

**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA EM BOTÕES FLORAIS DE
MAMOEIRO: ABORDAGEM SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DO SEXO E
ESTUDO DE HETEROSE**

RAFAELA PEREIRA DUARTE

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
ABRIL – 2023**

**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA EM BOTÕES FLORAIS DE
MAMOEIRO: ABORDAGEM SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DO SEXO E
ESTUDO DE HETEROSE**

RAFAELA PEREIRA DUARTE

“Tese 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 Doutora em Genética e Melhoramento de
Plantas.”

Orientadora: Prof.^a Helaine Cancela Christine Ramos

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
ABRIL – 2023

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

D812

Duarte, Rafaela Pereira.

Análise proteômica comparativa em botões florais de Mamoeiro : abordagem sobre a diferenciação do sexo e estudo de heterose / Rafaela Pereira Duarte. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

71 f. : il.

Bibliografia: 49 - 59.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2023.
Orientadora: Helaine Christine Cancela Ramos.

1. mamão. 2. proteoma. 3. diferenciação sexual. 4. desenvolvimento floral. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

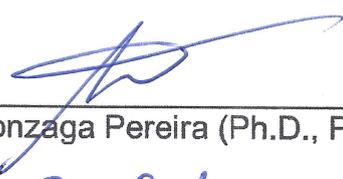
ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA EM BOTÕES FLORAIS DE
MAMOEIRO: ABORDAGEM SOBRE A DIFERENCIAÇÃO DO SEXO
E ESTUDO DE HETEROSE

RAFAELA PEREIRA DUARTE

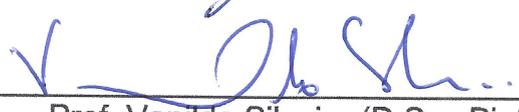
“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Genética e Melhoramento
de Plantas.”

Aprovada em 31 de março de 2023

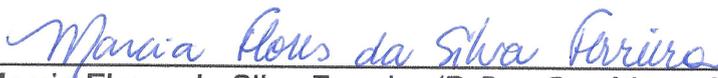
Comissão Examinadora:



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



Prof. Vanildo Silveira (D.Sc., Biotecnologia) - UENF



Prof.ª Marcia Flores da Silva Ferreira (D.Sc., Genética e Melhoramento) - UFES



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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Aos meus conselheiros, professor Messias Gonzaga Pereira e professor Vanildo Silveira, pelas contribuições, sugestões e apoio no desenvolvimento deste trabalho;

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

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

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

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral.....	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Importância econômica do mamoeiro	5
3.2 Evolução do sexo em plantas	6
3.3 Determinação do sexo no mamão	8
3.4 Flores anormais em mamoeiro	12
3.5 Proteômica em plantas	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 Material vegetal.....	15
4.2 Extração total de proteínas	16
4.3 Digestão de proteínas	17
4.4 Espectrometria de massas.....	17
4.5 Análise dos dados.....	18
4.6 Análise proteômica comparativa	19
5. RESULTADOS	21
5.1 Proteoma de botão floral de <i>C. papaya</i>	21

5.2	Análise de enriquecimento GO em proteínas diferencialmente acumuladas	25
5.2.1	Botões florais em estágio inicial de desenvolvimento.....	25
5.2.2	Botões florais em estágio final de desenvolvimento	27
5.3	Análise de enriquecimento de vias KEGG em proteínas diferencialmente acumuladas	28
5.3.1	Botões florais em estágio inicial de desenvolvimento.....	28
5.3.2	Botões florais em estágio final de desenvolvimento	30
5.4	Análise de interação proteína-proteína <i>in silico</i>	31
5.5	Análise de heterose	32
6.	DISCUSSÃO	35
6.1	Diferenças no metabolismo de carboidratos entre botões florais femininos e hermafroditas em <i>C. papaya</i>	40
6.2	Proteínas envolvidas no desenvolvimento do pólen em <i>C. papaya</i>	42
6.3	Manifestação da heterose em proteínas envolvidas com a fotossíntese	45
7.	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
	APÊNDICE	60

RESUMO

DUARTE, Rafaela Pereira; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; março de 2023; Análise proteômica comparativa em botões florais de Mamoeiro: abordagem sobre a diferenciação do sexo e estudo de heterose; Orientadora: D.Sc. Helaine Christine Cancela Ramos; Conselheiros: D.Sc. Messias Gonzaga Pereira e D.Sc. Vanildo Silveira.

O mamoeiro (*Carica papaya*) é uma espécie trioica, apresentando plantas femininas, masculinas e hermafroditas. A diferenciação sexual tem um grande impacto para a cultura, visto que apenas as plantas hermafroditas produzem frutos com valor comercial. Além da onerosa etapa de sexagem para seleção das plantas, estresses ambientais podem resultar no desenvolvimento anormal das flores em plantas hermafroditas. Contudo, os mecanismos moleculares que regulam o desenvolvimento floral e a diferenciação do sexo em mamoeiro ainda são pouco conhecidos. Assim, através da análise proteômica comparativa, o presente estudo teve o objetivo de identificar proteínas associadas à determinação do sexo de flores femininas e hermafroditas de mamoeiro, bem como identificar proteínas não aditivas em botões florais hermafroditas de um híbrido de mamoeiro em comparação com suas linhagens parentais. Proteínas de botões florais em estágio inicial e final de desenvolvimento de três genótipos de mamoeiro (UENF-CALIMAN 01, JS12 e Sunrise Golden 7212) foram estudadas por meio de análise proteômica combinando o método *shotgun* e a tecnologia nanoESI-HDMSE. Em botões em estágio inicial de desenvolvimento, 496 (35,9%) proteínas apresentaram abundâncias significativamente diferentes entre os sexos ($P < 0.05$,

$|\log_2\text{FoldChange}| > 0.5$) para genótipo SS 72/12, 139 (10%) para o genótipo JS12 e 165 (11,9%) para o genótipo UC-01. No estágio final de desenvolvimento, 181 (13,5%) proteínas apresentaram abundâncias significativamente diferentes para O genótipo SS 72/12, 113 (8,4%) para o genótipo JS12 e 125 (9,1%) para o genótipo UC-01. Estudando apenas as proteínas que apresentaram o mesmo padrão de acúmulo nos três genótipos estudados, verificou-se que um grande grupo de proteínas diferencialmente acumuladas entre os sexos estavam relacionadas ao metabolismo de carboidratos, monossacarídeos e aminoácidos. As vias de biossíntese de esporopolenina e fenilpropanoide foram enriquecidas nas amostras hermafroditas nos dois estádios de desenvolvimento, ademais observou-se interações preditas entre proteínas envolvidas nessas duas vias, o que reforça o envolvimento de intermediários da via de fenilpropanoide na biossíntese de esporopolenina, principal componente da parede exterior do pólen. Grande parte das proteínas diferencialmente acumuladas apresentaram papel chave na síntese de pectina, celulose e lignina. Esses compostos têm importante função na formação da parede celular e parecem estar relacionadas com o desenvolvimento das estruturas masculinas das flores, especialmente na formação do revestimento do pólen. Os resultados sugerem que flores hermafroditas necessitam de maior gasto energético durante o seu desenvolvimento, provavelmente devido à formação da complexa parede externa do pólen. Em relação ao estudo de heterose em botões florais hermafroditas, pode-se identificar várias proteínas não aditivas, sendo a maior parte delas acumuladas em botões florais em estágio inicial de desenvolvimento. A fotossíntese se destacou dentre as vias enriquecidas entre as proteínas não aditivas, podendo ser um indício de um melhor desempenho fotossintético e de uma melhor resposta a estresses abióticos em botões florais hermafrodita do híbrido UC-01 em relação aos seus parentais.

Palavras-chave: mamão; proteoma; diferenciação sexual; desenvolvimento floral.

ABSTRACT

DUARTE, Rafaela Pereira; D.Sc.; North Fluminense State University Darcy Ribeiro; march of 2023; Comparative proteomic analysis in papaya flower buds: approach to sex differentiation and heterosis study; Advisor: D.Sc. Helaine Christine Cancela Ramos; Counselors: D.Sc. Messias Gonzaga Pereira and D.Sc. Vanildo Silveira.

Papaya (*Carica papaya*) is a trioecious species, with female, male and hermaphrodite plants. Sexual differentiation has a great impact for the crop, since only hermaphrodite plants produce fruits with commercial value. Besides the costly sexing step for plant selection, environmental stresses can result in abnormal flower development in hermaphrodite plants. However, the molecular mechanisms that regulate floral development and sex differentiation in papaya are not well understood. Thus, through comparative proteomics analysis, this work aimed to identify proteins associated with sex determination of female and hermaphrodite papaya flowers, as well as non-additive proteins in hermaphrodite flower buds of a papaya hybrid in comparison with their parental lineages. Proteins of flower buds at early and late stages of development of three papaya genotypes (UENF-CALIMAN 01, JS12 and Sunrise Solo 72/12) were studied by means of proteomic analysis combining the shotgun method and nanoESI-HDMSE technology. Buds at an early stage of development, 496 (35.9%) proteins showed significantly different abundances between sexes ($P < 0.05$, $|\log_2\text{FoldChange}| > 0.5$) for genotype SS 72/12, 139 (10%) for genotype JS12 and 165 (11.9%) for the UC-01 genotype. At the final stage of development, 181 (13.5%) proteins showed significantly different

abundances for genotype SS 72/12, 113 (8.4%) for genotype JS12 and 125 (9.1%) for genotype UC-01. Studying only the proteins that showed the same accumulation pattern in the three genotypes studied, it was verified that a large group of proteins differentially accumulated between the sexes were related to the carbohydrates metabolism, monosaccharides and amino acids. The sporopollenin and phenylpropanoid biosynthesis pathways were enriched in hermaphrodite samples at both developmental stages, in addition, predicted interactions between proteins involved in these two pathways were observed, which reinforces the involvement of intermediates of the phenylpropanoid pathway in the biosynthesis of sporopollenin, the main component of the pollen outer wall. Most of the differentially accumulated proteins played a key role in the synthesis of pectin, cellulose and lignin. These compounds play an important role in cell wall formation and seem to be related to the development of male structures in flowers, especially in the formation of the pollen coat. The results suggest that hermaphrodite flowers require greater energy expenditure during their development, probably due to the formation of the complex external pollen wall. Regarding the study of heterosis in hermaphrodite flower buds, several non-additive proteins can be identified, most of which are accumulated in flower buds at an early stage of development. Photosynthesis stood out among the enriched pathways among non-additive proteins, which may be an indication of a better photosynthetic performance and a better response to abiotic stresses in hermaphrodite flower buds of the UC-01 hybrid in relation to its parents.

Keywords: papaya; proteome; sexual differentiation; floral development.

1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.), pertencente à família Caricaceae, é uma frutífera de grande importância econômica cultivada principalmente em países tropicais e com grande aceitação no mercado mundial. O Brasil atualmente se destaca como o segundo maior produtor da fruta (FAOSTAT, 2021). A cultura em questão é uma espécie rara de planta trioica, o que significa que existem plantas de mamoeiro femininas, masculinas e hermafroditas. As populações naturais são dioicas (plantas femininas e masculinas), enquanto as cultivadas são ginoca-andromonoicas (plantas femininas e hermafroditas) (Aryal e Ming, 2014).

Estudos dos mecanismos moleculares que regulam o desenvolvimento dos órgãos florais, bem como a diferenciação do sexo na cultura do mamoeiro são muito importantes. Além da biologia intrigante da cultura, a diferenciação sexual tem um grande impacto na produção de frutos. Apenas as plantas hermafroditas produzem frutos com valor comercial, o que envolve uma onerosa etapa de sexagem para seleção das plantas. Outro gargalo são os estresses ambientais, os quais podem resultar no desenvolvimento anormal das flores, e conseqüentemente de frutos, em plantas hermafroditas (pentandria ou carpeloidia) (Silva et al., 2007).

Pela sua complexidade, a diferenciação sexual no mamoeiro ainda não é bem compreendida. Esse processo parece compreender múltiplas camadas de regulação e coordenação, envolvendo regulação transcricional, epigenética e fitohormônios. Análises comparativa do transcriptoma em flores de mamoeiro de diferentes sexos detectaram a expressão diferencial de genes relacionados à biossíntese de hormônios vegetais e vias de sinalização, especialmente nas vias

de ABA, ROS e auxina (Zerpa-Catanho et al., 2019; Liu et al., 2021; Liao et al., 2022).

Em relação a determinação do sexo no mamoeiro, inicialmente foi proposto a regulação por um único gene com três alelos (Hofmeyr, 1938). Mais tarde, com o mapeamento genético e físico, chegou-se à conclusão de que o sexo na cultura é geneticamente determinado por um recente par de cromossomos sexuais (XX feminino, XY masculino e XY^h hermafrodita), havendo uma região genômica específica do sexo, onde a recombinação dos cromossomos Y e Y^h com o X é suprimida (Ming et al., 2007). Os cromossomos Y e Y^h são quase idênticos, com apenas 0,4% de divergência em suas regiões macho-específicas (MSY). A região HSY e sua contraparte do cromossomo X contém 121 genes, sendo 56 genes específicos do HSY e 74 específicos de X (Yue et al., 2022). Já entre as regiões inteiras do HSY e MSY, o conteúdo dos genes, a estrutura dos éxons e a ordem dos genes são conservados (VanBuren et al., 2015).

Além do interesse em compreender a diferenciação sexual do mamoeiro, o bom desenvolvimento floral é extremamente importante para a produção comercial e também para o desempenho de novos cruzamentos em programas de melhoramento genético de mamoeiro (Silva et al., 2007). Dessa forma, a flor pode ser um órgão ideal para investigar a base genética da heterose em mamoeiro, embora esse tipo de estudo ainda não tenha sido feito sistematicamente.

O uso de abordagens ômicas e bioinformáticas no melhoramento vegetal ajuda a obter uma compreensão holística das bases genéticas e genômicas da cultura, bem como entender a interação molecular entre genes, proteínas e metabólitos, especialmente no que diz respeito a características complexas. Dessa forma, os mecanismos de desenvolvimento de botões florais em plantas vêm sendo estudados através da observação da expressão diferencial de genes e proteínas em plantas dioicas e monoicas (Zerpa-Catanho et al., 2019; Zhang et al., 2021).

Como uma ferramenta poderosa para identificação de proteínas e análise da função gênica, a proteômica tem sido amplamente empregada na ciência de plantas. Uma das ferramentas mais confiáveis e sensíveis utilizadas atualmente para a identificação e quantificação de proteínas é a análise proteômica *gel-free* via cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC-MS/MS) (Karpievitch et al., 2010). A abordagem *gel-free* é muito mais confiável e sensível, podendo identificar aquelas proteínas com peso molecular muito alto ou baixo que não podem ser

identificadas por técnicas baseadas em gel (Washburn et al., 2001). A espectrometria de massa fornece informações valiosas sobre a forma, nível de abundância e aspectos funcionais de cada proteína em determinada amostra (Cravatt et al., 2007).

Com o objetivo de caracterizar centenas de proteínas ao mesmo tempo, tecnologias de alto rendimento vem sendo desenvolvidas. Na abordagem proteômica *bottom-up* ou *shotgun*, as proteínas de uma amostra são primeiramente digeridas em peptídeos para então serem separados por cromatografia líquida (LC) e posteriormente analisados por espectrometria de massa em tandem (MS/MS), resultando em um conjunto de espectros MS/MS. Por outro lado, na proteômica *bottom-down* as proteínas intactas são analisadas diretamente através de espectrômetros de massa. Apesar de exigir mais de técnicas computacionais e estatísticas para identificação de peptídeos e proteínas, a proteômica *shotgun* apresenta maior eficiência de separação e alta sensibilidade espectral de massa quando comparada à abordagem *bottom-down* (Li e Radivojac, 2012).

O advento da abordagem de proteômica comparativa *shotgun* permitiu medições rápidas e de baixo custo da expressão de proteínas em amostras biológicas complexas. Essa metodologia tem sido amplamente utilizada nos últimos anos em biologia vegetal para explorar a dinâmica de expressão de proteínas em diferentes condições de desenvolvimento da planta, inclusive para o estudo de proteínas diferencialmente acumuladas em botões florais masculinos e femininos, com destaque para *Pistacia chinensis* (Chen et al., 2019), *Coccinia grandis* (Devani et al., 2019) e kiwi (*Actinidia chinensis*) (Zhang et al., 2021). Vale ressaltar que em relação à cultura do mamoeiro, ainda não existem relatos de proteômica que busque identificar proteínas envolvidas no processo de desenvolvimento floral.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o desenvolvimento floral de mamoeiro através da abordagem proteômica comparativa *shotgun*, visando a identificação de proteínas que podem estar associadas à diferenciação sexual e ao vigor híbrido.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar proteômica comparativa em botões florais femininos e hermafroditas de mamoeiro em dois estádios de desenvolvimento;
- Identificar e quantificar proteínas diferencialmente acumuladas em botões florais hermafroditas de um híbrido de mamoeiro em comparação com as linhagens parentais para identificar proteínas não aditivas;
- Realizar a anotação funcional de proteínas diferencialmente acumuladas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Importância econômica do mamoeiro

A fruticultura é considerada como uma das atividades mais relevantes do agronegócio brasileiro, sendo importante na geração de empregos no campo, na agroindústria e ao longo de toda a cadeia produtiva, bem como na geração de renda nos mercados interno e externo. Estima-se que a produção brasileira das principais espécies é de 44 milhões de toneladas por ano, em uma área de 2,5 milhões de hectares. O mamão está entre as oito frutas com maior produção nacional, com valor de produção de 1.4 milhão de reais em 2021 (Kist et al., 2022).

O mamoeiro é cultivado em praticamente todo o território nacional, porém a Bahia e o Espírito Santo concentram mais de 65% de toda a produção brasileira. Do total de 1.25 milhão de toneladas produzidas no país em 2021, o estado do Espírito Santo responde por 439 mil toneladas e a Bahia por 400 mil toneladas. Nesse cenário, evidenciam-se também o Ceará com 140 mil toneladas e Rio Grande do Norte com 103 mil toneladas produzidas (IBGE, 2021).

Em relação à produção mundial de mamão, o Brasil se destaca como segundo maior produtor da fruta, respondendo com 8,5% de toda produção, ficando atrás da Índia (37,5%) Outros países com importante contribuição são a Indonésia (7,9%), República Dominicana (7,8%), México (7,6%) e a Nigéria (6%) (FAOSTAT, 2021).

O volume mundial de mamão exportado em 2019 foi de aproximadamente 364 mil toneladas, correspondendo a US\$ 295,6 milhões. O México aparece em

primeiro lugar como exportador, sendo responsável por aproximadamente 54,4% das exportações. Em segundo lugar destaca-se a Guatemala, sendo responsável por 17% das exportações (FAOSTAT, 2019). O Brasil ocupa a terceira posição e é responsável por 12% da exportação mundial, gerando uma renda de US\$ 40 milhões em 2021. O principal destino das exportações brasileiras é o continente europeu, com destaque para Portugal, Espanha e Países baixos.

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

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

3.2 Evolução do sexo em plantas

A maior parte das angiospermas são plantas hermafroditas, sendo apenas 5% das plantas monoicas e 6% dioicas (Renner e Ricklefs, 1995). Por outro lado, dentro da família Caricaceae a maioria das espécies são dioicas. As três espécies não dioicas são dos gêneros *Carica* e *Vasconcellea*; e compreendem a *C. papaya* e a *V. cundinamarcaensis* sendo trioicas, e a *V. monica*, monoica (Storey, 1941).

Plantas unissexuais são derivadas de ancestrais hermafroditas. Duas rotas possíveis têm sido propostas para a evolução de plantas dioicas: via plantas monoicas ou ginodioicas. Em relação à trioicia, evidências preliminares sugerem que plantas trioicas são derivadas de um ancestral dioico pela perda da função supressora do carpelo (Figura 1) (Aryal e Ming, 2014).

Flores unissexuais em uma espécie surgem a partir da supressão do desenvolvimento de um dos órgãos sexuais. Em algumas espécies esse processo ocorre no estágio de especificação celular do meristema floral, o que acarreta na não produção de um dos órgãos sexuais (estame ou carpelo). Para outras espécies a parada ocorre tardiamente durante o desenvolvimento, possibilitando a presença de um vestígio do órgão sexual oposto. A primeira condição é chamada unissexual por princípio e a última é chamada unissexual por aborto. No caso do mamão, os vestígios de um carpelo é evidente na flor masculina, enquanto a flor feminina não apresenta nenhum traço de estames (Mitchell e Diggle, 2005).

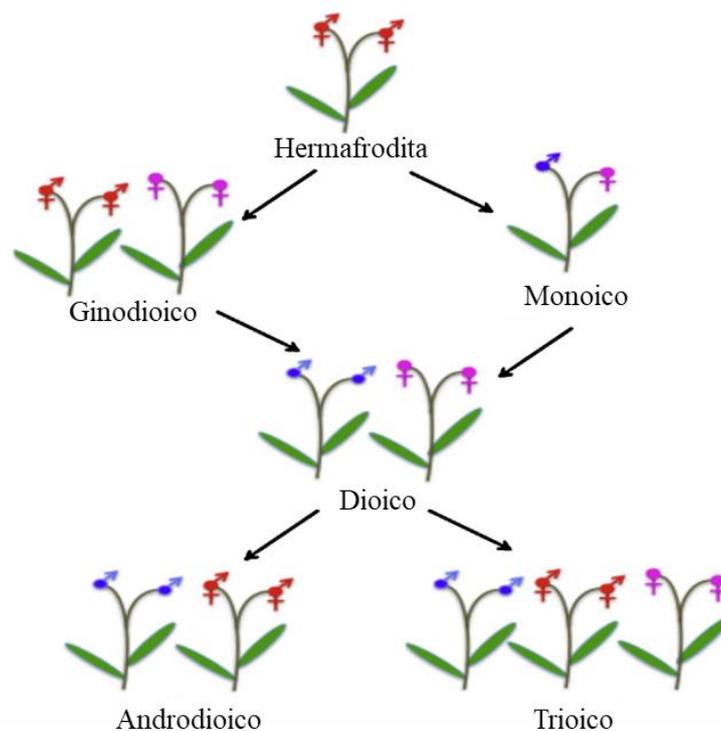


Figura 1. Evolução do sexo em plantas (Aryal e Ming, 2014).

As plantas adquirem vários mecanismos para suprimir o desenvolvimento de um dos órgãos sexuais dependendo do sexo das flores ou plantas. O desenvolvimento do estame e do carpelo envolve um grande número de genes especializados que são necessários em vários estágios do desenvolvimento sexual. Quando qualquer um desses muitos genes regulatórios sofre mutação, pode ocorrer o aborto ou a perda da função dos órgãos masculinos e / ou femininos. Diante disso, a ocorrência de mutações em genes envolvidos no desenvolvimento

do estame e do carpelo é o primeiro evento que leva a evolução dos cromossomos sexuais (Aryal e Ming, 2014).

O desenvolvimento de cromossomos sexuais em espécies dioicas ocorre somente quando os genes de determinação dos dois sexos estão intimamente ligados no mesmo cromossomo e apresentam dominância complementa (Charlesworth e Charlesworth, 1978). No sistema XY (heterogamético masculino), o desenvolvimento de plantas femininas é controlado pelos cromossomos XX homozigóticos e a mutação responsável pela esterilidade masculina tem de ser uma mutação de perda de função (isto é, recessiva). O cromossomo Y contém um alelo de fertilidade masculina em funcionamento, bem como uma mutação de ganho de função (isto é, dominante) num loco diferente que suprime o desenvolvimento de órgãos sexuais femininos (Wellmer et al., 2004; Ming et al., 2011).

Outro evento crucial na evolução dos cromossomos sexuais é a supressão da recombinação entre os dois genes de determinação sexual. Sem a supressão da recombinação, as mutações que levam a esterilidade masculina ou feminina poderiam reverter para hermafroditismo ou indivíduos neutros. A supressão da recombinação em regiões cromossômicas específicas é um fenômeno generalizado em plantas, muitas vezes protegendo o haplótipo que fornece vantagem seletiva; como a autoincompatibilidade, apomixia e determinação do sexo. Os mecanismos de supressão da recombinação incluem rearranjos cromossômicos (inversão, translocação, deleção) e metilação de DNA (Ming et al., 2011).

3.3 Determinação do sexo no mamão

O mamão é uma planta trioica, apresentando plantas femininas, masculinas e hermafroditas. As plantas hermafroditas são classificadas como autógamas facultativas com cleistogamia (Damasceno junior et al., 2009). À vista disso, o mamoeiro pode ser autopolinizado sem expressiva perda de vigor, o que confere uma grande vantagem à cultura pela possibilidade de obtenção de linhagens e híbridos (Dantas et al., 2015).

Por conta de sua biologia intrigante e pelos problemas econômicos causados pela segregação dos tipos sexuais, a determinação do sexo no mamoeiro atrai grande atenção de geneticistas e melhoristas. Antes da aplicação de técnicas

moleculares na pesquisa com mamão, havia poucas evidências para provar ou refutar várias hipóteses propostas ao longo dos anos. No entanto, algumas das hipóteses foram extremamente importantes para o conhecimento da natureza da determinação do sexo no mamão (Ming et al., 2007).

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

Estudos baseados em cruzamentos entre *Carica* e *Vasconcellea* levaram Horovitz e Jiminez (1967) a classificarem a determinação do sexo em mamoeiro como do tipo XY. Mais tarde, o avanço nas técnicas moleculares e a biotecnologia reforçaram a teoria de que o sexo na cultura é geneticamente determinado por um par de cromossomos sexuais (XX feminino, XY masculino e XY^h hermafrodita) (Ming et al., 2007).

O mapeamento genético de alta densidade agrupou o *locus* de determinação do sexo dentro de um grande grupo de marcadores cossegregantes, os quais compreendem 67% do grupo de ligação, demonstrando assim a supressão da recombinação nesta região determinante do sexo (Ma et al., 2004). A partir do mapeamento fino do gene de determinação do sexo, descobriu-se que essa região de recombinação muito baixa contém uma alta porcentagem de marcadores polimórficos. Essa descoberta fornece evidências diretas da origem dos cromossomos sexuais a partir dos autossomos, evidenciando que o mamão contém um cromossomo Y primitivo, com uma região específica do sexo masculino que responde por cerca de apenas 10% do cromossomo, mas que sofreu severa supressão de recombinação e degeneração da sequência de DNA (Liu et al., 2004).

Numerosos rearranjos cromossômicos foram detectados na região específica do sexo masculino do cromossomo Y (MSY), incluindo inversões, deleções, inserções, duplicações e translocações, mostrando o processo evolutivo dinâmico no MSY após o término da recombinação. A expansão da sequência de

DNA foi documentada em duas regiões do MSY, demonstrando que os cromossomos sexuais que são citologicamente homomórficos são heteromórficos ao nível molecular. A análise da divergência de sequência entre quatro pares de genes X e Y^h resultou em uma idade estimada de divergência entre 0,5 e 2,2 milhões de anos, apoiando uma origem recente dos cromossomos sexuais do mamão (Yu et al., 2008).

O genoma do mamão é relativamente pequeno (442,5 Mb), sendo a região determinante do sexo dos cromossomos sexuais curta e bem caracterizada; a região hermafrodita e a masculina específica do cromossomo Y^h e Y correspondem a 8,1 Mb (15% do cromossomo 1) e a região feminina do cromossomo X corresponde a 3,5 Mb (6% do cromossomo 1) (Wang et al., 2012). Os cromossomos Y e Y^h são quase idênticos, com apenas 0,4% de divergência em suas regiões macho-específicas (MSY) (VanBuren et al., 2015).

Wang et al. 2012 relataram existir 106 genes na região HSY e na sua contraparte do cromossomo X, dentre esses 50 estão presentes tanto na região X como na região HSY, 22 são específicos de HSY e 34 são específicos de X. Já entre as regiões inteiras de HSY e MSY, o conteúdo dos genes, a estrutura dos xons e a ordem dos genes são conservados.

Apesar de informações sobre sequenciamento do genoma do mamoeiro já estarem disponíveis, dados sobre os genes relacionados à determinação do sexo ainda são incompletos, provavelmente devido à estrutura complicada de suas sequências de cromossomos sexuais. Com intuito de identificar os genes candidatos à determinação do sexo, Urasaki et al. (2012) realizaram análise de transcriptoma digital de amostras de flores de plantas masculinas, femininas e hermafroditas. Entre as custas sequências de oligonucleotídeos (*tags*) identificadas a partir dos transcritos, 312 *tags* específicas foram mapeados para as sequências dos cromossomos sexuais (X ou Y^h). Uma análise de anotação revelou que os retroelementos são as sequências mais abundantes observadas nos genes correspondentes a essas *tags*. A maioria das *tags* nos cromossomos sexuais estavam localizadas no cromossomo X e apenas 30 foram comumente mapeados no cromossomo X e Y^h, implicando na perda de muitos genes no cromossomo Y^h. No entanto, os autores identificaram o gene Cp2671 como candidato na determinação do sexo, pelo fato do gene estar presente apenas nos cromossomos Y e Y^h. A proteína Cp2671 codificada contém um domínio da família MADS-box e

mostra alta similaridade (85%) com a proteína SVP (*Short Vegetative Phase*), a qual já é caracterizada como regulador transcricional para tempo de floração em *Arabidopsis thaliana*.

Em um estudo de mapeamento funcional do mamão, dois genes candidatos a serem relacionados ao sexo foram identificados: o gene SVP e o gene SERK (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*). O gene SVP se mostrou altamente expresso em flores masculinas e em flores com esterilidade feminina, ou seja, em flores que não desenvolvem o carpelo. Por outro lado, as flores carpeloides apresentaram baixa expressão de SVP. Em relação ao gene SERK, observou-se sequências com *splicing* alternativo em de todos os tipos florais, com exceção das flores masculinas e flores hermafroditas normais. Os SERKs são uma grande família de quinases semelhantes a receptores quinase ricos em leucina (LRR-LKs). Até o momento, vários genes SERK que desempenham papéis significativos no crescimento e desenvolvimento das plantas foram identificados. Entre esses papéis dos SERKs, a esporogênese masculina, a separação dos órgãos florais e o desenvolvimento embrionário são importantes para a reprodução das plantas (Lee et al., 2018).

Trabalhos com RNA-seq vem sendo desenvolvidos para avaliar genes diferencialmente expressos (DEGs) em plantas de mamoeiro de diferentes sexos. Zerpa-catanho et al. (2019) identificaram o gene CpMS1 (*Male Sterility 1 gene*) altamente regulado em brotos de flores masculinas e hermafroditas em comparação com brotos de flores femininas; e que pode estar desempenhando um papel importante no desenvolvimento de órgãos de flores masculinas, devido a sua homologia com os genes MS1 previamente identificados em outras plantas. Acredita-se que esse gene esteja envolvido na formação da parede celular e do revestimento do pólen, assim como na regulação dos fatores de transcrição envolvidos na produção de pólen. Os autores também identificaram a expressão diferencial de genes que participam nas vias de sinalização ABA, ROS e auxina (ABA-8-hidroxilases, AIL5, upBEAT 1, proteína de ligação a VAN3), entretanto o papel das vias de sinalização ABA e ROS no desenvolvimento das flores de mamão precisa ser mais explorado.

Chae et al. 2021 investigaram a expressão gênica ligada aos cromossomos X, Y e Y^h em diferentes estádios de desenvolvimento floral e identificaram 309 genes nos cromossomos sexuais, a maioria dos quais em regiões

pseudoautossômicas. A expressão em amostras femininas na região determinante do sexo foi quase o dobro da expressão ligada ao X em amostras masculinas e hermafrodita. O resultado sugeriu que a compensação de dose, um processo que equaliza a expressão ligada ao X masculino e feminino, não evoluiu para a maioria dos DEGs ligados ao sexo. Em contraste, uma análise de loci hemizigóticos ligados ao X encontrou evidências de compensação parcial da dosagem.

Estudos recentes com o sequenciamento de bissulfito do DNA genômico extraído de flores em estágio inicial de desenvolvimento, sugerem que a metilação do DNA está envolvida na diferenciação sexual e na evolução dos cromossomos sexuais. A variação do metiloma das flores em diferentes épocas do ano também foi detectada. Essa variação foi resultante de alterações no padrão de expressão transcricional de genes relacionados à modificação da metilação e relacionados ao remodelamento da cromatina (Zhou et al., 2022).

3.4 Flores anormais em mamoeiro

Dentre os três sexos que a espécie apresenta, o hermafrodita é mais vulnerável a produzir flores anormais, enquanto que as plantas femininas são estáveis quanto à floração, portanto, não sofrem com tais anomalias. Considerando que a expressão do sexo em plantas é o resultado da interação entre fatores genéticos e ambientais (Frankel e Galun, 1977), é comum observar-se no campo, plantas de mamoeiro hermafroditas apresentando diferentes alterações florais.

Em condições de temperaturas altas, estresse hídrico e baixos níveis de nitrogênio, as flores hermafroditas podem se transformar em masculinas, apresentando o ovário abortado ou rudimentar, portanto, tais flores não produzem frutos. Assim sendo, na maioria dos casos, a produção de frutos é reduzida. Esta alteração floral é conhecida como reversão sexual, “esterilidade de verão” ou esterilidade feminina (Martelleto et al., 2011).

Sob condições de temperatura baixa ou amena, e altos níveis de umidade e nitrogênio no solo, a flor hermafrodita pode transformar seus estames em estruturas semelhantes a carpelos, fenômeno conhecido por carpeloidia. As flores carpeloides produzem frutos deformados em diferentes graus, por isso, estes não são comercializados. Além dessas duas alterações florais devido às condições ambientais, é registrada também a ocorrência de pentandria, que corresponde na transformação da flor hermafrodita em um tipo semelhante ao feminino, porém com

redução do número de estames de 10 para 5, e ovário possuindo cinco sulcos profundos que permanecem até a maturidade do fruto, dando a ele um formato globular e sulcado, fora do padrão comercial, semelhantes aos frutos originados a partir de plantas femininas (Arkle Junior e Nakasone, 1984).

A deformação de flores hermafroditas pode representar uma estratégia evolutiva para superar o estresse ambiental. É possível que flores carpeloides e pentândricas representem uma tendência da planta a retornar a sua forma feminina, já que plantas femininas se mostram mais estáveis e mais eficientes na alocação de fotoassimilados, gerando maior rendimento de frutos. Por outro lado, a esterilização feminina indica uma forma da planta economizar energia sem afetar sua dispersão na população (Silva et al., 2007). Dependendo da intensidade de emissão dessas flores anormais gera-se problemas para a cultura devido à formação de frutos fora do padrão comercial.

Sabe-se que fatores ambientais, como temperatura, fotoperíodo, nutrição e disponibilidade de água podem determinar a expressão sexual da flor em muitas espécies. Embora os mecanismos moleculares de tal controle ambiental ainda não tenham sido estudados, a maioria dos sistemas de determinação do sexo influenciados pelo ambiente tem maior probabilidade de ser regulada por mecanismos epigenéticos (Aryal e Ming, 2014).

3.5 Proteômica em plantas

Proteoma são todas as proteínas expressas por um organismo, por um tecido ou por uma célula. O conceito de proteoma se diferencia do conceito de genoma, enquanto existe apenas um genoma definido para um organismo, o proteoma varia em diferentes condições, podendo variar em diferentes tecidos de um mesmo organismo (Wilkins et al., 1996). Como uma extensão do termo proteoma, proteômica descreve as análises de identificação e quantificação de proteínas expressas de um organismo, célula, tecido ou organela em um tempo específico sobre certas condições.

Em análises de proteômica, as proteínas podem ser separadas por meio de técnicas baseadas em gel (*gel based*) ou livres de gel (*gel free*). Em relação a primeira metodologia, realiza-se a separação inicial de proteínas por eletroforese em gel seguida da quantificação, digestão dos spots de proteínas e identificação por espectrométrica de massa (MS). Já na metodologia *gel free*, a digestão proteica

é realizada já no mix de proteínas extraídas (*shotgun*) para posterior separação dos peptídeos por cromatográfica líquida (LC) e identificação por MS. As abordagens *shotgun* possuem muitas vantagens, como sensibilidade e reprodutibilidade, mesmo para proteomas complexos. Entretanto, as respostas obtidas são fragmentos de um todo e, embora seja possível a identificação de uma proteína com base em alguns peptídeos, as modificações pós-traducionais não são reconhecidas. Além disso, um peptídeo pode ser perdido durante a cromatografia ou não gerar espectros de massas adequados (Champagne e Boutry, 2013).

Dentro das abordagens de proteômica ressalta-se a proteômica comparativa. O propósito dessa abordagem não é identificar o conjunto total de proteínas em uma determinada amostra, mas caracterizar diferenças entre diferentes populações de proteínas. Como exemplo, estudos são realizados com objetivo de estabelecer diferenças nos perfis proteicos entre genótipos, incluindo transgênicos e mutantes, tipo de células, tecidos, órgãos, estádios de desenvolvimento e respostas a fatores externos. Na maioria dos casos, o objetivo final da proteômica comparativa é identificar proteínas diferencialmente abundantes para explicar as características biológicas de cada sistema e/ou obter biomarcadores proteicos (Rose et al., 2004; Jorrín-Novo et al., 2015).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

As análises de proteômica foram realizadas com botões florais do híbrido UENF-CALIMAN 01 (UC-01), bem como de seus parentais: JS12 e Sunrise Golden 7212. O híbrido UC-01, primeiro híbrido nacional, foi desenvolvido pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e pela empresa Caliman Agrícola S/A, para as regiões Norte e Noroeste Fluminense, além da porção Norte do litoral do Espírito Santo. O UC-01 é uma planta vigorosa com elevada sanidade, alto potencial produtivo. As plantas apresentam características fenotípicas do grupo Formosa, produzindo frutos alongados nas plantas hermafroditas, com peso médio de 1,25 kg e com polpa firme e vermelha. Apresenta também alto teor de sólidos solúveis, além de sabor e aroma bastante agradáveis (Ferregueti, 2003).

Os genótipos parentais foram selecionados pelo método de pedigree e pertencem ao banco de germoplasma do programa de melhoramento de mamão UENF/Caliman. O parental masculino Sunrise Solo cv. 72/12 é uma cultivar de polinização aberta do grupo Solo procedente do Havaí, introduzida e melhorada pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), também conhecida como mamão-havaí, é amplamente disseminada nas regiões produtoras do Espírito Santo. O fruto proveniente de flor feminina é ovalado, e o de flor hermafrodita é piriforme (em forma de pêra). De casca lisa e firme, e peso médio de 500 g, é de grande aceitação nos mercados interno e externo.

Possui cavidade interna pequena e de formato estrelado; polpa espessa, de coloração vermelho-alaranjada e de boa qualidade (Faria et al., 2009).

O parental feminino JS12 é uma linhagem do grupo Formosa proveniente do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMPF). A linhagem apresenta frutos alongados de extremidades afuniladas, com peso médio de 900 g; polpa com moderada firmeza e alto teor de sólidos solúveis (Cardoso et al., 2014; Cortes et al., 2019).

Para obtenção dos botões florais, sementes de cada genótipo foram germinadas em casa de vegetação em bandeja de plástico com capacidade para 96 tubetes, utilizando substrato comercial Basaplant®. Um total de 160 mudas (60 de cada linhagem e 40 do híbrido) foram transplantados para a área experimental do Colégio Agrícola Antônio Sarlo, localizado no município de Campos dos Goytacazes/RJ. O espaçamento utilizado foi de 1,0 m entre linhas e de 1,0 m entre plantas.

Aproximadamente cinco meses após o transplante foi realizada a sexagem das plantas e coleta dos botões florais. Os botões florais de plantas femininas e hermafroditas de cada genótipo foram divididos em dois grupos de acordo com tamanho (em milímetros) descrito por Urasaki et al. (2012). Um grupo contendo botões florais com tamanho de 7 mm (estágio inicial de desenvolvimento) e o segundo grupo contendo botões florais com tamanho de 20 mm (estágio final de desenvolvimento). Portanto, o trabalho foi composto por 12 amostras distintas, organizadas em fatorial triplo: 2 sexos (feminino e hermafrodita) x 2 estádios de desenvolvimento (inicial e final) x 3 genótipos (UC-01, JS12 e SS 72/12). A fim de obter-se matéria fresca suficiente para a extração de proteínas, principalmente para botões em estágio inicial de desenvolvimento, botões florais de diferentes plantas foram agrupados ao acaso para formar cada amostra. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, e armazenadas a -80 °C até a extração de proteínas.

4.2 Extração total de proteínas

As análises foram realizadas utilizando-se três repetições biológicas para cada amostra, sendo cada repetição composta de 300 mg de matéria fresca. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de pistilo e cadinho de cerâmica. O material pulverizado foi transferido para microtubos e ressuspensão

em 1 mL de tampão de extração [10% de ácido tricloroacético (TCA; Sigma-Aldrich) em acetona]. As amostras foram incubadas por 60 minutos a 4°C e depois centrifugadas a 16.000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado três vezes em acetona fria com 20 mM de DTT. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de tampão (7 M de ureia, 2 M tiourea, 2% de Triton X-100, 1% de DTT (DTT, GE Healthcare, Piscataway, USA), 1 mM de fluoreto fenilmetanossulfonil (PMSF, Sigma-Aldrich) e coquetel completo de inibidores de protease (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), agitado em vórtex por 5 min e depois resfriado em gelo por 30 min. As amostras foram então agitadas por 30 min a 8°C e depois centrifugadas a 16.000 g por 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram então coletados e armazenados a -20°C. A quantificação das proteínas foi realizada utilizando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare).

4.3 Digestão de proteínas

Antes da etapa de digestão com tripsina, 100 µg de proteínas de cada amostra foram precipitadas utilizando a metodologia metanol/clorofórmio para remoção de interferentes das amostras (Nanjo et al., 2012). Após a precipitação das proteínas, as amostras foram ressuspendidas em solução de ureia 7 M/tiourea 2 M. A digestão de proteínas trípticas (1:100 enzima:proteína, V5111, Promega, Madison, EUA) foi realizada pelo método de preparo de amostra auxiliada por filtro (FASP - filter-aided sample preparation) descrito por Burrieza et al. 2019. Os peptídeos resultantes foram quantificados de acordo com o método de proteína e peptídeo A205nm utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA).

4.4 Espectrometria de massas

A espectrometria de massa foi realizada usando um cromatógrafo líquido de ultra desempenho nanoAcquity (upLC) acoplado a um instrumento Q-TOF SYNAPT G2-Si (Waters, Manchester, Reino Unido). As corridas foram realizadas com três repetições biológicas de 2 µg de proteína digerida. Durante a separação, as amostras foram carregadas em coluna de trap C18 de 5 µm nanoAcquity upLC M-Class Symmetry (180 µm × 20 mm) a 5 µL / min durante 3 minutos e depois na

coluna de fase reversa nanoAcquity M-Class HSS T3 de 1,8 μm (75 μm \times 150 mm) a 400 nL / min, com uma temperatura da coluna de 45 $^{\circ}\text{C}$.

Para eluição dos peptídeos, um gradiente binário foi utilizado. A fase A consistiu em água (Tedia, Fairfield, Ohio, USA) e 0,1% de ácido fórmico (SigmaAldrich) e a fase B consistiu de acetonitrila (Sigma-Aldrich) e 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich). A eluição em gradiente iniciou com B 5%, que então aumentou de B 5 a 40% até 91,12 min e de B 40 a 99% até 95,12 min, após isso foi mantida em 99% até 99,12 min. A eluição então diminuiu para B 5% até 101,12 min, e depois foi mantida a B 5% até o final da corrida em 117,00 min. As análises foram realizadas em positivo, em modo de resolução (V mode) a 35.000 FWHM com mobilidade iônica (HDMSE), e em modo independente de aquisição de dados (DIA) com o programa de velocidade de onda de mobilidade iônica começando em 800 m/s e terminando em 500 m/s. A transferência de energia de colisão aumentou de 25 para 55 V no modo de alta energia, as tensões do cone e capilar foram de 40 e 2800 V, respectivamente, a pressão do gás de nanofluxo foi de 0,5 bar, a taxa de fluxo do gás de purga foi de 150 L/h e a temperatura da fonte foi de 100 $^{\circ}\text{C}$. Para os parâmetros de tempo de voo (TOF), o tempo de varredura foi ajustado para 0,6 s em modo contínuo, com faixa de massa de 50 a 2000 Da. [Glu1]-fibrinopeptídeo B humano (Sigma-Aldrich) a 100 fmol μL^{-1} foi usado como um calibrador externo, e a aquisição de massa de bloqueio foi realizada a cada 30 s. Os espectros de massa foram posteriormente adquiridos pelo software MassLynx v4.1 (Waters).

4.5 Análise dos dados

O processamento dos espectros e banco de referência foram realizados utilizando o software ProteinLynx Global SERVER (PLGS) v.3.02 (Waters) e o workflow foi com o software ISOQuant (Distler et al., 2014, 2016). Na análise do PLGS foram utilizados os seguintes parâmetros: Apex3D de 150 contagens como limite de baixa energia, 50 contagens como limite de energia elevada e 750 contagens como limite de intensidade; uma clivagem perdida; no mínimo três fragmentos de íon por peptídeos; no mínimo sete fragmentos de íon por proteína; no mínimo dois peptídeos por proteína; modificações fixas como carbamidometil (C) e modificações variáveis como oxidação (M) e fosforil (STY); a 31 taxa de falsas descobertas (FDR) para identificação de peptídeos e proteínas foi ajustada para um máximo de 1%, com um comprimento mínimo de seis aminoácidos

Utilizou-se o banco de dados da Phytozome 10.2 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), contendo todas as entradas de proteína de *C. papaya* (27.793 sequências, julho de 2021). A quantificação foi realizada usando o software ISOQuant v.1.7 usando configurações e algoritmos descritos anteriormente (Distler et al., 2014, 2016). Foi utilizada uma normalização multidimensional, que corrige as intensidades de pico com base nos domínios de intensidade e tempo de retenção, resumidamente, a análise incluiu alinhamento no tempo de retenção, e o exato tempo de retenção de massa (EMRT). A análises quantitativa label-free foi estimada usando a abordagem de quantificação TOP3 (Silva et al., 2006). Seguido pelo processo de normalização multidimensional implementado no ISOQuant (Distler et al., 2014). Após o processamento dos dados e para garantir a qualidade dos resultados, apenas proteínas presentes em pelo menos três execuções foram utilizadas para análise de abundância diferencial. Finalmente, as proteínas foram submetidas à caracterização funcional pelo software OmicsBox software (www.biobam.com/omicsbox/). Essas sequências com o processo biológico não identificadas pelo OmicsBox foram analisadas manualmente utilizando as ferramentas de BLAST on-line: UniprotKB (<http://www.uniprot.org/blast/>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>).

Para realizar o mapeamento cromossômico dos genes referentes as proteínas identificadas no presente trabalho, utilizou-se como referência o genoma da cultivar SunUp, depositado em 2021 no NGDC (National Genomics Data Center), cuja montagem está a nível cromossômico (Yue et al., 2022).

4.6 Análise proteômica comparativa

A análise incluiu as comparações de botões florais hermafroditas em relação aos botões florais femininos dos três genótipos analisados nas duas fases de desenvolvimento floral. Proteínas com resultados significativos do teste t de Student (bicaudal; $P < 0,05$) foram consideradas diferentemente acumuladas (DAPs) e valores de Log2 fold change (Log2FC) maiores que 0,5 caracterizaram proteínas up-acumuladas e menores que -0,5, proteínas down-acumuladas. O enriquecimento de processos biológicos, componente celular, função molecular e vias KEGG entre DAPs foram realizados através do portal Metascape (Zhou et al., 2019) após um BLAST no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para obter as

sequências de proteínas de referência em *A. thaliana*, para as análises utilizou-se como critério de corte o teste exato de Fisher ($p < 0,01$). Para análise de heterose dos botões florais hermafroditas, a comparação entre a média do híbrido e suas linhagens parentais foi medida usando teste t de Student assumindo a seguinte hipótese nula (H_0): $H = (P_1 + P_2)/2$, em que H é a média híbrida e P1 e P2 são as médias dos dois pais correspondentes, respectivamente.

5. RESULTADOS

5.1 Proteoma de botão floral de *C. papaya*

A análise proteômica comparativa de botões florais hermafroditas e femininos foi realizada em dois estádios de desenvolvimento e em três genótipos de mamoeiro. Um total de 1402 e 1352 proteínas foram identificadas no estágio inicial e final de desenvolvimento, respectivamente. Para apontar algum padrão de resposta no perfil proteico relacionado aos tratamentos, as intensidades de contagem de íons das triplicatas biológicas foram utilizadas para uma redução de dimensionalidade utilizando análise de componentes principais (PCA), reduzindo a variância das proteínas entre os tratamentos em apenas 2 novas variáveis (Figura 2).

Observa-se que as proteínas que contribuíram para aproximadamente 29,6% da variância entre as amostras separaram principalmente as amostras em estágio inicial e final de desenvolvimento (genótipos na condição inicial ao lado direito do plano, figura 2), com destaque para o genótipo 7212 com ambos os sexos avaliados em estágio inicial ao extremo esquerdo. Já no segundo componente, com aproximadamente 22,6% da variância explicada, foi possível observar uma separação melhor do efeito de sexo, porém uma separação mais sutil, de menor magnitude comparada ao efeito de tempo. Essa separação acontece principalmente nas amostras em estágio final, e no genótipo 7212 em estágio inicial de desenvolvimento. Outro ponto importante, é que quando observada a terceira dimensão, com variância explicada de 13,5%, a separação do efeito de sexo ficou

mais visível, com maior variação no estágio inicial de desenvolvimento, novamente com destaque para o genótipo 7212 (Anexo 1).

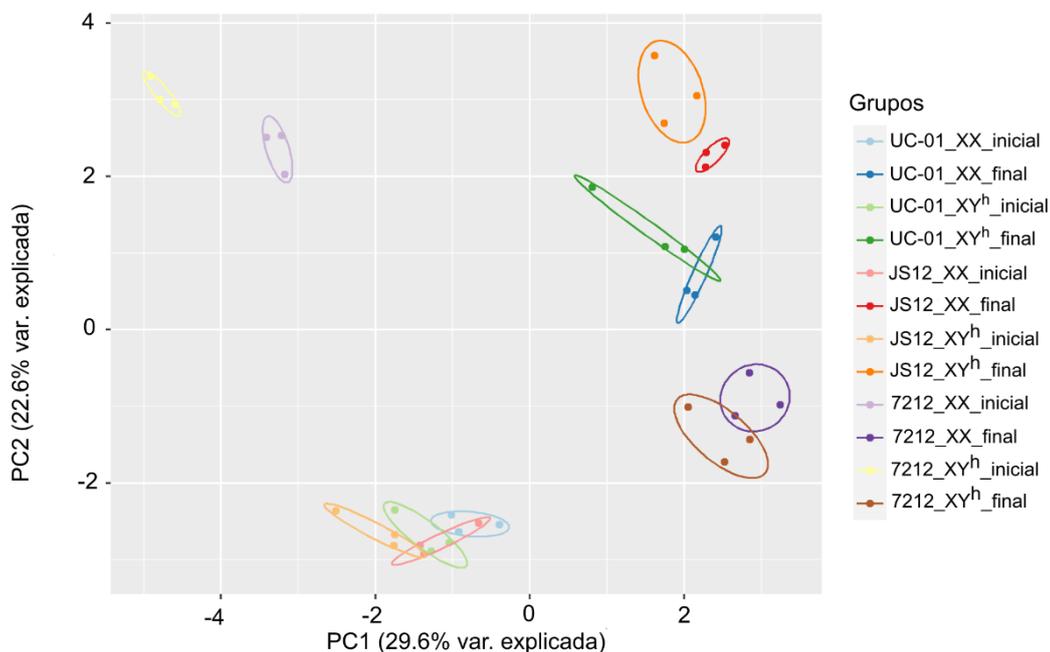


Figura 2. Análise de Componentes Principais (PCA) da contagem de íons onde proteínas foram consideradas dimensões e as triplicatas biológicas observações. A combinação dos fatores: genótipos (UC-01, JS12 e 7212), sexo (XX ou XY^h) e período de desenvolvimento (inicial ou final), formaram os 12 tratamentos (grupos) são observados no plano cartesiano.

No que se refere a análise diferencial entre botões florais hermafroditas em relação aos botões femininos em estágio inicial de desenvolvimento, 496 (35,9%) proteínas apresentaram abundâncias significativamente diferentes ($P < 0.05$, $|\log_2\text{FoldChange}| > 0.5$) para genótipo o 7212, 139 (10%) para o genótipo JS12 e 165 (11,9%) para o genótipo UC-01. Dentre as proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs), os genótipos JS12 e 7212 apresentaram a maior parte de suas proteínas como *up*-acumuladas. Por outro lado, além da maior quantidade de DAPs identificadas no genótipo 7212, observou-se um resultado balanceado entre as proteínas *up* e *down*-acumuladas (Tabela 1). Comparando os três genótipos, 36 proteínas *up*-acumuladas e 6 proteínas *down*-acumuladas coincidiram nos três genótipos analisados (Figura 3).

Tabela 1. Número de proteínas identificadas na análise proteômica comparativa (XY^h/XX) entre botões florais em estágio inicial e final de desenvolvimento de três genótipos de mamoeiro

Genótipos	Estádio inicial			Estádio final		
	7212	JS12	UC-01	7212	JS12	UC-01
Proteínas Totais	1381	1383	1386	1340	1339	1345
Proteínas <i>up</i> (XY^h/XX)	243	89	90	83	62	61
Proteínas <i>down</i> (XY^h/XX)	228	39	55	81	31	46
Proteínas únicas XY^h	18	9	14	14	18	13
Proteínas únicas XX	7	2	6	3	2	3

Em relação à análise diferencial entre botões florais hermafroditas em relação aos botões femininos em estágio final de desenvolvimento, 181 (13,5%) proteínas apresentaram abundâncias significativamente diferentes para genótipo o 7212, 113 (8,4%) para o genótipo JS12 e 125 (9,1%) para o genótipo UC-01. Assim como no estágio inicial de desenvolvimento dos botões, a maioria das DAPs foram *up*-acumuladas nos genótipos JS12 e UC-01. Em relação ao genótipo 7212 a quantidade de proteínas *up* e *down*-acumuladas foram parecidas (Tabela 1). Comparando os três genótipos, 32 proteínas *up*-acumuladas e 1 proteína *down*-acumulada coincidiram nos três genótipos analisados (Figura 3).

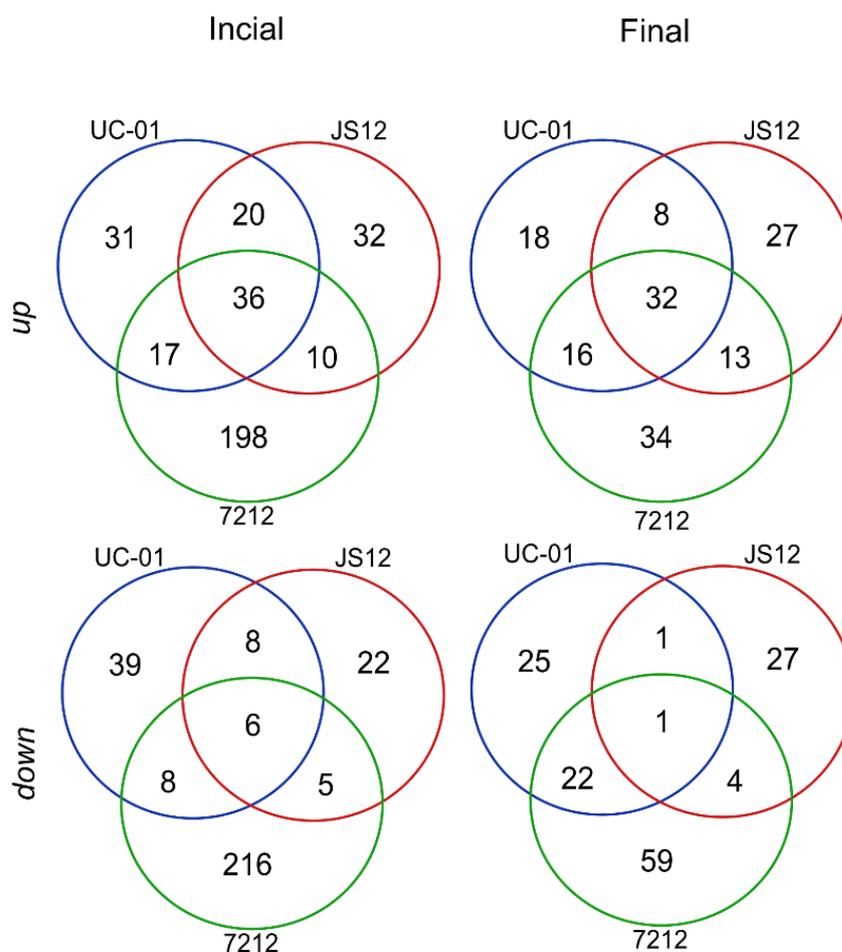


Figura 3. Diagrama de Venn de proteínas *up* e *down* acumuladas em botões florais hermafroditas e femininos de 3 genótipos de mamoeiro (UC-01, JS12 e 7212) em 2 estádios de desenvolvimento (inicial e final).

Foi realizado o mapeamento cromossômico para determinar se alguma das proteínas identificadas seriam codificadas por genes provenientes da região específica do sexo do mamoeiro. Utilizou-se como referência o genoma da cultivar SunUp, cuja montagem está a nível cromossômico (Yue et al., 2022). Dos acessos proteômicos, 87,5% foram significativamente alinhados com proteínas codificadas por regiões gênicas do genoma, para ambos os estádios de desenvolvimento. Na Figura 4 está o número de genes codificadores para os acessos proteômicos em cada cromossomo.

Apenas o gene codificador da proteína ARF-GTPase foi alinhado com a região HSY do cromossomo 1, entretanto a proteína não foi diferencialmente acumulada nas análises. O restante dos genes codificadores foram todos alinhados em cromossomos autossômicos ou na região autossômica do cromossomo 1.

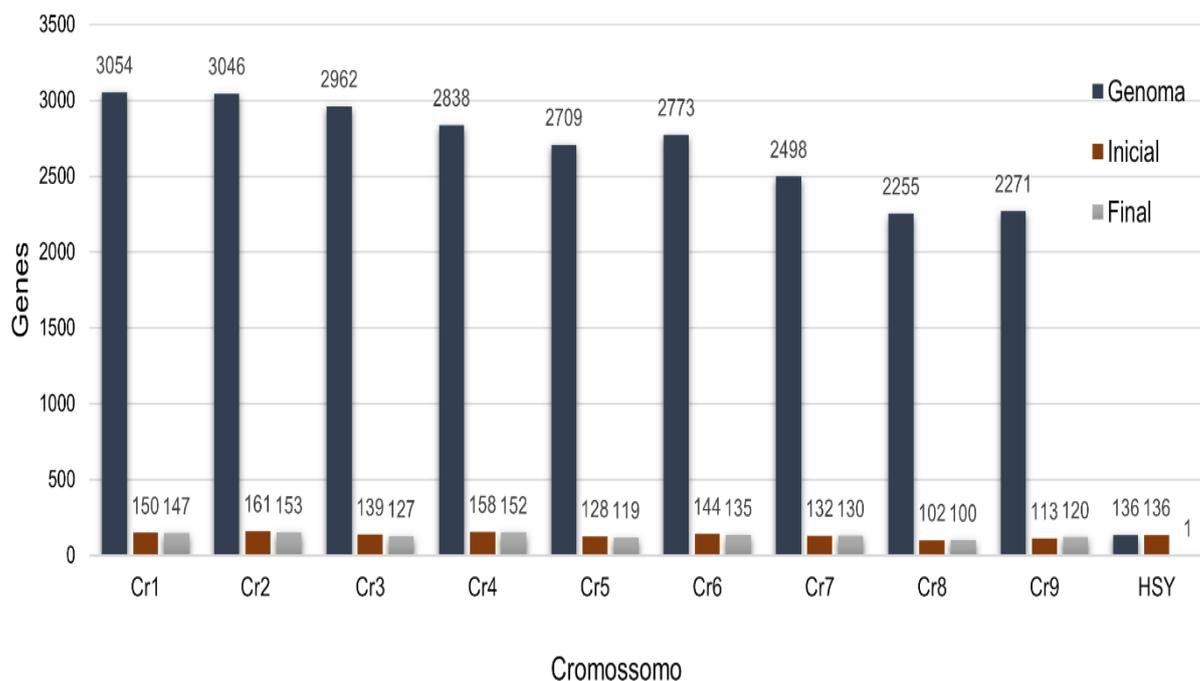


Figura 4. Número de genes para cada cromossomo. Em azul escuro encontra-se o número total de genes para cada um dos cromossomos de *C. papaya*. Em marrom e cinza está representado o número de genes codificadores, identificados nesta análise, que correspondem às regiões codantes dos peptídeos identificados pela proteômica nos estádios inicial e final de desenvolvimento, respectivamente.

5.2 Análise de enriquecimento GO em proteínas diferencialmente acumuladas

5.2.1 Botões florais em estágio inicial de desenvolvimento

Foi realizada a análise de enriquecimento dos termos de antologia de gene (GO) das DAPs identificadas nos três genótipos de mamoeiro. No processo biológico, as proteínas *up*-acumuladas enriquecidas no genótipo 7212 estão envolvidas no metabolismo de aminoácidos, metabolismo de S-adenosilmetionina, metabolismo do ácido dicarboxílico, biossíntese de esporopolenina, biossíntese de lignina, tradução e enovelamento de proteínas. Para o genótipo JS12, destaca-se o metabolismo de nucleosídeo bifosfato, metabolismo de S-adenosilmetionina, resposta ao estresse oxidativo e biossíntese de fenilpropanoide. No mesmo contexto, para o genótipo UC-01 os processos estão envolvidos na biossíntese de esporopolenina, metabolismo de nucleotídeos, resposta ao estresse oxidativo e biossíntese de metabólicos secundários (Figura 5).

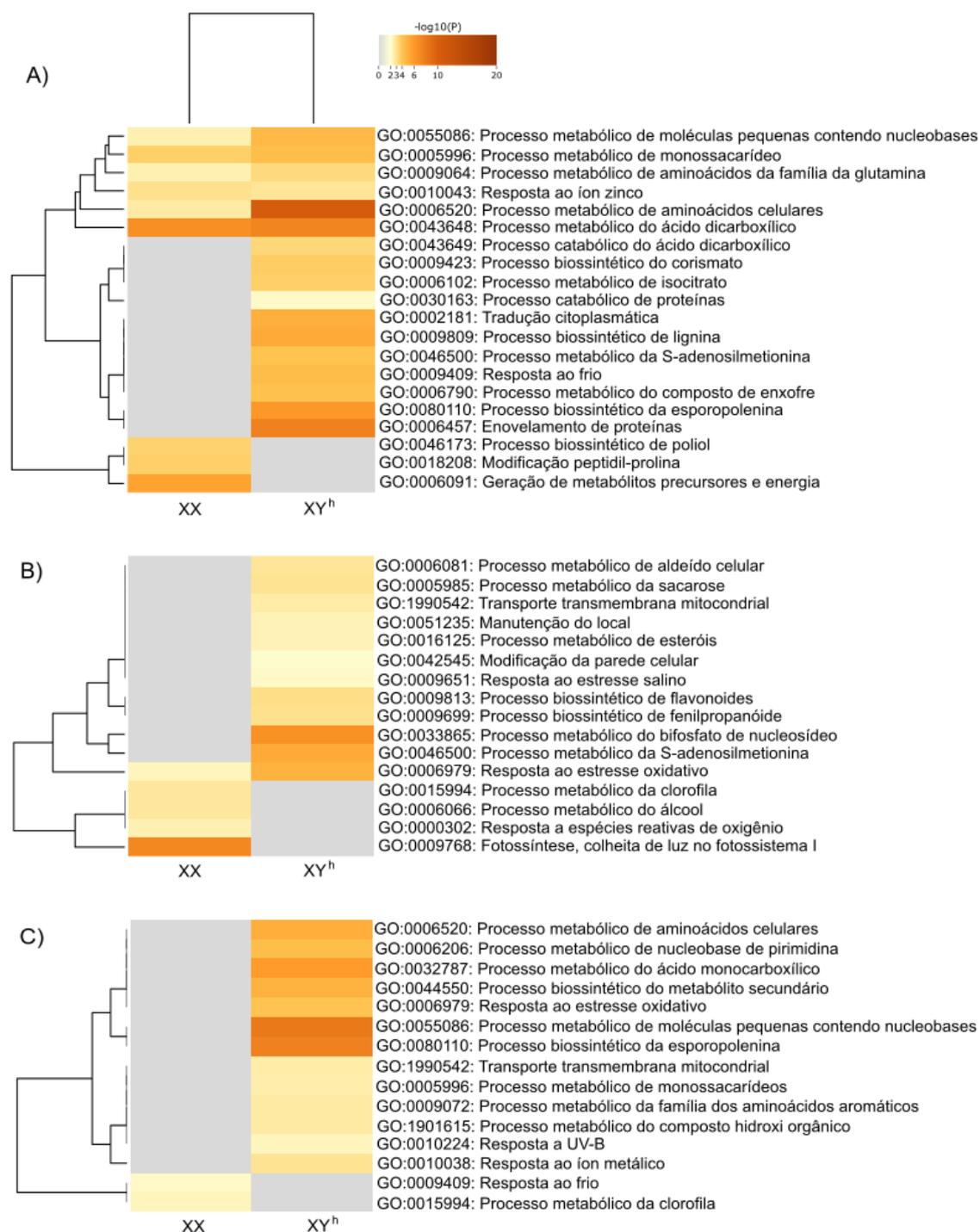


Figura 5. Heatmap dos 20 termos de ontologia de gene (GO) enriquecidos dentro do domínio “Processo Biológico” que mais variaram entre as DAPs de botões florais hermafroditas e femininos dos genótipos (A) 7212, (B) JS12 e (C) UC-01 em estágio inicial de desenvolvimento (Teste de Fisher com $p < 0.01$).

Em relação às proteínas *down-acumuladas*, houve uma quantidade menor de vias enriquecidas em processo biológico. Para o genótipo 7212, as DAPs estão envolvidas no metabolismo do ácido dicarboxílico, geração de metabólitos precursores e energia, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de ácido carboxílico e modificação de peptidil-prolina. Em relação ao genótipo JS12, destaca-se: fotossíntese, resposta a espécies reativas de oxigênio (ROS), metabolismo de álcool e metabolismo de clorofila. Por fim, no genótipo UC-01 foram enriquecidas as vias de metabolismo de clorofila e resposta ao frio.

5.2.2 Botões florais em estágio final de desenvolvimento

Em processo biológico, as proteínas *up-acumuladas* enriquecidas no genótipo 7212 estão envolvidas na biossíntese de lignina, metabolismo de monossacarídeos, resposta a dissecação, metabolismo de ácido dicarboxílico, metabolismo de hemicelulose e resposta a intensidade luminosa. Para o genótipo JS12, destaca-se o, metabolismo de monossacarídeos, biossíntese de metabólitos secundários, metabolismo de carboidratos, metabolismo de ácido carboxílico e biossíntese de flavonoides. No mesmo contexto, para o genótipo UC-01 os processos estão envolvidos na biossíntese de lignina, metabolismo de monossacarídeos, biossíntese de esporopolenina e metabolismo de aminoácido celular (Figura 6).

Em relação as proteínas *down-acumuladas*, as DAPs do genótipo 7212 estão envolvidas no enovelamento de proteínas, regulação de transporte mediado por vesícula, reparo de DNA, resposta ao calor e derivação de energia pela oxidação de compostos orgânicos. Em relação ao genótipo JS12, apenas os processos de enovelamento de proteínas e catabolismo de macromoléculas celular foram enriquecidos. Por fim, no genótipo UC-01 foram enriquecidos o desenvolvimento do gineceu, metabolismo de mRNA, modificação peptidil-lisina e divisão celular.

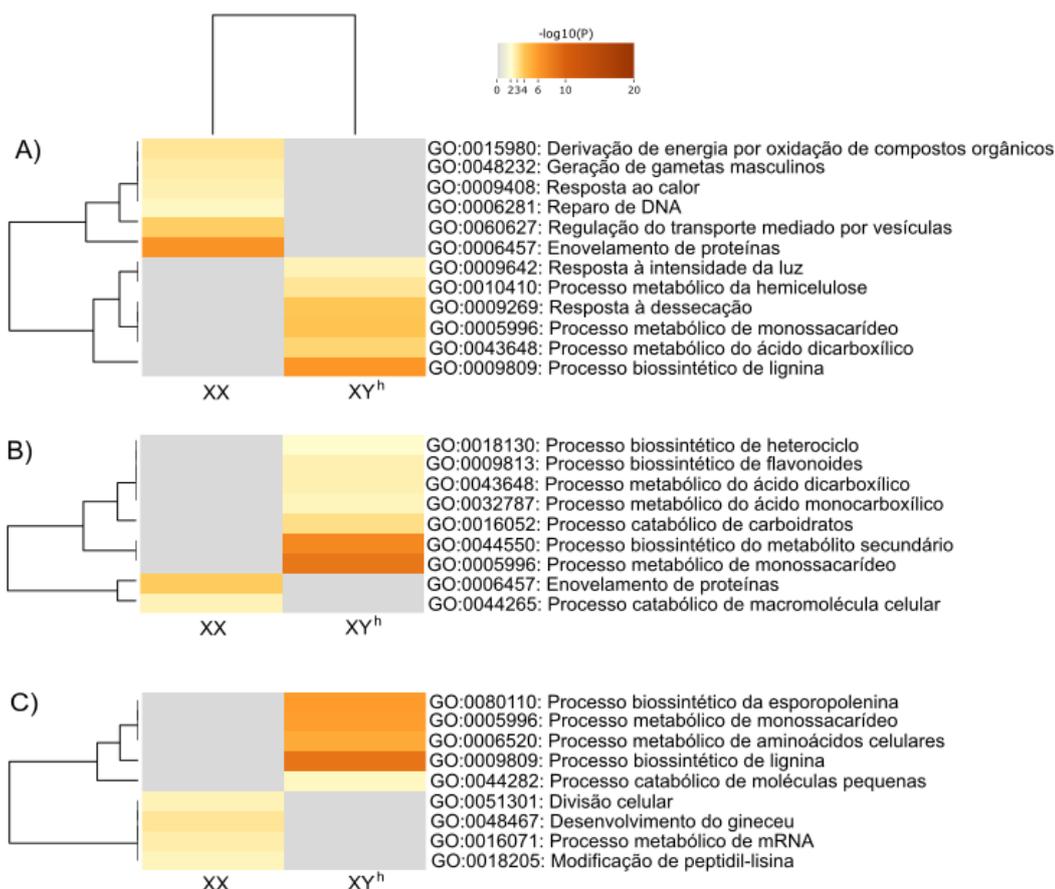


Figura 6. Heatmap dos 20 termos de ontologia de gene (GO) enriquecidos dentro do domínio “Processo Biológico” que mais variaram entre as DAPs de botões florais hermafroditas e femininos dos genótipos (A) 7212, (B) JS12 e (C) UC-01 em estágio final de desenvolvimento (Teste de Fisher com $p < 0.01$).

5.3 Análise de enriquecimento de vias KEGG em proteínas diferencialmente acumuladas

5.3.1 Botões florais em estágio inicial de desenvolvimento

As vias KEGGs enriquecidas nas proteínas *up*-acumuladas no genótipo 7212 estão envolvidas no metabolismo e biossíntese de aminoácidos, metabolismo de carboidratos, metabolismo de cofatores, biossíntese de metabólitos secundários (fenilpropanoide), tradução de proteínas (ribossomo) e em processo celular de transporte e catabolismo (fagossomo). Para o genótipo JS12 destaca-se o metabolismo de carboidratos, biossíntese de fenilpropanoide, biossíntese de cofatores e metabolismo de aminoácidos. Em relação ao genótipo UC-01, foram enriquecidas as vias de metabolismo de carboidratos, biossíntese de cofatores

(ubiquinona e outros terpenoides-quinona) e biossíntese de fenilpropanoide (Figura 7).

As proteínas *down*-acumuladas do genótipo 7212 foram enriquecidas nas vias envolvidas no metabolismo de carbono, transcrição (spliceossoma) e degradação de proteínas (proteassoma). Apenas as vias de fotossíntese e metabolismo do carbono foram enriquecidas nas proteínas *down*-acumuladas do genótipo JS12. No mesmo contexto, a única via enriquecida para o genótipo UC-01 é de proteassoma.

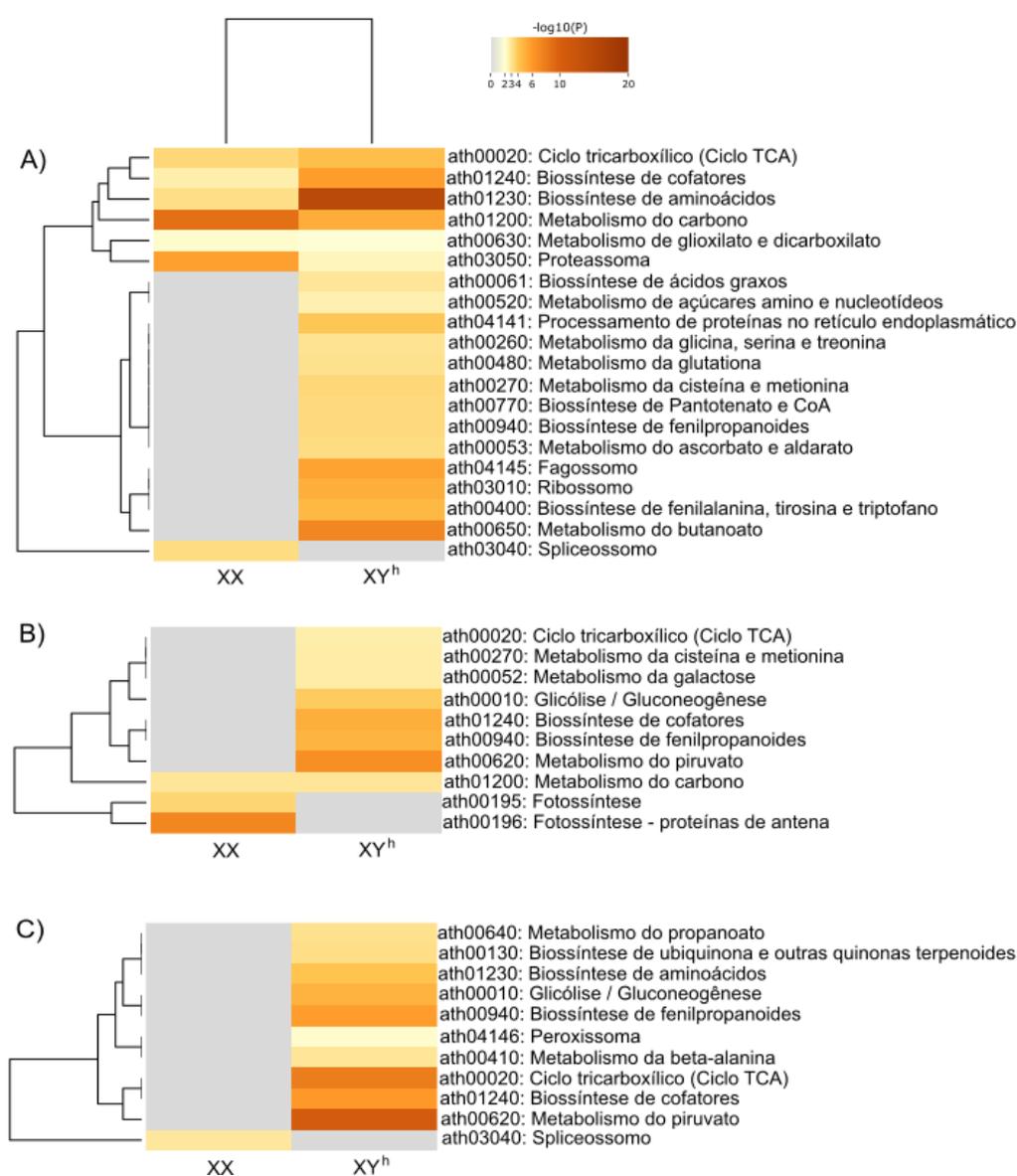


Figura 7. Heatmap das 20 vias KEGG enriquecidas que mais variaram entre as DAPs de botões florais hermafroditas e femininos os genótipos (A) 7212, (B) JS12 e (C) UC-01 em estágio inicial de desenvolvimento (Teste de Fisher com $p < 0.01$).

5.3.2 Botões florais em estágio final de desenvolvimento

As vias KEGGs enriquecidas nas proteínas *up*-acumuladas no genótipo 7212 estão envolvidas na biossíntese de fenilpropanoide, metabolismo de carboidratos, metabolismo de aminoácidos e metabolismo de carbono. Para o genótipo JS12 destaca-se o metabolismo de carbono e carboidratos, biossíntese de aminoácidos e biossíntese de fenilpropanoide. Em relação ao genótipo UC-01, foram enriquecidas as vias de biossíntese de fenilpropanoide, biossíntese de aminoácidos, metabolismo de carbono e carboidratos, e metabolismo do ácido 2-oxocarboxílico (Figura 8).

As proteínas *down*-acumuladas do genótipo 7212 foram enriquecidas em vias envolvidas no metabolismo de carbono, spliceossomo, metabolismo de carboidratos, proteassoma e processo celular de transporte e catabolismo (endocitose). Apenas as vias proteassoma e spliceossomo foram enriquecidas nas proteínas *down*-acumuladas do genótipo JS12. No mesmo contexto, a única via enriquecida para o genótipo UC-01 foi spliceossomo.

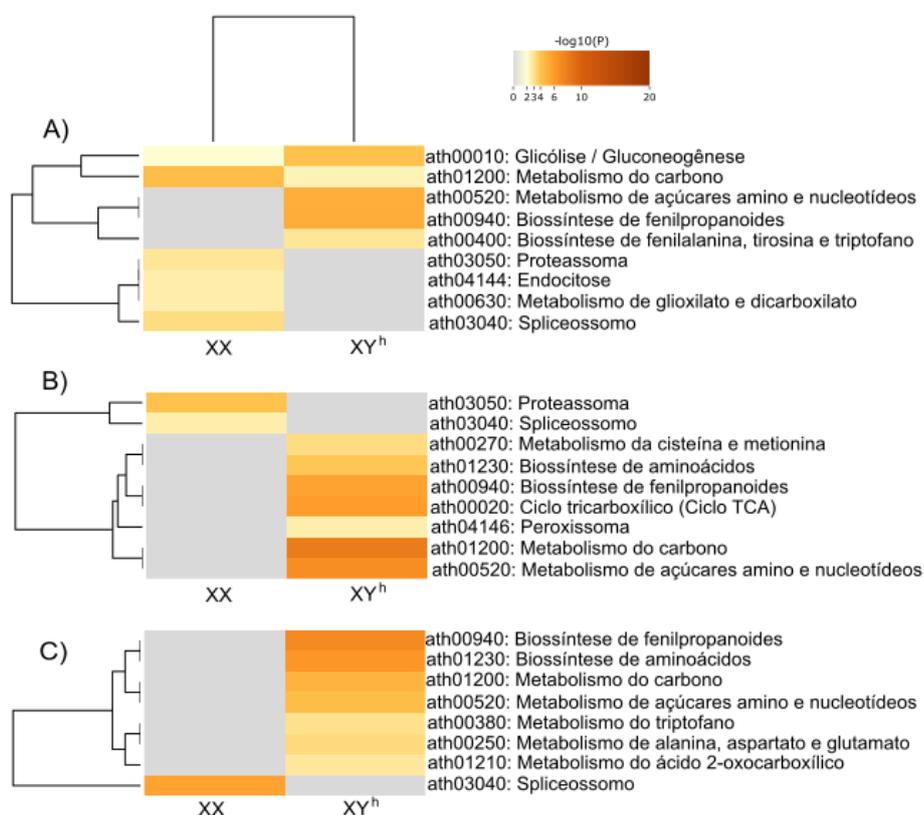


Figura 8. Heatmap das 20 vias KEGG enriquecidas que mais variaram entre DAPs de botões florais hermafroditas e femininos dos genótipos (A) 7212, (B) JS12 e (C) UC-01 em estágio final de desenvolvimento (Teste de Fisher com $p < 0.01$).

5.4 Análise de interação proteína-proteína *in silico*

A análise de interação proteína-proteína foi realizada apenas com DAPs com o mesmo padrão de acumulação nos três genótipos estudados (Figura 9). Como resultado, pode-se observar mais interações preditas entre proteínas *up*-acumuladas em botões hermafrodita, sendo poucas proteínas *down*-acumuladas preditas no estágio inicial e nenhuma proteína feminina no estágio final de desenvolvimento. Além disso, a maior parte das interações em botões hermafroditas envolveram proteínas associadas com vias metabólicas e com a biossíntese de fenilpropanoide.

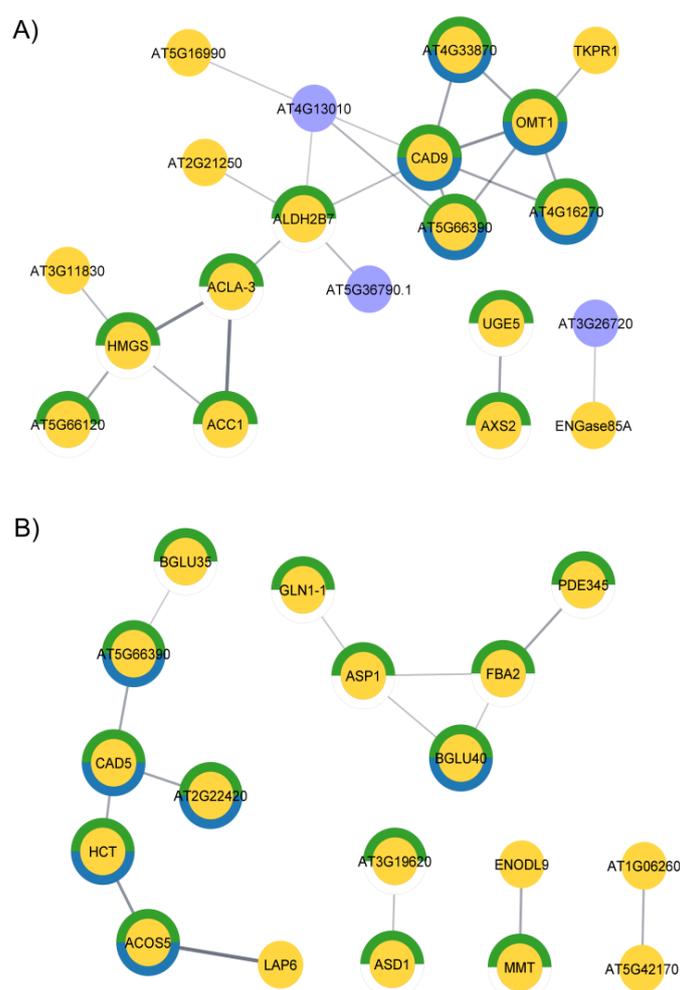


Figura 9. Rede de interação proteína-proteína preditas em botões florais de mamoeiro em estágio inicial (A) e final (B) de desenvolvimento. Os traços representam interações com probabilidade $>0,4$. Os nós amarelos representam proteínas acumuladas em flores hermafroditas. Os nós azuis representam proteínas acumuladas em flores femininas. O círculo verde indica proteínas envolvidas com vias metabólicas e o círculo azul representa proteínas associadas com a biossíntese de fenilpropanoide.

5.5 Análise de heterose

Proteínas não aditivas foram usadas para as análises seguintes quando suas abundâncias eram significativamente diferentes da média parental. Para identificar diferenças significativas na abundância de proteínas entre a descendência híbrida e as linhagens parentais, foram realizados testes t nos valores de contagem total de íons dessas proteínas. Os botões florais hermafroditas do híbrido UC-01 juntamente com seus parentais foram analisados em dois estádios de desenvolvimento. No estágio inicial de desenvolvimento foram identificadas 1398 proteínas. Dentre essas proteínas, 1372 foram comuns aos três genótipos, quatro foram exclusivas do genitor feminino JS12 e duas foram exclusivas do genitor masculino 7212. Das 1398 proteínas identificadas, 647 apresentaram acúmulo não aditivo em botões florais hermafroditas do híbrido JS12 x Sunrise Golden 7212 (t-test p- valor < 0,05) (tabela 2).

Tabela 2. Número de proteínas totais e número de proteínas não aditivas identificadas em botões florais hermafroditas de três genótipos de mamoeiro (híbrido UC-01 e seus parentais JS12 x Sunrise Golden 7212) em dois estádios de desenvolvimento

	Proteínas totais			Proteínas não aditivas
	7212	JS12	UC-01	
Estádio inicial de desenvolvimento	1381	1383	1386	647
Estádio final de desenvolvimento	1340	1339	1345	349

Foi realizada a análise de enriquecimento dos termos de antologia de gene (GO) e das vias KEGG das proteínas que apresentaram acúmulo não aditivo no híbrido analisado. Dando continuidade ao estágio inicial de desenvolvimento, a maioria dos termos enriquecidos foram agrupadas dentro do domínio “Componente Celular”, com destaque para estroma de cloroplasto, vacúolo, vesícula secretora, tilacoide, nucléolo e ribossomo. As vias KEEG enriquecidas estão envolvidas no metabolismo de carbono, de carboidrato e de energia, bem como na biossíntese de aminoácidos (Figura 10).

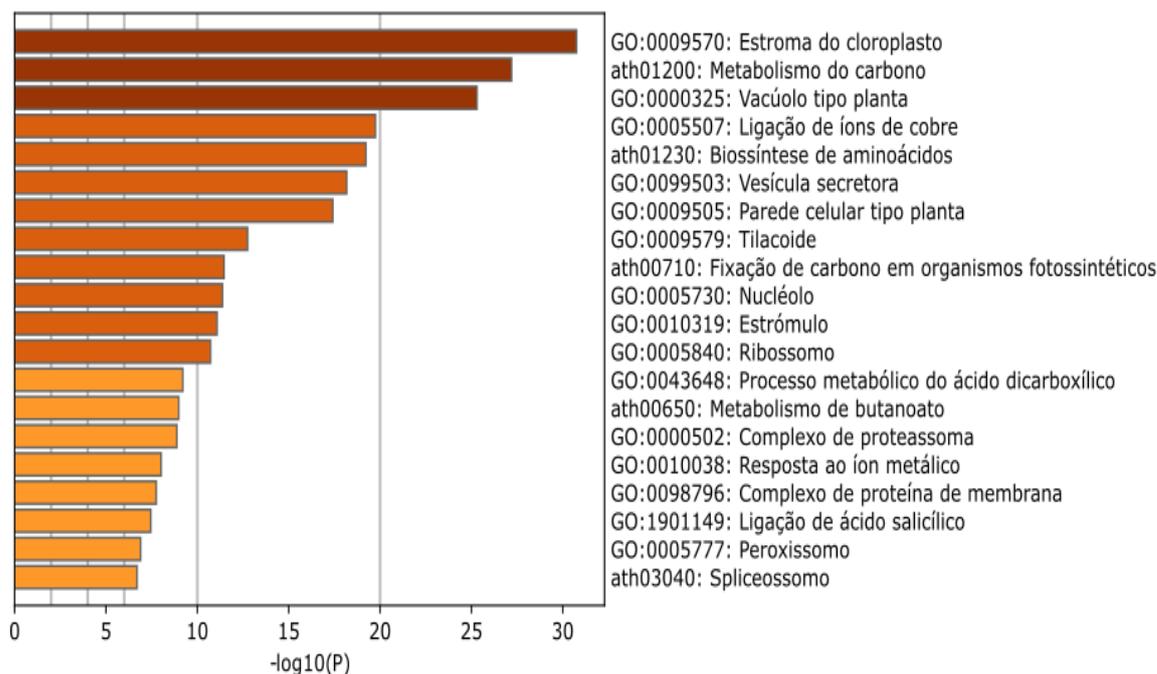


Figura 10. Termos de antologia de gene e vias KEGG mais enriquecidas para as proteínas não aditivas de botões florais hermafroditas de mamoeiro em estágio inicial de desenvolvimento.

Em relação às amostras em estágio final de desenvolvimento, 1349 proteínas foram identificadas. Dentre essas proteínas, 1344 foram comuns aos três genótipos, com apenas uma proteína exclusiva para o híbrido UC-01. Das 1398 proteínas identificadas, 349 apresentaram acúmulo não aditivo em botões florais hermafroditas do híbrido em estudo. Os termos de antologia de gene (GO) enriquecidos para essas proteínas que apresentaram heterose estão agrupadas dentro dos três domínios existentes. Dentro do domínio “Processo biológico” destacam-se: processo metabólico de moléculas pequenas contendo nucleobases, processo metabólico do piruvato e processo catabólico da sacarose. Dentro de “Função molecular” destacam-se: ligação de íon de cobre, atividade da glicosidase, ligação de moléculas pequenas, atividade intramolecular da oxidoredutase e atividade de ligase. Para o domínio “Componente celular” os termos apoplasto, vesícula secretora, estroma do cloroplasto e peroxissomo foram enriquecidos. Para as vias KEGG obteve-se vias envolvidas com o metabolismo de carbono, de carboidratos e de aminoácidos (Figura 11).

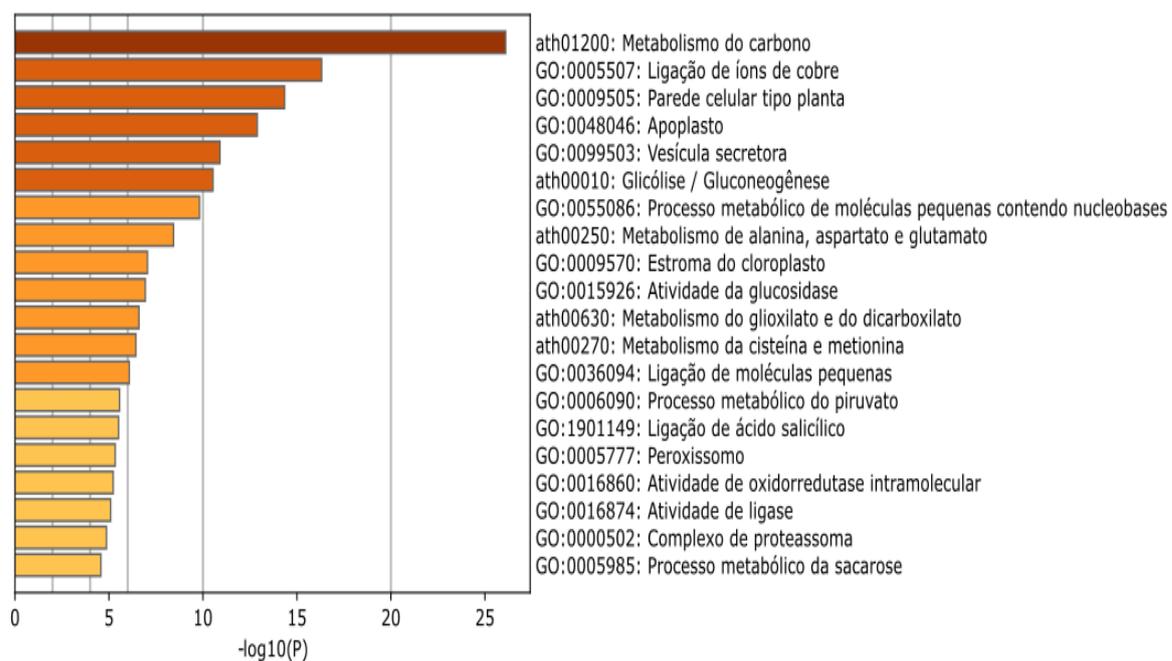


Figura 11. Termos de antologia de gene e vias KEGG mais enriquecidas para as proteínas não aditivas de botões florais hermafroditas de mamoeiro em estágio final de desenvolvimento.

6. DISCUSSÃO

A análise proteômica revelou diversas proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) em botões florais femininos (XX) e hermafrodita (XY^h) de genótipos contrastantes em estágio inicial e final de desenvolvimento. O efeito de tempo teve uma influência muito maior no perfil proteico do que o efeito de sexo, o que indica uma atribuição da característica do sexo a um conjunto menor de genes.

Devido à grande importância comercial de populações ginoicas-andromonoicas dentro da cultura do mamoeiro, o presente estudo se dedicou apenas às diferenças entre plantas femininas e hermafroditas. Em contrapartida, a maior parte dos estudos de diferenciação sexual fazem a comparação de plantas femininas e masculinas, devido à própria natureza das espécies estudadas. As diferenças de plantas femininas em comparação às plantas hermafroditas são sutis, mas de grande importância para compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento floral do mamoeiro.

A quantidade de proteínas diferencialmente acumuladas foi muito maior no genótipo 7212, tanto no estágio inicial como no estágio final de desenvolvimento. O tamanho dos botões florais foi o padrão utilizado para a amostragem, o que pode ter influenciado na diferença do padrão proteômico, pois tanto o desenvolvimento quanto o tamanho dos botões são distintos em cada genótipo. O resultado pode indicar uma ativação gênica relacionada ao sexo das plantas 7212 anterior às demais, já que nos outros genótipos, principalmente na condição inicial, foi observado duas vezes menos proteínas diferencialmente acumuladas entre os

sexos. Devido à diferença nos botões florais e com o objetivo de selecionar as proteínas com papel importante na diferenciação sexual independente do genótipo e tempo, o estudo se dedicou apenas às proteínas que apresentaram o mesmo padrão de acúmulo nos três genótipos estudados (Tabela 3).

Apesar de análises de transcriptoma com enfoque na diferenciação sexual do mamoeiro apontarem vários genes relacionados à biossíntese de hormônios vegetais e vias de sinalização de ABA, ROS e auxina, no presente estudo a maior parte das proteínas diferencialmente acumuladas entre os sexos estão envolvidas na metabolismo de carboidratos, biossíntese de fenilpropanoide e biossíntese de esporopolenina (Zerpa-Catanho et al., 2019; Liu et al., 2021; Liao et al., 2022). Além disso, os genes codificantes dessas proteínas foram todos mapeados em cromossomos autossômicos ou na região autossômica do cromossomo 1.

Tabela 3. Proteínas diferencialmente acumuladas entre botões florais hermafroditas e femininos (XY^h/XX) em estágio inicial e final de desenvolvimento de mamoeiro. Cro: cromossomo

Pacid	Nome da Proteína	Ortólogo de Arabidopsis	Contagem de peptídeos	Score	Estádio		Cro	Classificação funcional
					Inicial	Final		
16416228	Hidroximetilglutaril-CoA sintase	HMGS	7	22,22	<i>up</i>	-	4	Processo metabólico de acil-CoA
16420853	ATP-citrato sintase de cadeia alfa 2	ACLA-3	9	47,73	<i>up</i>	-	3	Processo metabólico de acil-CoA
16422019	Aspartato aminotransferase, mitocondrial	ASP1	14	55,37	-	<i>up</i>	3	Processo metabólico de aminoácidos
16423471	3-desidroquinato sintase, cloroplástico	AT5G66120	7	23,33	<i>up</i>	-	4	Processo metabólico de aminoácidos
16416662	Isoenzima do nódulo de glutamina sintetase	GLN1-1	15	65,73	-	<i>up</i>	9	Processo metabólico de aminoácidos
16431833	Subunidade tipo piridoxal 5'-fosfato sintase PDX1.2	PDX1.2	9	33,89	<i>up</i>	-	5	Processo metabólico de aminoácidos
16421959	Proteína tipo DJ-1 homóloga E	YLS5	2	6,57	Única XY ^h	-	3	Processo metabólico de auxina
16416617	Proteína de choque térmico de 23,6 kda, isoforma mitocondrial X2	HSP23.6	4	29,72	<i>up</i>	-	9	Resposta do íon cádmio
16417656	Alfa-L-arabinofuranosidase e beta-D-xilosidase	ASD1	5	8,53	-	<i>up</i>	8	Metabolismo de carboidratos
16405220	Alfa-L-arabinofuranosidase e beta-D-xilosidase	AT3G19620	19	38,24	-	<i>up</i>	6	Metabolismo de carboidratos
16407673	Alfa-manosidase putativa	AT3G26720	2	8,19	<i>down</i>	-	-	Metabolismo de carboidratos
16411511	Provável poligalacturonase	AT4G23500	6	19,67	<i>up</i>	-	4	Metabolismo de carboidratos
16423487	Glucano endo-1,3-beta-glicosidase 1	AT5G67460	4	20,05	<i>down</i>	-	4	Metabolismo de carboidratos
16429637	Mirosinase 5	BGLU35	6	39,93	-	<i>up</i>	3	Metabolismo de carboidratos
16404021	Beta-glicosidase 40	BGLU40	4	17,22	-	<i>up</i>	2	Metabolismo de carboidratos
16416524	Endoquitinase ácida	CHIA	10	50,16	Única XY ^h	-	9	Metabolismo de carboidratos
16423395	Frutose-bifosfato aldolase 1, cloroplástico	FBA2	15	51,52	-	<i>up</i>	4	Metabolismo de carboidratos
16424498	Frutose-bifosfato aldolase 3, cloroplástico	PDE345	17	64,97	-	<i>up</i>	2	Metabolismo de carboidratos
16426415	Xiloglucana endotransglicosilase/proteína hidrolase 2	XTH1	2	13,27	-	<i>up</i>	3	Metabolismo de carboidratos
16420647	UDP-D-apiose/UDP-D-xilose sintase 2	AXS2	13	48,28	<i>up</i>	-	2	Organização da parede celular
16423312	Pirofosfatase inorgânica solúvel	PPa1	7	52,8	<i>up</i>	-	4	Biogênese da parede celular
16419703	Provável pectinesterase/inibidor da pectinesterase 51	AT5G09760	5	15,11	<i>up</i>	-	6	Modificação da parede celular
16409807	Xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase 2	XTH16	4	15,9	<i>up</i>	-	3	Processo metabólico de polissacarídeos da parede celular
16409474	Endoglucanase tipo 24	GH9B18	5	16,8	Única XY ^h	-	6	Processo catabólico da celulose

Tabela 3. Cont.

Pacid	Nome da Proteína	Ortólogo de Arabidopsis	Contagem de peptídeos	Score	Estádio		Cro	Classificação funcional
					Inicial	Final		
16411521	Precursor do tipo endoglucanase	GH9B15	7	29,96	-	Única XY ^h	-	Processo catabólico da celulose
16421843	Cutina sintase	AT5G33370	2	8,99	-	Única XY ^h	6	Desenvolvimento da cutícula
16418378	Tipo de proteína de cobre azul	AT1G72230	2	19,47	<i>up</i>	-	1	Atividade de transferência de elétrons
16427195	Proteína tipo nodulina inicial 1	ENODL3	3	3692	-	<i>up</i>	3	Atividade de transferência de elétrons
16420466	Tipo de proteína de cobre azul	ENODL9	2	8,97	-	<i>up</i>	7	Atividade de transferência de elétrons
16424659	Acetil-CoA carboxilase tipo 1	ACC1	4	3,33	<i>up</i>	-	1	Processo biossintético de ácidos graxos
16419976	GDP-L-fucose sintase	At1g17890	2	16,89	-	<i>up</i>	6	Processo biossintético de GDP-L-fucose
16418782	Proteína 1 ativadora de GTPase RAN	RANGAP1	19	51,96	<i>up</i>	-	-	Atividade do ativador GTPase
16427824	Fosfoglicolato fosfatase 1A	AT5G36790.1	5	21,95	<i>down</i>	-	1	Atividade de hidrolase
16421839	GDSL esterase/lipase	AT5G33370	14	67,48	<i>up</i>	-	6	Atividade de hidrolase
16415240	GDSL esterase/lipase EXL3	AT5G42170	3	25,63	-	Única XY ^h	1	Atividade de hidrolase
16414779	GDSL lipase/esterase	ESM1	5	23,32	<i>down</i>	-	4	Atividade de hidrolase
16419252	Aldeído oxidase tipo GLOX	AT1G14430	6	20,25	-	Única XY ^h	9	Componente integral da membrana
16404669	Hidroxicinamoil-CoA: quinato/xiquimato hidroxicinamoil transferase	O- HCT	5	27,97	-	<i>up</i>	5	Processo biossintético de lignina
16426308	UDP-glicose 4-epimerase GEPI48	UGE5	8	34,96	<i>up</i>	<i>up</i>	4	Processo metabólico dos monossacarídeos
16410983	Metionina S-metiltransferase	MMT	9	11,64	<i>up</i>	<i>up</i>	9	Processo metabólico da S-adenosilmetionina
16422697	Proteína de desacoplamento mitocondrial 1	PUMP1	2	10,82	<i>up</i>	-	8	transporte mitocondrial
16411862	Endo-beta-N-acetilglucosaminidase 1 citosólica	ENGase85A	5	16,67	Única XY ^h	-	2	Processo metabólico composto de nitrogênio
16415424	Natterin-3	-	30	84,3	<i>down</i>	-	6	Sem função
16408016	Proteína 21 de arabinogalactana tipo fasciciclina	-	11	36,57	<i>up</i>	-	4	Sem função
16426214	Proteína semelhante à extensina repetida rica em leucina 4	AT2G19780	7	39,62	-	<i>up</i>	7	Sem função
16413335	Fosfolipase A1-II gama	At2g31100	3	12,08	-	Única XY ^h	3	Sem função
16424879	Aldeído desidrogenase família 2 membro B7, mitocondrial	ALDH2B7	19	63,04	<i>up</i>	-	8	Atividade da oxidoreductase
16430780	Enzima tipo ponte berberina 5	AT1G26390	6	29,02	-	Única XY ^h	9	Atividade da oxidoreductase

Tabela 3. Cont.

Pacid	Nome da Proteína	Ortólogo de Arabidopsis	Contagem de peptídeos	Score	Estádio		Cro	Classificação funcional
					Inicial	Final		
16409463	D-sorbitol-6-fosfato desidrogenase dependente de NADP	AT2G21250	6	23,62	<i>up</i>	-	6	Atividade da oxidoreductase
16426395	Homólogo da quinona oxidoreductase do envelope do cloroplasto	AT4G13010	4	25,23	<i>down</i>	-	3	Atividade da oxidoreductase
16422652	Peroxidase 17 (PRX17)	AT2G22420	6	36,59	-	<i>up</i>	4	Biossíntese de fenilpropanóide
16428257	Peroxidase 40 (PRX40)	AT4G16270	14	54,35	<i>up</i>	-	5	Biossíntese de fenilpropanóide
16417967	Peroxidase putativa 48	AT4G33870	3	13,95	Única XY ^h	-	5	Biossíntese de fenilpropanóide
16423354	Peroxidase 72-like (PRX72)	AT5G66390	14	56,8	<i>up</i>	Única XY ^h	4	Biossíntese de fenilpropanóide
16405261	Provável álcool cinâmico desidrogenase 1	CAD5	15	63,06	-	<i>up</i>	6	Biossíntese de fenilpropanóide
16425533	Provável álcool cinâmico desidrogenase 9	CAD9	13	63,23	<i>up</i>	-	-	Biossíntese de fenilpropanóide
16416437	Ácido cafeico 3-O-metiltransferase	OMT1	10	49,32	<i>up</i>	-	9	Biossíntese de fenilpropanóide
16411756	Pirofosfatase inorgânica solúvel 4	PPa4	6	54,36	<i>up</i>	<i>up</i>	8	Processo metabólico composto contendo fosfato
16413363	Provável cisteína protease RD21B	AT1G06260	20	68,48	-	<i>up</i>	3	Processo catabólico de proteínas
16405685	Proteína contendo domínio Mesd	AT2G46000	3	16,1	<i>up</i>	-	5	Dobramento de proteínas
16404975	Proteína do complexo T1 subunidade eta	AT3G11830	16	47,6	<i>up</i>	-	5	Dobramento de proteínas
16431194	Ponte berberina tipo enzima 10	AT1G30720	10	38,33	-	Única XY ^h	9	Proteólise
16418608	Protease tipo subtilisina SBT1.6	SBT1.6	33	69,74	<i>up</i>	-	6	Proteólise
16422477	Estrutura do precursor de uma variante termoestável da papaína na resolução de 2,6 Angstroem	XCP1	9	52,38	-	<i>up</i>	-	Proteólise
16429914	Proteína associada a plastídios e lipídios, cloroplástica	FIB	4	20,63	-	<i>up</i>	7	Resposta ao ácido abscísico
16414902	2-alquenal redutase	AT5G16990	10	38,22	<i>up</i>	-	5	Resposta ao estresse oxidativo
16425735	Glutamato-cisteína ligase, cloroplástico	GSH1	8	34,21	<i>up</i>	-	4	Resposta ao estresse oxidativo
16424279	Proteína tipo 5 relacionada à patogênese	TLP-3	2	15,51	-	<i>up</i>	1	Resposta ao estresse
16423506	Fator de emenda rico em serina/arginina SR45a	AT4G35785	5	15,28	-	<i>down</i>	-	Splicing de RNA
16420028	Acil-CoA sintetase	ACOS5	18	58,79	-	Única XY ^h	6	Biossíntese de esporopolenina
16404812	Hidroxiálquil alfa-pirona sintase	LAP6	10	48,33	-	Única XY ^h	5	Biossíntese de esporopolenina
16414345	Tetracetida alfa-pirona redutase 1	TKPR1	2	14,04	Única XY ^h	-	6	Biossíntese de esporopolenina

6.1 Diferenças no metabolismo de carboidratos entre botões florais femininos e hermafroditas em *C. papaya*

Verificou-se que um grande grupo de proteínas diferencialmente acumuladas em botões florais de mamoeiro estavam relacionadas ao metabolismo. A maioria delas estavam envolvidas no metabolismo de carboidratos e de aminoácidos, e foram reguladas positivamente no estágio inicial e final de botões hermafroditas. Este resultado reforça estudos que indicam que o metabolismo energético desempenha um papel crucial durante a diferenciação sexual e o desenvolvimento dos botões florais (Chen et al., 2016; Wang et al., 2019; Hu et al., 2020).

Estudos com plantas dioicas exibem diferenças entre o gasto energético de indivíduos masculinos e femininos. Flores masculinas de *Salix paraplexia* e *Silene latifolia* apresentam maiores custos reprodutivos, devido ao maior acúmulo de biomassa e consumo de energia durante a reprodução (Cai et al., 2021). No presente estudo, os botões florais hermafroditas no estágio inicial de desenvolvimento apresentaram uma regulação positiva de proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos quando comparadas com as flores femininas. No estágio final de desenvolvimento, as proteínas envolvidas no metabolismo de monossacarídeos e aminoácidos foram *up*-acumuladas.

Muitas das vias citadas estão diretamente relacionadas a estruturas ou funções específicas do androceu ou gineceu, visto que as proteínas envolvidas nessas vias são expressas em ambos os sexos, mas em níveis diferentes. Dessa forma, elas podem ser classificadas como características sexuais secundárias, que surgiram para aumentar a especialização sexual após a evolução da dioicidia e trioicidia (Sanderson et al., 2019).

No presente estudo, as proteínas ATP-citrato sintase de cadeia alfa 2 (ACLA-3) e acetil-CoA carboxilase 1 (ACC1), as quais desempenham papel importante no metabolismo energético, foram *up*-acumuladas em botões florais hermafroditas em estágio inicial de desenvolvimento. A primeira proteína atua na geração e a segunda na carboxilação do Acetil-CoA nas plantas, importantes passos na síntese de carboidratos, aminoácidos, ácido graxo e flavonoides (Fatland et al., 2002; Sasaki e Nagano, 2004).

A proteína hidroximetilglutaril-CoA sintase (HMGS), também *up*-acumulada, apresentou interação com as proteínas ACLA-3 e ACC1. A HMGS está envolvida na biossíntese de fitoesteroides, especificamente da condensação de acetoacetil-

CoA e acetil-CoA na via do mevalonato (MVA). Plantas de *Arabidopsis* mutantes para o gene de HMGS apresentaram grão de pólen infértil, revelando que o tapete requer a via MVA para desenvolver tapetossomas e elaioplastos, que são necessários para a formação de revestimentos de pólen (Ishiguro et al., 2010).

A maioria das proteínas enriquecidas no metabolismo de carboidratos no presente estudo apresentam papel importante na formação da parede celular. Complexas e altamente dinâmicas, as paredes celulares das plantas são compostas por redes interativas de polissacarídeos, proteínas altamente glicosiladas e outros polímeros. Essa estrutura responde e adapta-se a processos normais de crescimento e desenvolvimento, bem como a estresses bióticos e abióticos. Os principais carboidratos das paredes celulares primárias são celulose, hemicelulose e pectinas (Wormit e Usadel, 2018).

A proteína UDP-D-xilose sintetase (AXS2) e duas prováveis proteínas: pectinesterase/inibidor da pectinesterase (AT5G09760) e poligalacturonase (AT4G23500) foram *up*-acumuladas em botões florais hermafroditas de mamoeiro em estágio inicial de desenvolvimento. As duas primeiras proteínas estão envolvidas na síntese (Rocchi et al., 2012; Zhao et al., 2020) e a última na degradação da pectina (Yang et al., 2018). Por ser um constituinte principal das paredes celulares primárias, estudos mostram que a pectina é um fator essencial para o desenvolvimento do pólen (Willats et al., 2001; Sénéchal et al., 2014). Mais especificamente, a pectina está envolvida na formação da parede do grão de pólen, além de ser um componente significativo das reservas de carboidrato do mesmo (Aouali et al., 2001).

Outra proteína identificada no trabalho que abrange a síntese de pectina é a UDP-D-glicose 4-epimerase (UGE5). Essa proteína está envolvida na síntese de UDP-D-galactose, um açúcar nucleotídeo precursor de vários componentes da matriz da parede celular além da pectina, podendo-se destacar a arabinogalactanas, hemicelulose e outros polissacarídeos e glicoproteínas (Seifert et al., 2002; Barber et al., 2006).

Várias hidrolases glicosídicas extracelulares têm uma função importante, mas pouco compreendida, na remodelação da parede celular durante o crescimento das plantas (Xiong et al., 2007). No presente trabalho a enzima xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase 2 (XTH16) foi *up*-acumulada em botões florais hermafroditas de mamoeiro em estágio inicial de desenvolvimento. A função

dessa enzima é promover a plasticidade da parede celular através da clivagem e reconexão das moléculas de xiloglucana, principal monossacarídeo que compõe a hemicelulose. Em *Arabidopsis*, pelo menos 33 genes foram relatados para codificar essas enzimas (Yokoyama e Nishitani 2001), o homólogo XTH3, expresso predominantemente em botões florais de *Arabidopsis*, parece ter papel na degradação da parede celular do tapete (Ariizumi et al., 2002). A alfa-L-arabinofuranosidase/beta-D-xilosidase bifuncional (ASD1 e AT3G19620) é outra hidrolase glicosídica diferencialmente acumulada em botões florais hermafroditas, entretanto foi identificada em botões em estágio final de desenvolvimento. Esta enzima já foi identificada em raízes e flores de Alfalfa (*Medicago sativa* L.), e foi caracterizada por liberar xilose e arabinose das paredes celulares desses órgãos (Xiong et al., 2007).

As proteínas glicosil hidrolase 9B18 e 9B15 (GH9B18 e GH9B15) foram únicas em botões florais hermafroditas em estágio inicial e final de desenvolvimento, respectivamente. A família 9 de glicosídeo hidrolase (GH9) codifica um gene de celulase que consiste em endo- β -1,4-glucanase, o qual é responsável pelo processo de síntese e hidrólise da celulose. Estudos sobre os genes da família GH9 em plantas demonstram seu envolvimento em muitos processos de desenvolvimento das plantas, como alongamento celular, deiscência de anteras, crescimento do tubo polínico, abscisão de nós de ramificação e amadurecimento de frutos. Mais recentemente, genes de GH9 caracterizados em trigo, provaram desempenhar papéis importantes no desenvolvimento das anteras, podendo ter como alvo miRNAs e regular o nível de celulose por luz e fitohormônios (Luo et al., 2022).

6.2 Proteínas envolvidas no desenvolvimento do pólen em *C. papaya*

A parede exterior do pólen e dos esporos, denominada exina, é altamente resistente a reagentes químicos e enzimas. A exina não fornece apenas uma barreira protetora contra o ataque de patógenos, desidratação e irradiação ultravioleta (UV), mas também facilita o reconhecimento do pólen e a adesão ao estigma (Scott, 1994). Extensas evidências sugerem que a formação da exina é uma via biossintética de poliketídeos altamente conservada presente em todas as linhagens de plantas terrestres e provavelmente foi associada à evolução das plantas. As proteínas Tetracetida alfa-pirona redutase 1 (TKPR1), acil-CoA

sintetase (ACOS5) e a hidroxialquil alfa-pirona sintase (LAP6) foram únicas em botões florais hermafroditas de mamoeiro, sendo a primeira identificada em botões florais em estágio inicial e as duas últimas em estágio final de desenvolvimento. Essas enzimas já foram bem caracterizadas em várias espécies como *A. thaliana*, arroz, tabaco e colza e estão envolvidas na biossíntese de esporopolenina, principal componente da exina (Grienenberger et al., 2010; Zhu et al., 2021).

A composição da esporopolenina não é totalmente compreendida, além de tudo a exina é considerada uma das paredes celulares mais complexas em plantas. Contudo, estudos recentes mostram que derivados da via do fenilpropanoide são componentes essenciais da esporopolenina, atuando principalmente na proteção UV e manutenção da integridade genômica do pólen (Xue et al., 2020). O presente estudo reforça esses resultados, pois as vias de biossíntese de esporopolenina e fenilpropanoide foram enriquecidas nas amostras hermafroditas dos dois estádios de desenvolvimento estudado. Além disso, interações foram preditas entre proteínas envolvidas nessas duas vias.

Já é bem documentado que a via fenilpropanoide também fornece intermediários para a síntese de lignina, flavonoides e ésteres de hidroxicinamoil (Vogt, 2010). Além disso, estudos demonstraram que a fluorescência da lignina do xilema e da exina da parede do pólen são semelhantes. A proteína ácido cafeico 3-O-metiltransferase (OMT1), uma provável álcool cinâmico desidrogenase 9 (CAD9) e outra provável álcool cinâmico desidrogenase 1 (CAD5), já bem caracterizadas com papel chave na síntese de lignina, foram *up*-acumuladas nos botões florais hermafroditas, sendo as duas primeiras em estágio inicial e a última em estágio final de desenvolvimento. As O-metiltransferases vegetais (OMTs) constituem uma grande família de enzimas envolvidas na metilação do átomo de oxigênio de uma variedade de metabólitos secundários, incluindo fenilpropanoides, flavonoides e alcaloides (Pagadala et al., 2009). A proteína CAD5 tem papel chave na lignificação do endotécio da antera. Plantas mutantes para esse gene apresentam falha na deiscência da antera e na liberação do pólen, o que causa esterilidade masculina (Thévenin et al., 2011). Como seu homólogo citado acima, a CAD9 já foi detectada nos caules, folhas e flores de *Arabidopsis*, com a diferença de não possuir funções bioquímicas conhecidas e ser altamente expressa em órgãos masculinos das flores (Sibout et al., 2005; Kim et al., 2007).

As peroxidases de classe III (PRXs) são glicoproteínas com um papel importante na maturação da parede celular, com destaque para a formação de lignina. Quatro PRXs foram *up*-acumuladas no presente estudo: peroxidase 17 (AT2G22420), peroxidase 40 (AT4G16270), peroxidase putative 48 (AT4G33870) e peroxidase 72 (AT5G66390). Em *Arabidopsis*, o gene de PRX72 é expresso no caule, raiz, folha e flores; e o gene PRX17 é expresso em caules, flores e síliques. As duas proteínas correspondentes estão localizadas na parede celular e envolvidas com o acúmulo de lignina (Fernández-Pérez et al., 2015; Cosio et al., 2017; Hoffmann et al., 2020). No presente estudo a PRX72 foi *up*-acumulada em botões hermafroditas em estágio inicial e única em estágio final de desenvolvimento, já a PRX17 foi *up*-acumulada apenas em estágio final de desenvolvimento.

A PRX40, *up*-acumulada em estágio inicial de desenvolvimento, apresenta importante função no desenvolvimento do tapete e conseqüentemente papel chave na fertilidade masculina. Como o tapete não é considerado lignificado ou suberizado, as extensinas destacam-se como substrato potencial para a PRX40 (Jacobowitz et al., 2019). As extensinas são glicoproteínas estruturais e são conhecidas por regular o tamanho e a forma das células (Cannon et al., 2008). Por fim, a peroxidase putative 48 foi única em amostras hermafroditas em estágio inicial de desenvolvimento, essa proteína é também expressa em caules maduros de *Arabidopsis* (Minic et al., 2009). Ainda sem evidências sobre sua real função, essa PRX foi identificada pela primeira vez em órgãos florais no presente estudo.

A maioria das proteínas *up*-acumuladas em botões florais hermafroditas de mamoeiro parecem estar relacionadas com o desenvolvimento das estruturas masculinas das flores, especialmente na formação da parede do pólen. Vale ressaltar que genes de proteínas envolvidas na síntese de lignina, muito semelhantes àquelas aqui identificadas, foram altamente expressos em flores hermafroditas quando comparadas com flores masculinas de *Lilium apertum* (Huang et al., 2022).

Dentre os três sexos que o mamoeiro apresenta, o hermafrodita é mais vulnerável a produzir flores anormais, enquanto que as plantas femininas são estáveis quanto à floração. A deformação de flores hermafroditas pode representar uma estratégia evolutiva para superar o estresse ambiental. A teoria de que flores carpeloides e pentândricas representem uma tendência da planta hermafrodita a

retornar a sua forma feminina já foi levantada (Filho da Silva et al., 2007). O presente trabalho sugere que flores hermafroditas necessitam de maior gasto energético durante o desenvolvimento pólen, especificamente para a formação de sua complexa parede externa.

6.3 Manifestação da heterose em proteínas envolvidas com a fotossíntese

A cultivar UC-01 se destaca entre os híbridos desenvolvidos pela UENF, com superioridade em produção e qualidade de frutos em relação a outras cultivares, vem sendo cultivada em diferentes regiões produtoras do Brasil (Pereira et al., 2019). Apesar da extensiva exploração da heterose não só em mamoeiro, mas também em outras grandes culturas de interesse comercial, as bases moleculares para esse fenômeno permanecem indefinidas. Perspectivas genômicas sugerem que a heterose surge de interações alélicas entre genomas parentais, levando a programação alterada de genes que promovem o crescimento, tolerância ao estresse e aptidão dos híbridos. Além disso, técnicas recentes têm revelado que o fenômeno da heterose pode ser decifrado não só ao nível transcricional, mas também ao nível proteômico (Xing et al., 2016).

Muitos estudos foram realizados em botões florais de mamoeiro a nível transcricional, mas sempre buscando entender as bases genéticas da diferenciação sexual da cultura. O presente trabalho estudou pela primeira vez a heterose em flores de mamoeiro através da análise diferencial do proteoma de um híbrido (UC-01) em relação aos seus parentais (JS12 x Sunrise Golden 7212). O estudo foi realizado em botões florais hermafroditas em dois estádios de desenvolvimento. Apesar do quantitativo total de proteínas entre esses dois estádios ser similar, a quantidade de proteínas não aditivas no estágio inicial de desenvolvimento foi praticamente o dobro daquelas encontradas no estágio final de desenvolvimento. Esses resultados podem indicar que o início da floração pode ser o mais crítico para o desenvolvimento da flor.

Mais uma vez dando destaque para os botões florais em estágio inicial de desenvolvimento, foi possível observar uma grande quantidade de proteínas não aditivas com papel importante nos cloroplastos. Dentre essas proteínas, a Uracil fosforibosiltransferase (upP) catalisa o passo inicial na biossíntese de pirimidinas e é necessária para o estabelecimento da fotossíntese. Estudos já demonstraram que a perda de função da upP causa distúrbios cloroplásticos (Mainguet et al., 2009). A

proteína de ligação haste-loop do cloroplasto de 41 kDa (CSP41a) estimula tanto a transcrição quanto a tradução no cloroplasto, passos essenciais para o acúmulo de complexos fotossintéticos (Bollenbach et al., 2009). Além disso, a proteína Tioredoxina M tipo 1 (THM1) regula a atividade de várias proteínas cloroplásticas, desempenhando um papel importante na ativação das enzimas do ciclo de Calvin (Okegawa e Motohashi, 2015). Pode-se destacar outras proteínas não aditivas identificadas em botões florais hermafroditas que também participam do ciclo de Calvin, como a Triosefosfato isomerase (TIM) e a fosforibuloquinase (PRK) (Graciet et al., 2004; López-castillo et al., 2016).

As folhas são os órgãos especializados que captam a energia da luz pela fotossíntese. No entanto, o presente estudo reforça a importância da fotossíntese em outros órgãos vegetais. O benefício da fotossíntese nesses outros casos pode frequentemente estar associado à necessidade de recapturar carbono, especialmente em órgãos de armazenamento que possuem altas taxas de respiração. Além disso, essas vias de fotossíntese não foliar podem ser especialmente importantes no suporte ao crescimento das plantas sob estresse, sendo um fator chave para o crescimento e sobrevivência das plantas. Os caminhos da fotossíntese evoluíram muitas vezes em diferentes linhagens de plantas em resposta à seleção ambiental e também parecem ter se diferenciado em partes específicas da planta. Essa consideração pode ser útil no melhoramento de plantas cultivadas com melhor desempenho em resposta às mudanças climáticas (Henry et al., 2020).

Outras proteínas envolvidas na fotossíntese, mas também com papel chave na tolerância a estresses abióticos exibiram padrão de heterose no presente estudo. Dentre elas, duas proteínas extrínsecas do fotossistema II (PSBO-1 e PSBQ-2) e a Rubisco ativase (RCA). Um destaque especial é feito para a RCA, a qual garante que o sítio ativo da Rubisco não seja bloqueado por inibidores. Devido à baixa temperatura ideal para a atividade da ATPase e a uma instabilidade térmica inerente, essa proteína não atua bem durante períodos de estresse térmico. Além disso, estudos mostram que maiores níveis endógenos de RCA podem desempenhar um papel importante na produtividade da planta sob condições de temperatura acima do ideal (Ristic et al., 2009). Esses resultados sugerem que o maior acúmulo de RCA no híbrido UC-01 pode indicar um melhor desempenho

fotossintético de seus botões florais hermafroditas, em comparação aos botões de seus parentais.

A compreensão científica da regulação molecular e genética da fotossíntese em diferentes órgãos pode facilitar a modificação de plantas para melhorar os processos de fixação de carbono. O melhoramento de plantas com maior capacidade de realizar fotossíntese efetiva em tecidos não foliares pode fornecer melhorias significativas no desenvolvimento e na produtividade das plantas, especialmente em ambientes onde estresses abióticos ou bióticos limitam seu rendimento (Henry et al., 2020).

7. CONCLUSÃO

Este estudo empregou pela primeira vez o método de proteômica comparativa *shotgun* para analisar proteínas de botões florais femininos e hermafroditas de *C. papaya*, fornecendo informações sobre eventos moleculares importantes no desenvolvimento floral em mamoeiro. Vias do metabolismo de carboidratos, da biossíntese de fenilpropanoide e da biossíntese de esporopolenina foram enriquecidas em botões hermafroditas quando comparadas com botões femininos nos dois estádios de desenvolvimento. A maioria dessas proteínas tem papel chave na síntese de pectina, celulose e lignina. Esses compostos têm importante função na formação da parede celular e parecem estar relacionadas com o desenvolvimento das estruturas masculinas das flores, especialmente na formação do revestimento do pólen. Os resultados sugerem que flores hermafroditas necessitam de maior gasto energético durante o seu desenvolvimento, provavelmente devido à formação da complexa parede externa do pólen.

Em relação ao estudo de heterose em botões florais hermafroditas de mamoeiro, pode-se identificar várias proteínas não aditivas, sendo a maior parte delas acumuladas em botões florais em estágio inicial de desenvolvimento. A fotossíntese se destacou dentre as vias enriquecidas entre as proteínas não aditivas, podendo ser um indício de um melhor desempenho fotossintético e de uma melhor resposta a estresses abióticos em botões florais hermafroditas do híbrido UC-01 em relação aos seus parentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aouali, N., Laporte, P., Clément, C. (2001) Pectin secretion and distribution in the anther during pollen development in *Lilium*. *Planta* 213: 71–79.
- Ariizumi, T., Amagai, M., Shibata, D., Hatakeyama, K., Watanabe, M., Toriyama, K. (2002) Comparative study of promoter activity of three anther-specific genes encoding lipid transfer protein, xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase and polygalacturonase in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 21: 90–96.
- Arkle Junior, T.D., Nakasone, H.Y. (1984) Floral differentiation in the hermaphroditic papaya. *HortScience* 19: 832–834.
- Aryal, R., Ming, R. (2014) Sex determination in flowering plants: Papaya as a model system. *Plant Sci* 217–218: 56–62.
- Barber, C., Rösti, J., Rawat, A., Findlay, K., Roberts, K., Seifert, G.J. (2006) Distinct properties of the five UDP-D-glucose/UDP-D-galactose 4-Epimerase isoforms of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 281: 17276–17285.
- Bollenbach, T.J., Sharwood, R.E., Gutierrez, R., Lerbs-Mache, S., Stern, D.B. (2009) The RNA-binding proteins CSP41a and CSP41b may regulate transcription and translation of chloroplast-encoded RNAs in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 541–552.

- Cai, Z., Yang, C., Liao, J., Song, H., Zhang, S. (2021) Sex-biased genes and metabolites explain morphologically sexual dimorphism and reproductive costs in *Salix paraplesia* catkins. *Hortic Res* 8: 125.
- Cardoso, D.L., Da Luz, L.N., De Macêdo, C.M.P., Azeredo, L.G.S., Pereira, M.G. (2014) Heterosis in papaya: Inter and intragroup analysis. *Rev Bras Frutic* 36: 610–619.
- Chae, T., Harkess, A., Moore, R.C. (2021) Sex-linked gene expression and the emergence of hermaphrodites in *Carica papaya*. *Am J Bot* 108: 1029–1041.
- Champagne, A., Boutry, M. (2013) Proteomics of nonmodel plant species. *Proteomics* 13: 663–673.
- Charlesworth, B., Charlesworth, D. (1978) A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *Am Nat* 112: 975–997.
- Chen, L., Chen, Q., Zhu, Y., Hou, L., Mao, P. (2016) Proteomic identification of differentially expressed proteins during Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flower development. *Front Plant Sci* 7: 1–13.
- Chen, Y., Bai, Q., Ruan, F., Su, S. (2019) Proteomic analysis of differently expressed proteins in sex differentiation phases of flower buds in monoecious *Pistacia chinensis* Bunge. *Isr J Plant Sci* 66: 182–195.
- 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* 78: 350–360.
- Cosio, C., Ranocha, P., Francoz, E., Burlat, V., Zheng, Y., Perry, S.E., Ripoll, J.J., Yanofsky, M., Dunand, C. (2017) The class III peroxidase PRX17 is a direct target of the MADS-box transcription factor AGAMOUS-LIKE15 (AGL15) and participates in lignified tissue formation. *New Phytol* 213: 250–263.
- Cravatt, B.F., Simon, G.M., Iii, J.R.Y. (2007) The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. *Nature* 450: 991–1000.
- Damasceno junior, P.C., Pereira, T.N.S., Pereira, M.G., Silva, F.F. da., Souza, M.

- de M., Nicoli, R.G. (2009) Preferential reproduction mode of hermaphrodite papaya plant (*Carica papaya* L; Caricaceae). *Rev Bras Frutic* 31: 182–189.
- Dantas, J.L.L., Lucena, R.S., Boas, S.A.V. (2015) Avaliação agrônômica de linhagens e híbridos de mamoeiro. *Rev Bras Frutic* 37: 138–148.
- Devani, R.S., Chirmade, T., Sinha, S., Bendahmane, A., Dholakia, B.B., Banerjee, A.K., Banerjee, J. (2019) Flower bud proteome reveals modulation of sex-biased proteins potentially associated with sex expression and modification in dioecious *Coccinia grandis*. *BMC Plant Biol* 19: 330.
- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P., Levin, Y., Schild, H., Tenzer, S. (2014) Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. *Nat Methods* 11: 167–170.
- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P., Tenzer, S. (2016) Label-free quantification in ion mobility-enhanced data-independent acquisition proteomics. *Nat Protoc* 11: 795–812.
- Faria, A.R.N., Noronha, A.C.D.S., Oliveira, A.A.R., Oliveira, A.M.G., Cardoso, C.E.L., Ritzinger, C.H.S.P., Oliveira, E.J. De., Coelho, E.F., Santos Filho, H.P., Cruz, J.L., Oliveira, J.R.P., Dantas, J.L.L., Souza, L.D., Oliveira, M.D.A., Coelho Filho, M.A., Sanches, N.F., Meissner Filho, P.E., Medina, V.M., Cordeiro, Z.J.M. (2009) *A cultura do mamão*. 3.ed. Brasília, DF 119p.
- Fatland, B.L., Ke, J., Anderson, M.D., Mentzen, W.I., Cui, L.W., Allred, C.C., Johnston, J.L., Nikolau, B.J., Wurtele, E.S. (2002) Molecular characterization of a heteromeric ATP-Citrate lyase that generates cytosolic Acetyl-Coenzyme A in Arabidopsis. *Plant Physiol* 130: 740–756.
- Fernández-Pérez, F., Pomar, F., Pedreño, M.A., Novo-Uzal, E. (2015) Suppression of Arabidopsis peroxidase 72 alters cell wall and phenylpropanoid metabolism. *Plant Sci* 239: 192–199.
- Ferregueti, G.A. (2003) Caliman 01 – O primeiro híbrido de mamão formosa brasileiro. In: Martins, D.S. (ed) *Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno*. Vitória-ES: Incaper, p. 211–218

- Frankel, R., Galun, E. (1977) *Pollination Mechanisms, Reproduction and Plant Breeding*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 281p.
- Graciet, E., Lebreton, S., Gontero, B. (2004) Emergence of new regulatory mechanisms in the Benson-Calvin pathway via protein-protein interactions: A glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/CP12/ phosphoribulokinase complex. *J Exp Bot* 55: 1245–1254.
- Grienenberger, E., Kim, S.S., Lallemand, B., Geoffroy, P., Heintz, D., de Azevedo Souza, C., Heitz, T., Douglas, C.J., Legrand, M. (2010) Analysis of TETRAKETIDE α -PYRONE reductase function in *Arabidopsis thaliana* reveals a previously unknown, but conserved, biochemical pathway in sporopollenin monomer biosynthesis. *Plant Cell* 22: 4067–4083.
- Henry, R.J., Furtado, A., Rangan, P. (2020) Pathways of photosynthesis in non-leaf tissues. *Biology (Basel)* 9: 1–13.
- Hoffmann, N., Benske, A., Betz, H., Schuetz, M., Lacey Samuels, A. (2020) Laccases and peroxidases co-localize in lignified secondary cell walls throughout stem development. *Plant Physiol* 184: 806–822.
- Hofmeyr, J. (1938) Genetical studies of *Carica papaya* L. *South Africa Dep Agric Sci Bull* 187: 64.
- Horovitz, S., Jiminez, H. (1967) Cruzamientos interespecificos e intergenericos en Caricaceas y sus implicaciones fitotecnicas. *Agron Trop* 17: 353–359.
- Hu, X., Liao, Z., Zhang, B., Yue, J., Wang, Z., Jie, X., Liu, J. (2020) Transcriptome sequencing and screening of genes related to sex determination of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. *PLoS One* 15: e0239230.
- Huang, H., Wang, H., Hu, X., Zhang, Z. (2022) Identification of candidate genes associated with sex differentiation and determination of gender diphasic plant *Lilium apertum* (Liliaceae). *Sci Hort (Amsterdam)* 306: 111431.
- Ishiguro, S., Nishimori, Y., Yamada, M., Saito, H., Suzuki, T., Nakagawa, T., Miyake, H., Okada, K., Nakamura, K. (2010) The *Arabidopsis* FLAKY POLLEN1 gene encodes a 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Synthase required for

- development of tapetum-specific organelles and fertility of pollen grains. *Plant Cell Physiol* 51: 896–911.
- Jacobowitz, J.R., Doyle, W.C., Weng, J.K. (2019) PRX9 and PRX40 are extensin peroxidases essential for maintaining tapetum and microspore cell wall integrity during arabidopsis anther development. *Plant Cell* 31: 848–861.
- Jagtiani, J. (1988) *Tropical fruit processing*. San Diego: Academic Press, 184p.
- Jorrín-Novo, J. V., Pascual, J., Sánchez-Lucas, R., Romero-Rodríguez, M.C., Rodríguez-Ortega, M.J., Lenz, C., Valledor, L. (2015) Fourteen years of plant proteomics reflected in Proteomics: Moving from model species and 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms. *Proteomics* 15: 1089–1112.
- Karpievitch, Y. V., Polpitiya, A.D., Anderson, G.A., Smith, R.D., Dabney, A.R. (2010) Liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics: Biological and technological aspects. *Ann Appl Stat* 4: 1797–1823.
- Kim, S.-J., Kim, K., Cho, M., Franceschi, V.R., Davin, L.B., Lewis, N.G. (2007) Expression of cinnamyl alcohol dehydrogenases and their putative homologues during *Arabidopsis thaliana* growth and development: Lessons for database annotations? *Phytochemistry* 68: 1957–1974.
- Kist, B.B., Carvalho, C. de., Beling, R.R. (2022) *Anuário brasileiro de Horti & Fruti*. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 96p.
- Lee, C., Lin, H.-J., Viswanath, K.K., Lin, C., Chang, B.C.-H., Chiu, P.-H., Chiu, C., Wang, R., Chin, S., Chen, F.-C. (2018) The development of functional mapping by three sex-related loci on the third whorl of different sex types of *Carica papaya* L. *PLoS One* 13: e0194605.
- Li, Y.F., Radivojac, P. (2012) Computational approaches to protein inference in shotgun proteomics. *BMC Bioinformatics* 13: S4.
- Liao, Z., Dong, F., Liu, J., Xu, L., Marshall-Colon, A., Ming, R. (2022) Gene regulation network analyses of pistil development in papaya. *BMC Genomics* 23: 8.

- Liu, J., Han, J., Sharma, A., Wai, C.M., Ming, R., Yu, Q. (2021) Transcriptional regulation of dosage compensation in *Carica papaya*. *Sci Rep* 11: 1–9.
- Liu, Z., Moore, P.H., Ma, H., Ackerman, C.M., Ragiba, M., Yu, Q., Pearl, H.M., Kim, M.S., Charlton, J.W., Stiles, J.I., Zee, F.T., Paterson, A.H., Ming, R. (2004) A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature* 427: 348–352.
- López-castillo, L.M., Jiménez-sandoval, P., Baruch-torres, N. (2016) Structural basis for redox regulation of cytoplasmic and chloroplastic triosephosphate isomerases from *Arabidopsis thaliana*. *7*: 1–17.
- Luo, L., Bai, J., Yuan, S., Guo, L., Liu, Z., Guo, H., Zhang, T., Duan, W., Li, Y., Zhao, C., Song, X., Zhang, L. (2022) Genome wide identification and characterization of wheat GH9 genes reveals their roles in pollen development and anther dehiscence. *Int J Mol Sci* 23: 6324.
- Ma, H., Moore, P.H., Liu, Z., Kim, M.S., Yu, Q., Fitch, M.M.M., Sekioka, T., Paterson, A.H., Ming, R. (2004) High-density linkage mapping revealed suppression of recombination at the sex determination locus in Papaya. *Genetics* 166: 419–436.
- Mainguet, S.E., Gakière, B., Majira, A., Pelletier, S., Bringel, F., Guérard, F., Caboche, M., Berthomé, R., Renou, J.P. (2009) Uracil salvage is necessary for early *Arabidopsis* development. *Plant J* 60: 280–291.
- Martelleto, L.A.P., Ribeiro, R. de L.D., Sudo-Martelleto, M., Vasconcellos, M.A. da S., Pereira, M.B. (2011) Expressão da esterilidade feminina e da carpeloidia em mamoeiro sob diferentes ambientes de cultivo protegido. *Rev Bras Frutic* 33: 1185–1193.
- Matsuura, F.C.A.U., Folegatti, M.I. da S. (2003) Processamento de mamão. In: Martins, D. dos S., Costa, A. de F.S. da. (ed) *A cultura do mamoeiro*. Vitória-ES: Incaper, p. 467–492 467–492
- Ming, R., Bendahmane, A., Renner, S.S. (2011) Sex chromosomes in land plants. *Annu Rev Plant Biol* 62: 485–514.

- Ming, R., Yu, Q., Moore, P.H. (2007) Sex determination in papaya. *Semin Cell Dev Biol* 18: 401–408.
- Minic, Z., Jamet, E., San-Clemente, H., Pelletier, S., Renou, J.P., Rihouey, C., Okinyo, D.P., Proux, C., Lerouge, P., Jouanin, L. (2009) Transcriptomic analysis of arabidopsis developing stems: A close-up on cell wall genes. *BMC Plant Biol* 9: 1–17.
- Mitchell, C.H., Diggle, P.K. (2005) Evolution of unisexual flowers: results from diverse developmental transitions. *Am J Bot* 92: 1068–1076.
- Nanjo, Y., Skultety, L., Uváčková, L., Klubicová, K., Hajduch, M., Komatsu, S. (2012) Mass spectrometry-based analysis of proteomic changes in the root tips of flooded soybean seedlings. *J Proteome Res* 11: 372–385.
- Okegawa, Y., Motohashi, K. (2015) Chloroplastic thioredoxin m functions as a major regulator of Calvin cycle enzymes during photosynthesis *in vivo*. *Plant J* 84: 900–913.
- Pagadala, N.S., Arha, M., Reddy, P.S., Kumar, R., Sirisha, V.L., Prashant, S., Janardhan Reddy, K., Khan, B., Rawal, S.K., Kavi Kishor, P.B. (2009) Phylogenetic analysis, homology modelling, molecular dynamics and docking studies of caffeoyl–CoA-O- methyl transferase (CCoAOMT 1 and 2) isoforms isolated from subabul (*Leucaena leucocephala*). *J Mol Model* 15: 203–221.
- Pereira, M.G., Poltronieri, T.P. de S., Pereira, T.N.S., Ramos, H.C.C., Catarina, R.S., Vettorazzi, J.C.F., Arêdes, F.A.S., Boechat, M.S.B., Azevedo, T.M.V.A.O.N., Cortes, D.F.M., Moreira, N.F., Bohry, D., Silveira, S.F. da., Vivas, M., Ferregueti, G.A. (2019) Twent-two-year papaya breeding program: from breeding strategy establishment to cultivar development. *Funct plant Breed J* 1: 9–27.
- Renner, S.S., Ricklefs, R.E. (1995) Dioecy and its correlates in the flowering plants. *Am J Bot* 82: 596–606.
- Ristic, Z., Momčilović, I., Bukovnik, U., Prasad, P.V.V., Fu, J., DeRidder, B.P., Elthon, T.E., Mladenov, N. (2009) Rubisco activase and wheat productivity under heat-stress conditions. *J Exp Bot* 60: 4003–4014.

- Rocchi, V., Janni, M., Bellincampi, D., Giardina, T., D'Ovidio, R. (2012) Intron retention regulates the expression of pectin methyl esterase inhibitor (Pmei) genes during wheat growth and development. *Plant Biol* 14: 365–373.
- Rose, J.K.C., Bashir, S., Giovannoni, J.J., Jahn, M.M., Saravanan, R.S. (2004) Tackling the plant proteome: Practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J* 39: 715–733.
- Sanderson, B.J., Wang, L., Tiffin, P., Wu, Z., Olson, M.S. (2019) Sex-biased gene expression in flowers, but not leaves, reveals secondary sexual dimorphism in *Populus balsamifera*. *New Phytol* 221: 527–539.
- Sasaki, Y., Nagano, Y. (2004) Plant Acetyl-CoA Carboxylase: Structure, Biosynthesis, Regulation, and Gene Manipulation for Plant Breeding. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 1175–1184.
- Scott, R.J. (1994) Pollen exine – the sporopollenin enigma and the physics of pattern. In: *Molecular and Cellular Aspects of Plant Reproduction*. Cambridge University Press, p. 49–82
- Seifert, G.J., Barber, C., Wells, B., Dolan, L., Roberts, K. (2002) Galactose biosynthesis in Arabidopsis: Genetic evidence for substrate channeling from UDP-D-Galactose into cell wall polymers. *Curr Biol* 12: 1840–1845.
- Sénéchal, F., Wattier, C., Rustérucci, C., Pelloux, J. (2014) Homogalacturonan-modifying enzymes: Structure, expression, and roles in plants. *J Exp Bot* 65: 5125–5160.
- Sibout, R., Eudes, A., Mouille, G., Pollet, B., Lapierre, C., Jouanin, L., Se, A. (2005) CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C and -D are the primary genes involved in lignin Biosynthesis in the floral stem of Arabidopsis. *Plant Cell* 17: 2059–2076.
- Silva, F. da S., Pereira, M.G., Damasceno, P.C., Pereira, T.N.S., Viana, A.P., Daher, R.F., Ramos, H.C.C., Ferregueti, G.A. (2007) Evaluation of the sexual expression in a segregating BC1 papaya population. *Crop Breed Appl Biotechnol* 7: 16–23.

- Silva, J.C., Gorenstein, M. V., Li, G.-Z., Vissers, J.P.C., Geromanos, S.J. (2006) Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol Cell Proteomics* 5: 144–156.
- Storey, W.B. (1941) The botany and sex relations of the papaya. *Hawaii Agric Exp Stn Bull* 87: 5–22.
- Storey, W.B. (1953) Genetics of the papaya. *Heredity (Edinb)* 44: 70–78.
- Thévenin, J., Pollet, B., Letarnec, B., Saulnier, L., Gissot, L., Maia-Grondard, A., Lapierre, C., Jouanin, L. (2011) The simultaneous repression of CCR and CAD, two enzymes of the lignin biosynthetic pathway, results in sterility and dwarfism in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 4: 70–82.
- Urasaki, N., Tarora, K., Shudo, A., Ueno, H., Tamaki, M., Miyagi, N., Adaniya, S., Matsumura, H. (2012) Digital transcriptome analysis of putative sex-determination genes in Papaya (*Carica papaya*). *PLoS One* 7: e40904.
- VanBuren, R., Zeng, F., Chen, C., Zhang, J., Wai, C.M., Han, J., Aryal, R., Gschwend, A.R., Wang, J., Na, J., Huang, L., Zhang, L., Miao, W., Gou, J., Arro, J., Guyot, R., Moore, R.C., Wang, M., Zee, F., Charlesworth, D., Moore, P.H., Yu, Q., Ming, R. (2015) Origin and domestication of papaya Y^h chromosome. *Genome Res* 25: 524–533.
- Wang, J., Na, J., Yu, Q., Gschwend, A.R., Han, J., Zeng, F., Aryal, R., VanBuren, R., Murray, J.E., Zhang, W., Navajas-Pérez, R., Feltus, F.A., Lemke, C., Tong, E.J., Chen, C., Wai, C.M., Singh, R., Wang, M.-L., Min, X.J., Alam, M., Charlesworth, D., Moore, P.H., Jiang, J., Paterson, A.H., Ming, R. (2012) Sequencing papaya X and X^h chromosomes reveals molecular basis of incipient sex chromosome evolution. *Proc Natl Acad Sci* 109: 13710–13715.
- Wang, X., Zheng, Y., Su, S., Ao, Y. (2019) Discovery and profiling of microRNAs at the critical period of sex differentiation in *Xanthoceras sorbifolium* Bunge. *Forests* 10: 1141.
- Washburn, M.P., Wolters, D., Yates, J.R. (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 19: 242–247.

- Wellmer, F., Riechmann, J.L., Alves-Ferreira, M., Meyerowitz, E.M. (2004) Genome-wide analysis of spatial gene expression in *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell* 16: 1314–1326.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L. (1996) Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13: 19–50.
- Willats, W.G.T., McCartney, L., Mackie, W., Knox, J.P. (2001) Pectin: Cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* 47: 9–27.
- Wormit, A., Usadel, B. (2018) The multifaceted role of pectin methylesterase inhibitors (PMEIs). *Int J Mol Sci* 19: 1–19.
- Xing, J., Sun, Q., Ni, Z. (2016) Proteomic patterns associated with heterosis. *BBA - Proteins Proteomics* 1864: 908–915.
- Xiong, J.-S., Balland-Vanney, M., Xie, Z.-P., Schultze, M., Kondorosi, A., Kondorosi, E., Staehelin, C. (2007) Molecular cloning of a bifunctional beta-xylosidase/ -alpha-arabinosidase from alfalfa roots: heterologous expression in *Medicago truncatula* and substrate specificity of the purified enzyme. *J Exp Bot* 58: 2799–2810.
- Xue, J.S., Zhang, B., Zhan, H.D., Lv, Y.L., Jia, X.L., Wang, T.H., Yang, N.Y., Lou, Y.X., Zhang, Z.B., Hu, W.J., Gui, J., Cao, J., Xu, P., Zhou, Y., Hu, J.F., Li, L., Yang, Z.N. (2020) Phenylpropanoid Derivatives Are Essential Components of Sporopollenin in Vascular Plants. *Mol Plant* 13: 1644–1653.
- Yang, Y., Yu, Y., Liang, Y., Anderson, C.T., Cao, J. (2018) A profusion of molecular scissors for pectins: classification, expression, and functions of plant polygalacturonases. *Front Plant Sci* 9: 1–16.
- Yu, Q., Hou, S., Feltus, F.A., Jones, M.R., Murray, J.E., Veatch, O., Lemke, C., Saw, J.H., Moore, R.C., Thimmapuram, J., Liu, L., Moore, P.H., Alam, M., Jiang, J., Paterson, A.H., Ming, R. (2008) Low X/Y divergence in four pairs of papaya sex-linked genes. *Plant J* 53: 124–132.

- Yue, J., VanBuren, R., Liu, J., Fang, J., Zhang, X., Liao, Z., Wai, C.M., Xu, X., Chen, S., Zhang, S., Ma, X., Ma, Y., Yu, H., Lin, J., Zhou, P., Huang, Y., Deng, B., Deng, F., Zhao, X., Yan, H., Fatima, M., Zerpa-Catanho, D., Zhang, X., Lin, Z., Yang, M., Chen, N.J., Mora-Newcomer, E., Quesada-Rojas, P., Bogantes, A., Jiménez, V.M., Tang, H., Zhang, J., Wang, M., Paull, R.E., Yu, Q., Ming, R. (2022) SunUp and Sunset genomes revealed impact of particle bombardment mediated transformation and domestication history in papaya. *Nat Genet* 54: 715–724.
- Zerpa-Catanho, D., Wai, J., Wang, M.L., Yu, L., Nguyen, J., Ming, R. (2019) Differential gene expression among three sex types reveals a MALE STERILITY 1 (CpMS1) for sex differentiation in papaya. *BMC Plant Biol* 19: 545.
- Zhang, Y., Wang, Y., Zhou, W., Zheng, S., Zhang, W. (2021) Comparative proteomics analysis reveals differentially accumulated proteins associated with male and female *A. chinensis* var. *chinensis* bud development. *Proteome Sci* 19: 8.
- Zhao, X., Ebert, B., Zhang, B., Liu, H., Zhang, Y., Zeng, W., Rautengarten, C., Li, H., Chen, X., Bacic, A., Wang, G., Men, S., Zhou, Y., Heazlewood, J.L., Wu, A.M. (2020) UDP-Api/UDP-Xyl synthases affect plant development by controlling the content of UDP-Api to regulate the RG-II-borate complex. *Plant J* 104: 252–267.
- Zhou, P., Zhang, X., Ma, X., Yue, J., Liao, Z., Ming, R. (2022) Methylation related genes affect sex differentiation in dioecious and gynodioecious papaya. *Hortic Res* 9: 1–13.
- Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A.H., Tanaseichuk, O., Benner, C., Chanda, S.K. (2019) Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun* 10: 1523.
- Zhu, L., Zhang, T., Teeri, T.H. (2021) Tetraketide α -pyrone reductases in sporopollenin synthesis pathway in *Gerbera hybrida*: diversification of the minor function. *Hortic Res* 8: 1–12.

APÉNDICE

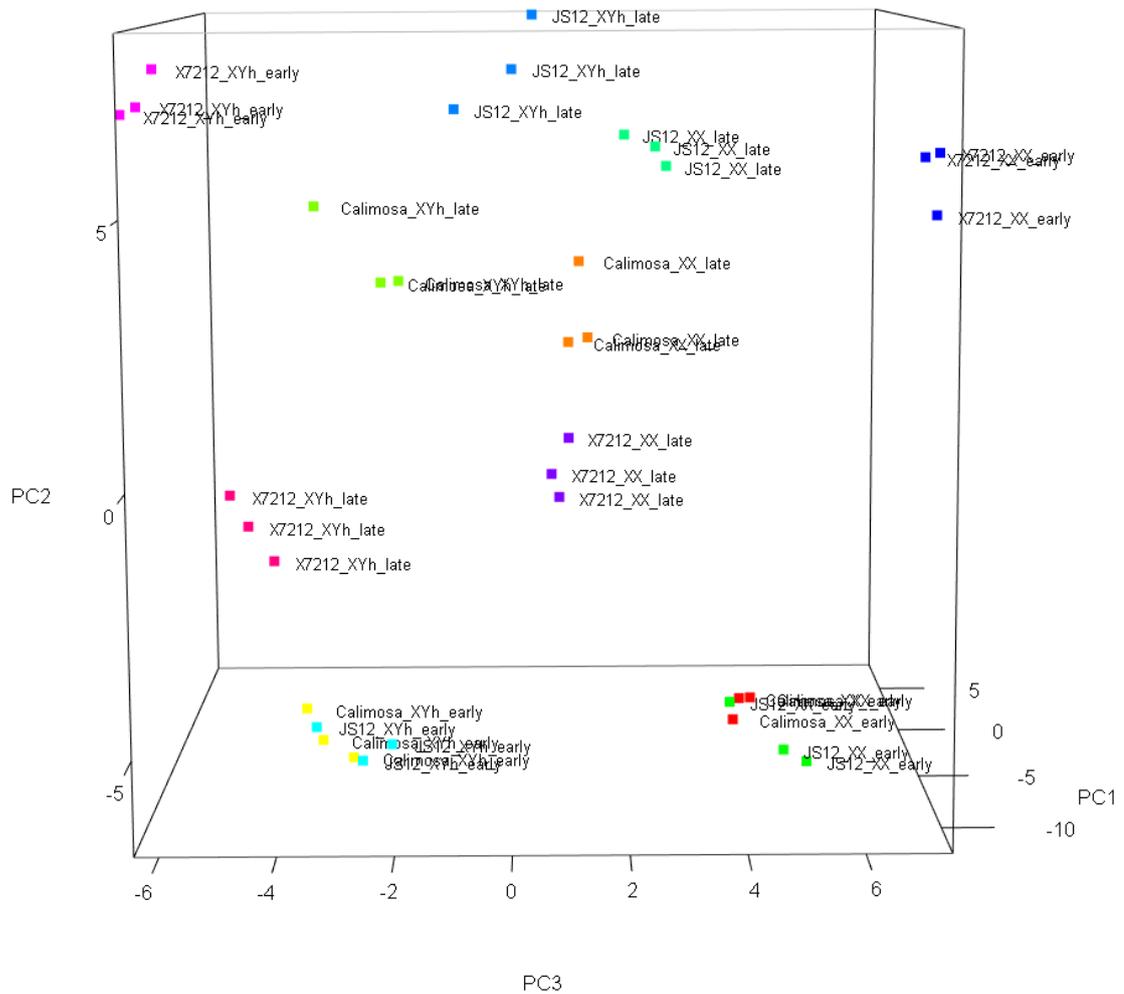


Figura suplementar 1. Espaço de análise de componentes principais (PCA) tridimensional. A combinação dos fatores: genótipos (UC-01, JS12 e 7212), sexo (XX ou XY^h) e estágio de desenvolvimento (inicial ou final), formaram os 12 tratamentos (grupos) observados no espaço 3-D.