendo eles: BAG8 (Caliman AM), (BAG38 (Sta Helena III – trat 02 plt 01x), BAG42 (Sta Helena III – trat 02 plt 01x), BAG53 (Grand golden). É comum que as linhagens apresentem coeficiente de endogamia elevado. Oliveira et al. (2010), por exemplo, obtiveram coeficientes de endogamia em sua grande maioria superiores a 0,8 para um estudo com 83 linhagens de mamão. Pirovani et al. (2020) também encontraram coeficientes de endogamia igual a 1 para 13 dos genótipos que estavam sendo analisados, e todos eles eram linhagens.

Tendo como referência a matriz de dissimilaridade obtida com os dados moleculares, foi feita a análise de agrupamento para obtenção do dendrograma. Três grupos foram formados pela avaliação de dissimilaridade com base nos dados moleculares (Figura 12). O grupo I tem apenas o genótipo BAG43, o grupo II reuniu 38 genótipos, correspondendo a 92,68% dos genótipos avaliados, e o grupo III é composto pelos acessos BAG16 e BAG53.

Ao contrário do esperado com base nas avaliações agronômicas, o acesso BAG43 ficou isolado no grupo I. O segundo grupo, composto por 38 genótipos, reuniu genótipos de grupos heteróticos distintos, sendo 20 do grupo Solo e 18 do grupo Formosa. O grupo III, por sua vez, reuniu dois genótipos (BAG16 e BAG53), sendo o BAG16 do grupo Formosa e o BAG53 do grupo Solo.

Tabela 7: Análise descritiva dos 41 genótipos do BAG UENF/Caliman, heterozigosidade observada (H_o), coeficiente de endogamia (f).

Genótipo	H_o	f	Genótipo	H_o	f
BAG1	0,20	0,62	BAG32	0,33	0,35
BAG2	0,27	0,47	BAG33	0,20	0,62
BAG3	0,17	0,65	BAG34	0,36	0,26
BAG4	0,11	0,75	BAG35	0,36	0,31
BAG5	0,20	0,62	BAG36	0,40	0,25
BAG6	0,20	0,62	BAG38	0,00	1,00
BAG7	0,50	0,04	BAG39	0,27	0,27
BAG8	0,00	1,00	BAG40	0,17	0,58
BAG10	0,50	0,04	BAG41	0,08	0,85
BAG13	0,18	0,57	BAG42	0,00	1,00
BAG14	0,42	0,15	BAG43	0,29	0,37
BAG15	0,08	0,81	BAG44	0,00	1,00
BAG16	0,22	0,59	BAG45	0,08	0,85
BAG17	0,30	0,44	BAG46	0,27	0,41
BAG18	0,45	0,11	BAG50	0,45	0,00
BAG19	0,08	0,81	BAG51	0,18	0,64
BAG23	0,00	1,00	BAG53	0,00	1,00
BAG24	0,36	0,26	BAG56	0,30	0,44
BAG26	0,09	0,83	BAG58	0,50	0,01
BAG27	0,30	0,39	THB	0,28	0,57
BAG29	0,27	0,47	Média	0,23	0,54

É perceptível que os grupos formados não seguem padrões heteróticos. Diferentemente do que foi encontrado por Pirovani et al. (2021), que, utilizando marcadores SSR para caracterizar linhagens elite de mamoeiro, obtiveram padrões de agrupamentos de acordo seu grupo heterótico. Tal padrão de agrupamento ocorre pelo fato de as características que distinguem os grupos heteróticos (PMF) serem também uma das que mais contribuem para a diversidade dos genótipos de mamoeiro, fato observado nas análises de componentes principais e de agrupamento, com base nos dados morfoagronômicos.

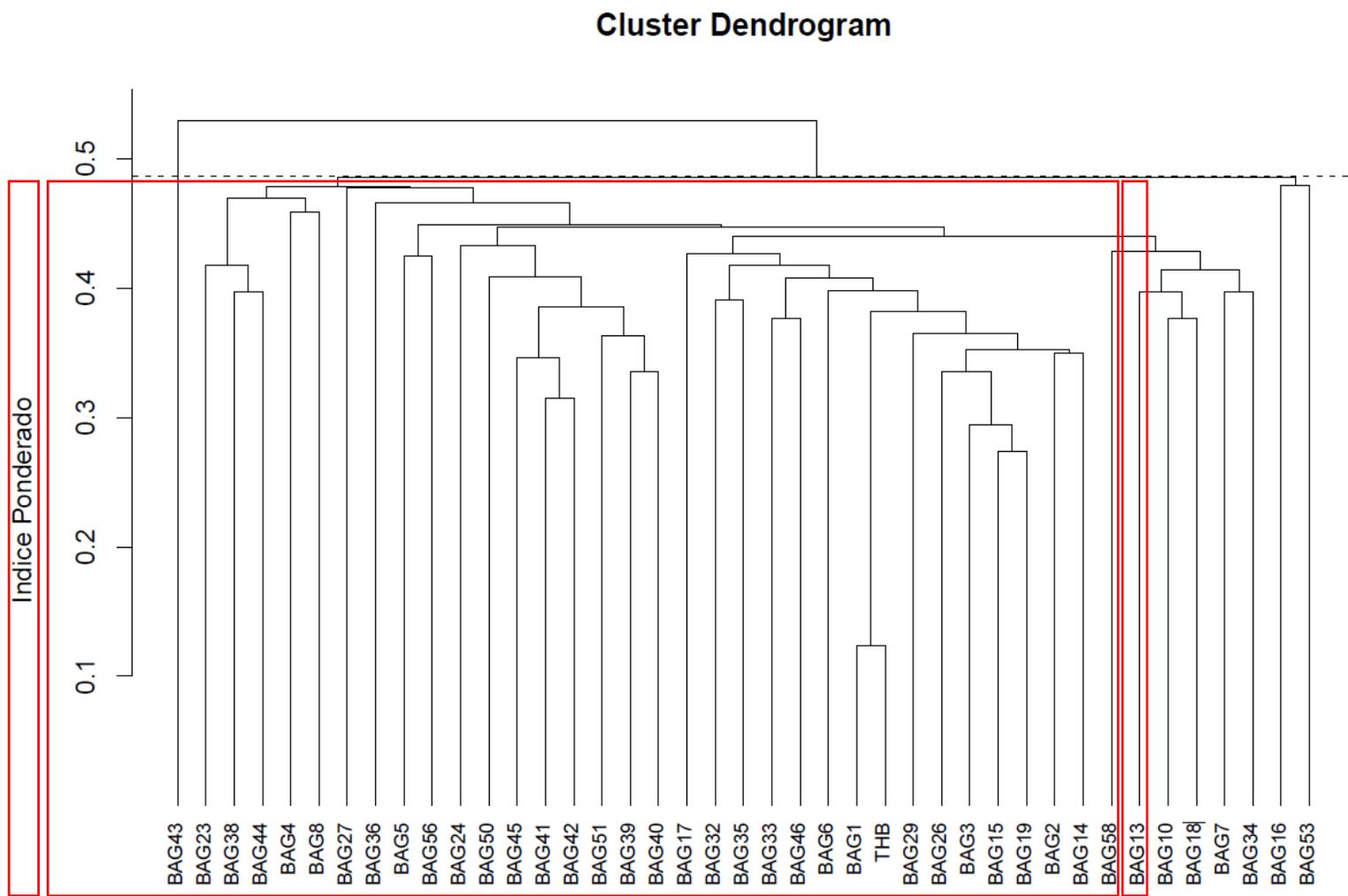


Figura 9. Dendrograma com os genótipos do BAG UENF/Caliman, gerado pela análise dos 12 marcadores SNPs associados as FF: firmeza de fruto; FP: firmeza de polpa, EP: espessura de polpa; e TSS: teor de sólidos solúveis.

Diante das variações estruturais apresentadas com a análise de dendrograma para os dados em questão, foi feita também a verificação da estrutura populacional do BAG através do programa *Structure* 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), tendo sido obtido um número de grupos diferente dos dendrogramas, haja vista que o pico mais proeminente em K ocorreu em 2, indicando, assim, a formação de apenas dois grupos (Figura 10).

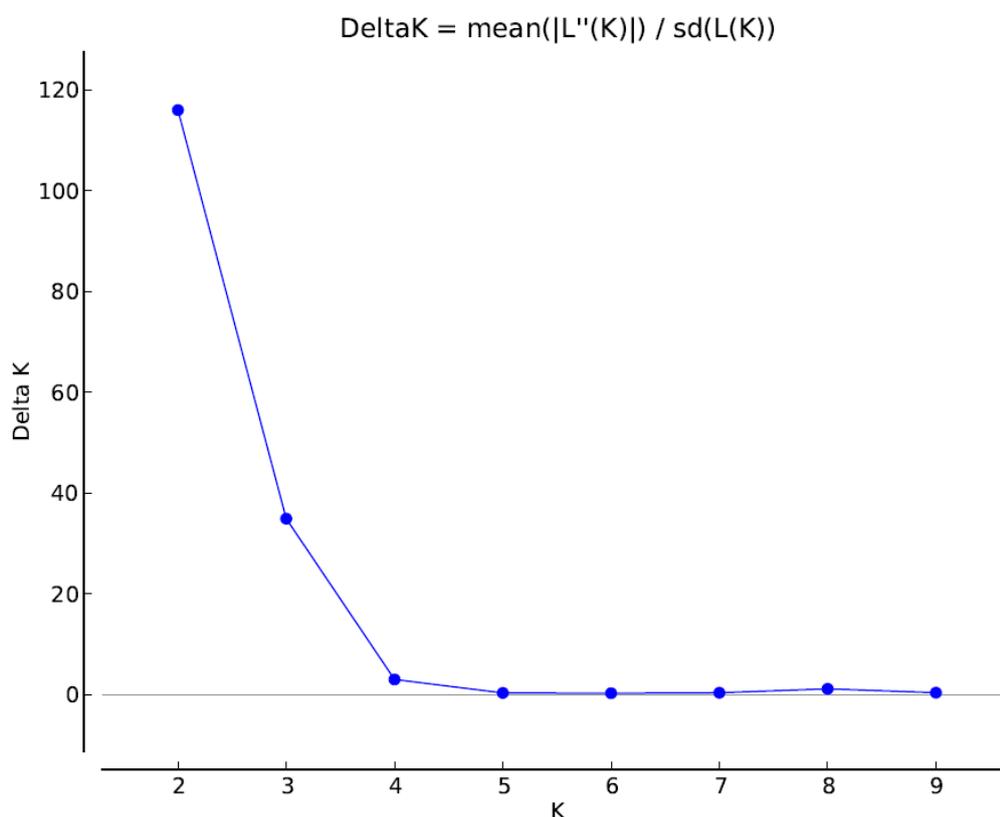


Figura 10. Gráfico de pico do ΔK indicando o número ótimo de clusters genéticos para a análise de estrutura genética do BAG UENF/Caliman obtida pelo programa *Structure* 2.3.4. UENF, Campos dos Goytacazes, 2022.

A Figura 11 mostra a distribuição dos genótipos nas populações que foram formadas de acordo com o *Structure*: o grupo 1 com a coloração vermelha e o grupo 2 com a coloração verde. É possível observar que, diferentemente da análise de dendrograma, no *Structure* o genótipo BAG43 não foi separado dos demais acessos, mas foi alocado juntamente com os demais acessos do grupo 2.

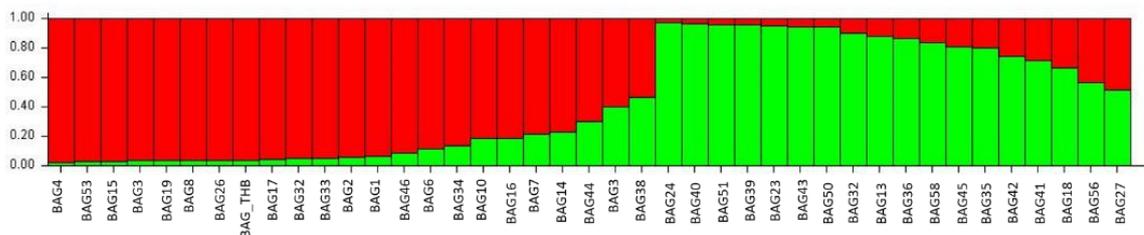


Figura 11. Estrutura genética do banco de germoplasma BAG-UENF/Caliman. Cada coluna representa um genótipo, sendo a coloração igual para mais de um genótipo, indicativo de que pertencem à mesma população.

5.5 Análise conjunta das variáveis morfológicas e moleculares

A figura do dendextend mostra que o número de grupos formados pela análise molecular é diferente do que foi observado na análise fenotípica, com características potencialmente ligadas aos marcadores (Figura 12). A análise de dissimilaridade com base nos dados fenotípicos (considerando apenas as quatro características potencialmente ligadas aos marcadores) formou dois grupos apenas, grupos estes formados por 12 e 29 genótipos (Figura 8). O agrupamento com os marcadores, por sua vez, separou 3 grupos: o primeiro deles com apenas 1 genótipo, o segundo com 38 e o terceiro com 2 (Figura 9).

Quando se verifica a análise de agrupamento das populações geradas pelo *Structure* (Figura 11) feita com os dados moleculares, é possível observar que somente dois grupos foram formados e que o genótipo que tinha sido isolado anteriormente (análise de agrupamento via dendrograma) passou a fazer parte de uma das duas populações existentes. Em relação aos grupos formados pela análise das características associadas aos marcadores, podem-se destacar: o grupo 1, que apresentou médias de 110,29 N para FF, 82,78 N para FP, 11,81 Brix para TSS e 2,17 cm para EP; e o grupo 2, que obteve médias de 102,70 N para FF, 75,05N para FP, 12,35 Brix para TSS e 1,95 cm para EP.

Os grupos dos dados moleculares, por sua vez, organizaram-se da seguinte forma: grupo 1, contendo 38 genótipos, apresentou média de 111,69N para FF, 83,05N para FP, 12,08 Brix para TSS e 2,12cm para EP; e o grupo 2, formado pelos genótipos BAG16 e BAG53, que apresentaram média de 95,04N para FF, 74,90N para FP, 9,95 Brix para TSS e 2,23cm para EP.

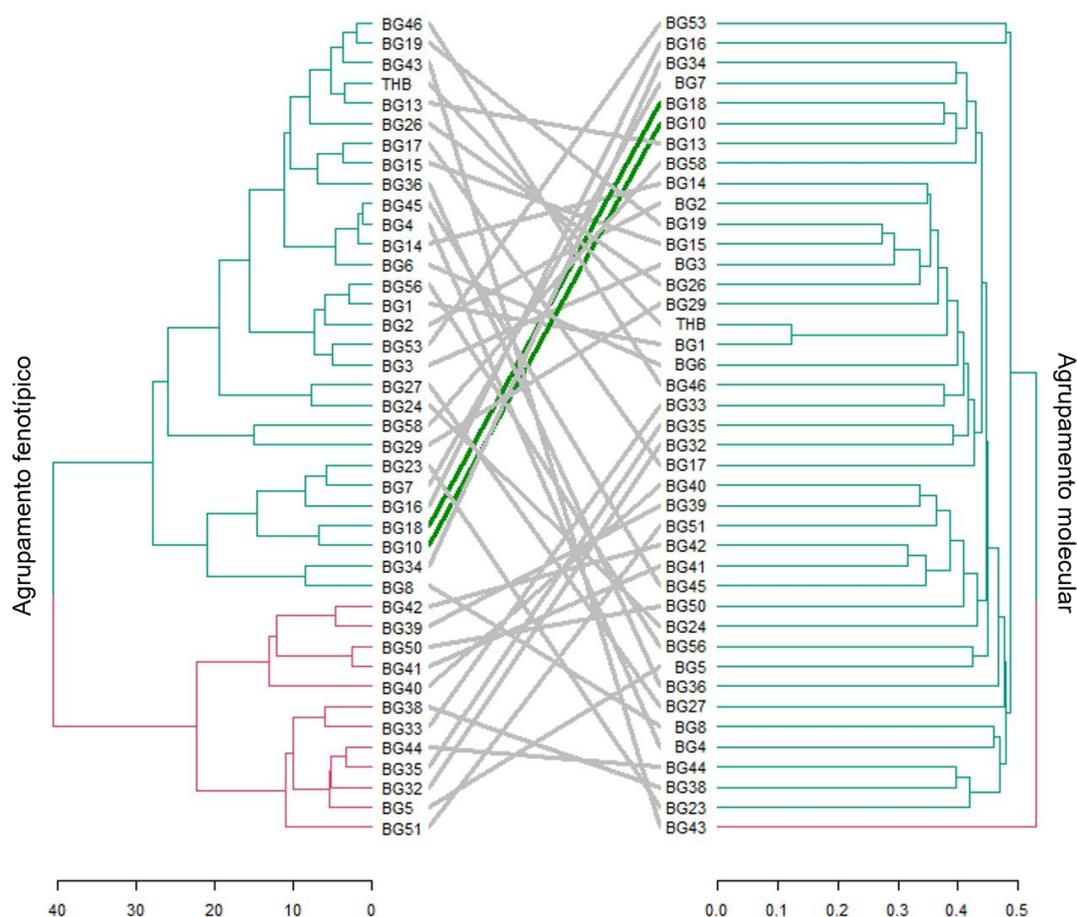


Figura 12. Análise comparativa dos dendrogramas gerados, por meio de Dendextend, utilizando os dados gerados pela análise das quatro características ligadas aos marcadores: FP: firmeza de polpa; EP – espessura de polpa; FF – firmeza de polpa; e TSS – teor de sólidos solúveis; e molecular utilizando os dados dos 12 marcadores SNPs utilizados.

A respeito da comparação dos dendrogramas, o que se percebe é um alto nível de emaranhamento, que se dá pela não correspondência dos genótipos em ambos os dendrogramas analisados. Há formas de mensurar o emaranhamento entre os dendrogramas. Essa avaliação pode variar de 1 (emaranhamento completo) e 0 (sem emaranhamento), sendo que quanto menor o coeficiente de emaranhamento, melhor o alinhamento dos genótipos (Santos e Santos, 2018).

No presente trabalho, apesar de não mensurado o nível de emaranhamento, é perceptível pela análise da figura que ele ficou distante de ser zero, todavia algumas semelhanças podem ser visualizadas, tais como a proximidade dos genótipos BAG18 e BAG10 em ambas as análises, assim como

outros genótipos que, apesar de não agrupados igualmente, permaneceram próximos (BAG35 e BAG32; BAG7 e BAG16, por exemplo).

Como os marcadores utilizados nesta pesquisa são marcadores gênicos, ou seja, específicos para as características analisadas fenotipicamente, há um aumento na acurácia e na confiabilidade da avaliação molecular e, por consequência, esperava-se que houvesse maior taxa de complementariedade na comparação dos dendrogramas. Todavia a divergência no método utilizado para estimar a distância entre os genótipos em cada uma das análises pode ter contribuído para o maior nível de distinção entre os agrupamentos, assim como ocorreu no trabalho de Rocha et al. (2020), avaliando o método de comparação entre análises de diversidade morfológica e molecular.

A utilização da análise de dendextend permite a verificação de níveis baixos de similaridade entre as análises, mas vale ressaltar que, por se tratar de uma análise mais generalizada, em que todos os marcadores e todos os genótipos são comparados simultaneamente, pode haver mascaramento de algumas semelhanças existentes entre as análises realizadas, sendo necessária, assim, uma verificação individual de cada marcador para os dados moleculares e fenotípicos.

5.6 Análise de Boxplot

Considerando a análise de associação individual dos 12 marcadores com as quatro características fenotípicas candidatas a estar ligadas aos marcadores (FF, FP, TSS e EP), foi obtida uma relação geral de associação dos SNPs analisados com as características verificadas (Figura 13) e observado também que alguns marcadores apontam estar potencialmente correlacionados com o aumento ou a diminuição das médias destas características.

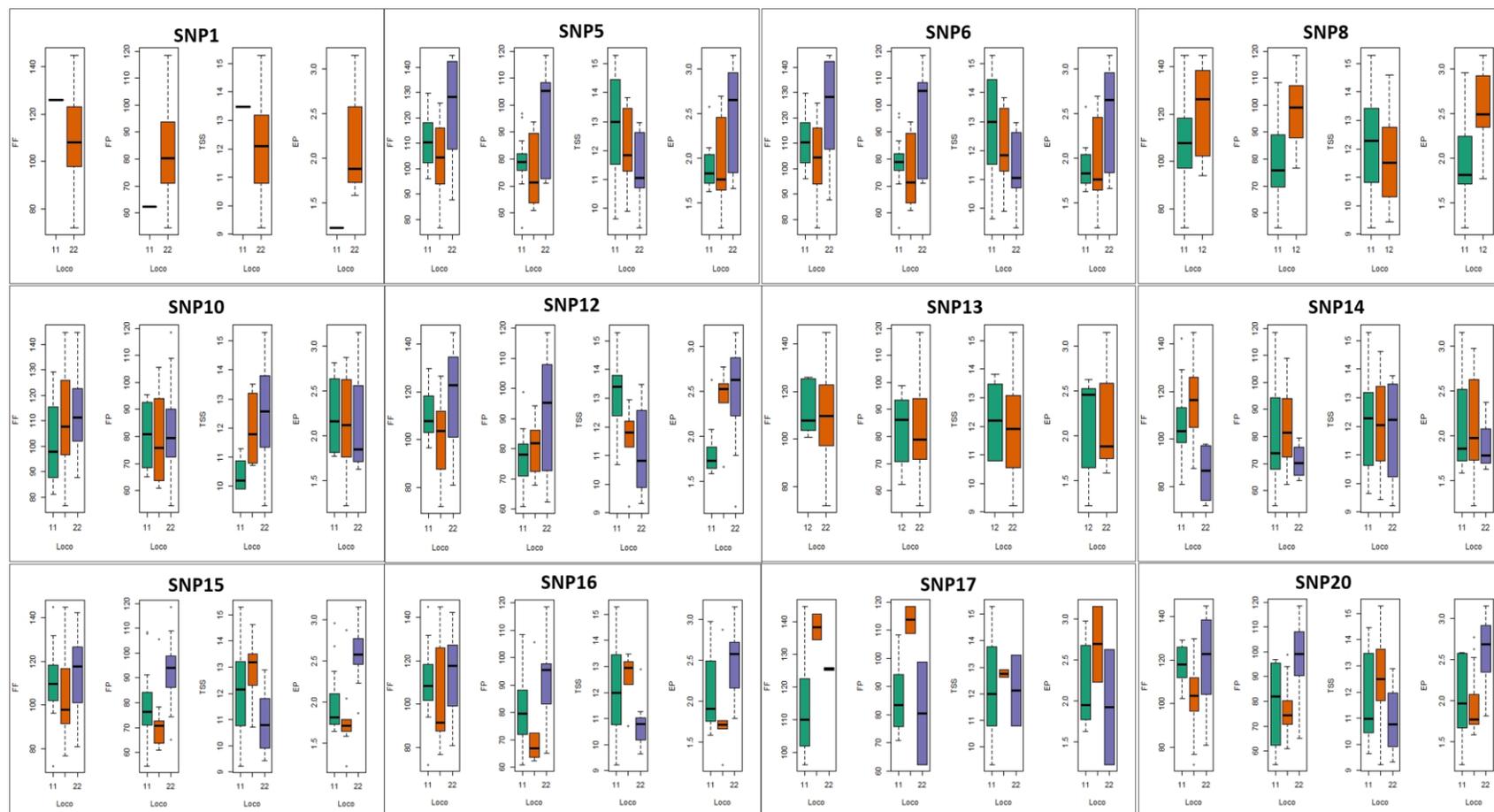


Figura 13: Gráfico Boxplot da relação genótipo-fenótipo entre os 12 marcadores SNAP e quatro características ligadas à qualidade do fruto (FF,FP, TSS e EP). FF: firmeza de fruto; FP: firmeza de polpa; TSS: teor de sólidos solúveis; e EP: espessura de polpa. 11: loco homocigoto para bandas do parental 1 (Sekati), 22: loco homocigoto para bandas do parental 2 (JS12), 12: heterocigoto para bandas de ambos os parentais.

O SNP5, por exemplo, localizado próximo ao gene UDP-galactose transporte, relacionado à parede celular, apresentou-se potencialmente relacionado às características de FF, FP e EP. Dos 41 acessos analisados no banco, 10 apresentaram-se homozigotos para os alelos do parental 2. Para esse grupo de genótipos, obteve-se uma média de 123,91 N para FF, 96,93N para FP e 2,48 cm para EP. Tais valores foram superiores às médias dos grupos que apresentaram bandas homozigotas para o parental 1 (11), bem como para os heterozigotos (12). Dessa maneira, pode-se inferir que o gene ao qual o marcador SNP5 está ligado pode estar envolvido na expressão das características de qualidade de fruto supracitadas, tendo em vista a diferença significativa entre as médias fenotípicas dos indivíduos pertencentes às diferentes classes genotípicas.

Entretanto, para esse mesmo marcador, observou-se que a característica de TSS apresentou maior variação das médias quando havia expressão dos alelos oriundos do parental 1, na conformação homozigota. Dos 41 acessos avaliados no banco, 14 apresentam o genótipo homozigoto do parental 1 e contaram com uma média de 12,80 °Brix para a característica em questão, média superior à apresentada pelos grupos de indivíduos cujo genótipo foi 12 ou 22.

Para o loco SNP5 é perceptível que, enquanto um determinado alelo em homozigose está associado aos caracteres de FF e FP, o alelo alternativo na conformação homozigota está relacionado à TSS. Como já citado, isso ocorre em razão da correlação inversamente proporcional destas características, podendo ser percebido no SNP5 pelo fato de o mesmo estar associado à síntese de um grupo de proteínas denominada Poligalacturonase 1 (FJ007644.1), responsável por participar da degradação da parede celular (Godoy et al., 2009). Dessa forma, a presença do genótipo homozigoto para o alelo 2 nos acessos de mamoeiro pode indicar que a degradação da parede celular é lenta ou diminuída, uma vez que pode contribuir para o aumento das firmezas de polpa e de fruto, enquanto para os genótipos homozigotos para o alelo 1, essa degradação se dá em maior intensidade, diminuindo as médias de FF e FP e aumentando a de TSS.

O gene UDP-galactose transporte é encontrado em outras espécies frutíferas, como, por exemplo, manga e banana (Godoy et al., 2009), e a forma como ele é expresso em cada uma dessas espécies é diferente e interfere no modo como suas polpas passam pelo processo de perda de firmeza. Por exemplo, Fioravante et al. (2008) comprovaram que a expressão do gene de

Polygalacturonase é diferente na mangueira e bananeira, concordando esta informação com os resultados obtidos por Cordenunsi e Lajolo (1995), que demonstraram que a polpa da banana é mais firme do que a da manga em razão do armazenamento de amido e que isso é percebido no nível de expressão do gene Polygalacturonase, o qual é reduzido quase pela metade quando comparada com a mangueira.

Assim, é visível que a expressão de tal gene na conformação do genótipo homocigoto para o alelo 1 aumenta a expressão de tais proteínas e eleva a degradação da parede celular, aumentando, assim, o TSS. Esse padrão de expressão é similar ao encontrado por Fabi et al. (2014), que descobriram que a capacidade de despolimerização da parede celular é predominantemente relacionada à expressão de Polygalacturonases.

O SNP8, associado também à parede celular, mais especificamente à síntese de Endoglucanase [DB3] 8-like, não se apresentou em nenhum dos acessos analisados com o genótipo homocigoto para o alelo 2, tendo sido encontrados nesse estudo apenas acessos com genótipo homocigoto para o alelo 1 e heterocigotos. As características FF, FP e EP obtiveram maiores médias quando apresentaram genótipo heterocigoto para o SNP8, sendo compostos de 8 acessos com médias de 12,53 N para FF, 97,97 N para FP e 2,56 cm para EP. Médias estas superiores às do grupo dos genótipos homocigotos para o alelo 1, composto pelos demais 33 acessos do banco. Somente para a característica de TSS, os acessos cujos genótipos foram 11 apresentaram média superior, contando, assim, com 12,09 °Brix em comparação a 11,65 °Brix do grupo de genótipo 12 (Figura 13).

Assim como no SNP5, o SNP8 mostrou correlação inversamente proporcional entre as características FF, FP e TSS para os genótipos analisados. Todavia, para o SNP8, o genótipo encontrado com maior contribuição para aumento das médias de três das quatro características avaliadas foi o genótipo heterocigoto.

6. CONCLUSÃO

O banco de germoplasma ativo da UENF/Caliman apresenta diversidade segundo avaliações morfológicas e moleculares. Na comparação dos métodos de dissimilaridade utilizando a análise de dendextend, houve semelhança baixa no agrupamento dos genótipos por conta de vários caracteres estarem sendo avaliados simultaneamente. Entretanto, pela análise associativa individual, apresentada via Boxplot, foi possível observar a associação dos genótipos de cada marcador individualmente para as quatro características potencialmente ligadas aos genes de interesse. Ainda assim, outras análises, como as de QTL, são necessárias para confirmação de tal associação e completa validação dos marcadores. Os marcadores necessitam de maiores ajustes e análises estatísticas para segura utilização em estudos de melhoramento assistido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdi, H., Willians, L. J. (2010) Principal components analysis. **WIREs Comput Stat**, v.2, p433–459.
- Agarwal, A.; Vyas, S.; Agarwal, D. P. (2016) Therapeutic benefits of *Carica papaya* leaf extracts in dengue fever patients. **Scholars Journal of Applied Medical Science (SJAMS)**, v. 4, n. 2, p. 299-302.
- Ahmad, S.; Gupta, D.; Srivastava, A. K. (2013) Studies on development, quality evaluation and storage stability of weaning food prepared from multipurpose flour, papaya powder and milk powder. **Food Processing and Technology**,
- 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, n. 4, p. 333 – 342.
- Anderle, L. Z.; Guimarães, F. C. M.; Kawakami, J. (2021) Seleção assistida por marcadores moleculares no Melhoramento Genético da Soja. **Revista Técnico- Científica do CREA**, p. 1-25.
- Arango, L.; Román, C.; Salamanca, C.; Almansa, E.; Bernal, J.; Gómez, P. (2010) **El cultivo de la papaya em Los Llanos Orientales de Colombia**. Technical Assistance Manual, n. 4, Corpoica; Sena; Asohofrucol, Bogotá.

- Araújo, G. (2017) **Brasil é referência mundial na produção e exportação de mamão. Jornal Entrepasto, CEAGESP.** Disponível em: <<https://jornalentrepasto.com.br/noticias/2797-brasil-e-referencia-mundial-na-producao-e-exportacao-de-mamao>> Acesso em 09 de abril de 2020.
- Aravind, G.; Bhowmik, D.; Duraivel, S.; Harish, G. (2013) Traditional and medicinal uses of *Carica papaya*. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 1, n. 1, p. 7 –15.
- Badillo, V. M. (2000) Caricaceae. Segundo esquema. **Revista Faculdade Agrônômica. Universidade Central.** Venezuela, v. 43, p. 1 – 111.
- Badillo, V. M. (1971) **Monografia de la familia Caricaceae.** (Tese de Botânica) – Maracay, Venezuela, Universidad Central de Venezuela – Publicada por la asociación de profesores, 222p.
- Barr, A. R.; Jefferies, S. P.; Warner, P.; Moody, D. B.; Chalmers, K. J. & Langridge, P. (2000) **Seleção assistida por marcadores na teoria e na prática.** Páginas 167–178 em S. Logue, eds. Anais do simpósio internacional de genética da cevada, Departamento de Ciência de Plantas, Universidade de Adelaide, Austrália.
- Barros, G. B.; Aredes, F. A. S.; Ramos, H. C. C.; Santa-Catarina, R.; Pereira, M. G. (2017) Combining ability of recombinant lines of papaya from backcrossing for sexual conversion. **Revista Ciência Agrônômica**, v.48, p.166–174.
- Barros, W. K. F. C.; Carvalho, F. L. C.; Barbosa-Junior, L. B.; Sousa, R. R.; Veras, F. H. C.; Sousa, P. H. S.; Lobo, R. F. S. (2019) Utilização de revestimentos alternativos na conservação pós-colheita de mamão Sunrise Solo. **Revista Agri-Environmental Sciences**, v. 5, p. 1 – 13.
- Bered, F.; Barbosa-Neto, J. F.; Carvalho, F. I. F. (2002) Genetic variability in common wheat germplasm based on coefficients of parentage. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 211-215.

- Basulto, F., SauriDuch, E., Espadas, F. G., Plaza, R. D., Saavedra, A.L., Santamaría, J. M. (2009) Postharvest ripening and maturity indices for aradol papaya. **Interciencia**, v.34, n.8, p.583-588.
- Bohry, D. (2018) **Desenvolvimento de um atlas de marcadores SNAPS associados a QTLs visando à seleção assistida por marcadores em *Carica papaya* L.** Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro 166p.
- Bohry, D.; Ramos, H. C. C.; Santos, P. H. D.; Boechat, M. S. B.; Arêdes, F. A. S.; Pirovani, A. A. V.; Pereira, M. G. (2021) Discovery of SNP and InDels in papaya genotypes and its potential for marker assisted selection of fruit quality traits. **Scientific Reports**, v. 11, n. 292.
- Borém, A.; Caixeta, E. T. (2009) **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, v.2, p. 585.
- Borém, A.; Miranda, G.V. (2009) **Melhoramento de Plantas**. 5° ed., Viçosa, MG, UFV, 529 p.
- Capistrano, M. C.; Andrade-Neto, R. C.; Santos, V. B.; Lessa, L. S.; Resende, M. D. V.; Mesquita, A. G. G.; Gurgel, F. L. (2021) Uso da metodologia REML/BLUP para seleção de genótipos de laranja-doce. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.56, p. 1-11.
- Cardoso, D. L.; Vivas, M.; Amaral Junior, A. T.; Pereira, M. G. (2015) Hayman's diallel analysis of traits related to the production and quality of papaya fruit. **Bragantia**, v.74, p.394–399.
- Cardoso, D. L.; Vivas, M.; Pinto, F. O.; Viana, A. P.; Amaral Júnior, A. T. O.; Pereira, M. G. (2017) Diallel mixed-model analysis of papaya fruit deformities. **Ciência Rural**, v.47, p.1–4.
- Carvalho, F. A.; Renner, S. S. (2012) A dated phyogeny of the papaya family (Caricaceae) reveals the crop's closet relatives and the family's biogeographic history. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 65, n. 1, p. 46 – 53.

- Chagné, D.; Batley, J.; Edwards, D.; Forster, J. W. (2007) Single nucleotide polymorphism genotyping in plants. **Assoc Mapp plants** p. 77–94.
- 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* culture in vitro. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, n. 9, p. 1913 – 1918.
- Chen, Y.; Wu, H.; Yang, W.; Zhao, W. Tong, C. (2021) Multivariate linear mixed model enhanced the power of identifying-wide association to poplar tree Heights in a randomized complete block design. **G3 Bethesda**, v.11, n. 2.
- CNA. Balanço 2016/Perpectivas 2017. **Fruticultura_Secex**, p.93–97, 2017.
- 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**, v.142, p.169-196.
- Cordenunsi, B. R.; Lajolo, F. M. (1995) Starch Breakdown During Banana Ripening: Sucrose Synthase And Sucrose Phosphate Synthase Behavior. **J. Agri. Food Chemi.** v.43, p. 347-351.
- Cortes, D. F. M.; Catarina, R. S.; Barros, G. B. A.; Aredes, F. A. S.; Silveira, S. F. D.; Ferregueti, G. A.; Ramos, H. C. C.; Viana, A. P.; Pereira, M. G. (2017) Model-assisted phenotyping by digital images in papaya breeding program. **Sci Agric**, v.74, p.294–302.
- Cortes, D. F. M.; Santa-Catarina, R.; Vettorazzi, J. C. F.; Ramos, H. C. C.; Viana, A. P.; Pereira, M. G. (2019) Development of superior lines of papaya from the Formosa group using the pedigree method and REML/Blup procedure. **Bragantia**, v.78, p;350–360.
- Costa, N. H. A. D.; Seraphin, J. C.; Zimmermann, F. J. P. (2002) Novo método de classificação de coeficientes de variação para a cultura do arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.243-249.

- Cruz, C. D.; Regazzi, A. J.; Carneiro, P. C. S. (2014) **Métodos biométricos aplicados ao melhoramento genético: volume 2**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária. 668p.
- Cseh, A.; Yang, C.; Edwards, S. H.; Scholefield, D.; Ashling, S. S.; Burridge, A. J.; Wilkinson, P. A.; King, I. P.; King, J.; Grewal, S. (2019) Development and validation of an exome-based SNP marker set for identification of the St, Jr and Jvs genomes of *Thinopyrum intermedium* in a wheat background. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 132, p.1555-1570.
- Cuquel, F. L.; Oliveira, C. F. S.; Lavoranti, O. J. (2012) Sensory profile of eleven peach cultivars. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 70-75.
- Cruz, C. D. (2006) Programa Genes - Estatística Experimental e Matrizes. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, v. 1. 285 p.
- Damasceno Junior, P.C.; Costa, F. R.; Pereira, T. N. S.; Neto, M. F.; Pereira, M. G. (2009) Karyotype determination in three caricaceae species emphasizing the cultivated form (*C. papaya* L.). **Caryologia**, v.62, p.10–15.
- Damasceno, P.C. J.; Pereira, T. N. S.; Neto, M. F.; Pereira, M. G. (2010) Meiotic behavior of *Carica papaya* and *Vasconcellea monoica*. **Caryologia**, v.63, p.229–236.
- Dantas, J. L. L.; Castro, M. T. N. (2000) **Aspectos botânicos e fisiológicos**. In: **Mamão Produção: Aspectos técnicos**. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA. Brasília-CNPMT, 77p.
- Dantas, J. L. L.; Junghans, D. T.; Lima, J. F. (2013) **Mamão: O produtor pergunta, a Embrapa responde. 2ª edição**. Brasília, DF: Embrapa, 170 p.
- Deng, L.; Zhao, M.; Bi, R.; Bello, A.; Egbeagu, U. U.; Zhang, J.; Li, S. Chen, Y.; Han, Y.; Sun, Y.; Xu, X. (2021) Insight into the influence of biochar on nitrification based on multi-level and multiaspect analyses of ammonia-oxidizing microorganisms during cattle manure composting. **Bioresource Technology**, v.339.

- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n. 1, p. 13-15.
- DRENKARD, E.; RICHTER, B. G.; ROZEN, S.; STUTIUS, L. M.; ANGELL, N. A.; Mindrinos, M.; Cho, R. J.; Oefner, P. J.; Davis, R. W.; Ausubel, F. M. (2000) A Simple Procedure for the Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms Facilitates Map-Based Cloning in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.124.
- Duarte, R. P.; Ramos, H. C. C.; Vieira, H. D.; Pirovani, A. A. V.; Boechat, F. A.; Mendes, T. N.; Poltronieri, T. P. S.; Pereira, M. G. (2020) Molecular sexing in papaya (*Carica papaya* L.) seeds based on endosperm DNA. **Euphytica**, v. 99.
- Fabi, J. P.; Seymour, G. B.; Graham, N. S.; Broadley, M. R.; May, S. T.; Lajolo, F. M.; Cordenunsi, B. R.; Nascimento, J. R. O. (2012) Analysis of ripening-related gene expression in papaya using an Arabidopsis-based microarray. **BMC Plant Biol.** v. 12, n. 242.
- Fabi, J. P.; Broetto, S. G.; Silva, S. L. G. L.; Zhong, S.; Lajolo, F. M.; Nascimento, J. R. O. (2014) Analysis of Papaya Cell Wall-Related Genes during Fruit Ripening Indicates a Central Role of Polygalacturonases during Pulp Softening. **Plos one**, v. 9, n.8, p. 105685.
- FAO, 2020. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- Farahani, M., Salehi-Arjmand, H., Khadivi, A., Akramian, M. (2019) **Phenotypic diversity among *Morus alba* var. *nigra* genotypes.**
- Fioravante, A. P.; Nascimento, J. R. O.; Lajolo, F. M.; Cordenunsi, B. R. (2008) Starch mobilization and sucrose accumulation in the pulp of Keitt mangoes during postharvest ripening. **J. Food Biochem**, v. 32, p.384-395.
- Godoy, A.; Morita, R. J.; Cordenunsi, B. R.; Lajolo, F. M.; Nascimento, J. R. O. (2009) Expression analysis of a set of genes related to the ripening of

- bananas an mangoes. **Brazilian society of plant physiology**, v. 21, n. 4, p. 251 – 259.
- Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.T., Karasawa, M., Sudré, C. P. (2009) Heirloom tomato genebank: assessing divergence based on morphological, agronomic and molecular data using Ward-MLM. **Genetic and Molecular Research**, v.8, p.364-374.
- Gomez, M., Lajolo, F., Cordenunsi, B. (2002) Evolution of soluble sugars during ripening of papaya fruit and its relation to sweet taste. **Journal of Food Science**, v. 7, p.442-447.
- Guan, Y.; Peace, C.; Rudell, D.; Verma, S.; Evans, K. (2015) QTLs detected for individual sugars and soluble solids content in apple. **Mol Breed**, v. 35, n. 6, p. 135.
- Hamilton, N. E.; Ferry, M. (2018) Ggtern: diagramas ternários usando ggplot2. **Journal of Statistical Software**, v. 87, n.3, p.1-17.
- Hanif, A.; Ahmad, S.; Jaskani, M. J.; Ahmad, R. (2020) Papaya treatment with putrescine maintained the overall quality and promoted the antioxidative enzyme activities of the stored fruit. **Sci Hortic (Amsterdam)**, v.268, p.109367.
- Hofmeyr, J. D. J. (1938) Genetical studies of *Carica papaya* L. **South African Dep f Agric Sci Bull**, v. 35, p. 300–304.
- Horovitz, S. (1954) Determinación del sexo en *Carica papaya* L: Estructura hipotetica de los cromossomas sexuales, **Agronomica Tropical**, v. 17, p. 323-343.
- IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acessado em 14 de abril de 2020.
- IBGE. **Produção Agrícola Municipal de 2011**. Disponível em: www.cnpmf.embrapa.br/. Acesso em 13 de abril de 2020.
- Irnawati; Riswanto, F. D. O.; Riyanto, S.; Martono, S.; Rohman, A. (2021) Permanfaatn Paket Perangkat Lunak R factoextra dan FactoMineR serta

Aplikasi Analisis Komponen Utama dalam Autentikasi Beragam Jenis Minyak. **Indonesian Journal of Chemometrics and Pharmaceutical Analysis**, v,1, n.1, p.1-10.

Kader, A. A. (1999) **Papaya: recommendations for maintaining postharvest quality**. Em <http://postharvest.ucdavis.edu>. University of California.

Khlestkina, E. K.; Salina, E. A. (2006) SNP markers: Methods of analysis, ways of development, and comparison on an example of common wheat. **Russian Journal of Genetics**, v. 42, p. 585-594.

Kim, B.; Hwang, I. S.; Lee, H. J.; Seo, E.; Choi, D.; Oh, C. S. (2018) Identification of a molecular marker tightly linked to bacterial wilt resistance in tomato by genome-wide SNP analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v.131, p.1017-1030.

Kim, M. Y.; Van, K.; Lestari, P.; Moon, J. K.; Lee, S. H. (2005) SNP identification and SNAP marker development for a GmNARK gene controlling supernodulation in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, n. 6, p. 1003–1010.

Klosin, A.; Casas, E.; Carcedo, C. H.; Vavouri, T.; Lehner, B. (2017) Transgenerational transmission of environmental information in *C. elegans*. **Science**, v. 356, n. 6335, p. 320 – 323.

Koebner, R. M. D. e Summers, R. W. (2003) 21st century wheat breeding: Plot selection or plate detection? **Trends Biotechnol**, v.21, p.59– 63.

Kumar, D.; Chhokar, V.; Sheoran, S.; Singh, R.; Sharma, P.; Jaiswal, S.; Iquebal, M.; Akanksha, J.; Jaisri, J.; Angadi, U. B.; Rai, A.; Sing, G. B.; Kumar, D.; Tiwari, R. (2020) Characterization of genetic diversity and population structure in wheat using array based SNP markers. **Mol. Bio. Rep.**, v.47, p.293-306.

Larekeng, S. H.; Maskromo, I.; Purwito, A.; Mattjik, N. A.; Sudarsono, S. (2015) Pollen dispersal based on SSR analysis proves Kalianda to Kopyor coconut pollinations. **Bulletin Palma**. v. 16, n.1, p.77-92.

- Lerceteau-Köhler, E.; Moing, A.; Guérin, G.; Renaud, C.; Maucourt, M.; Rolin, D. (2006) QTL analysis for sugars and organic acids in strawberry fruits. **Acta Horti**, v. 708, p. 573.
- Liao, Z.; Yu, Q.; Ming, R. (2017) Development of male-specific markers and identification of sex reversal mutants in papaya. **Euphytica**. doi: 10.1007/s10681-016-1806-z
- Luz, L. N.; Pereira, M. G.; Barros, F. R.; Barros, G. B.; Ferregueti, G. A. (2015) Novos híbridos de mamoeiro avaliados nas condições de cultivo tradicional e no semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, p. 159–171.
- Marin S. L. D. (2001) **Melhoramento genético do mamoeiro (*Carica papaya* L.): Habilidade combinatória de genótipos dos grupos „Solo“ e „Formosa“**, Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 117p.
- 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.
- Martins, D. S.; Costa, A. F. S. (2003) **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória: Incaper, p.497.
- MDIC/SECEX. Perfil da fruticultura 2020. <http://www.mdic.gov.br/index.php/auditorias/3531-secretaria-de-comercio-exterior-secex>. Acesso em 26 de novembro de 2020.
- Medina, V. M.; Cordeiro, Z. J. M. (1994) **Mamão para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 52p.
- Meier, C.; Marchioro, V. S.; Meira, D.; Olivoto, T.; Klein, L. A. (2021) Parâmetros genéticos e seleção de múltiplas características em genótipos de trigo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, p.1-9.

- Milach, S. C. K. (1998) **Marcadores Moleculares em plantas**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 17-28.
- Ming, R.; Yu, Q.; Moore, P. H. (2007) Sex determination in papaya. **Cell and Development Biology**, v. 18, p. 401-408.
- Mohammadi, S. A.; Prasanna, B. M. (2004) Analysis of genetic diversity in crop plants – Salient statistical tool and considerations. **Crop science**, v. 43, p. 1235-1248.
- Mohan, M. S.; Nair, A.; Bhagwat, T. G.; Krishna, M.; Yano, C. R.; Bhatia, T. (1997) Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Mol Breed**, v.3, p.87–103.
- Mojena, R. (1977) Hierarchical grouping methods and stopping rules: na evaluation. **The Computer Journal**, v.20, p.359-363.
- Moose, S.P.; Mumm, R. H. (2008) Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement. **Plant Physiology**, v. 147, p. 969 – 977.
- Moretti, C. L.; Mattos, L. M.; Calbo, A. G.; Sargent, S. A. (2010) Climate changes and potential impacts on postharvest quality of fruit and vegetable crops: a review. **Food Research International**, v. 43, p.1824-1832.
- Nantawan, U. Kanchana-Udomka, C.; Bar, I.; Forde, R. (2019) Linkage mapping and quantitative trait loci analysis of sweetness and other fruit quality traits in papaya. **BMC plant Biology**, v. 19, p. 449 – 460. DOI: 10.1186/s12870-019-2043-0
- Neves, L. C. (2019) **Manual pós-colheita da fruticultura brasileira**. SciELO-EDUEL.
- Nunes, A. C. D.; Neto, A. F.; Nascimento, I. K.; De Oliveira, F. J.; Mesquita, R. V. C. (2017) Armazenamento de mamão formosa revestido à base de fécula de mandioca. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, v. 40, n. 1, p. 254-263.
- Oliveira, A. A. R.; Santos Filho, H. P.; Andrade, E. C.; Meissner Filho, P. E. (2011) Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças do mamoeiro no Brasil. In: GHINI, R., HAMADA, E., BETTIOL, W. (org) Impactos das

mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil. **Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**: p. 356-356.

- Oliveira, C. R. R.; Vivas, M.; Silveira, S. F.; Gonçalves, V. M. L.; Dhaer, R. F.; Gravina, G. A.; Pereira, M. G. (2018) Potencial de progênies dioicas de mamoeiro para resistência a oídio. **Summa Phytopathol**, v.44, p.350–354.
- Oliveira, E. J.; Silva, A. S.; Carvalho, F. M.; Santos, L. F.; Costa, J. L.; Amorim, V. B. O.; Dantas, J. L. L. (2010) Polymorphic microsatellite marker set for *Carica papaya* L. and its use in molecular-assisted selection. **Euphytica**, v. 173, p. 279 – 287.
- Pereira, A. V.; Vencovsky, R.; Cruz, C. D. (1992) Selection of botanical and agronomical descriptors for the characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm. **Rev Bras Genética**, v.15, p.115–124.
- Pereira, M. G.; Ferregueti, G. A.; Pereira, T. N. S.; Ramos, H. C. C.; Cortes, D. F. M.; Santa-Catarina, R.; Luz, L. N.; Barros, G. B. A.; Arêdes, F. A. S.; Boechat, M. S. B.; Silveira, S. F.; Oliveira, J. G. (2015) **Melhoramento genético do mamoeiro: programa Uenf/Caliman**. In: Anais do VI Simpósio do papaya brasileiro. Vitória, v. 6, p. 1–41.
- Pereira, M. G.; Ferregueti, G. A.; Ramos, H. C. C.; Santa-Catarina, R.; Vettorazzi, J. C. F.; Poltronieri, T. P. S.; Arêdes, F. A. S.; Boechat, M. S. B.; Azevedo, A. O. N.; Moreira, N. F.; Bohry, D.; Pereira, T. N. S.; Silveira, S. F.; Vivas, M. (2018) Melhoramento genético do mamoeiro: programa Uenf/Caliman. In: **Anais do VII Simpósio do papaya brasileiro**. Vitória, v. 7, p. 1–59.
- Pereira, M. G.; Poltronieri, T. P. S.; Pereira, T. N. S.; Ramos, H. C. C.; Santa-Catarina, R.; Vettorazzi, J. C. F.; Arêdes, F. A. S.; Boechat, M. S. B.; Venâncio, T. M.; Azevedo, A. O. N.; Cortes, D. F. M.; Moreira, N. F.; Bohry, D.; Silveira, S. F.; Vivas, M.; Ferregueti, A. G. (2020) Twenty-two-year papaya breeding program: from breeding strategy establishment to cultivar development. **Functional Plant Breeding Journal**, v.1, p.9-27.
- Pesik, A.; Efendi, D.; Novariant, H.; Dinarti, D.; Sudarsono, S. (2017) Development of SNAP markers based on nucleotide variability of WRKY

genes in coconut and their validation using multiplex PCR. **Biodiversitas**, v. 18, n. 2, p. 465-475.

Pimentel-Gomes, F. (2000) **Curso de estatística experimental**. 14.ed. Piracicaba: Nobel, 477p.

Pirovani, A. A. V.; Ramos, H. C A hermaphrodite genotype in dioecious papaya progeny: sex reversal or contamination. C.; Santa-Catarina, R.; Vettorazzi, J. C. F.; Marmolejo, D. F. C.; Boechat, M. S. B.; Bohry, D.; Pereira, M. G. (2018)?. **Euphytica**, v. 214, n.12, p.227. doi: 10.1007/s10681-018-2304-2

Pirovani, A. A. V.; Ramos, H. C. C.; Duarte, R. P.; Miranda, D. P.; Bohry, D.; Santana, J. G. S.; Santos, D. P. H. A.; Pereira, M. G. (2020). Molecular characterization of elite lines of papaya (*Carica papaya* L.) via SSR markers. **Functional plant breeding journal**, v. 3, n.1, p.49 – 58.

Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959.

Quintal, S. S. R.; Viana, A. P.; Gonçalves, L. S. A.; Pereira, M. G.; Amaral Jr., A. T. (2012) Divergência genética entre acessos de mamoeiro por meio de variáveis morfoagronômicas. **Semia: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 131-142.

R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Available in: <<https://www.R-project.org>>

Ramos, H. C. C.; Pereira, M. G.; Gonçalves, L. S. A.; Berilli, A. P. C. G.; Pinto, F. O.; Ribeiro, E. H. (2012) Multivariate analysis to determine the genetic distance among backcross papaya (*Carica papaya* L.) progenies. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 1280-1295.

Ramos, H.C.C.; Pereira, M. G.; Silva, F. F.; Gonçalves, L.S.A.; Pinto, F. O.; De Souza Filho, G. A.; Pereira, T. S. N. (2011) Genetic characterization of papaya plants (*Carica papaya* L.) derived from the first generation of backcross. **Genetic and Molecular Research**. v. 10, p. 393-403.

- Ravel, C.; Faye, A.; Sadoun, S. B.; Ranoux, M.; Dardevet, M.; Dupuits, C.; Exbrayat, F.; Poncet, C.; Sourdille, P.; Branlard, G. (2020) SNP markers for early identification of high molecular weight glutenin subunits (HMW-GSs) in bread wheat. **Theor Appl Genetic**, v.133, p. 751-770.
- Reis, R. C.; Viana, E. S.; Jesus, J. L.; Dantas, J. L. L.; Lucena, R. S. (2015) Caracterização físico-química de frutos de novos híbridos e linhagens de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 3, p. 210-217.
- Reis, M. V. M.; Damasceno Junior, P. C.; Campos, T. O.; Diegues, I. P.; Freitas, S. C. (2015). Variabilidade genética e associação entre caracteres em germoplasma de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 2, p. 412-420.
- Ribaut, J. M. X. Hu, D.; Hoisington, D.; Gonzalez, D. L. (1997) Use of STSs and SSRs as rapid and reliable preselection tools in marker-assisted selection backcross scheme. **Plant Mol Biol Report**, v.15, p.156–164.
- Rocha, S. S.; Londe, L. C. N.; Pimenta, S.; Cardoso, M. M.; Gonçalves, N. P.; Gomes, W. S.; Calaes, J. G. (2020) Congruence between morphological and molecular markers for genetic diversity analysis applied to forage palm genotypes proagated via bioreactors. **Industrial Crops & Products**, v.147, p. 112230-112237.
- Ruggiero, C.; Marin, S. L. D.; Durigan, J. F. (2011) Mamão, uma história de sucesso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33 (SPE1), p.76-82.
- Santa-Catarina, R.; Cortes, D. F. M.; Vettorazzi, J. C. F.; Ramos, H. C. C.; Ferregueti, G. A.; Pereira, M. G. (2018) Image-based phenotyping of morpho-agronomic traits in papaya fruits (*Carica papaya* L. THB var.). **Aust J. Crop Sci**, v.12, p.1-12.
- Santa Catarina, R.; Pereira, M. G.; Vettorazzi, J. C. F.; Cortes, D. F. M.; Poltronieri, T. P. S.; Azevedo, A. O. N.; Moreira, N. F.; Miranda, D. P.; Moraes, R.; Pirovani, A. A. V.; Ramos, H. C. C.; Vivas, M.; Viana, A. P. (2020) Papaya (*Carica papaya* L.) S1 family recurrent selection:

- Opportunities and selection alternatives from the base population. **Sci Hortic (Amsterdam)**, v.260, p.108848.
- Santos, L. A.; Taveira, G. B.; Silva, M. S.; Gebara, R. S.; Pereira, L. S.; Perales, J.; Ferreira, A. T.; Mello, E. O.; Carvalho, A. O.; Rodrigues, R.; Gomes, V. M. (2020) Antimicrobial peptides from *Capsicum chinense* fruits: agronomic alternatives against phytopathogenic fungi. **Bioscience Reports**, v. 40, n. 8.
- Santos, R. M.; Viana, A. P.; Santos, E. A.; Souza, R. M.; Almeida, O. F.; Gomes, V. M.; Rodrigues, D. L.; Santos, P. R. (2020) Genetic structuring of segregating populations of *Psidium* spp resistant to the Southern root-knot nematode by Bayesian approach as basis for the guava breeding program. **Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, p.1-18.
- Saran, P. L.; Choudhary, R.; Solanki, I. S.; Patil, P.; Kumar, S. (2015) Genetic variability and relationship studies in new Indian papaya (*Carica papaya* L.) germplasm, using morphological and molecular markers. **Turish Journal of Agriculture and Forestry**, Erzurum, v. 39, p. 310-321.
- Sharp, P. J.; Johnston, S.; Brown, G.; McIntosh, R. A.; Pallotta, M.; Carter, M.; Bariana, H. S.; Khatkar, S.; Lagudah, E. S.; Singh, R. P.; Khairallah, M.; Potter, R.; Jones, M. G. K. (2001) Validation old molecular markers for wheat breeding. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 52, p. 1357 – 1366.
- Shen, Y. H.; Lu, B. G.; Feng, L.; Yang, F. Y.; Geng, J. J.; Ming, R.; Chen, X. J. (2017) Isolation of ripening-related genes from ethylene/1-MCP treated papaya through RNA-seq. **BMC Genomics**, v. 18, p. 671 – 684.
- Shiga, T. M.; Fabi, J. P.; Nascimento, J. R. O.; Petkowicz, C. L. O.; Vriesmann, L. C.; Lajolo, F. M.; Cordenunsi, B. R. (2009) Changes in cell wall composition associated to the softening of ripening Papaya: Evidence of extensive solubilization of large molecular mass galactouronides. **J Agric Food Chem**, v.57, p.7064–7071.
- Silva, M. F. Da.; Schuster, I.; Silva, J. F. V.; Ferreira, A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. (2007) Validation of microsatellite markers for assisted selection of

- soybean resistance of cyst nematode races 3 and 14. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p. 1143 – 1150.
- Silva, M. G. M., Viana, A. P., Amaral Junior, A. T., Goncalves, L. S. A., Reis R. V. (2012) Biometrics applied to intra-population improvement of the yellow passion fruit. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, p.493-499.
- Silva, W. B.; Silva, G. M. C.; Silva, L. R.; Waldman, W. R.; Oliveira, J. G. (2015) Tratamento com cloreto de cálcio na pós-colheita retarda o desverdecimento e a perda de firmeza do mamão uenf / caliman01. **Revista Brasilerira Fruticultura**, v.37, p.588–599.
- Singh, A. K.; Bajpai, A.; Singh, A. (2010) Classification of morpho-agronomic variability in papaya for developing elite cultivar. **Acta Hortic**, v.851, p.137–144.
- Singh, B. K.; Nandan, D.; Ambawat, S.; Ram, B.; Kumar, A.; Singh, T.; Meena, H. S.; Kumar, V.; Singh, V. V.; Rai, P. K.; Singh, D. (2015) Validation of molecular markers for markers-assisted pyramiding of white rust resistance loci in Indian Mustard (*Brassica juncea* L.). **Canadian Journal of Plant Science**, v.5.
- Singh. N.; Choudhury, D. R.; Singh, A. K.; Kumar, S.; Srinivasan, K. (2013) Comparison of SSR and SNP markers in estimation of genetic diversity and population structure of Indian rice varieties. **PLoS One**. v. 8, n. 12, p. 1-14.
- Souza, L. F. S.; Oliveira, A. M. G.; Dantas, J. L. L.; Trindade, A. V. (2013) Clima, Solo, Calagem e Adubação. In: O produtor pergunta, a Embrapa responde. – 2 ed. – Brasília, DF.
- Souza, A. F., Silva, W. B., Gonçalves, Y. S., Silva, M. G., Oliveira, J. G. (2014) Fisiologia do amadurecimento de mamões de variedades comercializadas no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, n.2, p.34-44.
- Srivastava, A. K. & Singh, V. K. (2016) *Carica papaya*- A Herbal Medicine. **International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)**, v. 4, n. 11, p. 19-25.

- STATISTA. The Statistics Portal. **Global fruit production in 2018, by variety** (in million metric tons). Disponível em: <
<http://www.statista.com/statistics/264001/worldwide-production-of-fruit-by-variety/>>. Acesso em 13 de abril de 2020.
- Steemers, F. J.; Gunderson, K. L. (2007) Whole genome genotyping Technologies on the BeadArray™ platform. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 41-49.
- Storey, W.B. (1938) The primary flower types of papaya and the fruit develop from them. **Proceeding of American Society for Horticultural Science**, Hawaii, v.35, p.80-82.
- Tamaki, M.; Urasaki, N.; Sunakawa, Y.; Motomura, K.; Adaniya, S. (2011) Seasonal variations in pollen germination ability, reproductive function of pistils, and seeds and fruit yield in papaya (*Carica papaya* L.) in Okinawa. **J Japan Soc Hort Sci.** v.80, p:156–163.
- Tolhurst, D. J. Matthews, K. L.; Smith, A. B.; Cullis, B. R. (2019) Genomic selection in multi-environment plant breeding trials using a factor analytic linear mixed model. **J. Anim. Breed Genetic.** v. 136, n. 4, p. 279 – 300.
- Trebbi, D.; Ravi, S.; Broccanello, C.; Chiodi, C.; Francis, G.; Oliver, J.; Mulpuri, S.; Srinivasan, S.; Stevanato, R. (2019) Identification and validation of SNP markers linked to seed toxicity in *Jatropha curcas* L. **Scientific Reports**, v. 9, p. 10220.
- Vale, E. D. M.; Heringer, A. S.; Barroso, T.; Teixeira, A.; Nunes, M.; Enrique, J.; Perales, A.; Santa-Catarina, C.; Silveira, V. (2014) Comparative proteomic analysis of somatic embryo maturation in *Carica papaya* L. **Proteome Sci**, v.12, p.37.
- Vale, E. M.; Reis, R. S.; Santa-Catarina, R.; Pereira, M.G.; Santa-Catarina, C.; Silveira, V. (2016) Comparative proteomic analysis of the heterosis phenomenon in papaya roots. **Sci Hortic (Amsterdam)**, v.209, p:178–186.
- Vettorazzi, R. G.; Carvalho, V. S.; Teixeira, M. C.; Campostrini, E.; Cunha, M. Da.; Matos, E. M.; Viccini, L. F. (2019) Cryopreservation of immature and mature

- seeds of Brazilian orchids of the genus *Cattleya*. **Scientia Horticulturae**, v. 256, p. 108603 – 108615.
- Vignal, A.; Milan, D.; Sancristobal, M.; Eggen, A. (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genet Sel Evol**, v. 34, p. 275–305.
- Vivas, M.; Deisy, L. C.; Helaine, C. C. R.; Santos, P. H. D.; Silveira, S. F.; Moraes, R.; Pereira, M. G. (2018) Genetic diversity between papaya lines and their correlation with heterosis in hybrids for diasease resistance and morpho-agronomic traits. **Summa Phytopathol**, v. 44, p. 110-1115.
- Vivas, M.; Silveira, S. F.; Silva Terra, C. E. P.; Pereira, M. G. (2010) Reação de germoplasma e híbridos de mamoeiro à manchade- phoma (*Phoma caricae-papayae*) em condições de campo. **Trop Plant Pathol**, v.35, p.323–328.
- Vivas, M.; Felipe, S.; Maganha, J.; Vivas, S.; Viana, A. P.; Teixeira, A.; Pereira, M. G. (2014) Seleção de progênies femininas de mamoeiro para resistência à mancha-de-phoma via modelos mistos. **Bragantia**, v.73, p.446–450.
- Vivas, M.; Silveira, S. F.; Terra, C. E. P. S.; Pereira, M. G. (2011) Testers for combining ability and selection of papaya hybrids resistant to fungal diseases. **Crop Breed Appl Biotechnol**, v.11, p.36–42.
- Vivas, M.; Silveira, S. F.; Pio-Viana, A.; Amaral-Júnior, A.T.; Ferreguetti, G. A.; Pereira, M. G. (2015) Resistance to multiple foliar diseases in papaya genotypes in Brazil. **Crop Prot**, v.71, p.138–143.
- Wang, J.; Na, J. K.; Yu, Q.; Gschwend, A. R.; Han, J.; Zeng, F.; Aryal, R.; Vanburen, R.; Murray, J. E.; Zhang, W.; Navajas-Perez, R.; Feltus, F. A.; Lemke, C.; Tong, E. J.; Chen, C.; Man Wai, C.; Singh, R.; Wang, M. L.; Min, X. J.; Alam, M.; Charlesworth, D.; Moore, P. H.; Jiang, J.; Paterson, A. H. (2012) Sequencing papaya X and Yh chromosomes reveals molecular asis of incipient sex chromosome evolution. **Proc Natl Acad Sci**, v.109, p.13710–13715.

- Xu, Q.; Wen, X.; Deng, X. (2007) Cloning of two classes of PR genes and the development of SNAP markers for powdery mildew resistance loci in chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt). **Mol Breeding**. v. 19, p. 179-191.
- Xu, Y. & Crouch, J. H. (2008) Marker-assisted selection in plant breeding: From publications to practice. **Crop Sci**. v.48, p. 391–407.
- Zolet, A. C. T.; Turchetto, C.; Zanella, C. M.; Passaia, G. (2017) **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 181p.
- Zou, S., Yao, X., Zhong, C., Zhao, T., Huang, H. (2019) Effectiveness of recurrent selection in *Akebia trifoliata* (Lardizabalaceae) breeding. **Sci Hortic (Amsterdam)**, v,246, p.79–85.
- Zucchini, N. M.; Miranda, M.; Bresolin, J. D.; Mitsuyuki, M. C.; Ferreira, M. D. (2017) **Avaliação do potencial de coberturas nanoestruturadas de cera de carnaúba na conservação pós-colheita de mamão**. In: ANAIS DA 9ª JORNADA CIENTÍFICA – EMBRAPA SÃO CARLOS. Embrapa Pecuária Sudeste e Embrapa Instrumentação – São Carlos, SP.