

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

ADEILSON FRIAS DORNELA

**MAPEAMENTO FÍSICO DOS GENES *serk 2*, *svp-like* E *mdar 4* EM *Carica papaya***

ALEGRE – ES

2022

ADEILSON FRIAS DORNELA

**MAPEAMENTO FÍSICO DOS GENES *serk 2*, *svp-like* E *mdar 4* EM *Carica papaya***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento, na área de concentração de Biologia Evolutiva e Citogenética.

Orientador: Prof. Dr. Wellington Ronildo Clarindo

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Fernanda Aparecida Ferrari Soares

ALEGRE – ES

2022

ADEILSON FRIAS DORNELA

**MAPEAMENTO FÍSICO DOS GENES *serk 2*, *svp-like* E *mdar 4* EM *Carica papaya***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento, na área de concentração de Biologia Evolutiva e Citogenética.

Aprovado em 20 de abril de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA

---

**Dr<sup>a</sup>. Fernanda Aparecida Ferrari**

**Soares**

Coorientadora

---

**Dr<sup>a</sup>. Jéssica Coutinho Silva**

Membro Externo

---

**Dr<sup>a</sup>. Mariana Cansian Sattler**

Membro Externo

---

**Dr<sup>a</sup>. Milene Miranda Praça-Fontes**

Membro Interno

---

**Dr. Wellington Ronildo Clarindo**

Orientador

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

D713 Dornela, Adeilson Frias, 1994-  
m Mapeamento físico dos genes serk 2, svp-like e mdar 4 em  
Carica papaya / Adeilson Frias Dornela. - 2022.  
33 f. : il.

Orientador: Wellington Ronildo Clarindo.  
Coorientadora: Fernanda Aparecida Ferrari Soares.  
Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramentos) -  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências  
Agrárias e Engenharias.

1. Citogenética. 2. Mapeamento cromossômico. 3.  
Marcadores genéticos. 4. Pré-seleção do sexo. I. Clarindo,  
Wellington Ronildo. II. Soares, Fernanda Aparecida Ferrari. III.  
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 631.523

---

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	I
AGRADECIMENTOS .....	II
BIOGRAFIA .....	III
RESUMO .....	IV
ABSTRACT .....	V
INTRODUÇÃO .....	1
MATERIAL E MÉTODOS .....	4
RESULTADOS .....	9
DISCUSSÃO .....	14
INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES .....	18
REFERÊNCIAS .....	20

**Aos meus pais, Ademilson Dornela e Maria José Lepre Frias Dornela.  
Ao meu irmão Ademilson Frias Dornela.**

**Dedico.**

*“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”*

*(Sharon Begley)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado e me dado sabedoria para chegar até aqui e por nunca me abandonar nos momentos mais difíceis.

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização do curso e pela infraestrutura oferecida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Sabrina Furtado, que enquanto esteve como secretária do programa, desempenhou um excelente trabalho. Gratidão por toda dedicação e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Wellington Ronildo Clarindo, por toda paciência, ajuda e trocas de conhecimento que auxiliaram no meu desenvolvimento científico e profissional.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Milene Miranda Praça-Fontes pela acolhida em seu laboratório durante os períodos iniciais do curso.

À Dr<sup>a</sup>. Fernanda Aparecida Ferrari Soares e Dr<sup>a</sup>. Jéssica Coutinho Silva pelo acompanhamento nos procedimentos de citogenética molecular e citogenética clássica, pelas trocas de conhecimento e parceria.

À Dr<sup>a</sup>. Mariana Cansian Sattler pela parceria e por toda dedicação no preparo das amostras para o sequenciamento genético.

Aos membros da banca examinadora, pelo interesse, disponibilidade e apontamentos que enriqueceram esse estudo.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética, Mutagênese e Cultura de Tecidos Vegetais (UFES) e do Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal (UFV) pela amizade, apoio e ótimos momentos em meio a tanto trabalho.

A todos os amigos que fiz durante o curso, pois ninguém chega até aqui sozinho. Meus sinceros agradecimentos pelo apoio e amizade. Não citarei os nomes para não ser injusto caso esqueça de alguém.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigado!

## BIOGRAFIA

Adeilson Frias Dornela, filho de Ademilson Dornela e Maria José Lepre Frias Dornela, natural de Bom Jesus do Itabapoana – RJ, nasceu em 17 de novembro de 1994.

Em janeiro de 2015, ingressou como aluno de graduação no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), no Centro de Educação Superior a Distância do Estado do Rio de Janeiro (CEDERJ), polo Bom Jesus do Itabapoana – RJ. Concluiu o curso em dezembro de 2018, obtendo o título de Licenciado em Ciências Biológicas em março de 2019 durante a cerimônia de colação de grau.

Em agosto de 2019, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – *campus* Alegre, na linha de pesquisa de Biologia Evolutiva e Citogenética, sob orientação do professor Dr. Wellington Ronildo Clarindo. Atuou em atividades de pesquisa na área de Cultura de Tecidos Vegetais e Citogenética, submetendo-se à defesa de dissertação em 20 de abril de 2022.



DORNELA, Adelson Frias. Mapeamento físico dos genes *serk 2*, *svp-like* e *mdar 4* em *Carica papaya*. 2022. Dissertação (Mestre em Genética e Melhoramento). Universidade Federal do Espírito Santo. Orientador: Dr. Wellington Ronildo Clarindo. Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Fernanda Aparecida Ferrari Soares.

## RESUMO

A citogenômica baseada no mapeamento físico fornece informações sobre a organização e estrutura do genoma. A localização física de sequências de DNA ao longo dos cromossomos é possível por meio da hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Os estudos citogenômicos em *C. papaya* vêm sendo desenvolvidos com abordagens BAC-FISH e a partir de sequências de genes rDNA. Embora haja avanços nos estudos citogenômicos na espécie, o mapeamento físico de genes de cópia única e/ou com poucas cópias não foi conduzido. Desse modo, nosso objetivo foi mapear os genes *serk 2*, *svp-like* e *mdar 4* em cromossomos mitóticos de *C. papaya*. A sequência dos três genes foi amplificada, e os produtos de amplificação sequenciados, confirmando a homologia com os genes *serk 2*, *svp-like* e *mdar 4*. A diploidia da espécie foi confirmada, visto que todos os cariótipos apresentaram  $2n = 2x = 18$  cromossomos e conteúdo 2C de DNA nuclear equivalente a  $0,75 \pm 0,016$  pg. Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (cromossomos 1, 5, 7 e 8) e submetacêntricos (cromossomos 2, 3, 4, 6 e 9), com uma variação no comprimento total de  $4,32 \pm 1,53$   $\mu\text{m}$  (cromossomo 1) a  $2,70 \pm 0,42$   $\mu\text{m}$  (cromossomo 9). Utilizando o mesmo procedimento de FISH, nós mapeamos sequências gênicas de 251 a 1.166 pares de bases. O gene *serk 2* foi mapeado na região intersticial do braço longo do cromossomo 1 e os núcleos interfásicos apresentaram dois nítidos sinais de fluorescência. Considerando os dados de sequenciamento dos cromossomos sexuais de *C. papaya*, os genes *svp-like* e *mdar 4* foram mapeados na região intersticial do braço longo do cromossomo X. Ambos os genes apresentaram apenas um sinal de marcação nos núcleos interfásicos. Portanto, os resultados evidenciam diferenças genéticas entre os cromossomos sexuais X e Y de *C. papaya*, contribuindo com novas informações acerca da estrutura e evolução do genoma desses cromossomos. Os dados também apontam genes úteis como marcadores citomoleculares para a determinação precoce do sexo. Além disso, o protocolo utilizado pode ser reproduzido para outros genes de cópia única e/ou poucas cópias, permitindo o mapeamento e a construção de mapas citogenéticos.

**Palavras-chave:** Citogenômica. Diferenciação sexual. Hibridização *in situ* fluorescente. Marcador citomolecular.

DORNELA, Adeilson Frias. Mapeamento físico dos genes *serk 2*, *svp-like* e *mdar 4* em *Carica papaya*. 2022. Dissertação (Mestre em Genética e Melhoramento). Universidade Federal do Espírito Santo. Orientador: Dr. Wellington Ronildo Clarindo. Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Fernanda Aparecida Ferrari Soares.

### ABSTRACT

Cytogenomics is based on physical mapping and provides data about the organization and structure of the genome. Physical mapping of specific DNA sequences along chromosomes is possible through fluorescent *in situ* hybridization (FISH). Cytogenomics in *C. papaya* has been developed using BAC-FISH, and repeatome sequences, as the rDNA genes. Despite the advances in cytogenomic studies in plant species, physical mapping has not been conducted from single-copy and/or few number-copy genes. Thus, we aimed to map the *serk 2*, *svp-like* and *mdar 4* genes in *C. papaya* mitotic chromosomes. The sequence of the three genes was amplified, and the amplicons sequenced, confirming the homology in relation to *serk 2*, *svp-like* and *mdar 4* genes. *C. papaya* diploidy was confirmed, since all karyotypes showed  $2n = 2x = 18$  chromosomes, and nuclear 2C DNA content of  $0.75 \pm 0.016$  pg. The mitotic chromosomes were classified as metacentric (chromosomes 1, 5, 7 and 8) and submetacentric (chromosomes 2, 3, 4, 6 and 9), with a total length variation of  $4.32 \pm 1.53$   $\mu\text{m}$  (chromosome 1) to  $2.70 \pm 0.42$   $\mu\text{m}$  (chromosome 9). Using the same FISH procedure, we mapped gene sequences from 251 to 1,166 base pairs. The *serk 2* gene was mapped in the interstitial portion of the chromosome 1 long arm, and the interphase nuclei showed two clear fluorescence signals. Considering the sequencing data from the *C. papaya* sex chromosomes (X and Y), the *svp-like* and *mdar 4* genes were mapped in the interstitial region of the X chromosome long arm. Both genes showed only one fluorescence signal in the interphase nuclei. Therefore, the results evidence genetic differences between the X and Y sex chromosomes of *C. papaya*, contributing with new data about the structure and evolution of these chromosomes. We point that *svp-like* and *mdar 4* are also genes useful as a cytomolecular marker for early sex determination. In addition, the protocol adopted here can be reproduced for other single-copy and/or low-copy genes, allowing the mapping and construction of cytogenetic maps.

**Keywords:** Cytogenomics. Cytomolecular marker. Fluorescent *in situ* hybridization. Sex differentiation.

## INTRODUÇÃO

*Carica papaya* L. (família Caricaceae) é uma importante frutífera comercial com centro de origem na Mesoamérica e cultivada em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Lee et al., 2018). A espécie é diploide com cariótipo  $2n = 2x = 18$ , apresentando cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (Damasceno Junior et al., 2009; Araújo et al., 2010), e genoma nuclear relativamente pequeno com  $\sim 1C = 0,32$  pg equivalente a 318 Mb (Araújo et al., 2010). No Brasil, a propagação seminífera é o principal sistema utilizado para o cultivo do mamoeiro, resultando em indivíduos dos três sexos biológicos. Visto o interesse comercial pelos indivíduos hermafroditas no Brasil, estratégias foram estabelecidas para seleção de plantas-mães com características de interesse e para o controle da polinização. Como resultado, sementes mais vigorosas são produzidas, resultando indivíduos hermafroditas em alta frequência (Costa et al., 2019).

O mamoeiro é uma espécie modelo em estudos que investigam a evolução dos cromossomos sexuais (Aryal e Ming, 2014) e os mecanismos de diferenciação sexual (Lee et al., 2018). A determinação sexual em *C. papaya* foi inicialmente proposta com base em um gene com pelo menos três alelos ( $M_1$ ,  $M_2$  e  $m$ ) responsáveis pela diferenciação do sexo. Conforme essa hipótese, os genótipos  $M_1m$ ,  $M_2m$  e  $mm$  resultam, respectivamente, nos indivíduos masculinos, hermafroditas e femininos (Hofmeyr, 1938; Storey, 1938). As combinações dos alelos  $M_1M_1$ ,  $M_2M_2$  e  $M_2M_1$  são letais, promovendo a morte do embrião (Hofmeyr, 1938; Storey, 1938).

Storey revisou a sua hipótese e sugeriu que o tipo sexual não se diferencia a partir da expressão de um gene com três alelos, mas por um grupo de genes ligados que estão localizados em uma região dos cromossomos sexuais onde a recombinação é suprimida (Storey, 1953). A recombinação é severamente suprimida na região próxima ao *locus* de diferenciação sexual (Ma et al., 2004) e pelo menos sete genes foram identificados nesse *locus* (Yu et al., 2008), corroborando com a hipótese de Storey. Além disso, rearranjos cromossômicos, os quais podem ser fatores responsáveis pela supressão da recombinação, foram detectados na região de diferenciação do sexo, como inversões, deleções e translocações (Yu et al., 2008).

A região de diferenciação sexual em *C. papaya* foi mapeada geneticamente no grupo de ligação 1 que está associado ao cromossomo 1 (Ming et al., 2007; VanBuren et al., 2015). O sexo biológico do mamoeiro é expresso por um sistema de diferenciação sexual do tipo XY, sendo as fêmeas homogaméticas (XX) e os machos (XY) e hermafroditas (XY<sup>h</sup>) heterogaméticos. Os cromossomos Y e Y<sup>h</sup> possuem uma região específica de diferenciação sexual com relativamente poucas diferenças na sua constituição genética (Wang et al., 2012). As regiões específicas da masculinidade (MSY) e do hermafroditismo (HSY) possuem cerca de 8,1 Mb, enquanto a sua contraparte X apresenta uma sequência de 3,5 Mb. As porções cromossômicas MSY e HSY possuem maior tamanho do genoma em relação à região correspondente no cromossomo X principalmente, em decorrência da inserção de retroelementos nesta região e de duplicações de sequências (Wang et al., 2012).

A disponibilidade da sequência genômica de *C. papaya* (Ming et al., 2008), em conjunto com técnicas citomoleculares, possibilita o aprofundamento de estudos comparativos e evolutivos na espécie. A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é uma técnica citogenômica que mapeia sequências de DNA nos cromossomos. A FISH contribui para a construção de mapas físicos, assim como para a integração desses mapas com os mapas genéticos (Zhang et al., 2010; Yu, 2014). A aplicação da FISH em cromossomos mitóticos de *C. papaya*, utilizando sondas das sequências de rDNA 18S e 5S nas cultivares ‘Solo’ e ‘Maradol’, evidenciou a localização pericentromérica do 18S em um par cromossômico, enquanto três pares de cromossomos apresentaram sinais na região pericentromérica relacionados ao 5S (Costa et al., 2008). Em contraste, cromossomos paquitênicos de *C. papaya* ‘SunUp’ apresentaram o rDNA 5S nos cromossomos 3, 5, 8, 9 e Y. O sinal do rDNA 45S foi mapeado na região pericentromérica do braço curto do cromossomo 4. Além disso, uma abordagem BAC-FISH mapeou os clones BAC associados aos 12 grupos de ligação (GL) nos cromossomos paquitênicos de *C. papaya* [BAC 96C17 (GL 1), BAC 39C20 (GL 9) e BAC 39P03 (GL 11), BAC 23B18 (GL 6), BAC 15O14 (GL 2), BAC 57E17 (GL 5), BAC 07H21 (GL 3), BAC 12M21 (GL 7) e BAC 01P02 (GL 12), BAC 43N18 (GL 4), BAC 78D03 (GL 8) e BAC 99D21 (GL 10)], respectivamente, nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, permitindo a integração dos grupos de ligação com os cromossomos individuais (Zhang et al., 2010).

Em plantas, o mapeamento físico tem contribuído para a caracterização dos cromossomos sexuais. O mapeamento de uma sequência de DNA satélite, denominada “HSR1”, em *Humulus lupulus* L. mostrou que essa sequência está localizada na região subtelomérica do braço longo dos cromossomos X e Y. Entretanto, a marcação também foi identificada em um sítio pericentromérico do cromossomo X (Divashuk et al., 2011). Em *Cannabis sativa* L., a sequência repetitiva denominada “CS-1” foi mapeada na região subtelomérica do braço curto do cromossomo Y, enquanto no cromossomo X ambos os braços apresentaram essa sequência na região subtelomérica (Divashuk et al., 2014). O mapeamento de sequências repetitivas em *Hippophae rhamnoides* L. revelou um DNA satélite, denominado “HRTR 12”, apenas no cromossomo Y (Puterova et al., 2017). Sequências de DNA satélite, denominadas “RAYS”, foram mapeadas especificamente no cromossomo Y e não apresentavam sinais no cromossomo X de *Rumex acetosa* L. (Jesionek et al., 2021). Portanto, a caracterização dos cromossomos sexuais em plantas tem sido conduzida, principalmente, com foco nas sequências repetitivas. Além do mapeamento de sequências, a FISH auxilia na identificação precoce do sexo. A utilização de um marcador molecular polimórfico como sonda evidenciou sinais fluorescentes em núcleos foliares de plantas hermafroditas, porém, nenhum sinal foi detectado em núcleos foliares de plantas femininas de *C. papaya* ‘Golden’ e ‘Rubi’ (Abreu et al., 2015).

Além dessas sequências (especialmente do repeatoma), o mapeamento citogenético de genes de cópia única e/ou de poucas cópias é necessário para a construção de mapas de sequências específicas de um cromossomo, inclusive dos cromossomos sexuais, e que tenham potencial para serem utilizadas como marcadores citomoleculares. Nesse contexto, alguns genes que ocorrem na região de diferenciação sexual foram explorados aqui, entre eles: *gene receptor quinase da embriogênese somática* (em inglês: *serk 2*), *gene fase vegetativa curta* (em inglês: *svp-like*) e *gene monodehidroascorbato redutase* (em inglês: *mdar 4*).

O gene *serk 2* codifica uma proteína que pertence à família das quinases receptoras da membrana plasmática. A proteína SERK possui repetições ricas em leucina, atuando na transdução de sinal (Duarte-Aké e De-la-Peña, 2016) e na esporogênese masculina (Albrecht et al., 2005). O gene *svp-like* codifica um fator de transcrição que regula a transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva, ativando

os genes da identidade dos órgãos florais das classes B e C (Gregis et al., 2006; Gregis et al., 2013). Análises de expressão gênica e sequenciamento mostraram que o gene *svp-like* presente no cromossomo Y codifica uma proteína intacta com todos os domínios, enquanto o alelo mutante do gene presente no cromossomo Y<sup>h</sup> codifica uma proteína que possui apenas o domínio K-box. Em contrapartida, no cromossomo X foi identificado um fragmento mais curto do gene *svp-like* que, possivelmente, não codifica uma proteína funcional (Urasaki et al., 2012; Ueno et al., 2015; Lee et al., 2018). O gene *mdar 4* codifica uma enzima que possui atividade antioxidante que atua na eliminação de espécies reativas de oxigênio, aumentando a tolerância contra estresses oxidativos em algumas espécies (Eltayeb et al., 2007; Gill e Tuteja, 2010). Análises genéticas evidenciaram que o gene *mdar 4* apresenta um alelo tipo selvagem no cromossomo X, enquanto nos cromossomos Y e Y<sup>h</sup> o alelo contém uma inserção de retroelemento (Urasaki et al., 2012).

Em *C. papaya*, os estudos citogenômicos vêm sendo desenvolvidos no contexto de genes rDNA e com abordagens BAC-FISH. O mapeamento de genes de cópia única e/ou de poucas cópias ainda não foi realizado na espécie, sendo então necessário para ampliar os conhecimentos sobre a posição desses genes no cariótipo, além de permitir explorar possíveis sequências que possam ser usadas como marcadores citomoleculares e contribuir para entender os aspectos evolutivos e estruturais do genoma da espécie. Dessa forma, nosso objetivo foi mapear os genes *serk 2*, *svp-like* e *mdar 4* em cromossomos mitóticos de *C. papaya*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Conteúdo de DNA nuclear*

Folhas jovens e saudáveis de *C. papaya* 'Golden' (fêmea) e *Solanum lycopersicum* L. (padrão de referência - 2C = 2,00 pg, Praça-Fontes et al., 2011) foram coletadas em campo no município de Viçosa/MG (Brasil) e utilizadas para mensurar o conteúdo de DNA nuclear. As folhas foram colocadas em uma placa de Petri e cortadas em fragmentos de 1 cm<sup>2</sup>. Os fragmentos foram retalhados (Galbraith et al., 1983) com uma lâmina de barbear em uma placa de Petri contendo 500 µL do tampão

de extração OTTO-I (0,1 M de ácido cítrico, 0,5% de Tween 20, 2,0 mM de DL-ditiotreitol e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de RNase, pH = 2,3). Após 3 minutos, 500  $\mu\text{L}$  do mesmo tampão de extração foram adicionados e a suspensão foi filtrada por meio de um filtro de náilon de 30  $\mu\text{m}$  (Partec®) em um tubo de microcentrífuga de 2,0 mL (Eppendorf®) e centrifugada a 100 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensão e incubado em 100  $\mu\text{L}$  do tampão de extração OTTO-I por 10 minutos à temperatura ambiente. As suspensões nucleares foram coradas com 500  $\mu\text{L}$  do tampão de coloração OTTO-II (0,4  $\mu\text{M}$  de fosfato de sódio dibásico, suplementado com 75  $\mu\text{M}$  de iodeto de propídio e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de RNase, pH = 7,8) por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente, as suspensões foram filtradas por meio de um filtro de náilon de 20  $\mu\text{m}$  (Partec®) em um tubo de acrílico (Sarstedt, Inc) e analisadas em um citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (Accuri Cytometers, Inc), equipado com fonte de laser (488 nm) para promover a emissão nos filtros FL2 (615-670 nm) e FL3 (>670 nm). Os histogramas gerados foram analisados pelo software BD Accuri™ C6.

Quatro repetições internas foram realizadas e o tamanho do genoma de *C. papaya* foi mensurado de acordo com a fórmula (Doležel e Bartoš, 2005):

$$\text{DNA 2C (amostra)} = \left[ \frac{\text{(média do pico G}_1 \text{ da amostra)}}{\text{(média do pico G}_1 \text{ do padrão)}} \right] \times \text{conteúdo de DNA 2C do padrão (pg)}$$

O valor médio do conteúdo de DNA em picogramas (pg) foi convertido em pares de base (pb), considerando que 1 pg de DNA corresponde a  $0,978 \times 10^9$  pb (Doležel et al., 2003).

#### *Obtenção dos cromossomos*

Sementes de *C. papaya* 'Hawaii' (Isla®) foram imersas em uma solução contendo 200 ppm de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) por 24 horas para promover a quebra de dormência (Bhattacharya e Khuspe, 2001). Posteriormente, as sementes foram colocadas em placas de Petri com papel filtro umedecido com água destilada e mantidas a 30°C até a germinação. As raízes com 0,5 – 1,0 cm de comprimento foram tratadas com 3  $\mu\text{M}$  de amiprofos-metil (APM, Sigma®) e 0,3% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma®) por 4 horas a 30°C. As raízes foram lavadas e fixadas em solução

de metanol: ácido acético na proporção de 3:1, com três trocas de 10 minutos cada e mantidas a -20°C (Sattler et al., 2019; Silva et al., 2020).

Os meristemas radiculares foram excisados, lavados com água destilada por três vezes, e incubados a 36°C por 2 horas em solução enzimática contendo 4% de celulase (Sigma®), 0,4% de hemicelulase (Sigma®), 1% de macerozima R10 (Yakult®) e 100% de pectinase (Sigma®) diluída em água destilada na proporção de 1:14 (solução enzimática: água destilada). Após a maceração enzimática, os meristemas radiculares foram lavados em água destilada e fixados em solução de metanol: ácido acético (3:1) e mantidos a -20°C. As lâminas foram preparadas por meio da técnica de dissociação celular e secagem ao ar (Araújo et al., 2010).

#### *Construção da sonda*

O DNA genômico total foi extraído de folhas jovens de *C. papaya* 'Golden' (fêmea) com o kit GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep (Sigma®) seguindo as instruções do fabricante. A concentração e pureza do DNA foi determinada por espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific®) e sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os primers desenhados para esse estudo foram baseados nas sequências depositadas no Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (em inglês: NCBI): *serk 2* - LOC110813265 e *mdar 4* - LOC110807062. Para o gene *svp-like*, os primers foram obtidos com base em Chen et al. (2019).

As sequências dos primers utilizadas neste estudo e o tamanho da região de amplificação são descritos a seguir: gene *serk 2* (F: 5'-CTCTCACTGCACGCCTAAC-3' - R: 5'-TCGCCTTCAAATCCTGAAACT-3') com amplicon de 1.166 pb; gene *svp-like* (F: 5'-ACTTGTTGCCTCAGTTTCTCATTCTCTTC-3' - R: 5'-GAGATCAGTGATCTTCAAAGGAAGGTC-3') com amplicon de 251 pb; gene *mdar 4* (F: 5'-TATTCCGACCCCAGTCTCCA-3' - R: 5'-TCCTACCGCGCCAAACAAAT-3') com amplicon de 731 pb. A validação *in silico* dos primers foi realizada pela ferramenta do OligoAnalyzer™ (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) e a possível formação de homodímeros, heterodímeros e estruturas em grampo foi verificada. A análise de especificidade foi realizada usando a Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico (em inglês: BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



As reações de PCR para amplificação do DNA genômico consistiram em 0,5 µM de cada primer, 60 ng de DNA genômico, 200 µM de cada dNTP (Promega®), 1,3 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega®), 1X de tampão Colorless GoTaq® Flexi (Promega®) e 1 U da enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega®). Todas as amplificações foram realizadas em um termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc) nas seguintes condições: 4 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 54°C, 50°C e 50°C, respectivamente, para os primers dos genes *serk 2*, *svp-like* e *mdar 4*, 1 minuto a 72°C e 5 minutos a 72°C para uma extensão final. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% (Figura Suplementar 1).

As reações de PCR para marcação das sequências amplificadas consistiram em 0,5 µM de cada primer, 200 ng de DNA amplificado anteriormente, 200 µM de cada dATP, dCTP e dGTP (Promega®), 100 µM de dTTP (Promega®), 20 µM de Tetrametilrodamina-5-dUTP (Roche®), 1,3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X de tampão Colorless GoTaq® Flexi (Promega®) e 1 U da enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega®) (Silva et al., 2020). As condições de PCR foram as mesmas utilizadas para a amplificação do DNA genômico.

#### *Sequenciamento dos produtos de amplificação*

As reações de PCR foram feitas com um volume total de 50 µL e consistiram em 0,5 µM de cada primer, 200 ng de DNA amplificado anteriormente, 200 µM de cada dNTP (Promega®), 1,3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X de tampão Colorless GoTaq® Flexi (Promega®) e 1 U da enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega®). As condições de PCR foram as mesmas utilizadas para a amplificação das sequências e produção das sondas. A purificação das amostras foi realizada com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e pureza do produto de PCR foi determinada por espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific®) e sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os produtos de PCR purificados foram enviados para sequenciamento pelo método de Sanger na empresa ACTGene Análises Moleculares.

## *FISH*

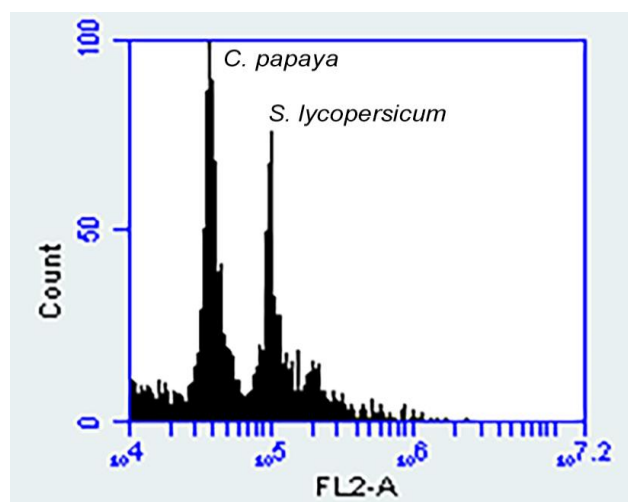
Lâminas com prometáfases/metáfases sem cromossomos sobrepostos e centrômeros bem definidos foram selecionadas usando microscópio de contraste de fase Olympus BX 41. As lâminas foram tratadas em 1X de solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 5 minutos, fixadas em solução de formalina 4% por 10 minutos e lavadas novamente com 1X de PBS por 5 minutos. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica gelada (70%, 85% e 100%) por 3 minutos cada.

A mistura de hibridização consistiu em 200 ng da sonda, 50% de formamida e 2X de citrato de sódio salino (SSC). Os cromossomos foram desnaturados em banho-maria a 70°C por 3 minutos em solução tampão de 70% de formamida/2X SSC. Após a desnaturação as lâminas foram desidratadas em série alcoólica gelada (70%, 85% e 100%) por 3 minutos cada. A mistura de hibridização foi desnaturada em um termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc) a 85°C por 5 minutos e imediatamente colocada no gelo por pelo menos 5 minutos. A mistura contendo a sonda foi colocada sobre as lâminas, coberta com lamínulas de plástico HybriSlip™ (Sigma®) e seladas com cola Rubber Cement (Elmer's®). A hibridização foi conduzida no equipamento ThermoBrite™ (StatSpin®) a 37°C por 24 horas. Posteriormente, as lâminas foram submetidas à lavagem de estringência realizada a 40°C em solução 4X SSC por 5 minutos. As lâminas foram contra-coradas com 10% glicerol/PBS + 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), cobertas com lamínula de vidro e seladas com esmalte de unha (Contim et al., 2003; Silva et al., 2018; Soares et al., 2020; Quadros et al., 2021).

As prometáfases, metáfases e núcleos foram capturados com uma câmera digital 12-bit CCD (Olympus®) acoplada a um fotomicroscópio Olympus BX-60 equipado com epifluorescência e objetiva de imersão (100x, NA = 1,4). As imagens capturadas foram processadas no software Image-Pro Plus 6,1 (Media Cybernetics, Inc).

## RESULTADOS

Os histogramas obtidos a partir da suspensão nuclear de folhas de *C. papaya* e *S. lycopersicum* apresentaram picos de núcleos G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> com coeficiente de variação variando entre 3,47% e 4,69% (Figura 1). O conteúdo 2C de DNA nuclear médio da planta feminina de *C. papaya* foi estimado em  $0,75 \pm 0,016$  pg (1C = 0,375 pg, 1C =  $0,367 \times 10^9$  pb).



**Figura 1:** Histograma mostrando a posição dos picos G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de *C. papaya* (2C = 0,75 pg) e *S. lycopersicum* (2C = 2,0 pg - padrão interno de referência), respectivamente.

A imersão das sementes em solução de ácido giberélico para quebra de dormência proporcionou 95% de germinação após cerca de 5 dias a 30°C. A quebra da dormência foi essencial para aumentar o percentual de germinação em um curto período, proporcionando grande quantidade de meristemas radiculares para a obtenção de prometáfases e metáfase. O procedimento citogenético empregado (tratamento das raízes com amiprofos-metil, maceração enzimática, e a técnica de dissociação e secagem ao ar) resultou em prometáfases/metáfases com cromossomos morfologicamente preservados, e apresentando constrições primárias e secundárias bem definidas.

As prometáfases e metáfases apresentaram  $2n = 2x = 18$  cromossomos, confirmando a diploidia de *C. papaya*. O tamanho total médio dos cromossomos variou de  $4,32 \pm 1,53$   $\mu\text{m}$  (cromossomo 1) a  $2,70 \pm 0,42$   $\mu\text{m}$  (cromossomo 9). O cariograma

da espécie é composto por quatro pares de cromossomos metacêntricos (cromossomos 1, 5, 7 e 8) e cinco pares de cromossomos submetacêntricos (cromossomos 2, 3, 4, 6 e 9) (Tabela Suplementar 1). A constrição secundária foi identificada na região pericentromérica do cromossomo 1 (Figuras 2 e 3). A caracterização morfométrica dos cromossomos e a montagem dos kariogramas foram fundamentais para o mapeamento citogenético dos genes *serk 2*, *svp-like* e *mdar 4*.

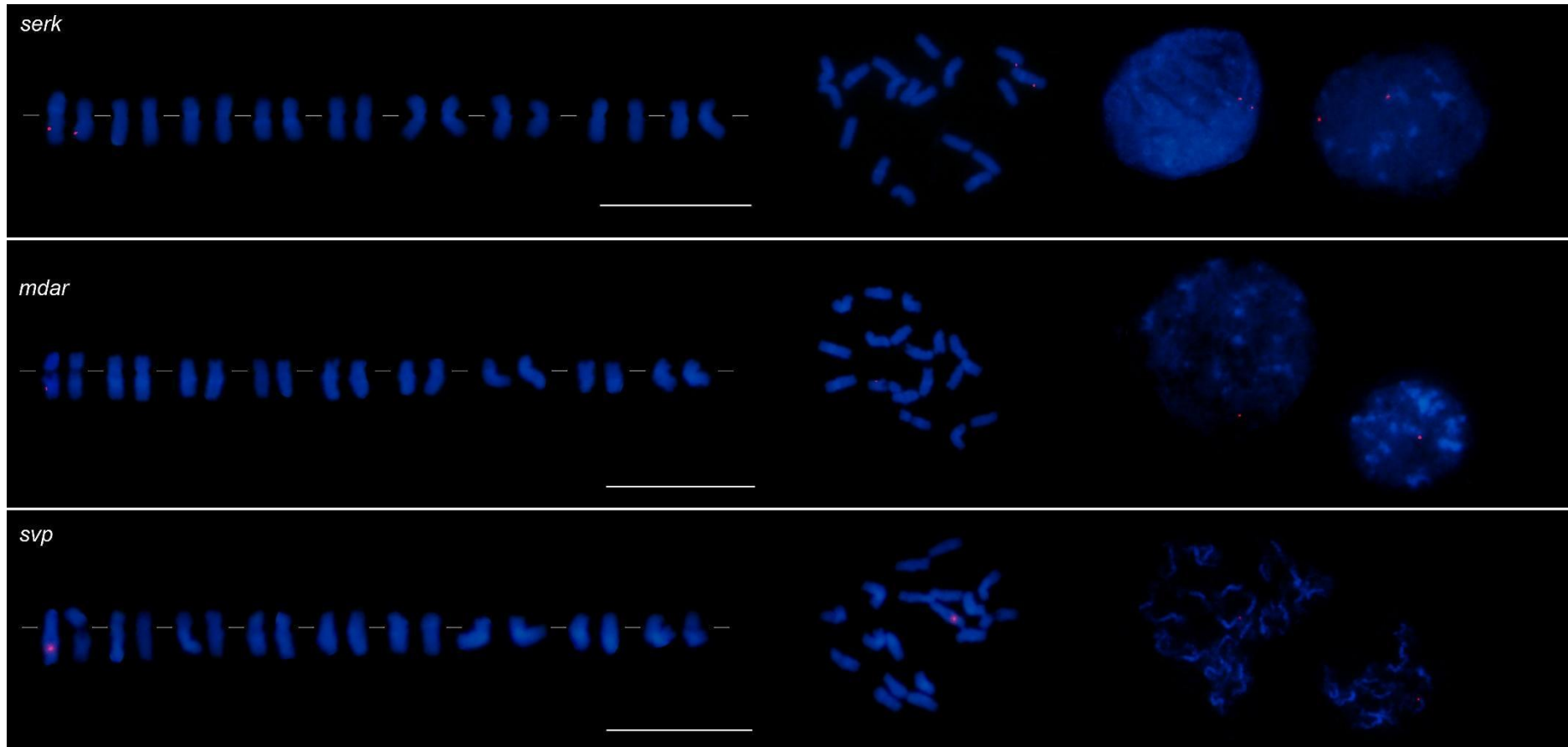
A amplificação das sequências dos genes *serk 2*, *svp-like* e *mdar 4* a partir do DNA genômico de *C. papaya* gerou amplicons com tamanho aproximado de 1.100, 250 e 700 pares de bases, respectivamente (Figura Suplementar 1). Com base no sequenciamento, a similaridade com as sequências depositadas no banco de dados (Ming et al., 2007; VanBuren et al., 2015) foi equivalente a 90% para a fita *sense* e 83% para a fita *antisense* do gene *serk 2*; 92% para a fita *sense* e 96% para a fita *antisense* do gene *mdar 4*; 50% para a fita *sense* e 62% para a fita *antisense* do gene *svp-like*. Uma vez que não há uma sequência contígua do cromossomo X depositada no NCBI, nós utilizamos a sequência contígua do cromossomo Y como referência para confirmar a homologia do gene *svp-like*. Dessa forma, a porcentagem de similaridade é relativamente baixa, visto que esse fragmento apresenta poucas regiões homólogas entre as sequências desse gene nos cromossomos X e Y.

Nós definimos o procedimento da FISH com base em diferentes testes e seus respectivos resultados, considerando a visualização dos sinais de fluorescência nos núcleos e cromossomos mitóticos. A principal adequação envolveu a concentração de 4X SSC na solução de lavagem pós-hibridização (estringência). Dessa forma, as condições da FISH foram estabelecidas para que a hibridização das sondas com diferentes tamanhos fosse possível. As hibridizações com as sondas confeccionadas para os genes investigados foram realizadas em prometáfases/metáfases para identificar a localização física desses genes, e em núcleos interfásicos para confirmar o número de cópias de cada gene. Sinais nítidos foram gerados após a hibridização das sondas em núcleos e cromossomos.

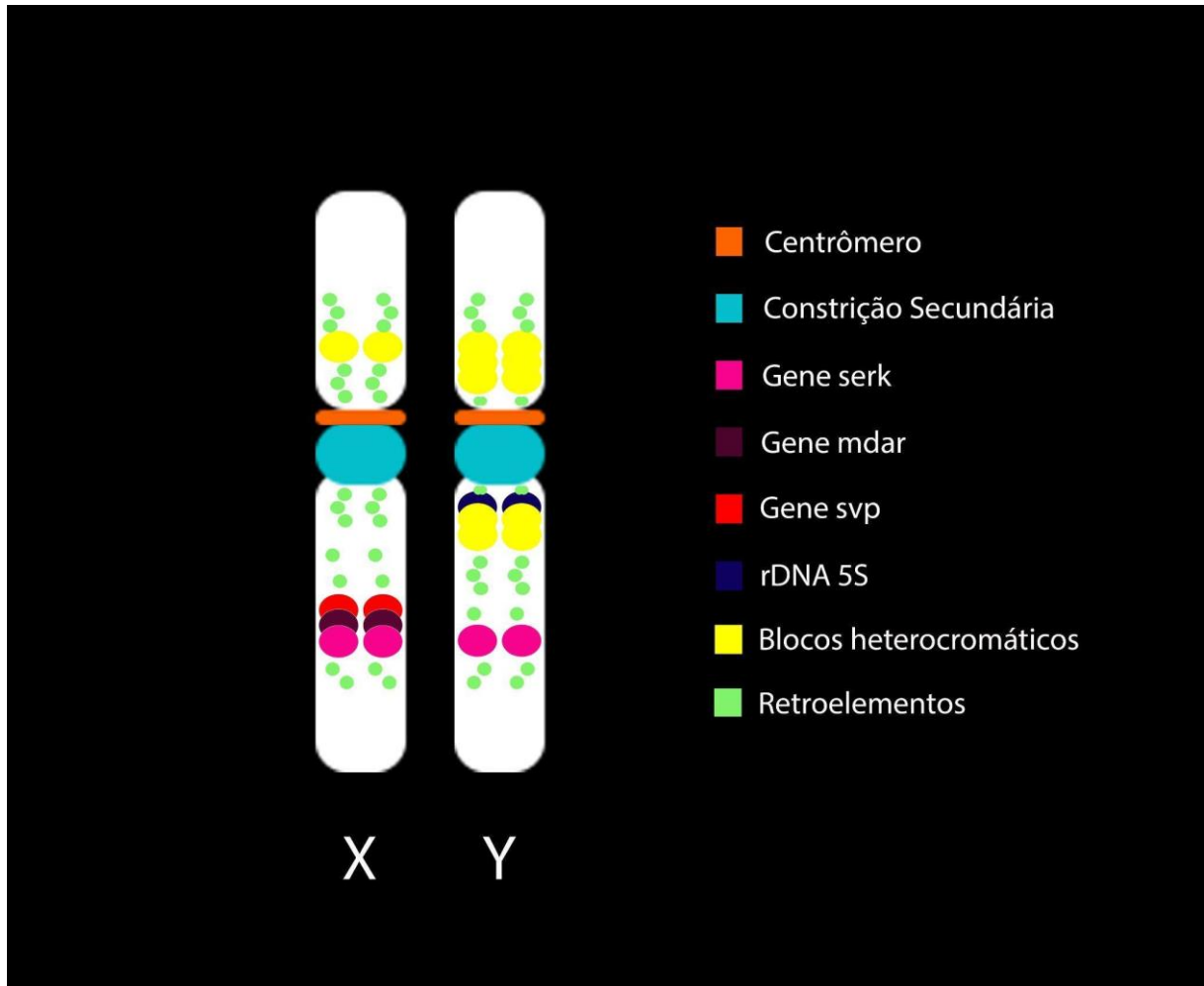
O sinal de fluorescência da sonda confeccionada a partir da sequência do gene *serk 2* foi detectado em 2 prometáfases/metáfases no cromossomo 1, sendo mapeado na região intersticial do braço longo desse cromossomo. Além disso, dois sinais de fluorescência foram detectados em 9 núcleos interfásicos, sendo possível sugerir que o gene *serk 2* é um gene de cópia única (Figura 2).

As hibridizações com as sondas dos genes *svp-like* e *mdar 4* apresentaram sinais de fluorescência em 6 e 5 prometáfases/metáfases, respectivamente, onde o sinal de marcação foi identificado no cromossomo X, sendo mapeados na região intersticial do braço longo desse cromossomo (Figura 2). Corroborando, nós verificamos 1 sinal de fluorescência do gene *svp-like* em 5 núcleos interfásicos, e 1 sinal do gene *mdar 4* em 13 núcleos interfásicos. Dessa forma, nossos resultados sugerem diferenças entre os cromossomos do par homólogo 1, também designados como XY, evidenciando que as sondas destes dois genes permitiram a caracterização da porção não-homóloga entre os cromossomos sexuais.

Após a montagem do cariógrama, nós estruturamos um ideograma (Figura 3) dos cromossomos X e Y para representar esquematicamente os sítios marcados com base nos padrões observados da localização das sondas dos genes em estudo, do centrômero e da constrição secundária. Além disso, o ideograma contempla os dados citogenômicos da localização física de porções heterocromáticas (Zhang et al., 2008), do gene rDNA 5S (Zhang et al., 2010) e da distribuição de retroelementos (Urasaki et al., 2012).



**Figura 2:** Mapeamento físico dos genes *serk 2*, *mdar 4* e *svp-like* em cromossomos mitóticos e núcleos interfásicos de *C. papaya*. Detalhe para as marcações dos genes *serk 2*, *mdar 4* e *svp-like* na região intersticial do braço longo do cromossomo 1. Os cariogramas apresentam  $2n = 2x = 18$  cromossomos, alinhados pelo centrômero. Observa-se a constrição secundária presente na região pericentromérica do cromossomo 1. Barras: 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3:** Ideograma dos cromossomos X e Y de *C. papaya*. A barra laranja representa a posição do centrômero. O círculo azul claro mostra a posição da constrição secundária. Os círculos rosa, roxo e vermelho no braço longo do cromossomo X evidenciam a localização dos genes *serk 2*, *mdar 4* e *svp-like*, respectivamente. O círculo rosa no braço longo do cromossomo Y mostra a posição do gene *serk 2*. Os círculos amarelos representam os knobs (porções heterocromáticas) (Zhang et al., 2008). O círculo azul escuro na região pericentromérica do braço longo do cromossomo Y representa o rDNA 5S (Zhang et al., 2010). Os círculos verdes mostram a distribuição de retroelementos ao longo dos cromossomos sexuais (Urasaki et al., 2012).

## DISCUSSÃO

Com base nas sequências depositadas e no procedimento de FISH, nós mapeamos, pela primeira vez, os genes *serk 2*, *svp-like* e *mdar 4* em cromossomos mitóticos de *C. papaya*. Empregando o mesmo procedimento de FISH, nós mapeamos amplicons de 251 a 1.166 pb, permitindo a co-hibridização de sondas de diferentes tamanhos. Os dados do presente estudo também são inéditos com relação ao mapeamento físico em cromossomos mitóticos de genes de cópia única ou com poucas cópias em *C. papaya*. Dessa forma, os resultados obtidos ampliam o conhecimento sobre a localização física desses genes, além de permitir a investigação de possíveis genes candidatos a marcadores citomoleculares e auxiliar na compreensão das relações evolutivas e estruturais dos cromossomos sexuais.

O mapeamento citogenético dos genes mostrou que há sequências divergentes entre os cromossomos X e Y. Possivelmente as sequências dos genes *svp-like* e *mdar 4* ocorrem na região de determinação sexual. O incipiente par de cromossomos sexuais e a supressão da recombinação fazem com que *C. papaya* seja considerada uma espécie modelo para os estudos de evolução dos cromossomos sexuais e determinação do sexo em plantas (Lee et al., 2018). Além da ocorrência das sequências dos genes *svp-like* e *mdar 4*, a alta densidade de retroelementos foi identificada ao longo dos cromossomos sexuais do mamoeiro (Urasaki et al., 2012). Além disso, pelo menos quatro knobs (porções heterocromáticas) e sequências altamente metiladas foram identificadas apenas na região sexual do cromossomo Y e não na porção não-homóloga do cromossomo X (Zhang et al., 2008). Essas características citogenéticas podem ter influência na expressão gênica e na divergência entre as sequências.

O mapeamento da sequência do gene *serk 2* revelou a sua posição em uma região intersticial do braço longo do cromossomo 1. Corroborando, os dados do sequenciamento do *locus* de determinação do sexo do cromossomo Y mostrou que o gene *serk 2* está presente nessa região (VanBuren et al., 2015). A presença de dois sinais de marcação nos núcleos e nas metáfases confirma que o gene *serk 2* é um gene de cópia única, e que possivelmente ocorre próximo ou na porção pseudoautossômica entre X e Y. Apesar da região de determinação sexual possuir



genes específicos ou sequências divergentes entre os cromossomos sexuais, pelo menos cinquenta genes já foram identificados tanto na região sexual do cromossomo X quanto na sua contraparte  $Y^h$  (Wang et al., 2012).

O gene *svp-like* foi mapeado em uma região intersticial do braço longo do cromossomo X. Análise do transcriptoma revelou que esse gene estaria presente apenas no cromossomo que possui a região de determinação sexual masculina ou hermafrodita (Urasaki et al., 2012). Entretanto, recentemente, uma análise de expressão dos íntrons do gene *svp-like* mostrou que plantas fêmeas possuíam íntrons desse gene que também eram expressos nos indivíduos masculinos e hermafroditas (Lee et al., 2018). O nosso resultado do produto amplificado na PCR confirma a existência de um fragmento desse gene no indivíduo feminino, uma vez que utilizamos o DNA genômico extraído de uma planta feminina para amplificar os primers utilizados neste estudo. Como esperado, o resultado do sequenciamento mostrou que o fragmento desse gene presente no cromossomo X apresenta regiões homólogas ao cromossomo Y e possui uma sequência específica que não apresenta homologia com o cromossomo Y. Portanto, nossos dados sugerem que a sonda desse gene foi mapeada no cromossomo X.

O mapeamento da sonda confeccionada a partir da sequência do gene *mdar 4* revelou a sua localização no braço longo do cromossomo X, na região intersticial. Análises genômicas evidenciaram divergência entre as sequências do gene *mdar 4* em cromossomos sexuais, principalmente, como resultado da inserção de retroelementos na sequência desse gene no genoma dos indivíduos masculinos e hermafroditas, o que não ocorre no genoma dos indivíduos femininos (Urasaki et al., 2012). Uma vez que o gene *mdar 4* tem papel na eliminação de espécies reativas de oxigênio, mantendo a viabilidade celular, a ausência desse gene no cromossomo X pode ser letal (Eltayeb et al., 2007). Corroborando, apenas um sinal de hibridização para o gene *mdar 4* foi detectado nos núcleos e cromossomos, evidenciando que a sequência ocorre no cromossomo X e que esse gene pode ter sido deletado do cromossomo Y. O alinhamento de uma região do cromossomo X e  $Y^h$  revelou deleções de segmentos no cromossomo  $Y^h$  em *C. papaya*. Além disso, o gene *folhas assimétricas* (em inglês: *asymmetric leaves 2*) parece ter sido perdido, uma vez que estava presente apenas no cromossomo X (Yu et al., 2008). A perda de genes já foi reportada em *Silene latifolia* Poir., a qual apresentou uma estimativa de genes

perdidos de 14,5% no cromossomo Y (Bergero et al., 2015). Assim, para *C. papaya*, mais estudos, inclusive de citogenômica, precisam ser conduzidos para confirmação da nossa hipótese de perda de genes entre os cromossomos X e Y.

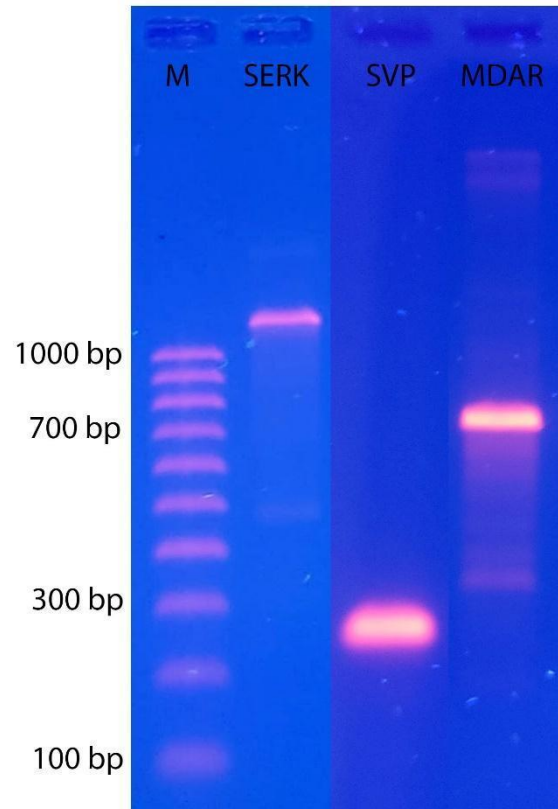
O mapeamento dos genes localizados no cromossomo 1 corrobora com a região de determinação sexual no mamoeiro, que se localiza em uma região pericentromérica que se expande para o braço longo do cromossomo 1 (Ming et al., 2011). Acredita-se que a expansão da região de recombinação suprimida se dá a partir da seleção de genes sexualmente antagônicos ou por rearranjos cromossômicos (Charlesworth et al., 2005; Ming et al., 2011). Como consequência da supressão da recombinação na região de determinação sexual, o cromossomo Y sofre degeneração genética, apresentando baixa expressão ou perda de genes, o que pode ter acontecido com o gene *mdar 4*, com base nos resultados deste estudo. A recombinação suprimida nas regiões de determinação sexual pode promover a divergência entre as sequências presentes nessa porção cromossômica e alterar gradualmente o seu número de cópias. Dessa forma, nós exploramos os fragmentos gênicos específicos do cromossomo X, os quais também podem ser usados no desenvolvimento de marcadores citomoleculares ligados ao sexo.

A identificação de diferenças citogenéticas e a caracterização dos cromossomos sexuais em plantas vêm sendo conduzida, principalmente, por meio do mapeamento físico de sequências repetitivas. Em *H. lupulus*, o DNA satélite “HSR1” foi mapeado na região subteloamérica e pericentromérica do cromossomo X, enquanto o cromossomo Y apresentava o sinal apenas na região subteloamérica (Divashuk et al., 2011). O mapeamento de uma sequência repetitiva, denominada “CS-1”, diferenciou os cromossomos sexuais de *C. sativa*, que apresentou apenas a região subteloamérica do braço curto do cromossomo Y marcada, enquanto a região subteloamérica de ambos os braços do cromossomo X possuía essa marcação (Divashuk et al., 2014). Em *H. rhamnoides* e *R. acetosa*, as sequências de DNA satélites “HRTR 12” e “RAYS”, respectivamente, foram mapeadas apenas no cromossomo Y (Puterova et al., 2017; Jesionek et al., 2021). Além de sequências repetitivas, explorar genes que possuem sequências divergentes nos cromossomos sexuais ou que ocorrem apenas em um dos cromossomos, permite caracterizar os cromossomos sexuais.

Em *C. papaya*, marcadores moleculares do tipo Região Amplificada de Sequência Caracterizada (SCAR – *Sequence Characterized Amplified Region*) vêm sendo utilizados para diferenciar indivíduos hermafroditas de femininos, por meio da aplicação da FISH em núcleos extraídos do tecido foliar dessas plantas. Utilizando o marcador molecular *NAPF-2*, apenas os núcleos extraídos das plantas hermafroditas apresentavam um forte sinal de fluorescência, o que não foi observado nos núcleos foliares de plantas femininas (Abreu et al., 2015). Dessa forma, essa técnica pode ser empregada em núcleos foliares de plântulas para identificar precocemente o tipo sexual, tornando possível a seleção de indivíduos hermafroditas, diminuindo assim o gasto com desbaste de plantas que não possuem interesse comercial. Aqui, com base nos resultados da FISH, os genes *svp-like* e *mdar 4* podem ser explorados em futuras aplicações citomoleculares para determinar precocemente o tipo sexual de *C. papaya*.

Nós, pela primeira vez, determinamos o número de cópias e mapeamos os genes *serk 2*, *svp-like* e *mdar 4* em cromossomos mitóticos de *C. papaya*. Além disso, as sondas dos genes *svp-like* e *mdar 4* foram fortes candidatas a serem investigadas como um possível marcador citomolecular para identificação precoce do tipo sexual, uma vez que os sinais de hibridização foram marcados em apenas um dos cromossomos sexuais. Com isso, nossos dados contribuem para aumentar as análises citogenômicas e o entendimento da evolução e estrutura do genoma da espécie.

## INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES



**Figura Suplementar 1:** Produtos de PCR resultantes da amplificação do DNA genômico de *C. papaya* utilizando primers específicos para os genes *serk 2*, *svp-like* e *mdar 4* analisados em gel de agarose 1,5%.

Tabela Suplementar 1: Morfometria e classificação dos cromossomos de *C. papaya*.

Cromossomo	Comprimento total ( $\mu\text{m}$ )	Braço ( $\mu\text{m}$ )		r	ic	Comprimento relativo (%)	Classe
		Curto	Longo				
1	4,32 $\pm$ 1,53	1,79 $\pm$ 0,69	2,53 $\pm$ 1,16	1,42	41,4	5,56	M
2	3,72 $\pm$ 0,90	1,43 $\pm$ 0,52	2,29 $\pm$ 0,41	1,60	38,5	4,79	SM
3	3,54 $\pm$ 0,84	1,17 $\pm$ 0,20	2,37 $\pm$ 0,75	2,04	32,9	4,55	SM
4	3,38 $\pm$ 0,87	1,25 $\pm$ 0,39	2,13 $\pm$ 0,24	1,70	37,0	4,35	SM
5	3,27 $\pm$ 0,70	1,34 $\pm$ 0,27	1,93 $\pm$ 0,29	1,44	41,0	4,21	M
6	3,22 $\pm$ 0,70	1,20 $\pm$ 0,30	2,02 $\pm$ 0,38	1,68	37,3	4,14	SM
7	3,17 $\pm$ 0,64	1,29 $\pm$ 0,35	1,88 $\pm$ 0,31	1,46	40,6	4,08	M
8	2,81 $\pm$ 0,42	1,16 $\pm$ 0,42	1,66 $\pm$ 0,25	1,43	41,1	3,62	M
9	2,70 $\pm$ 0,42	1,08 $\pm$ 0,27	1,63 $\pm$ 0,15	1,51	39,9	3,48	SM
	30,14	11,70	18,44			38,78	

r: razão entre os braços, ic: índice centromérico, M: metacêntrico, SM: submetacêntrico.

## REFERÊNCIAS

- Abreu, I. S., Carvalho, C. R., & Soares, F. A. (2015). Early sex discrimination in *Carica papaya* by nuclei FISH. *Euphytica*, 206(3), 667-676.
- Albrecht, C., Russinova, E., Hecht, V., Baaijens, E., & de Vries, S. (2005). The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 control male sporogenesis. *The Plant Cell*, 17(12), 3337-3349.
- Araújo, F. S., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2010). Genome size, base composition and karyotype of *Carica papaya* L. *The Nucleus*, 53(1), 25-31.
- Aryal, R., & Ming, R. (2014). Sex determination in flowering plants: papaya as a model system. *Plant Science*, 217, 56-62.
- Bergero, R., Qiu, S., & Charlesworth, D. (2015). Gene loss from a plant sex chromosome system. *Current Biology*, 25(9), 1234-1240.
- Bhattacharya, J., & Khuspe, S. S. (2001). In vitro and in vivo germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. *Scientia Horticulturae*, 91(1-2), 39-49.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B., & Marais, G. (2005). Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity*, 95(2), 118-128.
- Chen, J. R., Urasaki, N., Matsumura, H., Chen, I. C., Lee, M. J., Chang, H. J., Chung, W. C., & Ku, H. M. (2019). Dissecting the all-hermaphrodite phenomenon of a rare X chromosome mutant in papaya (*Carica papaya* L.). *Molecular Breeding*, 39(1), 14.
- Contim, L. A. S., Waclawovsky, A. J., Delú-Filho, N., Pirovani, C. P., Clarindo, W. R., Loureiro, M. E., Carvalho, C. R., & Fontes, E. P. (2003). The soybean sucrose binding protein gene family: genomic organization, gene copy number and tissue-specific expression of the SBP2 promoter. *Journal of experimental botany*, 54(393), 2643-2653.
- Costa, A. F. S., Abreu, E. F. M., Schmildt, E. R., Costa, A. N., & Schmildt, O. (2019). Advances observed in papaya tree propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41.

Costa, F. R., Pereira, T. N. S., Hodnett, G. L., Pereira, M. G., & Stelly, D. M. (2008). Fluorescent in situ hybridization of 18S and 5S rDNA in papaya (*Carica papaya* L.) and wild relatives. *Caryologia*, 61(4), 411-416.

Damasceno Junior, P. C., da Costa, F. R., Pereira, T. N. S., Neto, M. F., & Pereira, M. G. (2009). Karyotype determination in three Caricaceae species emphasizing the cultivated form (*C. papaya* L.). *Caryologia*, 62(1), 10-15.

Divashuk, M. G., Alexandrov, O. S., Kroupin, P. Y., & Karlov, G. I. (2011). Molecular cytogenetic mapping of *Humulus lupulus* sex chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 134(3), 213-219.

Divashuk, M. G., Alexandrov, O. S., Razumova, O. V., Kirov, I. V., & Karlov, G. I. (2014). Molecular cytogenetic characterization of the dioecious *Cannabis sativa* with an XY chromosome sex determination system. *PLoS one*, 9(1), e85118.

Doležel, J., & Bartoš, J. A. N. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of botany*, 95(1), 99-110.

Doležel, J., Bartoš, J., Voglmayr, H., & Greilhuber, J. (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A*, 51(127-128), 754.

Duarte-Aké, F., & De-la-Peña, C. (2016). Epigenetic advances in somatic embryogenesis in sequenced genome crops. In *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*. Springer, (pp. 81-102).

Eltayeb, A. E., Kawano, N., Badawi, G. H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Shibahara, T., Inanaga, S., & Tanaka, K. (2007). Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta*, 225(5), 1255-1264.

Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P., & Firoozabady, E. (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220(4601), 1049-1051.

Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.

Gregis, V., Andrés, F., Sessa, A., Guerra, R. F., Simonini, S., Mateos, J. L., Torti, S., Zambelli, F., Prazzoli, G. M., Bjerkan, K. N., Grini, P. E., Pavesi, G., Colombo, L., Coupland, G., & Kater, M. M. (2013). Identification of pathways directly regulated by SHORT VEGETATIVE PHASE during vegetative and reproductive development in *Arabidopsis*. *Genome biology*, 14(6), 1-26.

Gregis, V., Sessa, A., Colombo, L., & Kater, M. M. (2006). AGL24, SHORT VEGETATIVE PHASE, and APETALA1 redundantly control AGAMOUS during early stages of flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18(6), 1373-1382.

Hofmeyr, J. D. J. (1938). Genetical studies of *Carica Papaya* L. *South African Journal of Science*, 35(12), 300-304.

Jesionek, W., Bodláková, M., Kubát, Z., Čegan, R., Vyskot, B., Vrána, J., Šafář, J., Puterova, J., & Hobza, R. (2021). Fundamentally different repetitive element composition of sex chromosomes in *Rumex acetosa*. *Annals of botany*, 127(1), 33-47.

Lee, C. Y., Lin, H. J., Viswanath, K. K., Lin, C. P., Chang, B. C. H., Chiu, P. H., Chiu, C. T., Wang, R. H., Chin, S. W., & 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(3), e0194605.

Ma, H., Moore, P. H., Liu, Z., Kim, M. S., Yu, Q., Fitch, 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(1), 419-436.

Ming, R., Bendahmane, A., & Renner, S. S. (2011). Sex chromosomes in land plants. *Annual review of plant biology*, 62, 485-514.

Ming, R., Hou, S., Feng, Y., Yu, Q., Dionne-Laporte, A., Saw, J. H., Senin, P., Wang, W., Ly, B. V., Lewis, K. L., Salzberg, S. L., Feng, L., Jones, M. R., Skelton, R. L., Murray, J. E., Chen, C., Qian, W., Shen, J., Du, P., Eustice, M., Tong, E., Tang, H., Lyons, E., Paull, R. E., Michael, T. P., Wall, K., Rice, D. W., Albert, H., Wang, M. L., Zhu, Y. J., Schatz, M., Nagarajan, N., Acob, R. A., Guan, P., Blas, A., Wai, C. M., Ackerman, C. M., Ren, Y., Liu, C., Wang, J., Wang, J., Na, J. K., Shakirov, E. V., Haas, B., Thimmapuram, J., Nelson, D., Wang, X., Bowers, J. E., Gschwend, A. R., Delcher, A. L., Singh, R., Suzuki, J. Y., Tripathi, S., Neupane, K., Wei, H., Irikura, B., Paidi, M., Jiang, N., Zhang, W., Presting, G., Windsor, A., Navajas-Pérez, R., Torres, M. J., Feltus, F. A., Porter, B., Li, Y., Burroughs, A. M., Luo, M. C., Liu, L., Christopher, D. A., Mount, S. M., Moore, P. H., Sugimura, T., Jiang, J., Schuler, M. A., Friedman, V., Mitchell-Olds, T., Shippen, D. E., dePamphilis, C. W., Palmer, J. D., Freeling, M., Paterson, A. H., Gonsalves, D., Wang, L., Alam, M. (2008). The draft genome of the



transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, 452(7190), 991-996.

Ming, R., Yu, Q., & Moore, P. H. (2007). Sex determination in papaya. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 18, No. 3, pp. 401-408). Academic Press.

Praça-Fontes, M. M., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2011). C-value reassessment of plant standards: an image cytometry approach. *Plant cell reports*, 30(12), 2303-2312.

Puterova, J., Razumova, O., Martinek, T., Alexandrov, O., Divashuk, M., Kubat, Z., Hobza, R., Karlov, G., & Kejnovsky, E. (2017). Satellite DNA and transposable elements in seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*), a dioecious plant with small Y and large X chromosomes. *Genome biology and evolution*, 9(1), 197-212.

Quadros, I. P. S., Madeira, N. N., Loriato, V. A. P., Saia, T. F. F., Silva, J. C., Soares, F. A. F., Carvalho, J. R., Reis, P. A. B., Fontes, E. P. B., Clarindo, W. R., & Fontes, R. L. F. (2021). Cadmium-mediated toxicity in plant cells is associated with the DCD/NRP-mediated cell death response. *Plant, Cell & Environment*. v. 1, p. 1-16.

Sattler, M. C., Soares, F. A. F., Silva, J. C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2019). Physical Mapping of 5S rDNA in *Eucalyptus dunnii* Maiden and *Zea mays* L. by PRINS. *Cytologia*, 84(1), 77-83.

Silva, J. C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2018). Updating the maize karyotype by chromosome DNA sizing. *PLoS One*, 13(1), e0190428.

Silva, J. C., Soares, F. A. F., Sattler, M. C., & Clarindo, W. R. (2020). Repetitive sequences and structural chromosome alterations promote intraspecific variations in *Zea mays* L. karyotype. *Scientific reports*, 10(1), 1-9.

Soares, F. A. F., Carvalho, C. R., Sattler, M. C., Silva, J. C., Pinto, D. E. E., Passamani, P. Z., ... & Clarindo, W. R. (2020). Plant Chromosome-Specific Probes by Microdissection of a Single Chromosome: Is That a Reality?. *Frontiers in plant science*, 11, 334.

Storey, W. B. (1938). Segregations of sex types in Solo papaya and their application to the selections of seed. In *Proc Am Soc Hortic Sci* (Vol. 35, pp. 83-85).

Storey, W. B. (1953). Genetics of the papaya. *Journal of Heredity*, 44(2), 70-78.

Ueno, H., Urasaki, N., Natsume, S., Yoshida, K., Tarora, K., Shudo, A., Terauchi, R., & Matsumura, H. (2015). Genome sequence comparison reveals a candidate gene involved in male–hermaphrodite differentiation in papaya (*Carica papaya*) trees. *Molecular Genetics and Genomics*, 290(2), 661-670.

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(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 Yh chromosome. *Genome research*, 25(4), 524-533.

Wang, J., Na, J. K., 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 Yh chromosomes reveals molecular basis of incipient sex chromosome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34), 13710-13715.

Yu, Q. (2014). Physical Map of Papaya Genome. In *Genetics and Genomics of Papaya* (pp. 169-183). Springer, New York, NY.

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. *The Plant Journal*, 53(1), 124-132.

Zhang, W., Wai, C. M., Ming, R., Yu, Q., & Jiang, J. (2010). Integration of genetic and cytological maps and development of a pachytene chromosome-based karyotype in papaya. *Tropical plant biology*, 3(3), 166-170.

Zhang, W., Wang, X., Yu, Q., Ming, R., & Jiang, J. (2008). DNA methylation and heterochromatinization in the male-specific region of the primitive Y chromosome of papaya. *Genome research*, 18(12), 1938-1943.