

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR



CITOGENÉTICA COMPARATIVA E ANÁLISE DE
MARCADORES MOLECULARES RGA_s EM CULTIVARES
DE MARACUJAZEIRO AZEDO (*Passiflora edulis* Sims)

JONATHAN ANDRE MORALES MARROQUÍN

ILHÉUS – BAHIA - BRASIL

Fevereiro de 2018

JONATHAN ANDRE MORALES MARROQUÍN

**CITOGENÉTICA COMPARATIVA E ANÁLISE DE
MARCADORES MOLECULARES RGA_s EM CULTIVARES
DE MARACUJAZEIRO AZEDO (*Passiflora edulis* Sims)**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz
como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Genética
e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e
Biologia Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margarete
Magalhães de Souza.

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ioná
Araujo.

ILHÉUS – BAHIA - BRASIL

Fevereiro de 2018

JONATHAN ANDRE MORALES MARROQUÍN

CITOGENÉTICA COMPARATIVA E ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES
RGAs EM CULTIVARES DE MARACUJAZEIRO AZEDO (*Passiflora edulis* Sims)

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2018

Prof. Dr. Gonçalo Santos da Silva
(UESC)

Prof. Dr. Clausio A. Ferreira de Melo
(UESC)

Dr^a. Francisca Feitosa Jucá Santos
(Renova Cacau)

Prof^a. Dr^a. Margarete Magalhães de Souza
(UESC – Orientadora)

DEDICATÓRIA

Aos poderes latentes da humanidade e ao amor que meus pais, Amarilis e Oscar me ensinaram a dar e a sentir. Obrigado por ser os seres mais maravilhosos que conheço. Obrigado por me dar os melhores companheiros desta viagem, meus irmãos Oscar e Johan. Obrigado a todos vocês por acolher minhas diferenças.

Obrigado por acreditar na ciência.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Santa Cruz, e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, sob a atual coordenação do Prof. Dr Carlo Priminho e vice-coordenação da Profa. Dra. Janisete Gomes da Silva.

À Professora Dra. Margarete Magalhães de Souza, pela dedicação na orientação e apoio no desenvolvimento deste projeto.

À professora Dra Ioná Araujo pela co-orientação e pela acolhida na UFERSA.

Aos Professores Dr. Cláudio Antonio de Melo, Dr. Gonçalo Santos da Silva e Viviane de Oliveira pela ajuda e colaboração para a realização deste trabalho, sem vocês não tivesse sido possível, muito obrigado.

Aos amigos que o LAMEP me proporcionou, Ritinha, Ritão, Manu, Pedro, Jôsie, Analu, Matu e Aline, com o apoio de vocês essa caminhada se tornou mais fácil.

Aos amigos, Natasha, Thaynara, Thaís, Roger, Dani, Lalu, Pati, Joedson, Ailton e Will pela amizade que tornou os meus dias na UESC mais felizes.

As secretárias do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia molecular, Fábricia, Mara e Kátia pelo excelente trabalho, disposição e ajuda em todo momento.

À Coordenadoria do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos da Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e Produção Vegetal, pelo companheirismo e pela ajuda na resolução de problemas biológicos.

EXTRATO

MARROQUIN, Jonathan Andre Morales. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2018. **Citogenética comparativa e análise de marcadores moleculares RGAs em cultivares de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims).** Orientadora: Margarete Magalhães de Souza. Coorientadora: Ioná Santos Araújo.

As análises cariotípicas e genômicas de *Passiflora* tem ajudado a entender a diversificação do gênero tanto no melhoramento genético como na produção de híbridos intra e interespecíficos. O objetivo deste estudo foi verificar a variabilidade cariotípica e genética intraespecífica de *Passiflora edulis* Sims, analisando nove cultivares através da combinação de técnicas de citogenética clássica e molecular e marcadores moleculares RGAs. Para a parte citogenética do estudo utilizou-se a coloração convencional (Giemsa 4%) e técnica de Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH) para localizar de sítios DNAr 5S e 45 para análises cariotípica. Todas as cultivares apresentaram um número cromossômico diploide $2n = 18$. Foi observado que todas as cultivares apresentaram o mesmo número cromossômico $2n = 18$. Foi observada uma diferença significativa ($p < 0.001$) entre o tamanho cromossômico médio (χ) das cultivares analisadas. Na FISH foram observados um par cromossômico com sítio DNAr 5S e dois pares com sítios de DNAr45S. O sítio de DNAr 5S foi observado no braço longo do cromossomo cinco e os dois sítios de DNAr 45S variaram sua posição nos dois pares nas diferentes cultivares (6L e 8L; 7L e 9L; 7L e 8L). Foi observado um heteromorfismo no tamanho do sítio DNAr 45S em alguma cultivares tanto como um heteromorfismo no comprimento do braço longo de alguns cromossomos satelitados. Na segunda parte deste trabalho se utilizaram os marcadores RGA (Disease Resistance Gene Analogs) para estudar a diversidade das nove cultivares. Estes permitem a identificação de genótipos que possuam resistência a patógenos e doenças. Os 8 primers utilizados amplificaram com sucesso 62 loci, a maioria monomórficos. O número de amplicões obtidos por combinação de primers variou de 2 a 12 bandas sendo 5R/S2 e 8R/S2 as combinações mais polimórficas, ambas dirigidas aos 3 domínios principais das famílias protéticas que os genes *R* codificam: (1) TIR (2) NB e (3) LLR. As cultivares que apresentaram maior similaridade genética intraespecífica foram Livramento de Nossa Senhora - BA (0.9004) e São Francisco de Itabapoana - RJ (0.8902). Ambos indivíduos oriundos de produções locais. A menor semelhança genética intraespecífica foi observada entre indivíduos dos cultivares BRS

RC (0.5298) e Amarelo redondo – Isla Sementes (0.5619). A Análise de Componentes Principais (PCA) distribuiu as cultivares em dois agrupamentos principais compostos por (1) FB 200, IAC 275, Amarelo redondo – Isla Sementes e BRS RC; e a segunda por (2) FB 300, IAC 273/277, Amarelo redondo – Top Seed Sementes, Livramento de Nossa Senhora - BA e São Francisco de Itabapoana - RJ. Os dados apresentados neste trabalho poderão ajudar a entender a variação cariotípica intraespecífica e genética em *Passiflora edulis* revelando fenômenos de diversificação que seguramente acontecem em outras espécies do subgênero. Os clusters de DNAr 45S e 5S são ótimos marcadores citogenéticos para entender os processos evolutivos e de variação cariotípica em espécies do gênero. Por outro lado, os marcadores RGAs podem ser utilizados para estudos de análise da diversidade genética intraespecífica visando à resistência a doenças na cultura do maracujazeiro azedo. Os análogos de genes R em *Passiflora edulis* mostra as homologias relacionadas à historia evolutiva dos genes R em diferentes famílias de angiospermas.

Palavras-chave: Maracujá, Genes R, Recursos genéticos, Variabilidade cariotípica intraespecífica, DNA ribossomal, FISH.

ABSTRACT

MARROQUIN, Jonathan Andre Morales. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, February 2018. **Comparative cytogenetics and RGA molecular markers analyses in cultivars of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims)**. Advisor: Margarete Magalhães de Souza. Co-Advisor: Ioná Santos Araújo.

The karyotypic and genomic analyzes of the genus *Passiflora* have helped to understand the diversification of the genus as well as in the breeding and production of hybrids in the genus. The objective of this study is to understand the intraspecific karyotype and genomic variability of *Passiflora edulis* Sims, analyzing nine cultivars in order to understand the diversity and its diversification through the combination of classic and molecular cytogenetic techniques and molecular markers RGAs. For the cytogenetic part of the study, conventional staining (Giemsa 4%) and in situ hybridization technique (FISH) were used to localize 5S and 45 rDNA sites for karyotype analysis. All cultivars presented a diploid chromosome number $2n = 18$. A significant difference ($p < 0.001$) was observed between the mean chromosome size (χ) of the cultivars analyzed. In FISH a chromosomal pair with 5S rDNA site and two pairs with 45S rDNA sites were observed. The 5S rDNA site was observed in the long arm of chromosome 5 and the two 45S rDNA sites varied their position in the two pairs in the different cultivars (6L and 8L, 7L and 9L, 7L and 8L). We observed a heteromorphism in the size of the 45S rDNA site in some cultivars as well as a heteromorphism in the length of the long arm of some satellite chromosomes. For the second chapter of this work we used RGA (Disease Resistance Gene Analogs) markers for analysing the diversity of the 9 cultivars. The objective of the present work was to study the intraspecific genetic diversity of *Passiflora edulis* Sims through molecular markers RGAs in 9 cultivars. The 8 primers used successfully amplified 62 loci, mostly monomeric. The number of amplicons obtained by combining primers ranged from 2 to 12 bands with 5R / S2 and 8R / S2 being the most polymorphic combinations, both directed to the 3 main domains of the prosthetic families that the R genes encode: (1) TIR (2) NB and (3) LLR. The cultivars that presented the highest genetic similarity intraspecific were Livramento de Nossa Senhora - BA (0.9004) and São Francisco de Itabapoana - RJ (0.8902). Both individuals come from local productions. The lowest intraspecific genetic similarity was observed among individuals of cultivars BRS RC (0.5298) and Yellow round - Seeds Island

(0.5619). Principal Component Analysis (PCA) distributed the cultivars in two main groupings composed of: (1) FB 200, IAC 275, Amarelo redondo- Isla Sementes and BRS RC; and the second by (2) FB 300, IAC 273/277, Amarelo redondo- Top Seed Sementes, Livramento de Nossa Senhora - BA and São Francisco de Itabapoana - RJ. The data presented in this paper may help to understand the intraspecific karyotypic variation and genetic variation in *Passiflora edulis* revealing phenomena of diversification that surely happen in other species of the subgenus. The 45S and 5S rDNA clusters are excellent cytogenetic markers for understanding evolutionary and karyotype variation processes in species of the genus. On the other hand, the RGAs markers can be used for intraspecific genetic diversity analysis studies aiming at resistance to diseases in sour passion fruit culture. The R gene analogues in *Passiflora edulis* show homologies related to the evolutionary history of R genes in different angiosperm families.

Key words: Passionflower, R genes, Genetic resources, Intraspecific karyotypic variability, ribosomal DNA, FISH.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

Figura 1. Análise da heterogeneidade cariotípica usando variações inter cromossômicas quanto ao comprimento cromossômico (CVcl) e à posição do centrômero (CVci) em nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims. (A) FB 200, (B) FB 300, (C) IAC 273/277, (D) IAC 275, (E) Isla Sementes, (F) Livramento de Nossa Senhora - BA, (G) São Francisco de Itabapoana - RJ, (H) BRS RC, (I) Top Seed Sementes23

Figura 2. Metáfases mitóticas em nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims ($2n = 18$). (A) FB 200, (B) FB 300, (C) IAC 273/277, (D) IAC 275, (E) Isla Sementes, (F) Livramento de Nossa Senhora - BA, (G) São Francisco de Itabapoana - RJ, (H) BRS RC, (I) Top Seed Sementes. Barra = 10 μ m.25

Figura 3. Cariogramas de nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims ($2n = 18$). (A) FB 200, (B) FB 300, (C) IAC 273/277, (D) IAC 275, (E) Isla Sementes, (F) Livramento de Nossa Senhora - BA, (G) São Francisco de Itabapoana - RJ, (H) BRS RC, (I) Top Seed Sementes. Barra = 10 μ m.....26

Figura 4. Metáfases mitóticas marcadas com FISH com sondas para sítios de DNAr 5S (vermelho/rodamina) e DNAr 45S (sonda Pe26S-rDNA) (verde/FITC) colocalizado com os satélites em nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims ($2n = 18$). (A) FB 200, (B) FB 300, (C) IAC 273/277, (D) IAC 275, (E) Isla Sementes, (F) Livramento de Nossa Senhora - BA, (G) São Francisco de Itabapoana - RJ, (H) BRS RC, (I) Top Seed Sementes. Barra = 10 μ m.....28

Figura 5. Cariogramas marcados com FISH com sondas para sítios de DNAr 5S (vermelho / rodamina) e DNAr 45S (sonda Pe26S-rDNA) (verde / FITC) colocalizado com os satélites em nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims ($2n = 18$). (A) FB 200, (B) FB 300, (C) IAC 273/277, (D) IAC 275, (E) Isla Sementes, (F) Livramento de Nossa Senhora - BA, (G) São Francisco de Itabapoana - RJ, (H) BRS RC, (I) Top Seed Sementes. Barra = 10 μ m.....29

Figura 6. Ideogramas baseados na cariomorfologia evidenciando sítios de DNAr 5S e DNAr 45S (sonda Pe26S-rDNA) em nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims ($2n = 18$). (A) FB 200, (B) FB 300, (C) IAC 273/277, (D) IAC 275, (E) Isla Sementes, (F) Livramento de Nossa Senhora - BA, (G) São Francisco de Itabapoana - RJ, (H) BRS RC, (I) Top Seed Sementes.....30

CAPITULO 2

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos amplificados gerados pelas 8 combinações de primers RGAs usados em diferentes cultivares. *Molecular ladder* de 100pb. Código dos poços: **La**: Molecular Ladder; **F**: Livramento de Nossa Senhora; **C**: IAC 273 / 277; **H**: BRS RC; **G**: São Francisco de Itabapoana; **C**: IAC 273 / 277.....

Figura 2. Dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA dos indivíduos das nove cultivares de *Passiflora edulis* a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard. Cada agrupamento foi representado por uma cor, vermelho: B; A3: rosa; A2-5: azul; A2-4: amarelo; A1-3: verde; A1-2: celeste; A1-1: preto. Cada genótipo avaliado é representado pela letra do cultivar e o número do indivíduo. Os códigos das cultivares é: A: FB 200, B: FB 300, C: IAC 273 / 277, D: IAC 275, E:

Amarelo redondo (Isla Sementes), F: Livramento de Nossa Senhora, G: São Francisco de Itabapoana, H: BRS RC, I: Amarelo redondo (Top Seed Sementes).....

Figura 3. Análise de Componentes Principais (PCA) dos indivíduos das nove cultivares de *Passiflora edulis* a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard (1901) dos marcadores RGAs...

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

Tabela 1. Cultivares de maracujá-azedo (*Passiflora edulis* Sims) utilizadas neste estudo. Classificação de acordo com a Registro Nacional de Cultivares (RNC), com comercialização de sementes e mudas legalizada pelo MAPA. Dados atualizados até 15/02/2018.....16

Tabela 2. Dados cariomorfológicos dos cromossomos metafásicos das nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims analisados.....20

Tabela 3. Comparação entre as características cariotípicas com base na FISH (DNAr 45S e 5S) e nos dados cariomorfológicos das nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims analisados.....22

CAPITULO 2

Tabela 1 Cultivares de maracujá-azedo (*Passiflora edulis* Sims) utilizadas neste estudo. Classificação de acordo com a Registro Nacional de Cultivares (RNC), com comercialização de sementes e mudas legalizada pelo MAPA. Dados atualizados até 15/02/2018.....42

Tabela 2. Lista de *Primers* e combinações para a detecção dos loci RGA. Mostra-se o nome do *primer* junto a combinação para a detecção do domínio RGA específico, número de bandas geradas (alelos) e o autor do marcador.....44

ÍNDICE

EXTRATO	iv
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO	01
REVISÃO DE LITERATURA	03
1. Cultura do maracujá azedo e melhoramento genético	03
2. Marcadores RGA como ferramentas no melhoramento de Maracujá	06
3. Citogenética clássica e molecular com <i>Passiflora</i>	08
CAPÍTULO 1: Citogenética comparativa em nove cultivares de maracujazeiro azedo (<i>Passiflora edulis</i> Sims)	11
Resumo	11
Abstract	13
1. Introdução	14
2. Material e Métodos	15
2.1 Material vegetal	15
2.2 Preparo de lâminas	16
2.3 Citogenética convencional	17
2.4 Hibridação Fluorescente in situ (FISH)	18
3. Resultados	19
3.1 Citogenética convencional	19
3.2 Citogenética molecular	27
4. Discussão	31
5. Conclusões	33
6. Agradecimentos	33
7. Referências bibliográficas	34
CAPÍTULO 2: Análise da diversidade genética em nove cultivares de maracujazeiro azedo (<i>Passiflora edulis</i> Sims) através de marcadores moleculares RGAs	37
Resumo	37
Abstract	39
1. Introdução	40
2. Material e Métodos	41

2.1 Material vegetal	41
2.2 Extração de DNA genômico	42
2.3 Análises com marcadores RGA (<i>Resistance Gene Analogs</i>)	43
2.4 Análise estatística	34
3.Resultados	44
4. Discussão	50
5. Conclusões	52
6. Agradecimentos	52
7. Referências bibliográficas	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES	57

INTRODUÇÃO

Apresentando grande importância ecológica e também econômica, o gênero *Passiflora* é composto por espécies com vários representantes endêmicos da flora Brasileira (BERNACCI *et al.*, 2003). Algumas espécies do gênero possuem destaque econômico, seja por sua utilização direta no consumo *in natura* ou para a indústria alimentícia, como *P. edulis* Sims (maracujá-azedo), *P. alata* Curtis (maracujá-doce) e *P. cincinnata* Mast (maracujá do mato), ou ainda para utilização na indústria farmacêutica e de uso diversas espécies silvestres como plantas ornamentais. *P. edulis* é, entre as espécies que apresentam maior interesse econômico, a que mais se destaca, ocupando uma área plantada superior a 95% do total das áreas cultivadas no Brasil, destinando-se à indústria de sucos e mercados de frutas (MELETTI, 2011).

Desse modo, o gênero apresenta-se como um grande gerador de renda para o país, sendo de grande importância para o agronegócio e agricultura familiar no Brasil (AGRIANUAL, 2016). Embora o consumo principal de maracujá no Brasil seja dos seus frutos, grande parte do germoplasma silvestre pode ser utilizado como ornamental, como é feito na Europa (VANDERPLANK, 2000; ABREU *et al.*, 2009). Na indústria farmacêutica o maracujá apresenta importância devido à presença de um composto denominado passiflorina, sendo utilizado como calmante natural (INGALE; HIVRALE, 2010). Por apresentarem uma beleza única, com flores exóticas e folhagens diversificadas, os maracujazeiros são utilizados também como plantas ornamentais e, desde sua introdução no velho mundo, em 1625, as passifloras vêm sendo utilizadas na decoração de estufas e jardins europeus e americanos (ABREU *et al.*, 2009). Sendo utilizadas também muitas espécies para ornamentação de pérgulas, muros, dentre outros (VANDERPLANK, 2000).

Com o intuito de conhecer a diversidade cariotípica e genética de espécies silvestres e cultivadas do gênero *Passiflora* diversos estudos vêm sendo realizados (MELO *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2014; OLIVEIRA, 2017). No entanto, apesar da compreensão da diversidade do gênero promovida através das análises cariotípicas, o conhecimento da sua estrutura genômica e distribuição da heterocromatina ainda é pouco conhecida. O mesmo fenômeno acontece com a estrutura genética das populações naturais e cultivares.

Os marcadores moleculares dominantes e codominantes tem sido altamente utilizados para entender a diversidade genética de indivíduos silvestres como cultivares (OLIVEIRA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2014; ORTIZ *et al.*, 2012). Estudos de diversidade genética no gênero

Passiflora ainda são incipientes. Marcadores RGA (Análogos a Genes de Resistencia) vêm sendo utilizados em estudos de diversidade. Estes permitem a identificação de genótipos que possuam resistência a patógenos e doenças (LEISTER *et al.*, 1996; KANAZIN *et al.*, 1996; YU *et al.*, 1996). O uso deste tipo de marcador pode assistir programas de melhoramento de *Passiflora* visando à identificação de indivíduos resistentes (PAULA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2013, OLIVEIRA, 2017). Diante deste contexto, o presente trabalho objetivou o estudo da diversidade genética e cariotípica intraespecífica de *Pasiflora edulis* Sims através de marcadores moleculares análogos a genes de resistência (RGAs), cariomorfológica comparativa e citogenética molecular de DNA ribossomal (45S e 5S).

REVISÃO DE LITERATURA

1. Cultura do maracujá azedo e melhoramento genético

O maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims) pertence ao gênero *Passiflora* L., família Passifloraceae A. L. de Jussieu ex Kunth, ordem Malpighiales (BERNACCI *et al.*, 2011). O gênero está amplamente distribuído na América tropical, sendo esta área o maior centro de diversidade do grupo. A família Passifloraceae é composta por 18 gêneros e 630 espécies, sendo o gênero *Passiflora* o que tem maior relevância econômica (ULMER; MACDOUGAL, 2004). No Brasil estão distribuídas mais de 400 espécies do gênero, sendo aproximadamente 200 endêmicas do nordeste do país (BERNACCI *et al.*, 2013). O gênero se subdivide em quatro subgêneros: *Astrophea*, *Deidamioides*, *Decaloba* e *Passiflora*. É importante ressaltar que existe uma divergência ideológica na taxonomia e sistemática tanto da família Passifloraceae quanto dos gêneros. Esta divergência existe pelos estudos filogenéticos que contrastam com a classificação feita a partir do número de cromossomos.

As espécies do gênero *Passiflora* são trepadeiras lenhosas ou herbáceas, que apresentam gavinhas axilares e glândulas nos pecíolos e nas folhas, sendo esta última de morfologia alterna simples (ULMER; MACDOUGAL, 2004). As flores são de inegável beleza, sendo simétricas radialmente apresentando cores distintas, com cinco pétalas e sépalas, cinco estames no androceu e três estiletes no gineceu. A característica floral mais proeminente é sua coroa, formada por filamentos coloridos que atraem os polinizadores (KILLIP, 1938). O fruto é uma cápsula de cor amarela, vermelha ou roxa. As sementes são compridas e pontuadas recobertas por uma mucilagem (CATUNDA *et al.*, 2003). São plantas alógamas perenes que geralmente possuem autoincompatibilidade, isso se reflete na especificidade do polinizador (abelhas de grande porte do gênero *Xylocopa*), na alta variabilidade genética inter e intraespecífica (JUNQUEIRA *et al.*, 2001). Sua alta heterozigose gera uma falta de uniformidade nas plantações (SILVA *et al.*, 2005). O maracujazeiro é uma das culturas com maior crescimento no Brasil nas últimas décadas, sendo o país o maior produtor mundial da fruta (MELETTI, 2011).

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, além de ser o maior produtor e consumidor de maracujá. A produção dela começou a incrementar-se na década de 1970 e se intensificou em 1980 com o aparecimento de novos produtores do mercado internacional. Na década de 1990 o Brasil foi responsável por mais de 50% da produção mundial (SÃO JOSÉ,

1996). Desde então a produção de maracujá no Brasil tem aumentado, passando de 409 mil toneladas produzidas no ano de 1996 para 713 mil toneladas em 2009 (MELETTI, 2011). Na atualidade os maiores produtores mundiais de maracujá são o Brasil, Equador, Peru, Colômbia e alguns países africanos, sendo 93% da produção concentrada na América do Sul (PIRES *et al.*, 2011). Desde 2011, o Brasil é responsável por 70% da produção mundial, abrangendo em torno de 61 mil hectares de área colhida com uma produção superior a 823 mil toneladas por ano (AGRIANUAL, 2016).

No Brasil, a produção do maracujá se estende por todo o país, sendo as regiões Nordeste e Norte as que apresentam maior produção. O Nordeste brasileiro produz mais de 71% do maracujá azedo para consumo e exportação. Na década de 1990 o estado com maior produção foi o Pará (35%) seguido pela Bahia (18%) (PIRES *et al.*, 2011). Atualmente a Bahia é o estado que apresenta a maior produção de maracujá, com mais de 381 toneladas, representando 46% da produção total do Brasil (AGRIANUAL, 2016). Isto tem sido o resultado da reorganização espacial da produção devido à minimização dos custos de produção, aumento da área cultivada, melhoria tecnológica, incentivo na pesquisa agrícola e transferência de tecnologia aos produtores. Na Bahia, os municípios com maior produtividade são Livramento de Nossa Senhora, Dom Basílio, Rio Real e Juazeiro (PIRES *et al.*, 2011; REUNIÃO TECNICA DE PESQUISAS EM MARACUJAZEIRO, 2005).

Devido à versatilidade da utilização da cultura, e também pela sua grande atratividade no mercado, o maracujá ocupa um importante lugar no setor industrial. Ele é utilizado na indústria de alimentos, fármacos, cosméticos e ornamentais, sendo as primeiras duas os destinos principais da cultura (ABREU *et al.*, 2009; MELETTI, 2011). Na indústria alimentícia a fruta é utilizada para a produção de sucos, polpas, doces e licor (FERRAZ; LOT, 2006; MELETTI, 2011). Como alimento, o maracujá é abundante em vitamina A, vitamina C, ferro, fósforo, potássio, cálcio e fibra. Como produto medicinal, o maracujazeiro possui diferentes compostos ativos com propriedades antipsicóticas (INGALE; HIVRALE, 2010).

Na atualidade, os grandes desafios na produção de maracujá são fitossanitários (PIRES *et al.*, 2014). São conhecidos mais de vinte agentes fitopatogênicos que afetam o maracujazeiro, incluindo fungos, bactérias, vírus e fitoplasmas (RUGGIERO *et al.*, 1996). No Brasil, as principais doenças que atacam o maracujazeiro são a antracnose (*Colletotrichum goesporioides*), a verrugose ou cladosporiose (*Cladosporium herbarum*), a mancha parda (*Alternaria passiflorae*), a septoriose (*Septoria passiflorae*), a fusariose (*Fusarium oxysporum*),

o vírus do mosaico do caupi (CABMV - *Cowpea aphid borne mosaic virus*), virose do endurecimento do fruto (PWV - *Passion fruit woodiness virus*) e o crestamento-bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae*) (MELETTI, 2011; PIRES *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2015). O lançamento das primeiras variedades melhoradas foi visando aumentar a produtividade. São relativamente poucas as iniciativas de melhoramento genético visando a resistência a fitopatógenos em maracujazeiro.

Os programas de melhoramento de plantas têm como objetivo elevar o valor econômico das espécies através do aumento da produtividade e da resistência a doenças (BORÉM; MIRANDA, 2005). Para desenvolver uma variedade geneticamente melhorada de maracujá é necessário conhecer a diversidade genética e caracterizar o germoplasma disponível. No Brasil, grande parte dos pomares plantados de maracujazeiro azedo é composto preferencialmente por variedades selecionadas, seja para a produção e qualidade dos frutos ou para a resistência a pragas e doenças. Mas a ausência de cultivares mais homogêneas, de alta produtividade e tolerantes às principais doenças, tem restringido o desenvolvimento dos pomares. As técnicas mais populares de melhoramento de maracujá são a seleção massal, seleção recorrente e a criação de híbridos inter e intraespecíficos de linhagens contrastantes (MELETTI, 2000). Foi relatada a introgressão com sucesso de genes de resistência na hibridação interespecífica entre *P. edulis* (suscetível ao CABMV) e *P. setacea* (resistente ao CABMV), embora sejam necessários vários ciclos de retrocruzamentos para recuperar as características de produtividade do genitor recorrente (*P. edulis*) (SOUZA *et al.*, 2008). Como centro de alta diversidade, o Brasil tem alta variabilidade genética naturalmente nas populações de passifloras, sendo uma importante fonte de germoplasma para o melhoramento genético.

As primeiras variedades melhoradas de maracujá brasileiras começaram a surgir no ano de 1998, apresentando um aumento no número de cultivares registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a partir de 2005, sendo a maioria delas desenvolvidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e Viveiros Flora Brasil LTDA (MELETTI, 2011; RNC, 2017). Atualmente no Registro Nacional de Cultivares (RNC) do MAPA existem mais de 30 registros, entre estes as variedades com maior popularidade são a BRS Gigante Amarelo, BRS Ouro Vermelho, BRS Rubi do Cerrado, FB200 Yellow Master, FB300 Araguari, IAC Paulista, IAC-273 Monte Alegre, IAC-275 Maravilha e IAC-277 Jóia (RNC; 2017). Algumas destas variedades apresentaram tolerância nos ensaios regionais a doenças como a virose do

endurecimento dos frutos, verrugoses e doenças fúngicas (GALO; 2008; MELETTI, 2011). A técnica de enxertia em maracujá com objetivo de prevenir a fusariose tem apresentado sucesso, mas a aplicação em escala comercial não é economicamente aplicável. A utilização de biotecnologia como ferramenta que auxilia o melhoramento de maracujá tem sido muito útil, desde o reconhecimento de QTL (*loci* de caracteres quantitativos) até a engenharia genética (GALO; 2008; MELETTI, 2011).

2. Marcadores RGA como ferramentas no melhoramento de Maracujá

O melhoramento genético de maracujazeiro tem sido realizado visando melhorar a produtividade e o desenvolvimento de variedades resistentes, assim como a melhor aceitação do produto (VIEIRA *et al.*, 2005, BORÉM; MIRANDA, 2005). Existem muito poucos estudos genéticos comparando os genótipos/variedades que vem sendo utilizadas nos campos de produção do Brasil. O melhoramento genético tem sido beneficiado com os avanços na biotecnologia, principalmente com o reconhecimento de *loci* de caracteres quantitativos – QTL (*Quantitative Trait Loci*) por marcadores moleculares como RAPDs (*Random amplified polymorphic DNA*), SSRs (*Simple Sequence Repeats*), RGAs (*Resistance Genes Analogs*) (BERTRAND *et al.*, 2008; ASINS *et al.*, 2009; PAULA *et al.*; 2010). A vantagem desta tecnologia é realizar uma rápida distinção de genótipos, que sejam superiores para um programa de melhoramento, possibilitando uma redução nos custos e no tempo de obtenção de variedades melhoradas (FALEIRO *et al.*, 2005).

Os marcadores direcionados a repetições de sequências curtas (SSRs) tem sido excelentes ferramentas para a análise da diversidade genética em populações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). O estudo da variabilidade genética do gênero *Passiflora* tem sido realizado tanto em variedades comerciais quanto em populações silvestres (OLIVEIRA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2014; ORTIZ *et al.*, 2012). A utilidade destes marcadores é detectar a diversidade alélica em *loci* específicos. Os marcadores são direcionados para repetições de sequências simples que estão dentro de um *locus* com altas taxas de mutação. Devido à variabilidade e polimorfismos dos SSRs, estes são ideais para o mapeamento genético e caracterização da diversidade em níveis interespecíficos e intraespecíficos de espécies (MATUS; HAYES, 2002). Nas populações comerciais de maracujá azedo se têm observado

uma variabilidade genética média devido a testes de estabilidade da cultura (VIANA *et al.*, 2003; VIANA *et al.*, 2006).

As plantas, como todo organismo vivo, precisam se defender de vírus, microrganismos, invertebrados e inclusive de outras plantas. A resistência nas plantas reside na capacidade de cada célula ter um mecanismo de defesa pré-formado ou induzível contra a infecção a patógenos orquestrado por um ou mais genes de resistência (genes *R*) (HAMMOND-KOSACK, JONES, 1997; MCDOWELL, WOFFENDEN, 2003). Muitas vezes um único gene pode proporcionar resistência completa a uma ou mais cepas de um determinado patógeno, por esta razão, os genes *R* têm sido utilizados em programas de melhoramento há décadas (PINK, 2002). Estas características são herdadas geralmente por um gene dominante ou codominante (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997), com características padronizáveis em sequências conservadas para a produção de proteínas específicas.

A teoria de Flor (1947) propõe que os genes de resistência (plantas) e avirulência (patógenos) têm coevoluído, onde a perda ou alteração no gene *R* ou no gene de avirulência (*Avr*) resultará numa doença. Ainda hoje muitas das interações são pouco entendidas. Os genes *R* codificam proteínas que podem se agrupar em super-famílias baseadas nos domínios proteicos que elas possuem. A grande maioria das proteínas *R* contém repetições em *tandem* ricas em leucina (*Leucine-rich repeats*: LLR), que têm a função de reconhecimento específico (JONES, 2001). A maior família apresenta um sítio de união de nucleotídeos (*nucleotide-binding*: NB) localizadas no citoplasma. Algumas proteínas NB-LLR contêm domínios de receptores do tipo TIR (*Toll-interleukin-like receptor*: TIR) e outras apresentam domínios de alfa hélices superenrolados (*Coiled-coil*: CC) (DANGL; JONES, 2001). A segunda família consiste em proteínas extracitoplasmáticas ricas em LRR (eLRR) ancoradas a um domínio transmembrana. A terceira superfamília são as eLRR-KIN, que são eLRR fundidas a uma serina-treonina quinase citoplasmática (Ser-Thr-KIN) (DANGL; JONES, 2001).

Em tomate foram encontradas quinases Ser-Thr sem o eLRR (proteína Tomato Pto) e proteínas quinases com dois domínios em milho (Maize Rpg1) (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997). As proteínas Ve em tomate apresentam um eLRR ancoradas a um domínio PEST (sequências ricas em resíduos de Prolina-Acido glutâmico-Serina-Treonina) seguido por *motifs* proteicos de receptores de mediação de endocitose (*Receptor-Mediated-Endocytosis*) (KAWCHUK *et al.*, 2001). Em *Arabidopsis* têm se observado proteínas CC ancoradas ao citoplasma (RPW8) (XIAO *et al.*, 2003).

Por estas características, as sequências dos genes *R* podem ser padronizáveis e assim detectar sequências conservadas. Para a identificação dos genes *R* é necessária uma amplificação com *primers* degenerados desenhados a partir dos *motifs* conservados nesses domínios, assim possibilitando isolar seus análogos (*Resistance gene analogs*- RGAs) (LEISTER *et al.*, 1996; KANAZIN *et al.*, 1996; YU *et al.*, 1996). Na atualidade, a maioria de genes estudados são das superfamílias NB-LRR, eLRR e LRR-KIN identificadas em *Arabidopsis*, tomate e tabaco. Os RGAs também têm sido estudados em outras culturas como maracujá (PAULA *et al.*, 2010), mandioca (PEREIRA *et al.*, 2013), milho (XIAO *et al.*, 2007) e soja (KANAZIN *et al.*, 1996).

Os genótipos e a variabilidade natural nos *loci R* têm sido analisados para sua clonagem, com a finalidade de entender as interações moleculares para introgressão em culturas elite por melhoramento clássico ou engenharia genética (CHEN *et al.*, 2015). Mas algumas culturas são difíceis de transformar porque os *loci R* geralmente são compreendidos em complexos de múltiplas cópias (HULBERT *et al.*, 2001). A pesquisa de RGAs em parentes silvestres das culturas pode ser uma valiosa fonte de novos genes *R* para sua utilização em programas de melhoramento. Sendo eles uma ótima ferramenta complementar em estudos de genética de populações (JUANSHEG *et al.*, 2013), e conservação de recursos genéticos, focados na resistência a doenças e melhoramento clássico e molecular (STEUERNAGEL *et al.*, 2016).

3. Citogenética clássica e molecular de *Passiflora*

A caracterização cariotípica convencional e molecular auxilia estudos de melhoramento de plantas, sistemática, evolução, taxonomia e biologia da reprodução, além da conservação de recursos genéticos (MELO; GUERRA, 2003; VIANA; SOUZA, 2012; MELO *et al.*; 2015). O gênero *Passiflora* possui um cariotípico diplóide apresentando números distintos no conjunto cromossômico, podendo ser o número básico (x) de 6, 9, 10 e 12 sendo o primeiro o mais ancestral. Teorias de disploidias, ou poliploidias seguidas por disploidias são possíveis explicações da divergência cariotípica do gênero. Foram relatados indivíduos tetraploides ($4n = x = 6 = 24$), hexaplóides ($6n = x = 6 = 36$), e octaplóides ($8n = x = 9 = 72$) tanto como indivíduos com aneuploidias. *Passiflora edulis* possui um número básico de $2n = x = 9 = 18$ (MELO *et al.*, 2001; MELO; GUERRA, 2003).

A análise cariotípica do gênero *Passiflora* tem proporcionado a observação de variações morfológicas cromossômicas intra e interespecíficas no número e na localização de satélites (constrições secundárias), número e tamanho dos cromossomos e a posição do centrômero. A presença de dois pares de cromossomos com braços largos com satélites são uma característica do gênero (SOUZA *et al.*, 2008). A citogenética clássica tem ajudado na discriminação de espécies muito próximas no gênero, como pode ser observado no caso de *P. edulis* e *P. cacaoensis* Bernacci & Souza, que apresentaram um padrão de heterocromatina distinta (bandamento C) (VIANA; SOUZA, 2012).

A caracterização e descrição cariomorfológica de *Passiflora* ainda apresenta variações que podem limitar os estudos de citogenética convencional. Estas variações podem ser resultado do desempenho da técnica refletindo na posição do centrômero e no número e localização das constrições secundárias. Um bom exemplo são as diferentes localizações relatadas para os satélites cromossômicos em *Passiflora edulis* (CUCO *et al.*, 2005; MELO; GUERRA, 2003; COELHO *et al.*, 2016).

A identificação das constrições secundárias (satélites) pode ajudar a delimitar populações e espécies dentro do gênero (MELO *et al.*, 2015) por auxiliar na diferenciação e caracterização de grupos taxonômicos (MELO *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2008). A nível intraespecífico, nos diferentes estudos de citogenética convencional e molecular de *P. edulis* o número e a localização de satélites (constrição secundária) têm variado. Dois satélites foram observados no braço longo do cromossomo 7 e 9 (MELO; GUERRA, 2003), no braço longo do par 8 e no braço curto do par 9 (CUCO *et al.*, 2005), no braço curto do par 1 e 4 (VIANA; SOUZA, 2012), e no braço longo do par 6 e 8, com um heteromorfismo no último (COELHO *et al.*, 2016); já foi observado também 3 pares de cromossomos com satélites (SOARES-SCOTT *et al.*, 1999). Outro exemplo é o caso de *Passiflora foetida* onde foi relatado $2n = x = 10 = 22$, por apresentar duas constrições secundárias (satélites) proximais distendidas que foram confundidas com 2 cromossomos na prófase e na prometáfase (MELO *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2008). Por estas diferenças, complementar estudos de citogenética convencional com citogenética molecular se torna vantajoso como uma forma de verificação dos resultados obtidos.

A localização cromossômica dos satélites tem demonstrado ser útil para a análise taxonômica (MELO *et al.*, 2001; MELO *et al.*, 2015). A utilidade desta ferramenta pode ser observada no melhoramento de plantas em espécies e híbridos do gênero. Em *Passiflora*, o

reconhecimento dos satélites por citogenética molecular é feito através de duas formas, a primeira é a coloração com fluorocromos base-específicos CMA₃ e DAPI, sendo as bandas CMA₃⁺ restritas as constrições secundárias. As variações do número de blocos CMA₃⁺/DAPI é pouca no gênero. O segundo método é mais específico, sondas genômicas marcadas com fluorocromos são dirigidas ao DNA ribossomal por FISH (hibridação fluorescente *in situ*). Esta técnica permite localizar sequências específicas a nível cromossômico. A identificação de sequências de DNA específicas nos cromossomos vegetais tem permitido observar de forma mais detalhada a estrutura molecular dos mesmos, permitindo diferenciar padrões a nível intra e interespecíficos (VIANA; SOUZA, 2012). Esta técnica tem sido utilizada no gênero para estudos cariomorfológicos e cariotaxonômicos que dilucidaram a diversificação do gênero (MELO; GUERRA, 2003; SOUZA *et al.*, 2010; VIANA; SOUZA, 2012; MELO *et al.*, 2015; COELHO *et al.*, 2016). Outra técnica é a hibridação genômica *in situ* (GISH) que utiliza a hibridação de sondas genômicas que permitem a marcação de lotes cromossômicos. Ela é utilizada na confirmação de híbridos de *Passiflora* (SILVA, 2014; MELO *et al.*, 2015).

A localização do DNA ribossomal (DNAr) a partir da FISH tem auxiliado a esclarecer muito sobre a taxonomia de angiospermas incluindo a família Passifloraceae. A identificação de sequências de DNAr 45S e 5S com FISH permite visualizar variações no número de sítios e localização, que pode ser utilizado para estudos na evolução do gênero e comparação de populações já que são genes altamente conservados (MELO; GUERRA 2003; SOUZA *et al.*, 2010). Os ribossomos se compõem de 2 subunidades formadas principalmente por RNA ribossomal (RNAr) e proteínas que em conjunto atuam como uma ribozima que realiza a tradução proteica. Em eucariotas superiores do reino Plantae, a subunidade maior (60S) contém os RNAr 5S, 5.8S e 25S e a subunidade menor (40S) contém o RNAr 18S. Os RNA ribossomais 28S, 5.8S e 18S são codificados por uma única unidade de transcrição (45S) separadas por 2 espaçadores internos (ITS1 e ITS2). O DNAr se organiza em arranjos de repetições em tandem, geralmente em cluster em cromossomos específicos. A localização destes clusters nos cromossomos é geralmente conservado em grupos evolutivamente relacionados. O DNAr 5S usualmente aparece num sítio cromossômico independente dos outros genes. Os sítios de DNAr 45S constituem as regiões organizadoras do nucléolo (RONs) que aparecem como constrições secundárias, de cromatina menos condensada nos cromossomos na metáfase (NEVES *et al.*, 2005). Nesse trabalho se estudou o gene 26S por ser o maior e mais utilizado.

CAPÍTULO 1: Citogenética comparativa em nove cultivares de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims)

Jonathan Andre Morales Marroquín¹, Margarete Magalhães Souza^{1*}, Viviane de Oliveira Souza¹

¹ Departamento de Ciências Biológicas (DCB), Universidade Estadual de Santa Cruz, CEP 45662900 Ilhéus, Bahia, Brasil.

*Corresponding author: e-mail: souzamagg@yahoo.com.br (M.M. Souza); Phone/Fax.: +557336805055.

Resumo

As análises cariotípicas de *Passiflora* tem ajudado a entender a taxonomia do gênero, o melhoramento genético e também na produção de híbridos intra e interespecíficos. O objetivo deste estudo foi verificar a variabilidade cariotípica intraespecífica em nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims. Para isto utilizou-se a coloração convencional (Giemsa 4%) e a técnica Hibridação Florescente *in situ* (FISH) para localizar sítios DNAr 5S e 45S para análises cariotípica. Foi observado que todas as cultivares apresentaram o mesmo número cromossômico $2n = 18$. Foi observada uma diferença significativa ($p < 0.001$) entre o tamanho cromossômico médio (χ) das cultivares analisadas. Na FISH foram observados um par cromossômico com sítio DNAr 5S e dois pares com sítios de DNAr45S. O sítio de DNAr 5S foi observado no braço longo do cromossomo cinco e os dois sítios de DNAr 45S variaram sua posição nos dois pares nas diferentes cultivares (6L e 8L; 7L e 9L; 7L e 8L). Foi observado um heteromorfismo no tamanho do sitio DNAr 45S em alguma cultivares tanto como um heteromorfismo no comprimento do braço longo de alguns cromossomos satelitados. Os dados apresentados neste trabalho poderão ajudar a entender a variação cariotípica intraespecífica em *Passiflora edulis* revelando os fenômenos de diversificação que seguramente acontecem em outras espécies do subgênero. Os clusters de DNAr 45S e 5S são ótimos marcadores citogenéticos para entender os processos evolutivos e de variação cariotípica em espécies do gênero.

Palavras-chave: Variabilidade cariotípica intraespecífica, Citogenética clássica, DNA ribossomal, FISH.

Abstract

Karyotypic analysis of the genus *Passiflora* has helped to understand the diversification of as well as in breeding and hybrid production in the genus. The objective of this study was to understand the intraspecific karyotypic variability of *Passiflora edulis* Sims, analyzing nine cultivars in order to understand the diversity and its diversification through the combination of classic and molecular cytogenetic techniques. For this, conventional staining (Giemsa 4%) and in situ hybridization technique (FISH) were used to localize 5S and 45S rDNA sites for karyotype analysis. All cultivars presented a diploid chromosome number $2n = 18$. A significant difference ($p < 0.001$) was observed between the mean chromosome size of the cultivars analyzed. In FISH a chromosomal pair with 5S rDNA site and two pairs with 45S rDNA sites were observed. The 5S rDNA site was observed in the long arm of chromosome 5 and the two 45S rDNA sites varied their position in the two pairs in the different cultivars (6L and 8L, 7L and 9L, 7L and 8L). We observed a heteromorphism in the size of the 45S rDNA site in some cultivars as well as a heteromorphism in the length of the long arm of some satellite chromosomes. The data presented in this work may help to understand the intraspecific karyotypic variation in *Passiflora edulis* revealing the diversification phenomena that surely happen in other species of the subgenus. The 45S and 5S rDNA clusters are excellent cytogenetic markers for understanding evolutionary and karyotype variation processes in species of the genus.

Key words: Intraspecific karyotype variability, Classical cytogenetics, Ribosomal DNA, FISH.

1. INTRODUÇÃO

Maracujás são lianas trepadeiras, pertencentes ao gênero *Passiflora* L., que ocorrem nos trópicos e subtropicais (BERNACCI et al., 2003). Muitas espécies de maracujá produzem frutos comestíveis, que podem ser consumidos *in natura*, na forma de sucos ou em diversos pratos culinários, além do seu uso para fins medicinais e ornamentais. O maracujazeiro azedo, *Passiflora edulis* Sims, pertence ao gênero *Passiflora* L., família Passifloraceae A. L. de Jussieu ex Kunth, ordem Malpighiales (BERNACCI; SOUZA, 2012). Se destaca devido a grande produção de frutos produzindo 694.539 toneladas no ano de 2017 (MELETTI, 2011; IBGE, 2015). Devido ao grande interesse econômico, já foram lançadas no mercado diversas cultivares.

Passiflora edulis Sims possui nível cariotípico diplóide apresentando um conjunto cromossômico básico $x = 9$. Teorias de disploidias, ou poliploidias seguidas por disploidias são possíveis explicações da divergência cariotípica do gênero. (MELO *et al.*, 2001; MELO; GUERRA, 2003). Os trabalhos principais abordando o número cromossômico foram realizados por Bowden (1945), Storey (1950), Beal (1969), Raven (1975) Morawtz (1986), Snow e MacDougal (1993), Melo et al. (2001) e Melo e Guerra (2003). A citogenética comparativa do gênero *Passiflora* tem ajudado a observar as variações cariomorfológicas intra e interespecíficas no número e tamanho dos cromossomos, posição do centrômero e no número e localização das constrições secundárias (satélites). Quase toda a filogenia de *Passiflora* pode ser respaldada com o número básico dos subgêneros indicando assim a grande importância dos eventos cromossômicos na evolução das espécies. A presença de dois pares largos de cromossomos como dois satélites são uma característica de *Passiflora edulis* (SOUZA *et al.*, 2008; VIANA; SOUZA, 2012). A localização cromossômica dos satélites tem demonstrado ser útil para a análise comparativa taxonômica como em *Passiflora cacao* Bernacci & M. M. Souza (BERNACCI; SOUZA, 2012; MELO *et al.*, 2001; MELO *et al.*, 2015). A utilidade desta ferramenta pode ser observada no melhoramento de plantas em espécies e híbridos do gênero.

As variações da descrição e caracterização cariomorfológica de *Passiflora* podem limitar os estudos de citogenética convencional. O desempenho da técnica é a principal variável que gera estas imprecisões refletindo na posição do centrômero e no número e localização de satélites (constrições secundárias) (CUCO *et al.*, 2005; MELO; GUERRA, 2003; COELHO *et al.*, 2016). Um bom exemplo pode ser observado na grande variação do número e a localização

de satélites (constricção secundária) nos estudos de citogenética convencional e molecular de *P. edulis*. Por exemplo no estúdio clássico de Melo e Guerra (2003) foram observadas duas constricções secundárias no braço longo do cromossomo 7 e 9. Cuco et al. (2005) observaram elas no braço longo do par 8 e no braço curto do par 9, no entanto Viana e Souza (2012) encontraram os satélites no braço curto do par 1 e 4. Finalmente Coelho et al. (2016) observou as constricções secundárias no braço longo do par 6 e 8 com um heteromorfismo no tamanho do sítio no último par. Também foram observados três pares de cromossomos com satélites (SOARES-SCOTT *et al.*, 1999).

A Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH) tem sido utilizada no gênero para estudos cariomorfológicos e cariotaxonômicos que tem ajudado a dilucidar a diversificação e evolução de *Passiflora* (MELO; GUERRA, 2003; SOUZA *et al.*, 2010; VIANA; SOUZA, 2012; MELO *et al.*, 2015; COELHO *et al.*, 2016). A identificação de sequências de DNAr 45S e 5S com FISH permite visualizar variações no número de sítios e localização, que pode ser utilizado para estudos na evolução do gênero e comparação de populações já que são genes altamente conservados (MELO; GUERRA 2003; SOUZA *et al.*, 2010). Na família Passifloraceae a identificação dos sítios das sequências específicas de DNA ribossomal nos cromossomos tem permitido observar de forma mais detalhada a estrutura molecular dos mesmos, permitindo diferenciar padrões a nível intra e interespecíficos (VIANA; SOUZA, 2012). Dessa forma o objetivo deste estudo foi verificar a variabilidade cariotípica intraespecífica em nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims através da citogenética convencional e molecular, visando entender a diversidade intraespecífica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Foram analisadas nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims (Tabela 1). Colocaram-se para germinar 5 sementes de cada cultivar em 30 sacos de polietileno preto, com capacidade de 0.5 L, os quais foram mantidos no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, Brasil (longitude 39° 10' W, latitude 14° 39' S, altitude 78 m). As espécies foram mantidas sob condições de cultivo protegidas, no sistema de espaldada, em uma estufa de tipo semi-arco com uma cobertura de plástico de 100 µm de espessura, ativada contra os raios UV. Após a germinação foram escolhidos os 8 indivíduos

mais vigorosos de cada cultivar para fazer estacas. Para os cultivares oriundos de Livramento de Nossa Senhora - BA e São Francisco de Itabapoana - RJ foram utilizados indivíduos previamente coletados em cada localidade que foram propagados por estaquia.

Tabela 1 Cultivares de maracujá-azedo (*Passiflora edulis* Sims) utilizadas neste estudo. Classificação de acordo com a Registro Nacional de Cultivares (RNC), com comercialização de sementes e mudas legalizada pelo MAPA. Dados atualizados até 15/02/2018.

ID	Denominação	Nome comum	Mantenedor	No. Registro
A	FB 200	Yellow Master	Viveiros Flora Brasil	23207
B	FB 300	Araguari	Viveiros Flora Brasil	23218
C	IAC 273 / 277	Monte Alegre / Jóia	IAC	11314 / 11316
D	IAC 275	Maravilha	IAC	11315
E	Amarelo redondo (Agristar)	Amarelo redondo	Isla Sementes	3505
F	Livramento de Nossa Senhora*	-	-	-
G	São Francisco de Itabapoana**	-	-	-
H	BRS RC	Rubi do Cerrado	EMBRAPA	29632
I	Amarelo redondo (Agristar)	Amarelo redondo	Top Seed Sementes	3505

*Oriundas de produtores locais de Livramento de Nossa Senhora, Centro-Sul Baiano – BA.

** Oriundas de produtores locais de São Francisco de Itabapoana, Norte Fluminense – RJ.

2.2. Preparo de lâminas

O meristema radicular foi coletado de ápices de raízes com aproximadamente um centímetro de comprimento proveniente de estacas mantidas em sacos plásticos de polietileno contendo areia lavada. As estacas foram feitas do material vegetal descrito na **Tabela 1**. Os meristemas foram pré-tratados com 8-hidroxiquinolina (8-HQ) a 0,002 M por uma hora em temperatura ambiente (TA) e mais 21 h a $\pm 8-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, lavadas duas vezes em água destilada e fixadas em Carnoy (etanol:ácido acético glacial [3:1], v/v) (JOHANSEN, 1940) por 3 h em TA, depois foram mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua utilização. Para o preparo das lâminas foi seguido o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002). Foram feitas duas lavagens em água destilada nos ápices de raízes e em seguida foram digeridas com o uso da solução enzimática de 2% celulase e 20% pectinase (v/v) incubadas em estufa a 37°C por 80 minutos. Após a incubação as raízes foram lavadas novamente com água destilada para retirada da enzima e em seguida foram maceradas em 6 μl de ácido acético 45% com auxílio de agulhas sob microscópio estereoscópico. Adicionou-se uma lamínula 18 x 18 sob o material macerado e com a ajuda da

pinça e papel de filtro foi feito o espalhamento do material biológico (células) com delicadeza utilizando o papel de filtro e pressão com o dedo para o espalhamento dos cromossomos. Posteriormente, as lâminas foram mantidas em nitrogênio líquido por no mínimo 5 minutos sendo então retiradas as lamínulas com auxílio de um bisturi e logo as lâminas foram secas ao ar. As lâminas analisadas e que apresentaram metáfases de qualidade foram mantidas a -20 °C até a aplicação das técnicas.

2.3. Citogenética convencional

A citogenética convencional foi realizada para identificação do número cromossômico e análise cariomorfológica das cultivares. As lâminas previamente obtidas foram coradas de acordo com o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002), com modificações, sendo utilizado Giemsa a 4% (Merck®) por cerca de 20 minutos. Após a coloração as lâminas foram lavadas, secas ao ar e montadas com meio Neomount® (Merck®). A fotodocumentação das metáfases foi feita com um microscópio Olympus BX41 equipado com câmera digital de 5M Olympus DP25 pelo software DP2-BSW e a análise foi realizada a partir da medição cromossômica de cinco metáfases de boa qualidade para cada cultivar. Foram mensurados o comprimento do braço curto (BC), braço longo (BL) e satélites (SAT) com a utilização do software ImageTool. Foram calculadas as seguintes características cariotípicas: i) relação entre braços ($BL/BC = \text{braço longo}/\text{braço curto}$); ii) comprimento total do cromossomo ($CT = BL + BC$, não sendo levado em consideração o comprimento dos satélites por questão do pareamento e ordenamento dos cromossomos); iii) comprimento do lote haplóide ($CLH = \text{somatório dos comprimentos absolutos dos cromossomos metafásicos levando em consideração os satélites}$); iv) índice de assimetria ($TF\% = \text{somatório dos braços curtos do lote haplóide} \div CLH$ (HUZIWARA, 1962); v) comprimento médio dos cromossomos ($\chi = \Sigma CT / \text{Número de cromossomos}$); vi) heterogeneidade cariotípica (HC) (PASZKO, 2006). Os cariótipos foram montados de acordo com o comprimento dos cromossomos, em ordem decrescente, e com a posição do centrômero, de acordo com a nomenclatura proposta por Melo *et al.* (2001), levando-se em conta a razão entre braços: metacêntrico (1,00 - 1,49) e submetacêntrico (1,50 - 2,99). Os cariogramas foram montados no *software* Adobe Photoshop SC5. Os ideogramas foram elaborados utilizando com base as médias das mensurações cromossômicas com o *software* Corel Draw® X7 (Corel Corporation, Canada).

2.4. Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH)

Para a Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH) foi utilizada a sonda para cluster de DNAr 45S direcionada ao gene 26S (Pe26S-rDNA), elaborada por Silva (2017). A sonda foi obtida pela amplificação por PCR com os primers Pe26S-rDNA-F - GGCTGAATCTCAGTGGATCG; Pe26S-rDNA-R – GCT GTC GGT GGA CTG CTC. A sonda 5S foi obtida por PCR com os pares de primers 5'-GTG CGA TCA TAC CAG C(AG) (CT)T AAT GCA CCG G-3' e 5'-GAG GTG CAA CAC GAG GAC TTC CCA GGA GG-3' para 5S rDNA (MELO; GUERRA, 2003). A sonda Pe26S-rDNA foi marcada com Biotina-16-dUTP (Roche Diagnostics®) e a sonda 5S foi marcada com a Digoxigenina-11-dUTP (Roche Diagnostics). As sondas foram marcadas por *Nick Translation*, com concentração final de 1 µg de DNA, seguindo o protocolo proposto pelo fabricante.

O tratamento das lâminas para a FISH seguiu o protocolo proposto por Schwarzscher e Heslop-Harrison (2000) e Souza *et al.* (2010), com modificações feitas por Melo *et al.* (2015). Lâminas contendo as preparações citológicas foram secas em estufa a 37 °C pelo tempo mínimo de 1 h. Após aplicação de 50 µl de RNase (Sigma®) a 1 µg/mL em tampão 2xSSC (cloreto de sódio [Sigma®] a 0,3 M; citrato de sódio [Sigma®] a 0,03 M), as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 1 h a 37°C. As lâminas foram imersas em 2xSSC em TA duas vezes por 5 min cada; 50 µL de ácido clorídrico (HCl; Vetec) a 10 mM foi adicionado sobre as metáfases por 5 min, e após retirada do HCl, foi adicionado 50 µL de pepsina (Sigma®) (pepsina a 10 mg/mL; HCl a 10 mM (1:100 v/v)) e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 20 min a 37°C. Todas as etapas de lavagens citadas a seguir foram realizadas em plataforma agitadora (Biomixer, Mos-1) a 120 rpm. As lâminas foram lavadas em 2xSSC em TA duas vezes por 5 min cada, imersas em formaldeído (Sigma) a 4% em TA por 10 min, e novamente lavadas em 2xSSC duas vezes por 5 min cada. As preparações citológicas foram desidratadas em etanol 70% e etanol 96% por 5 min cada. Após a secagem das lâminas em TA por 30 min, foi adicionada a mistura de hibridação com o volume final de 15µl, sendo formamida (Sigma®) 50%, dextran sulfato (Sigma®) 10%, 2xSSC (cloreto de sódio, citrato de sódio; Sigma), dodecil sulfato de sódio (SDS; Bioagency) 0,13% e 50 ng da sonda. A mistura de hibridação foi aquecida a 75 °C por 10 min em termociclador (Eppendorf, Mastercycler) e transferida imediatamente para gelo pelo tempo mínimo de 5 min. As lâminas contendo a mistura de hibridação foram desnaturadas em termociclador (Techne, TC-412), contendo um adaptador para lâminas, a 75 °C por 10 min e incubadas overnight a 37 °C em câmara úmida.

Após a hibridação, as lâminas foram imersas em 2xSSC em TA por 5 min para a remoção das lamínulas. Os banhos pós-hibridação a seguir foram realizados em banho-maria com agitação (Marconi, MA093/1/E), a 42 °C, com duas imersões em 2xSSC por 5 min cada, duas em 0,1xSSC por 5 min cada, e mais duas imersões em 2xSSC por 5 min cada. As lâminas foram imersas em solução com 4xSSC/Tween 20 (Sigma®) a 0,2% em TA por 5 min e tratadas com 50 µl de albumina de soro bovino, fração 5 (BSA; Sigma®) a 5%. As sondas marcadas com biotina-16-dUTP foram detectadas com 0,7 µl de Avidina-isotiocianato de fluoresceína (FITC; Vector®) mais 19,3 µL de BSA 5% por lâmina. As sondas marcadas com digoxigenina-11-dUTP foram detectadas com 0,7 µl anti-digoxigenina-rodamina (Roche™) mais 19,3 µL de BSA 5% por lâmina. As lâminas contendo os anticorpos para a detecção foram incubadas em câmara úmida por 1 h a 37 °C. Para a remoção do excesso de anticorpo, foram realizados três banhos por 5 min cada com 4xSSC/Tween20 a 0,2% em TA. As lâminas foram brevemente imersas em 2xSSC e as preparações citológicas foram simultaneamente montadas e contracoradas com Vectashield® Antifade Mounting Medium com DAPI (H-1200).

As lâminas foram estocadas a 4 °C até análise. A análise e fotodocumentação foram realizadas com a utilização do microscópio de epifluorescência Olympus BX41 equipado com câmera digital de 5MP Olympus DP25 e com o *software* DP2-BSW. As hibridações detectadas com avidina-FITC foram visualizadas com o filtro U-MWB (excitation 450-480nm / dichroic cutoff 500nm / emission > 515nm) e as hibridações detectadas com anti-digoxigenina-rodamina foram visualizadas com o filtro U-MWG (excitation 510-550 nm / dichroic cutoff 570nm / emission > 590nm). As sobreposições FITC/Rodamina/DAPI junto com os cariogramas foram realizados foram realizadas no *software* Photoshop SC5.

3. RESULTADOS

3.1. Citogenética convencional

No presente estudo, pela primeira vez, se compara a variabilidade cariotípica de nove cultivares de Maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims) utilizando citogenética convencional e molecular (Tabela 1). Todas as cultivares apresentaram núcleo interfásico semireticulado, com o número cromossômico diploide $2n = 18$ (Tabela 2 e 3). O tamanho cromossômico médio (χ) variou de 3.74 µm (Livramento de Nossa Senhora - BA) a 2.87 µm (Amarelo redondo -Isla Sementes). O comprimento cromossômico do primeiro par até o último

variou de 9.35% (FB 300) até 5.08% (Amarelo redondo - Isla Sementes) nas nove cultivares (Tabela 2).

Tabela 2. Dados cariomorfológicos dos cromossomos metafásicos das nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims analisados.

Cultivar	Par cromossômico	BC	BL	SAT	CT*	DS	BL/BC
FB 200 (Yellow Master)	1	1.74	2.57		4.31	± 0.93	1.48
	2	1.76	2.51		4.27	± 0.29	1.42
	3	1.62	2.02		3.64	± 0.33	1.19
	4	1.65	1.98		3.63	± 0.49	1.43
	5	1.59	1.72		3.32	± 0.30	1.24
	6	1.44	1.70	0.72	3.14*	± 0.20	1.20
	7	1.28	1.77		3.05	± 0.24	1.08
	8	1.30	1.72	0.74	3.02*	± 0.33	1.38
	9	1.34	1.62		2.97	± 0.35	1.21
FB 300 (Araguari)	1	1.88	2.28		4.16	± 0.27	1.21
	2	1.84	2.06		3.89	± 0.18	1.12
	3	1.76	2.05		3.81	± 0.61	1.17
	4	1.60	1.82		3.41	± 0.18	1.16
	5	1.61	1.73		3.35	± 0.17	1.20
	6	1.47	1.70	0.63	3.17*	± 0.16	1.14
	7	1.36	1.63	0.54	2.99*	± 0.33	1.08
	8	1.28	1.65		2.92	± 0.19	1.29
	9	1.22	1.33		2.55	± 0.20	1.10
IAC 273/277 (Monte Alegre / Jóia)	1	1.77	2.38		4.15	± 0.35	1.34
	2	1.70	2.15		3.86	± 0.26	1.26
	3	1.73	1.90		3.63	± 0.37	1.12
	4	1.66	1.89		3.55	± 0.34	1.10
	5	1.55	1.87		3.41	± 0.28	1.13
	6	1.49	1.66	0.58	3.15*	± 0.17	1.15
	7	1.37	1.68		3.05	± 0.32	1.21
	8	1.37	1.50	0.67	2.87*	± 0.16	1.23
	9	1.34	1.45		2.79	± 0.50	1.08
IAC 275 (Maravilha)	1	1.63	2.15		3.78	± 0.35	1.32
	2	1.58	2.01		3.59	± 0.50	1.27
	3	1.59	1.80		3.39	± 0.13	1.13
	4	1.46	1.68		3.14	± 0.12	1.13
	5	1.43	1.60		3.03	± 0.14	1.15
	6	1.18	1.61		2.79	± 0.13	1.24
	7	1.27	1.43	0.73	2.69*	± 0.33	1.11
	8	1.23	1.34		2.57	± 0.15	1.36
	9	1.02	1.27	0.78	2.29*	± 0.29	1.09
Isla Sementes (Amarelo redondo)	1	1.51	1.95		3.46	± 0.54	1.29
	2	1.39	1.80		3.19	± 0.59	1.30
	3	1.40	1.60		2.99	± 0.39	1.14
	4	1.34	1.54		2.88	± 0.37	1.14
	5	1.28	1.59		2.87	± 0.37	1.24
	6	1.20	1.36		2.56	± 0.26	1.04
	7	1.21	1.26	0.60	2.47*	± 0.42	1.11

	8	1.07	1.24		2.31	±	0.21	1.13
	9	1.00	1.11	0.40	2.10*	±	0.19	1.16
Livramento de Nossa Senhora –BA (Produção local)	1	1.92	2.50		4.42	±	0.74	1.30
	2	1.85	2.39		4.24	±	0.59	1.29
	3	1.78	2.12		3.90	±	0.48	1.19
	4	1.63	2.10		3.73	±	0.43	1.26
	5	1.67	1.96		3.63	±	0.42	1.29
	6	1.53	1.85	0.63	3.38*	±	0.47	1.17
	7	1.51	1.78		3.29	±	0.49	1.24
	8	1.35	1.76	0.70	3.11*	±	0.15	1.18
	9	1.29	1.70		2.98	±	0.42	1.32
São Francisco de Itabapoana –RJ (Produção local)	1	1.54	2.01		3.55	±	0.46	1.30
	2	1.54	1.72		3.26	±	0.43	1.12
	3	1.45	1.75		3.20	±	0.29	1.20
	4	1.49	1.53		3.02	±	0.29	1.28
	5	1.36	1.50		2.86	±	0.30	1.21
	6	1.21	1.55	0.40	2.75*	±	0.37	1.03
	7	1.25	1.49		2.74	±	0.37	1.11
	8	1.22	1.48	0.40	2.70*	±	0.33	1.20
	9	1.11	1.25		2.36	±	0.14	1.12
BRS RC (Rubi do Cerrado)	1	1.74	2.23		3.98	±	0.32	1.28
	2	1.54	1.96		3.51	±	0.38	1.27
	3	1.60	1.75		3.35	±	0.21	1.19
	4	1.52	1.73		3.25	±	0.17	1.10
	5	1.46	1.70		3.16	±	0.17	1.12
	6	1.36	1.62	0.50	2.97*	±	0.23	1.14
	7	1.29	1.62		2.91	±	0.19	1.16
	8	1.23	1.38	0.71	2.61*	±	0.37	1.26
	9	1.21	1.35		2.56	±	0.13	1.12
Top Seed Sementes (Amarelo redondo)	1	2.01	2.62		4.64	±	0.38	1.30
	2	1.79	2.25		4.04	±	0.61	1.26
	3	1.80	2.08		3.89	±	0.41	1.16
	4	1.71	2.03		3.74	±	0.32	1.18
	5	1.67	1.92		3.59	±	0.30	1.15
	6	1.49	1.84	0.61	3.33*	±	0.27	1.33
	7	1.51	1.77		3.28	±	0.30	1.08
	8	1.40	1.65	0.65	3.05*	±	0.20	1.17
	9	1.43	1.57		3.00	±	0.28	1.10

BC: Braço curto; **BL:** Braço longo; **SAT:** Satélite; **CT:** Comprimento total do cromossomo, *Sem tomar em conta o comprimento do satélite; **DS:** Desvio padrão; **BL/BC:** Razão entre braço longo e o braço curto.

A partir da ANOVA ($p < 0.001$) foi observado uma diferença significativa entre o tamanho cromossômico médio (χ) das cultivares analisadas (Tabela 3). De acordo com o teste de comparação de médias Scott-Knott entre o χ de todas as cultivares, foram formados dois grupos principais. O primeiro grupo foi formado pelas cultivares (A) FB 200, (B) FB 300, (C) IAC 273/277, (F) Livramento de Nossa Senhora, (I) Amarelo redondo - Top Seed Sementes, enquanto que o segundo grupo foi composto pelas cultivares (D) IAC 275, (E) Amarelo redondo

- Isla Sementes, (G) São Francisco Itabapoana, (H) BRS RC. Não houve diferença significativa entre as cultivares pertencentes ao mesmo grupo.

Tabela 3. Comparação entre as características cariotípicas com base na FISH (DNAr 45S e 5S) e nos dados cariomorfológicos das nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims analisados.

ID	Cultivar	DNAr 45S (Satélite)	DNAr 5S	χ (μ m)	CLH	TF%	Fórmula Cariotípica
A	FB 200 (Yellow Master)	1 (6L) 1 (8L)	2 (5L)	3.63 ^{a*}	32.68	41.66	18m
B	FB 300 (Araguari)	1 (6L) 1 (7L)	2 (5L)	3.49 ^a	31.41	44.56	18m
C	IAC 273/277 (Monte Alegre / Jóia)	1 (6L) 1 (8L)	2 (5L)	3.51 ^a	31.58	43.97	18m
D	IAC 275 (Maravilha)	1 (7L) 1 (9L)	2 (5L)	3.20 ^b	28.77	43.06	18m
E	Isla Sementes (Amarelo redondo)	1 (7L) 1 (9L)	2 (5L)	2.87 ^b	25.82	44.14	18m
F	Livramento de Nossa Senhora –BA (Produção local)	1 (6L) 1 (8L)	2 (5L)	3.74 ^a	33.68	42.71	18m
G	São Francisco de Itabapoana –RJ (Produção local)	1 (6L) 1 (8L)	2 (5L)	3.03 ^b	27.23	44.68	18m
H	BRS RC (Rubi do Cerrado)	1 (6L) 1 (8L)	2 (5L)	3.27 ^b	29.44	43.87	18m
I	Top Seed Sementes (Amarelo redondo)	1 (6L) 1 (8L)	2 (5L)	3.67 ^a	33.03	43.79	18m

DNAr 45S: Número de sinais que colocalizam com o satélite no cromossomo (par) seguido pela posição no braço Longo (L); **DNAr 5S:** Número de sinais no cromossomo (par) seguido pela posição no braço Longo (L); χ : tamanho cromossômico médio; **CLH:** complemento do lote haploide (levando em consideração o comprimento do satélite); **TF%:** índice de assimetria; fórmula cariotípica: m: cromossomo metacêntrico; *Médias seguidas das mesmas letras nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 0,01% de probabilidade.

O comprimento do Lote Haploide (CLH) variou 9% entre as cultivares, sendo que Livramento de Nossa Senhora e Isla Sementes as que apresentaram a maior e a menor variação, respectivamente (Tabela 3). Todas as cultivares apresentaram cromossomos metacêntricos seguindo a classificação proposta por Guerra e Souza (2002), porém a razão do comprimento dos braços (BL/BC) dos dois primeiros pares apresentaram valores próximos ao limite (Tabela 2). O índice de assimetria (TF%) mostrou que todos os cariótipos analisados foram simétricos, sendo a cultivar FB 300 a mais simétrica (44.56%) e a FB 200 a menos simétrica (41.66%).

A análise heterogeneidade cariotípica (HC) que utiliza parâmetros de dispersão que avalia as variações intercromossômicas contra o comprimento cromossômico (CVcl) e o

posicionamento do centrômero (CVci) permitiu distribuir as cultivares em um grupo evidente formado pelas cultivares IAC 273/277, BRS RC, Livramento de Nossa Senhora –BA e São Francisco de Itabapoana – RJ (Figura 1). O agrupamento principal foi composto das cultivares oriundas de produções locais (Livramento de Nossa Senhora e São Francisco Itabapoana), uma cultivar composta (IAC 273/277), um híbrido F1 de maracujazeiro azedo de frutos amarelos e avermelhados (BRS RC). Os pontos mais próximos ao agrupamento principal pertencem as cultivares Amarelo redondo das companhias Isla sementes e Top Seed Sementes. Os pontos mais distantes foram das cultivares melhoradas FB 200, FB 300, ambas da companhia Viveiros Flora Brasil e a cultivar IAC 275 produzida pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC) (Figura 1).

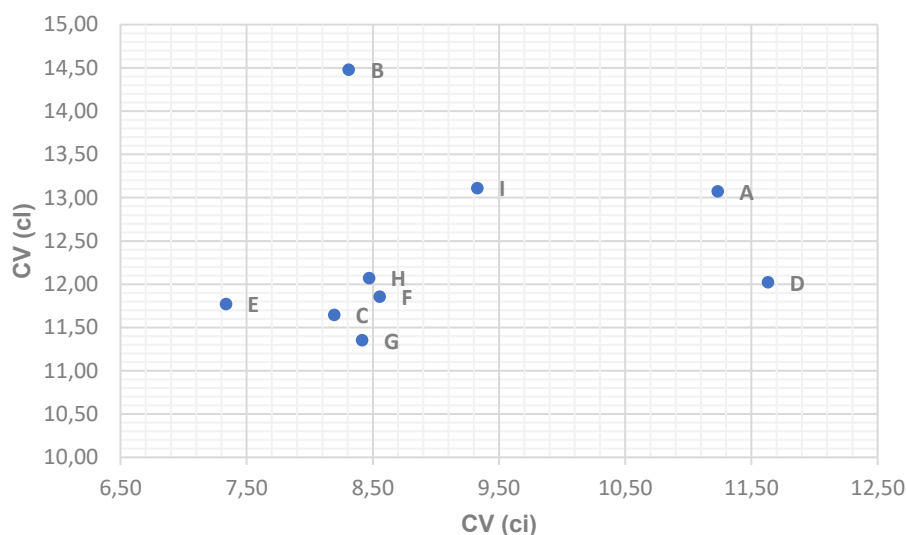


Figura 1. Análise da heterogeneidade cariotípica usando variações inter cromossômicas quanto ao comprimento cromossômico (CVcl) e à posição do centrômero (CVci) em nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims. (A) FB 200, (B) FB 300, (C) IAC 273/277, (D) IAC 275, (E) Isla Sementes, (F) Livramento de Nossa Senhora - BA, (G) São Francisco de Itabapoana - RJ, (H) BRS RC, (I) Top Seed Sementes.

Os cariogramas das cultivares foram elaborados levando em consideração o tamanho cromossômico, seguindo uma ordem descendente. O pareamento dos cromossomos homólogos foi feito levando em consideração os cumprimentos dos mesmos e a presença do satélite (se houver). Foi possível visualizar satélites em quase todas as metáfases analisadas das cultivares utilizando a coloração convencional (Giemsa 4%), sendo que às vezes foi possível observar o satélite em apenas um homólogo do par. Todas as cultivares de *P. edulis* apresentaram dois

pares de cromossomos com satélites nos braços longos. Algumas cultivares, como FB 200 e Amarelo redondo - Top Seed Sementes apresentaram os satélites distendidos (Figuras 2 e 3). Além disso observou-se um polimorfismo dentro da espécie em relação ao comprimento do segundo par de cromossomos satelitados, evidente no par 8 das cultivares FB 300 e Amarelo Redondo - Top Seed Sementes (Figura 3).

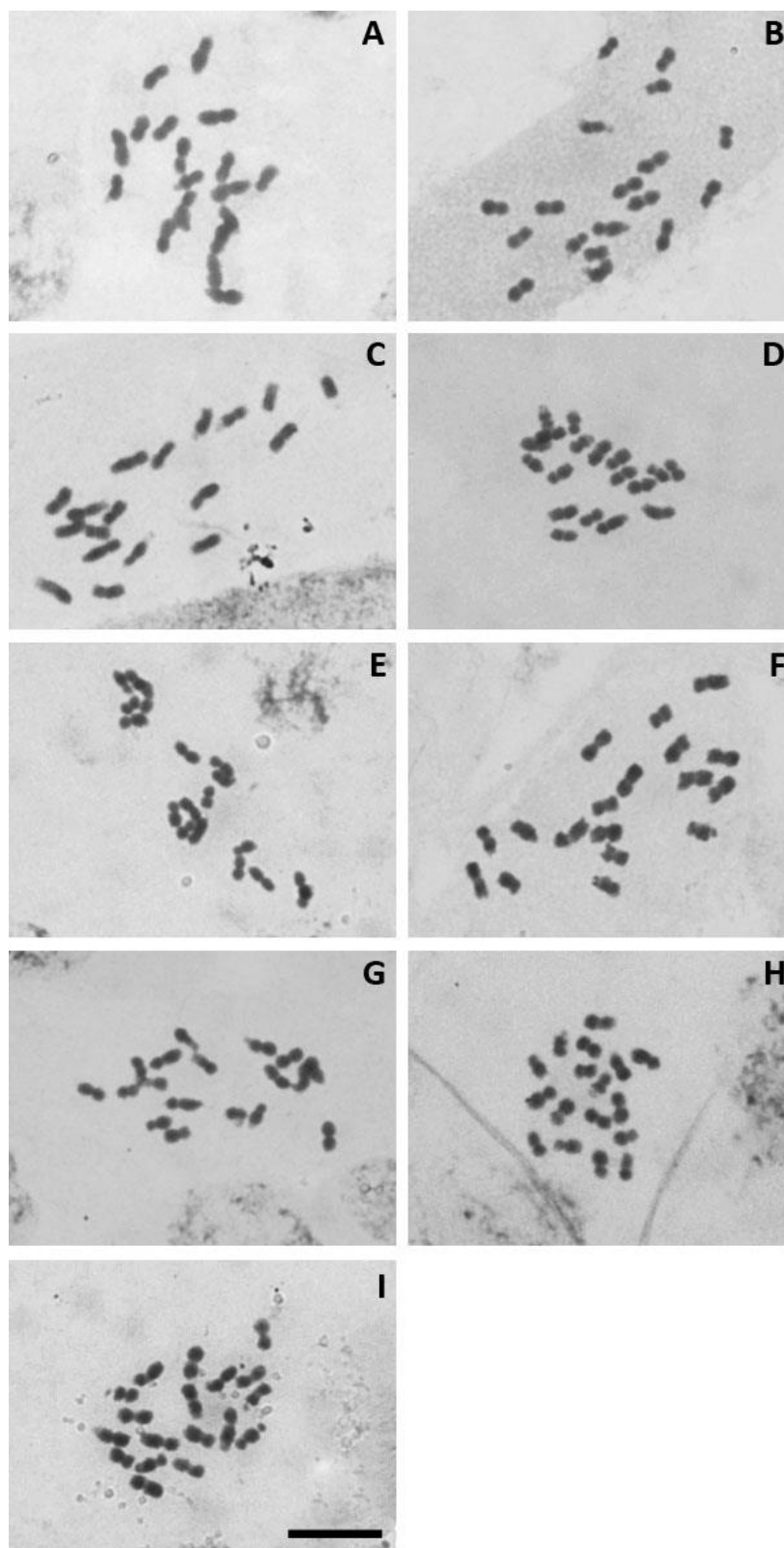


Figura 2. Metáfases mitóticas em nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims ($2n = 18$). (A) FB 200, (B) FB 300, (C) IAC 273/277, (D) IAC 275, (E) Isla Sementes, (F) Livramento de Nossa Senhora - BA, (G) São Francisco de Itabapoana - RJ, (H) BRS RC, (I) Top Seed Sementes. Barra = 10 μ m.

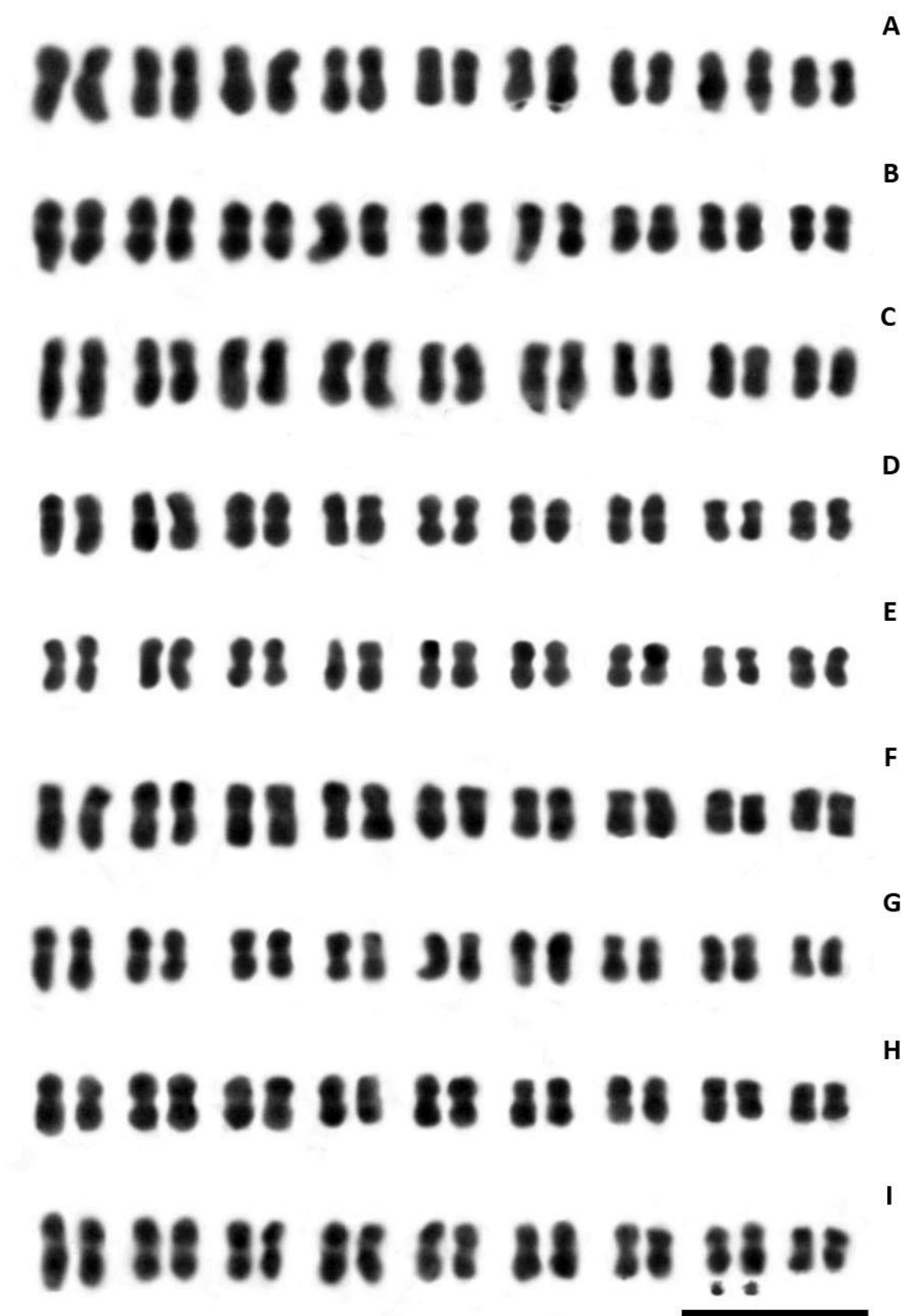


Figura 3. Cariogramas de nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims ($2n = 18$). (A) FB 200, (B) FB 300, (C) IAC 273/277, (D) IAC 275, (E) Isla Sementes, (F) Livramento de Nossa Senhora - BA, (G) São Francisco de Itabapoana - RJ, (H) BRS RC, (I) Top Seed Sementes. Barra = 10 μ m.

3.2. Citogenética molecular

Foram mapeados os sítios de DNAr 5S e 45S (Figuras 4 e 5) em nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims por meio da Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH). Os kariogramas das cultivares foram elaborados levando em consideração o tamanho cromossômico, seguindo uma ordem descendente. O pareamento dos cromossomos homólogos foi feito levando em consideração a marcação dos sítios de DNAr e a kariomorfologia.

Na FISH foram observados um par cromossômico com sítio DNAr 5S e dois pares com sítios de DNAr45S. O sítio de DNAr 5S foi observado no braço longo do cromossomo cinco e os sítios de DNAr 45S variaram nas diferentes cultivares (6L e 8L; 7L e 9L; 7L e 8L), às vezes, apresentando uma distensão (Tabela 3, Figuras 4 - 6). A interpretação da diferença da localização dos sítios de DNAr 45S em diferentes pares foi realizada com base no tamanho cromossômico e na localização previamente relatada, uma vez que todos os cromossomos são metacêntricos e de tamanhos similares. Foi observado um heteromorfismo no tamanho do sítio de DNAr 45S nas cultivares FB 200 (8L), IAC 273/277 (6L; 8L), IAC 275 (9L), Amarelo redondo - Isla Sementes (7L), Livramento de Nossa Senhora (6L), São Francisco de Itabapoana (6L), BRS RC (8L), sendo mais comum encontrar este no segundo par de cromossomos homólogos satelitados (Figura 5).

Também foi evidente observar um heteromorfismo no comprimento do braço longo de alguns cromossomos marcados com a sonda DNAr 45S nas cultivares FB 200 (8L), FB 300 (7L), Redondo amarelo - Isla Sementes (9L), Livramento de Nossa Senhora (6L; 8L), Amarelo redondo - Top Seed Sementes (8L), sendo mais comum encontrar o heteromorfismo no segundo par de cromossomos satelitados (Figuras 5). Este último polimorfismo também foi observado na análise de citogenética convencional (Figura 3).

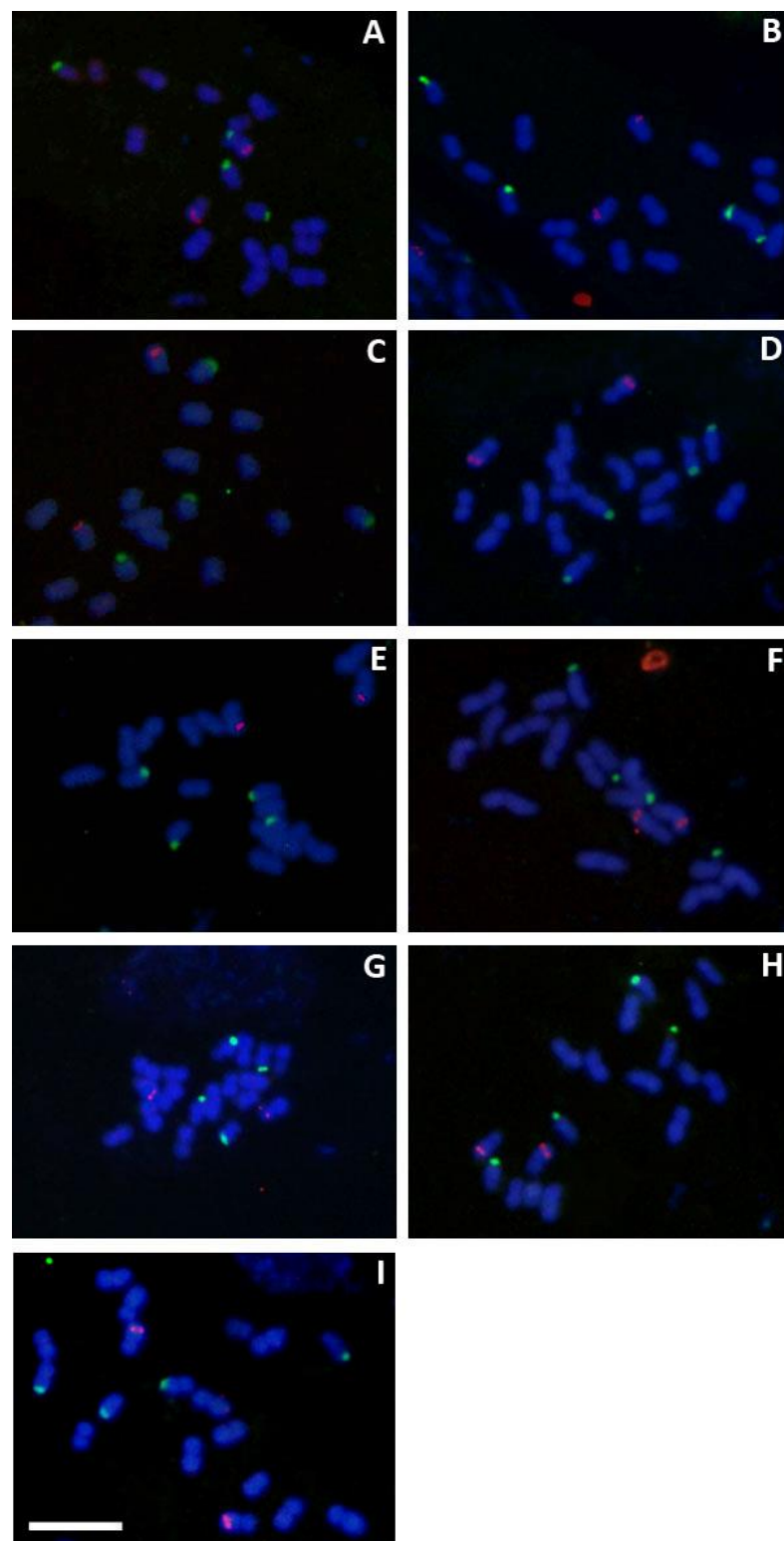


Figura 4. Metáfases mitóticas marcadas com FISH com sondas para sítios de DNAr 5S (vermelho/rodamina) e DNAr 45S (sonda Pe26S-rDNA) (verde/FITC) colocalizado com os satélites em nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims ($2n = 18$). (A) FB 200, (B) FB 300, (C) IAC 273/277, (D) IAC 275, (E) Isla Sementes, (F) Livramento de Nossa Senhora - BA, (G) São Francisco de Itabapoana - RJ, (H) BRS RC, (I) Top Seed Sementes. Barra = 10 μ m.

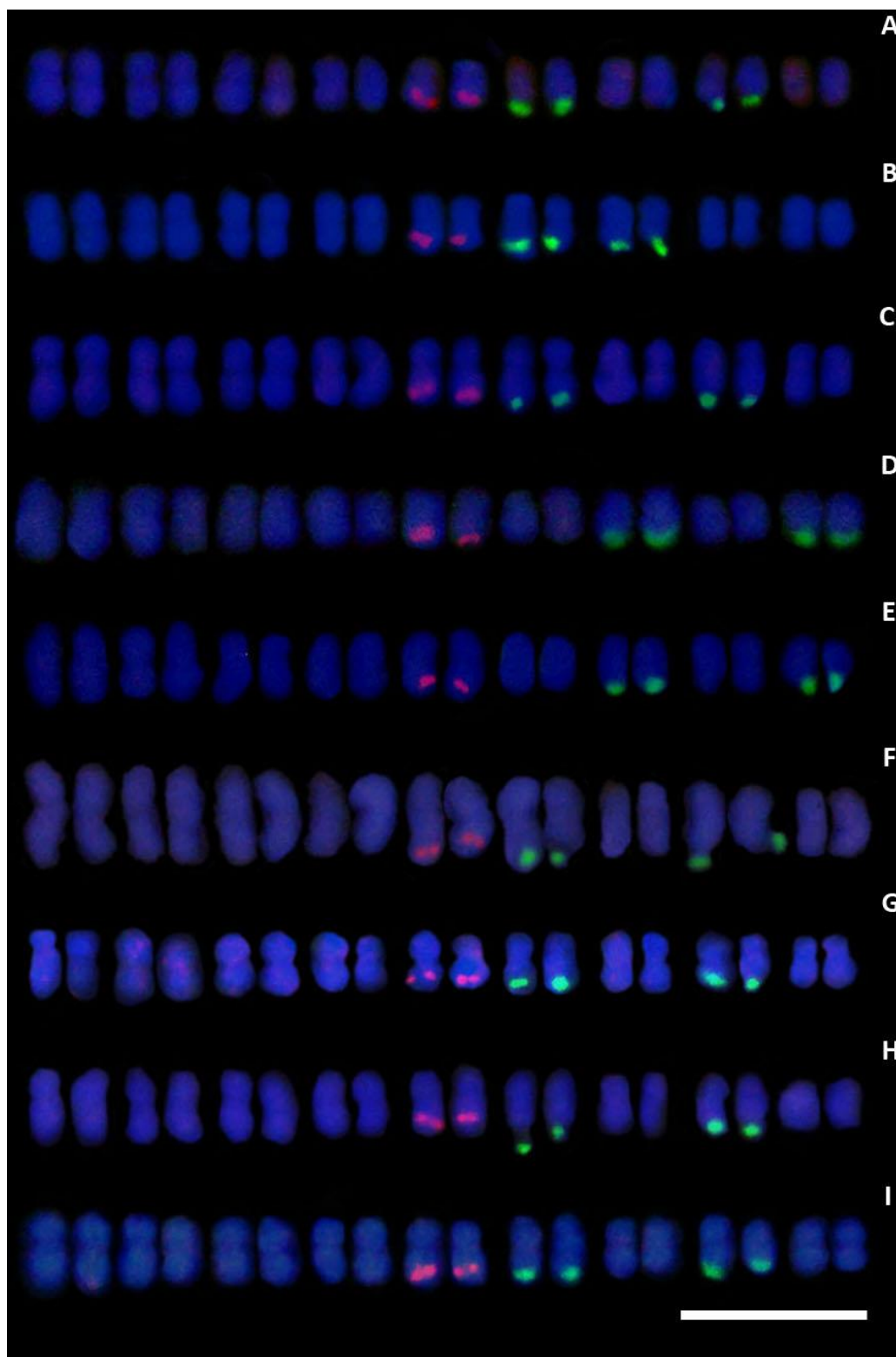


Figura 5. Cariogramas marcados com FISH com sondas para sítios de DNAr 5S (vermelho / rodamina) e DNAr 45S (sonda Pe26S-rDNA) (verde / FITC) colocalizado com os satélites em nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims ($2n = 18$). (A) FB 200, (B) FB 300, (C) IAC 273/277, (D) IAC 275, (E) Isla Sementes, (F) Livramento de Nossa Senhora - BA, (G) São Francisco de Itabapoana - RJ, (H) BRS RC, (I) Top Seed Sementes. Barra = 10 μ m.

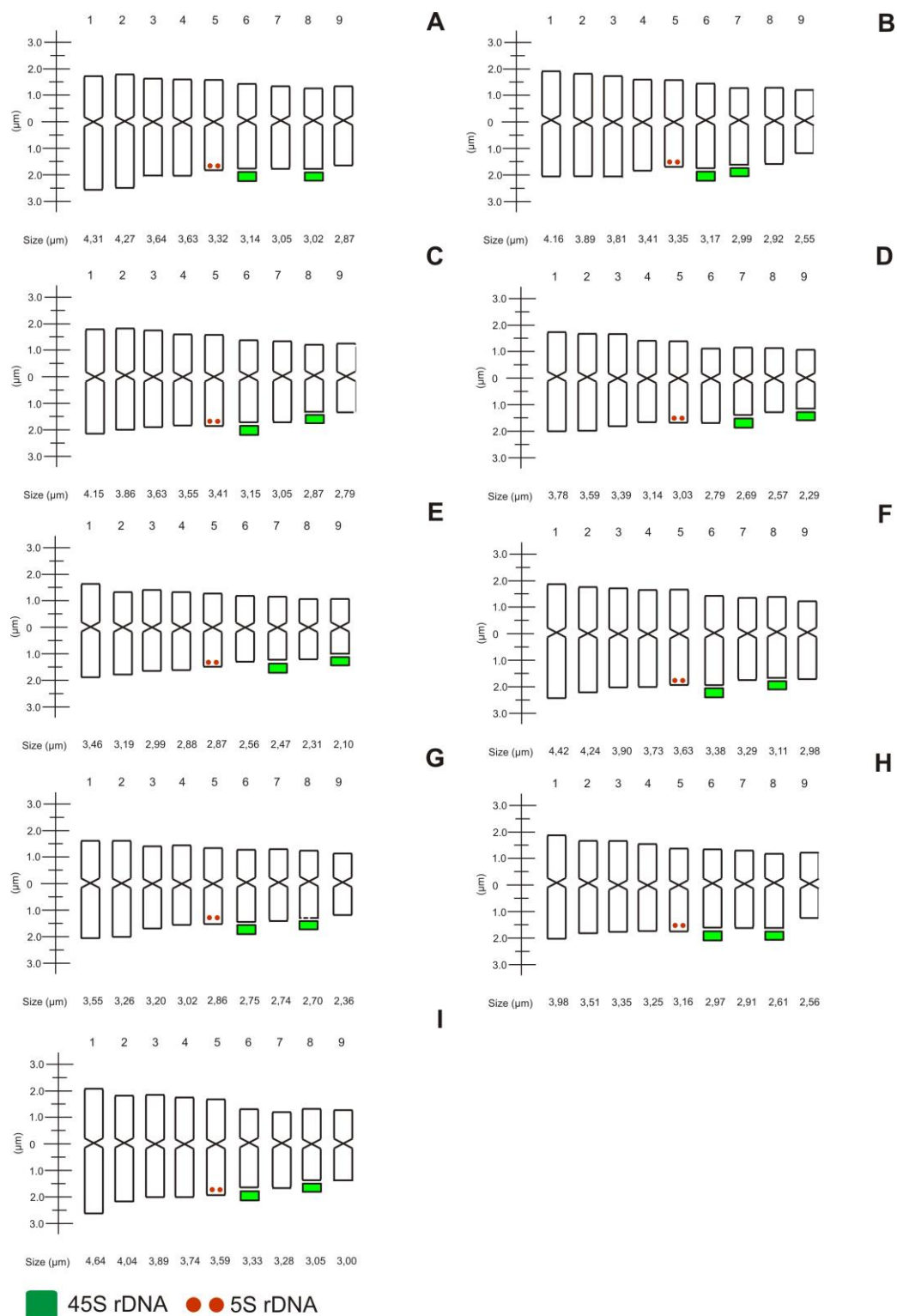


Figura 6. Ideogramas baseados na cariomorfologia evidenciando sítios de DNAr 5S e DNAr 45S (sonda Pe26S-rDNA) em nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims ($2n = 18$). (A) FB 200, (B) FB 300, (C) IAC 273/277, (D) IAC 275, (E) Isla Sementes, (F) Livramento de Nossa Senhora - BA, (G) São Francisco de Itabapoana - RJ, (H) BRS RC, (I) Top Seed Sementes.

4. DISCUSSÃO

A hibridização intraespecífica tem um papel fundamental no intercâmbio genético em plantas alógamas (que geralmente apresentam incompatibilidade) e no melhoramento genético clássico, já que permite a introgressão de características fenotípicas promovendo a diversidade. No presente estudo foi analisada e comparada a diversidade cariotípica intraespecífica em nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims utilizando citogenética convencional e molecular utilizando sondas específicas para DNAr 5S e 45S. O número cromossômico determinado em estudos citológicos prévios para a espécie foi corroborado nas nove cultivares contendo $2n = x = 9 = 18$, um par de cromossomos com sítios DNAr 5S e 2 pares com sítios de DNAr 45s colocalizados com os satélites (MELO *et al.*, 2001; MELO; GUERRA, 2003; SOUZA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2010; VIANA; SOUZA, 2012; MELO *et al.*, 2015; COELHO *et al.*, 2016).

Não obstante, os sítios de DNAr 45S localizados neste estudo variaram entre as cultivares, seis das nove apresentaram os sítios nos pares 6L e 8L coincidindo com o relatado por Coelho *et al.* (2016). Duas das nove cultivares apresentaram os sítios de DNAr 45S nos pares 7L e 9L coincidindo com o relatado por Melo e Guerra (2003). Somente a cultivar FB 300 apresentou a marcação de DNAr 45S nos pares 7L e 8L sendo um novo relato para *P. edulis* Sims. Estas discrepâncias podem ser uma consequência de como os cromossomos são analisados pelos diferentes autores. Uma possível explicação poderia ser o nível de compactação da heterocromatina no tratamento com o antimetabólito na técnica. Além disso geralmente as espécies do gênero *Passiflora* apresentam um cariótipo similar, muitos dos cromossomos com comprimento semelhante de tipo metacêntricos (SOUZA *et al.*, 2008; VIANA; SOUZA, 2012; COELHO *et al.*, 2016). Um exemplo disso foi o conflito taxonômico entre *Passiflora cacao* Bernacci & Souza e *Passiflora edulis*, onde somente com a análise dos blocos de heterocromatina (bandamento C) as duas espécies puderam ser distinguidas com exatidão.

Outro conflito analisado foram os artefatos cromossômicos que se assemelham as constrições secundárias características dos satélites no primeiro par na maioria das metáfases analisadas das cultivares por citogenética convencional (Figura 3- B, C, D, I). Isto reitera a necessidade de utilizar a citogenética molecular como uma ferramenta para dar robustez e confiabilidade aos resultados obtidos nos estudos de cariomorfologia por coloração convencional (MELO *et al.*, 2015). Além de que este estudo fornece dados da especificidade e

capacidade da sonda Pe26S-rDNA direcionada ao gene ribossomal 26S do cluster 45S elaborada por Silva (2017), sendo útil para estudos intraespecíficos do gênero *Passiflora*.

A variação observada no comprimento do lote haplóide (CLH) mostra um grau significativo de diversificação intraespecífica, além dele mostrar uma inferência da variação do conteúdo de DNA (*C-value*) em *Passiflora edulis* (MELO *et al.*, 2015). Este grau de variação também pode ser observado no diagrama de dispersão da análise de heterogeneidade cariotípica (HC). O conjunto principal está composto por plantas oriundas de produtores locais (em dois estados diferentes, RJ e BA), cultivares provenientes de híbridos F1 de populações contrastantes (BRS RC), cultivares provenientes de populações sintéticas ou compostos (IAC 273/277).

Todos os métodos de melhoramento utilizados nas cultivares do conjunto principal tem como objetivo aumentar a heterozigosidade e é provável que os indivíduos estudados possuam essa característica. O Brasil é centro de origem de uma grande quantidade de espécies do gênero *Passiflora* e esta grande variabilidade é natural dentro dos indivíduos das populações silvestres, sendo muitos desses indivíduos tomados como fonte de germoplasma para o melhoramento genético em produções locais e programas de melhoramento (MELETTI *et al.*, 2000; MELETTI, 2011). Os pontos mais dispersos foram das cultivares oriundas de programas de melhoramento com mais ciclos de seleção, as FB 200, FB 300 e IAC 275. Provavelmente estas cultivares contêm mais *loci* em homozigose, o que faz com que elas possuam genótipos específicos e diferenciados, corroborando a utilidade da análise de heterogeneidade cariotípica a um nível intraespecífico.

Os diferentes polimorfismos encontrados, tanto no tamanho do sítio do DNAr 45S como no comprimento do braço longo, ambos eventos sendo mais comuns no último par satelitado, indicam uma alta variabilidade cariotípica intraespecífica refletida especificamente nesse cromossomo. Este resultado corrobora o relatado por Coelho *et al.*, (2016) e Silva (2017). Esta heterozigosidade cromossômica pode ser o resultado de deleções e/ou ampliações o que altera o tamanho das repetições do DNA ribossomal por causas dos mecanismos de reparação de DNA. Este processo pode indicar diversificação (evolução), *crossing-over* desigual, erros na replicação e/ou eventos de translocação (EICKBUSH; EICKBUSH, 2007; BHARGAVA; FUENTES, 2009; MEHROTRA; GOYAL, 2014; COELHO *et al.*, 2016; SILVA, 2017). Esta alta variação cromossômica no grupo deu lugar aos processos de diversificação na história evolutiva e biogeográfica da família Passifloraceae (MELO *et al.*, 2001; HANSEN *et al.*, 2006). Por isso os polimorfismos observados podem ratificar a teoria que o grupo $x = 9$ em *Passiflora*

se derivou de processos de poliploidização seguido por uma disploidia descendente. (MELO; GUERRA, 2003; MELO *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2015). A variabilidade cariotípica intraespecífica, aliás, os heteromorfismos observados neste estudo podem ser um reflexo dos processos de diversificação do subgênero *Passiflora*, fenômeno também observado em *Passiflora cincinnata* onde também foi observado um heteromorfismo no último par satelitado (COELHO *et al.*, 2016).

5. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho ajudarão a entender a variação cariotípica intraespecífica em *Passiflora edulis* revelando fenômenos de diversificação que seguramente acontecem em outras espécies do subgênero. Os clusters de DNAr 45S e 5S são ótimos marcadores citogenéticos para entender os processos evolutivos e de variação cariotípica em espécies do gênero. A citogenética convencional em conjunto com a citogenética molecular podem complementar estudos filogenéticos e taxonômicos. Finalmente, entender a variação cariotípica complementa os estudos dos recursos genéticos o que enriquece os programas de melhoramento de maracujazeiro azedo.

6. AGRADECIMENTOS

À CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro à pesquisa; à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida. À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) pela infraestrutura do Laboratório de Melhoramento de Plantas (LAMEP).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHARGAVA, A.; FUENTES, F. F. Mutational dynamics of microsatellites. **Mol Biotechnol**, v44, p.250–266. doi:10.1007/s12033-009-9230-4. 2009.
- BEAL, P. R. Chromosome numbers of exotic *Passiflora* species in Australia. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences**, v. 26, n. 1, p. 73- 81, 1969.
- BERNACCI, L. C.; VITTA, F. A.; BAKKER, Y. V. Passifloraceae. In: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPPERD G. J.; MELHEM T. S.; GIULIETTI A. M.; KIRIZAWA M. (Eds.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**, RiMa/FAPESP, São Paulo, v.3, p.247- 274, 2003
- BERNACCI, L. C.; SOUZA, M. M. *Passiflora cacao* (Passifloraceae), a New Species from Southern Bahia, Brazil. **Novon**, v.22, p.1-7, 2012.
- BOWDEN, M. W. A list of chromosome numbers in higher plants.II *Menispermaceae* to *Verbenaceae*. **American Journal of Botany**, v.32, p.191-201, 1945.
- COELHO, M.S.E.; BORTOLETI, K. C.; ARAUJO, F. P.; MELO, N. F. Cytogenetic characterization of the *Passiflora edulis* Sims x *Passiflora cincinnata* Mast. interspecific hybrids and its parents. **Euphytica**. doi 10.1007/s10681-016-1704-4. 2016.
- CUCO, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. **Caryologia**, v.58, p.220-228, 2005.
- EICKBUSH, T. H.; EICKBUSH, D. G. Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. **Genetics** 175:477–485. doi:10.1534/genetics.107.071399. 2007.
- GUERRA, M. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto-Brasil, v.9, p.741-743. 1986.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo: Funpec, p.131, 2002.
- HANSEN, A. K.; GILBERT, L. E.; SIMPSON, B. B.; DOWNIE, S. R.; CERVI, A. C.; JANSEN, R. K. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany**, v.31, p.138–150, 2006.
- HUZIWARA, Y. Karyotype analysis in some genera of Compositae. VIII. Further studies on the chromosome of *Aster*. **American Journal of Botany**. v.49, p.116-119, 1962.
- IBGE – Produção Agrícola Municipal. Produção Brasileira de Maracujá em 2015. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura. Acessado em 05 de setembro de 2017 em: http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/maracuja/b1_maracuja.pdf

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, p.523, 1940.

MEHROTRA, S.; GOYAL, V. Repetitive sequences in plant nuclear DNA: types, distribution, evolution and function. **Genom Proteom Bioinform.** v.12, p.164–171, doi:10.1016/j.gpb.2014.07.003. 2014.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Volume Especial, p.83-91, 2011.

MELETTI, L.M.M.; DOS SANTOS, R.; MINAMI, KEIGO. Melhoramento do Maracujazeiro-Amarelo: Obtenção do Cultivar “Composto IAC-27”. **Scientia Agricola**, v.57, n.3, p.491-498, 2000.

MELO, C. A. F.; SILVA, G. S.; SOUZA, M. M. Establishment of genomic *in situ* hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora*. **Genetics and Molecular Research**, v.14, p.2176-2188, 2015.

MELO, C.A.F., MARTINS, M.I.G., OLIVEIRA, M.B.M., BENKO-ISEPPON, A.M., CARVALHO, R. Karyotype analysis for diploid and polyploid species of the *Solanum* L. **Plant Syst. Evol.** v.293, p.227–235, 2011.

MELO, N. F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA Sites in *Passiflora* L. Species with Distinct Base Chromosome Numbers. **Annals of Botany**, v.92, p.309-316, 2003.

MELO, N. F.; CERVI, A. C.; GUERRA, M. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae), **Plant Systematics and Evolution**, v.226, p.69-84, 2001.

MORAWETZ, W. Remarks on karyological differentiation patterns in tropical Woody plants. **Plant Systematics and Evolution**, v.152, p.49-100, 1986.

PASZKO, B. A. critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. **Plant Systematic and Evolution**, v.258, p.39-48. 2006.

RAVEN, P. H. The bases of angiosperm phylogeny: cytology. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.62, p.724-764, 1975.

SILVA, G. S. **Análises genômicas (GISH) e citogenômicas comparativas em espécies do gênero *Passiflora* L.** 118p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia. 2017.

SNOW, N.; MACDOUGAL, J. M. New chromosome reports in *Passiflora* (Passifloraceae). **Systematic Botany**, v.18, p.261-272, 1993.

SOARES-SCOTT M. D.; MELETTI, L. M.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Citogenética clássica e molecular em passifloras. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: Germoplasma e Melhoramento Genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p.213–240, 2005.

SOUZA, M. M.; URDAMPILLETA, J. D.; FORNI-MARTINS, E. R. Improvements in cytological preparations for fluorescent in situ hybridization in *Passiflora*. **Genet Mol Res** v.9, p.2148-2155, 2010.

SOUZA, L.S., JUNQUEIRA, N.T.V., LIMA, C.A., SILVA, D.G.P., FALEIRO, F.G., CAMPOS NETO, F.C., BERNACCI, L.C. **Determinação da compatibilidade genética entre espécies de Passifloras visando a obtenção de híbridos resistentes a doença**. Anais do IX Simpósio Nacional do Cerrado, Brasília, DF, Brasil, 2008.

STOREY, W. B. Chromosomes numbers of some species of *Passiflora* occurring in Hawaii. **Pacific Science**, v.4, p.37-42, 1950.

SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J.S. Practical *in situ* hybridization. Oxford: **Bios Scientific® Publishers**. 2000.

VIANA, A. J. C.; SOUZA, M. M. Comparative cytogenetic between the species *Passiflora edulis* and *Passiflora cacaoensis*. **Plant Biology**, v.14, p.820-827, 2012.

CAPÍTULO 2: Análise da diversidade genética em nove cultivares de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims) através de marcadores moleculares RGAs

Jonathan Andre Morales Marroquín¹, Margarete Magalhães Souza^{1*}

¹ Departamento de Ciências Biológicas (DCB), Universidade Estadual de Santa Cruz, CEP 45662900 Ilhéus, Bahia, Brasil.

*Corresponding author: e-mail: souzamagg@yahoo.com.br (M.M. Souza); Phone/Fax.: +557336805055.

Resumo

Marcadores RGA (*Disease Resistance Gene Analogs*) vêm sendo utilizados em estudos de diversidade. Estes permitem a identificação de genótipos que possuam resistência a patógenos e doenças. O objetivo do presente trabalho foi estudar a diversidade genética intraespecífica de *Passiflora edulis* Sims através de marcadores moleculares RGAs em nove cultivares. Os 8 primers utilizados amplificaram com sucesso 62 loci, a maioria monomórficos. O número de amplicões obtidos por combinação de primers variou de 2 a 12 bandas sendo 5R/S2 e 8R/S2 as combinações mais polimórficas, ambas direcionadas aos 3 domínios principais das famílias protéicas que os genes *R* codificam: (1) TIR (2) NB e (3) LLR. As cultivares que apresentaram maior similaridade genética intraespecífica foram Livramento de Nossa Senhora - BA (0.9004) e São Francisco de Itabapoana - RJ (0.8902), ambos indivíduos oriundos de produções locais. A menor semelhança genética intraespecífica foi observada entre indivíduos dos cultivares BRS RC (0.5298) e Amarelo redondo – Isla Sementes (0.5619). A Análise de Componentes Principais (PCA) distribuiu as cultivares em dois grupos principais compostos por (1) FB 200, IAC 275, Amarelo redondo – Isla Sementes e BRS RC; e a segunda por (2) FB 300, IAC 273/277, Amarelo redondo – Top Seed Sementes, Livramento de Nossa Senhora - BA e São Francisco de Itabapoana - RJ. Conseguiu-se obter o perfil RGA para as nove cultivares de maracujazeiro azedo avaliadas. Se comprovou a transferibilidade dos marcadores desenvolvidos em outras espécies (*Nicotiana tabacum*, *Linum usitatissimum*, *Arabidopsis thaliana*) Existe pouca variabilidade genética nas cultivares melhoradas. Se observou a maior

variabilidade genética nas variedades oriundas de produtores locais (Livramento de Nossa Senhora - BA e São Francisco de Itabapoana – RJ).

Palavras-chave: Maracujá, Genes *R*, Cultivares, Recursos genéticos

Abstract

RGA (Disease Resistance Gene Analogs) markers have been used in diversity studies. These allow the identification of genotypes that have resistance to pathogens and diseases. The objective of the present work was to study the intraspecific genetic diversity of *Passiflora edulis* Sims through molecular markers RGAs in 9 cultivars. The 8 primers used successfully amplified 62 loci, mostly monomorphic. The number of amplicons obtained by combining primers ranged from 2 to 12 bands with 5R / S2 and 8R / S2 being the most polymorphic combinations, both directed to the 3 main domains of the prosthetic families that the R genes encode: (1) TIR (2) NB and (3) LLR. The cultivars that presented the highest genetic similarity intraspecific were Livramento de Nossa Senhora - BA (0.9004) and São Francisco de Itabapoana - RJ (0.8902). Both cultivars come from local productions. The lowest intraspecific genetic similarity was observed among individuals of cultivars BRS RC (0.5298) and Yellow round - Seeds Island (0.5619). Principal Component Analysis (PCA) distributed the cultivars in two main groupings composed of: (1) FB 200, IAC 275, Amarelo redondo – Isla sementes and BRS RC; and the second by (2) FB 300, IAC 273/277, Amarelo redondo- Top Seed Sementes, Livramento de Nossa Senhora - BA and São Francisco de Itabapoana - RJ. The RGAs markers can be used for studies of intraspecific genetic diversity analysis aiming at resistance to diseases in yellow passion fruit culture. It was possible to obtain the RGA profile for the nine cultivars of sour passion fruit. We demonstrated the transferability of the RGA markers developed in other species (*Nicotiana tabacum*, *Linum usitatissimum*, *Arabidopsis thaliana*). We also observed low genetic diversity in the cultivars of breeding programs. The greatest genetic diversity was observed in the varieties originating from local producers (Livramento de Nossa Senhora - BA and São Francisco de Itabapoana - RJ).

Key words: Passion fruit, *R* genes, Cultivars, Genetic resources

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento genético das culturas tem avançado principalmente com o reconhecimento de *loci* de caracteres quantitativos – QTL (*Quantitative Trait Locus*) por marcadores moleculares como RAPDs (*Random amplified polymorphic DNA*), SSRs (*Simple Sequence Repeats*), RGAs (*Resistance Genes Analogs*) (BERTRAND *et al.*, 2008; ASINS *et al.*, 2009; PAULA *et al.*, 2010). A vantagem desta tecnologia é realizar uma rápida distinção de genótipos, que sejam superiores para um programa de melhoramento, possibilitando uma redução nos custos e no tempo de obtenção de variedades melhoradas (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997; MCDOWELL; WOFFENDEN, 2003; FALEIRO *et al.*, 2005).

Os genes de resistência (genes R) em plantas desempenham um papel importante para a planta se defender de ataques de fungos, bactérias, vírus, nematóides e pragas de insetos. Um certo grau de variação genética entre os genes R é importante para uma planta se adaptar bem a um ambiente ecológico. Estudos de diversidade genética no gênero *Passiflora* ainda são incipientes. Marcadores RGA (Disease Resistance Gene Analogs) vêm sendo utilizados em estudos de diversidade. Estes permitem a identificação de genótipos candidatos a possuir resistência a patógenos e doenças (LEISTER *et al.*, 1996; KANAZIN *et al.*, 1996; YU *et al.*, 1996). O uso deste tipo de marcador pode assistir programas de melhoramento de *Passiflora* visando à identificação de indivíduos resistentes (PAULA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2013, OLIVEIRA, 2017).

A resistência nas plantas reside na capacidade de cada célula ter um mecanismo de defesa pré-formado ou induzível contra a infecção a patógenos orquestrado por um ou mais genes de resistência (genes R). Muitas vezes um único gene pode proporcionar resistência completa a uma ou mais cepas de um determinado patógeno, por esta razão, os genes R têm sido utilizados em programas de melhoramento há décadas (PINK, 2002). Estas características são herdadas geralmente por um gene dominante ou codominante (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997), com características padronizáveis em sequências conservadas para a produção de proteínas específicas. Estudos anteriores usaram as estruturas e localizações de proteínas previstas nas células para classificar os genes R em cinco grupos: repetições em tandem ricas em leucina (Leucine-rich repeats: LRR), que têm a função de reconhecimento específico, proteínas de sítio de união de nucleotídeos (nucleotide-binding site: NBS) localizadas no citoplasma. Proteínas NBS-LRR que é a união dos dois tipos anteriores. Proteínas que contêm

domínios de receptores do tipo TIR (Toll-interleukin-like receptor: TIR) e outras apresentam domínios de hélices alfa superenrolados (Coiled-coil: CC) (JONES, 2001). Motivos conservados ou sítios hidrofóbicos no NBS permitiram uma nova abordagem baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR) que usa primers degenerados para amplificar análogos de genes de resistência (RGA), como genes putativos ou experimentais de resistência a doenças, de muitas espécies de plantas. Os RGAs também têm sido estudados em outras culturas como maracujá (PAULA *et al.*, 2010), mandioca (PEREIRA *et al.*, 2013), milho (XIAO *et al.*, 2007) e soja (KANAZIN *et al.*, 1996).

O melhoramento genético de maracujazeiro tem sido realizado visando melhorar a produtividade e o desenvolvimento de variedades resistentes, assim como a melhor aceitação do produto (VIEIRA *et al.*, 2005, BORÉM; MIRANDA, 2005). O maracujá enfrenta problemas fitossanitários o que tem um impacto negativo na produtividade (MELETTI 2011). Entre os patógenos mais comuns que atacam a planta estão, o vírus do amadurecimento do maracujá (PWV) e o vírus do mosaico do pulgão (CABMV), que provocam o endurecimento dos frutos (NASCIMENTO *et al.* 2004; SILVA *et al.* 2012); *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, fungo causador de fusariose (SILVA *et al.* 2013) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *bactérias passiflorae* que causam doença bacteriana (BORO *et al.* 2011). Existem muito poucos estudos genéticos comparando os genótipos/variedades que vem sendo utilizadas nos campos de produção do Brasil. O estudo dos RGAs em nas culturas pode ser uma valiosa fonte de novos genes *R* para sua utilização em programas de melhoramento. Sendo eles uma ótima ferramenta complementar em estudos de genética de populações (JUANSHEG *et al.*, 2013), e conservação de recursos genéticos focados na resistência a doenças e melhoramento clássico e molecular (STEUERNAGEL *et al.*, 2016). Diante deste contexto, o presente trabalho objetivou o estudar da diversidade genética intraespecífica de *Passiflora edulis* Sims através de marcadores moleculares análogos a genes de resistência RGAs (*Disease Resistance Gene Analogs*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Foram analisados 22 indivíduos de nove cultivares de *Passiflora edulis* Sims (Tabela 1). Colocaram-se para germinar 5 sementes de cada cultivar em 30 sacos de polietileno preto, com capacidade de 0.5 L, os quais foram mantidos no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da

Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, Brasil (longitude 39° 10' W, latitude 14° 39' S, altitude 78 m). As espécies foram mantidas sob condições de cultivo protegidas, no sistema de espaldara, em uma estufa de tipo semi-arco com uma cobertura de plástico de 100 µm de espessura, ativada contra os raios UV. Após a germinação foram coletadas 1,5 gramas de folha para cada genótipo escolhido. Para os cultivares oriundos de Livramento de Nossa Senhora - BA e São Francisco de Itabapoana - RJ foram utilizados indivíduos previamente coletados em cada localidade que foram propagados por estaquia.

Tabela 1 Cultivares de maracujá-azedo (*Passiflora edulis* Sims) utilizadas neste estudo. Classificação de acordo com a Registro Nacional de Cultivares (RNC), com comercialização de sementes e mudas legalizada pelo MAPA. Dados atualizados até 15/02/2018.

ID	Denominação	Nome comum	Mantenedor	No. Registro
A	FB 200	Yellow Master	Viveiros Flora Brasil	23207
B	FB 300	Araguari	Viveiros Flora Brasil	23218
C	IAC 273 / 277	Monte Alegre / Jóia	IAC	11314 / 11316
D	IAC 275	Maravilha	IAC	11315
E	Amarelo redondo (Agristar)	Amarelo redondo	Isla Sementes	3505
F	Livramento de Nossa Senhora*	-	-	-
G	São Francisco de Itabapoana**	-	-	-
H	BRS RC	Rubi do Cerrado	EMBRAPA	29632
I	Amarelo redondo (Agristar)	Amarelo redondo	Top Seed Sementes	3505

*Oriundas de produtores locais de Livramento de Nossa Senhora, Centro-Sul Baiano – BA.

** Oriundas de produtores locais de São Francisco de Itabapoana, Norte Fluminense – RJ.

2.2. Extração de DNA genômico

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990) modificado por Melo *et al.*, (2015). Folhas jovens foram maceradas em nitrogênio líquido e incubadas em tampão de extração CTAB 2% [1.5 MNaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl; 0.2% Beta-Mercaptoetanol] por 40 minutos a 65° C. O isolamento de ácidos nucleicos foi realizado com solução (24:1) clorofórmio: álcool isoamílico e a ressuspensão do DNA com a utilização de tampão TE [10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA]. Para a inferência da quantificação da concentração do DNA genômico foi realizada pela comparação com 100 ng de DNA lambda (Promega) em eletroforese em gel de agarose 1 % e corado com SYBR® safe (Invitrogen). O DNA genômico foi diluído para a concentração de 20 ng/µl em tampão TE.

2.3. Análise com marcadores RGA (*Resistance Gene Analogs*)

Foram escolhidas 8 combinações informativas de primers RGAs utilizados previamente em distintas espécies da família Passifloraceae seguindo a metodologia descrita por Oliveira (2017). Os análogos dos genes *R* foram obtidos de *Nicotiana tabacum*, *Linum usitatissimum* e *Arabidopsis thaliana* para os marcadores relatados por Kanazin *et al.* (1996) e Leister *et al.* (1996). Também se utilizou primers específicos para *Passiflora alata* relatados por Pereira *et al.* (2013) (Tabela 2). A reação de PCR teve um volume final de 20 µL, contendo: 1X ViBuffer A (50 mM KCL, 20 mM Tris-HCL e 0.1% Triton™X-100), MgCl₂ [2 mM] (Vivantis®), dNTP mix [0.2 mM] (Invitrogen™), primers RGAs [0.1 µM] (Invitrogen™), 1U de Taq DNA Polimerase (Vivantis®) e 20ng/µL de DNA genômico. A reação foi feita em uma placa de 96 poços. A reação de PCR foi amplificada utilizando o termociclador SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Life Technologies®) com o programa: 5 min. a 95 °C seguido por 35 ciclos (40 s. a 95 °C, 1 min. a 37 °C e 1 min. e 20 s a 72 °C). Finalizando com uma extensão final de 72 °C por 10 min. Os produtos foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X pH 8.3 [1.1M Tris (Promega®); 900mM Borato (Synth®); 25mM EDTA (Sigma® Aldrich)]. Utilizou-se o marcador molecular de 100pb (Fermentas®) corado com SYBR® Safe DNA (Invitrogen™). A corrida de eletroforese foi a 90V por 1h 30min. A visualização foi feita num transiluminador L-PIX EX (Loccus Biotechnology) com luz UV.

Tabela 2. Lista de *Primers* e combinações para a detecção dos loci RGA. Mostra-se o nome do *primer* junto a combinação para a detecção do domínio RGA específico, número de bandas geradas (alelos) e o autor do marcador.

Família do Domínio	Primers	Sequências	Número de alelos	Autor
TIR-NBS-LRR	1F	AGTTTATAATT(C/T)(C/G)ATTGCT	8	Kanazin <i>et al.</i> , (1996) Leister <i>et al.</i> , (1996)
	S2	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC		
TIR-NBS-LRR	1R	ACTACGATTCAAGACGTCCT	4	Kanazin <i>et al.</i> , (1996) Leister <i>et al.</i> , (1996)
	S2	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC		
TIR-NBS-LRR	3R	CTCTCGATTCAAAATATCAT	11	Kanazin <i>et al.</i> , (1996) Leister <i>et al.</i> , (1996)
	S2	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC		
TIR-NBS-LRR	4F	TGTTACTGCTTTGTTTGTA	7	Kanazin <i>et al.</i> , (1996) Leister <i>et al.</i> , (1996)
	S2	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC		
TIR-NBS-LRR	5R	TCAATCATTCTTTGCACAA	12	Kanazin <i>et al.</i> , (1996) Leister <i>et al.</i> , (1996)
	S2	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC		
TIR-NBS-LRR	8R	AGCCACTTTTGACAACGTC	11	Kanazin <i>et al.</i> , (1996) Leister <i>et al.</i> , (1996)
	S2	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC		
NBS-LRR	AS3	IAGIGCIAGIGGIAGICC	7	Leister <i>et al.</i> , (1996) Leister <i>et al.</i> , (1996)
	S2	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC		
Kinase/NBS	Kdc-F	ATGGGAAGGAAGTATTCCAA	2	Pereira <i>et al.</i> , (2013) Pereira <i>et al.</i> , (2013)
	A01	GACTGCGTACGAATTAA		

Domínios das famílias dos RGAs: NBS: *Nucleotide Binding Sites*; LRR: *Leucine-Rich Repeat*; TIR: *Toll-Interleukin Receptor type*. PR: *Pathogenesis-related protein*. **Código dos primers degenerados:** I= inosine.

2.4. Análise estatística

Com os padrões de amplificação obtidos para cada indivíduo com cada set de primers se criou uma matriz de dados binários, presença (1) ou ausência (0) de cada banda. Para análise de similaridade genética foi utilizado o software NTSYS-pc 2.1 (ROHLF, 2000). O coeficiente de similaridade utilizado foi Jaccard (JACCARD, 1901). Para a criação do dendrograma utilizou-se o método de agrupamento UPGMA (Método de Grupo de GPares Não Ponderados com Média Aritmética) com um coeficiente de corte de 0.63. Com o uso do software NTSYS-pc 2.1 (ROHLF, 2000) e com base no coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1901), foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA). A vetorização dos gráficos do PCA e do dendrograma foi feita através do Software CorelDRAW® Graphics Suite X7 (Corel Corporation).

3. RESULTADOS

Os 8 primers utilizados amplificaram com sucesso 62 loci (Tabela 2). Os primers foram escolhidos visando ter as combinações de RGAs com amplificações claras, evidentes e

reprodutíveis e baseando-se nos resultados de Oliveira (2017). No atual estudo as combinações foram medianamente informativas (Figura 1). As combinações de primers sintetizadas a partir de *P. alata* detectaram apenas 2 loci, em sua maioria monomórfico, enquanto os primers dirigidos a sequências heterólogas revelaram 60 loci. O número de amplificações obtidos por combinação de primers variou de 2 a 12 bandas sendo 5R/S2 e 8R/S2 as combinações mais polimórficas, ambas dirigidas aos 3 domínios principais das famílias protéticas que os genes *R* codificam: (1) receptores do tipo TIR (*toll-interleukin like receptor*: TIR), (2) sítios de união de nucleotídeos (*nucleotide binding*: NB) e (3) repetições em tandem ricas em leucina (*leucine-rich repeats*: LLR). Amplificação de bandas específicas foram observadas nas combinações de primers 1F/S2, 5R/S2 e 8R/S2. Por outro lado, as combinações menos informativas foram Kdc-F/A01 e 4F/S2 (Tabela 2, Figura 1).

O cálculo dos coeficientes de similaridade de Jaccard através dos dados obtidos pela amplificação das 8 combinações de primers mostrou maior similaridade genética intraespecífica em loci RGAs foi entre os indivíduos F18 e G6 dos cultivares de Livramento de Nossa Senhora - BA (0.9004) e São Francisco de Itabapoana - RJ (0.8902). Ambos indivíduos oriundos de produções locais. A menor semelhança genética intraespecífica foi observada entre indivíduos dos cultivares BRS RC (0.5298) e Amarelo redondo – Isla Sementes (0.5619).

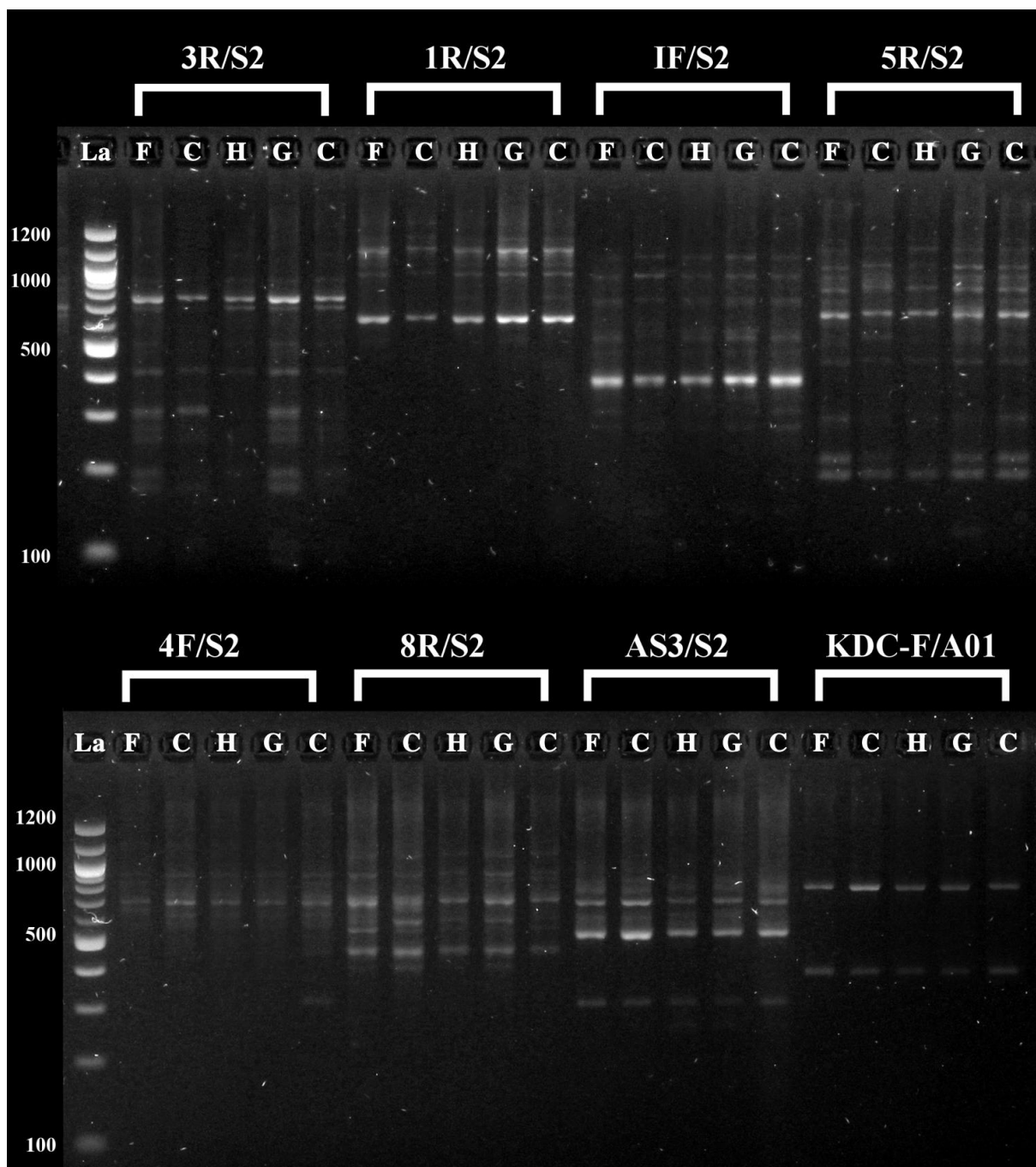


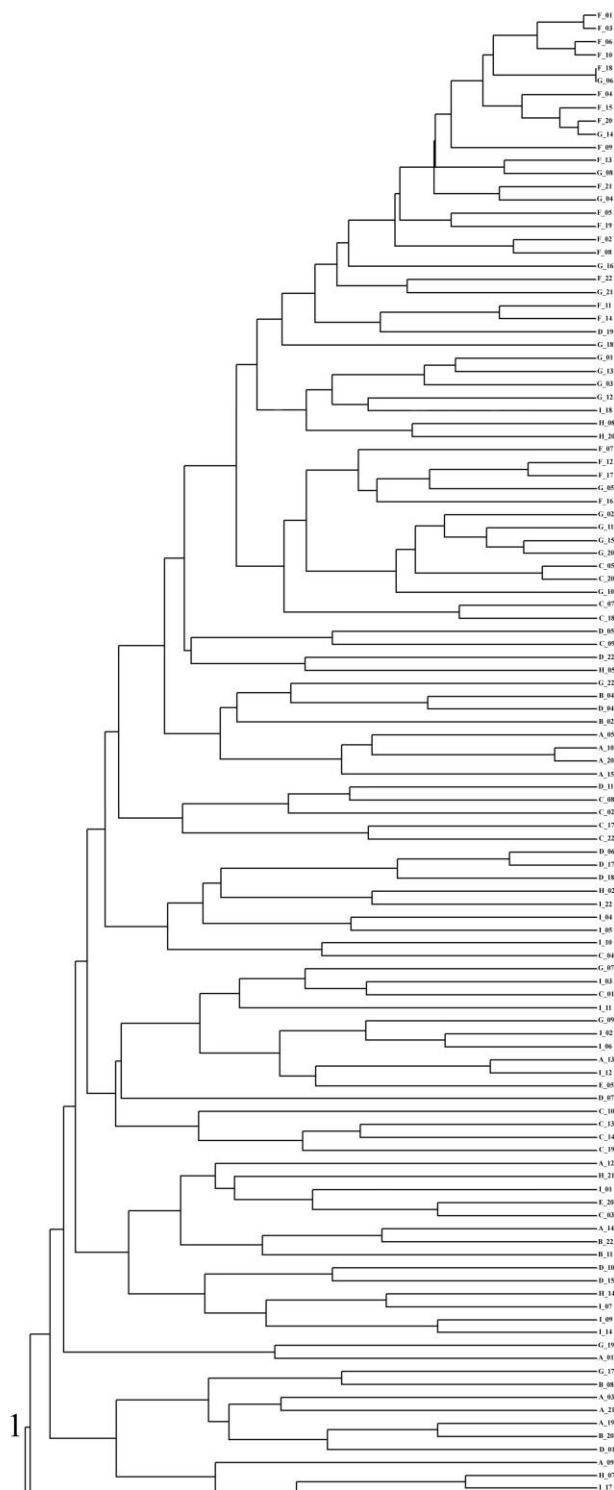
Figura 1. Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos amplificados gerados pelas 8 combinações de primers RGAs usados em diferentes cultivares. *Molecular ladder* de 100pb. Código dos poços: **La:** Molecular Ladder; **F:** Livramento de Nossa Senhora; **C:** IAC 273 / 277; **H:** BRS RC; **G:** São Francisco de Itabapoana; **C:** IAC 273 / 277.

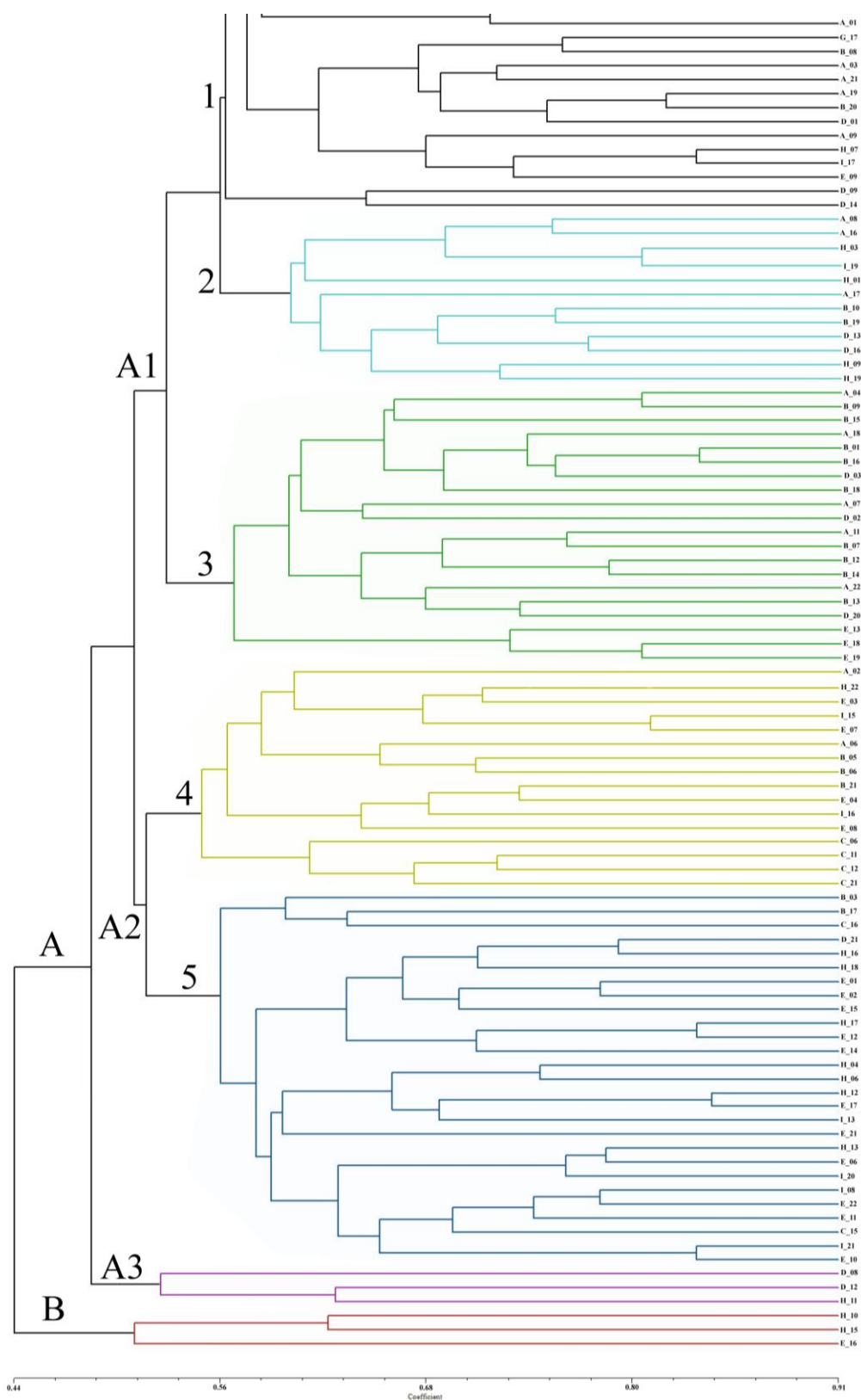
O dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA usando o coeficiente de similaridade de Jaccard reuniu os indivíduos das cultivares em dois clados principais (A e B). O clado A se subdividiu em três sub clados (A1, A2, A3) (Figura 2). O coeficiente de corte

utilizado para o dendrograma foi 0,63. No clado B se agruparam somente os 3 indivíduos pertencentes as cultivares BRS RC e Amarelo redondo – Isla Sementes. Os outros 195 indivíduos avaliados foram agrupados no mega-clado A, dividido em 6 agrupamentos principais (A1-1, A1-2, A1-3, A2-4, A2-5 e A3). O clado A3 agrupou indivíduos pertencentes principalmente as cultivares BRS RC e IAC 275, sendo eles os mais distintos de todos os indivíduos contidos no clado principal (A). Os cladros A1 e A2 apresentaram um coeficiente de similaridade de 0.51, sendo eles os quais agruparam a maioria dos indivíduos (192). O clado A2 é composto pelos subclados A2-4 e A2-5 agrupando 42 indivíduos pertencentes as cultivares FB 300, IAC 273/277, Amarelo redondo – Isla Sementes e BRS RC, sendo os dois primeiros exclusivos do clado A2-4. O clado A1 é Composto pelos subclados A1-1, A1-2 e A1-3. O subclado A1-3 junto com A1-2 agruparam 33 indivíduos principalmente das cultivares FB 200 e FB 300. O sub-clado A1-1 foi o qual agrupou a maior quantidade de indivíduos (117), sendo os indivíduos das cultivares de Livramento de Nossa Senhora - BA e São Francisco de Itabapoana - RJ os mais relacionados.

A Análise de Componentes Principais (PCA) distribuiu as cultivares em dois agrupamentos principais compostas por (1) FB 200, IAC 275, Amarelo redondo – Isla Sementes e BRS RC; e a segunda por (2) FB 300, IAC 273/277, Amarelo redondo – Top Seed Sementes, Livramento de Nossa Senhora - BA e São Francisco de Itabapoana - RJ. Se observaram também indivíduos dispersos pertencentes à cultivar Amarelo redondo – Isla Sementes (Figura 3).

Figura 2. Dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA dos indivíduos das nove cultivares de *Passiflora edulis* a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard. Cada agrupamento foi representado por uma cor, vermelho: B; A3: rosa; A2-5: azul; A2-4: amarelo; A1-3: verde; A1-2: celeste; A1-1: preto. Cada genótipo avaliado é representado pela letra do cultivar e o número do indivíduo. Os códigos das cultivares é: A: FB 200, B: FB 300, C: IAC 273 / 277, D: IAC 275, E: Amarelo redondo (Isla Sementes), F: Livramento de Nossa Senhora, G: São Francisco de Itabapoana, H: BRS RC, I: Amarelo redondo (Top Seed Sementes).





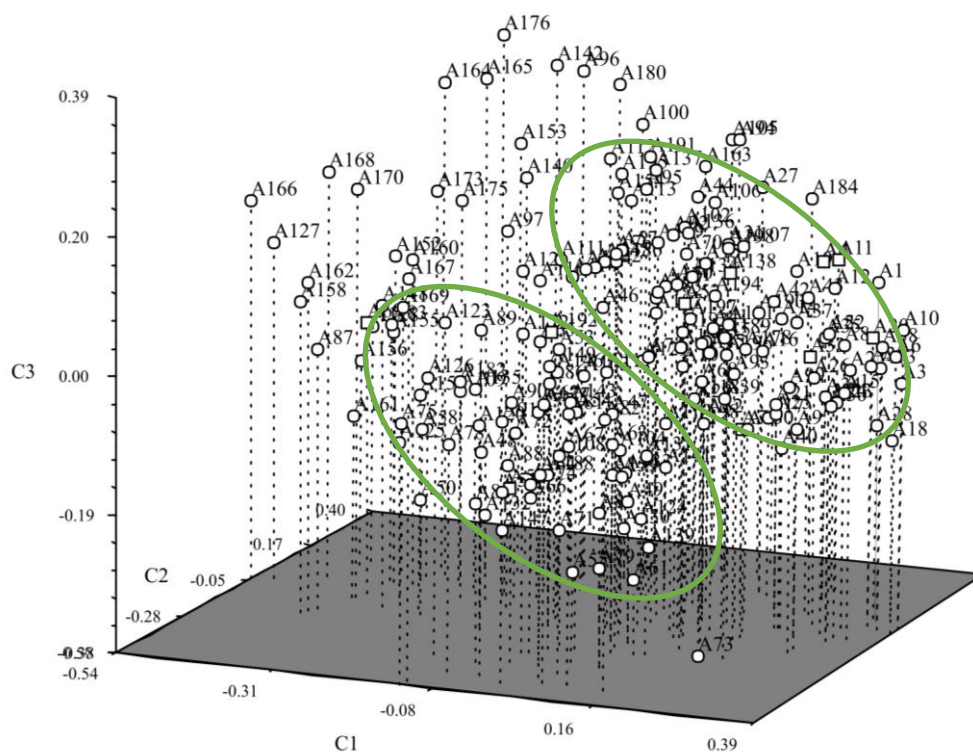


Figura 3. Análise de Componentes Principais (PCA) dos indivíduos das nove cultivares de *Passiflora edulis* a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard (1901) dos marcadores RGAs.

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi estudada a diversidade genética intraespecífica de 198 indivíduos pertencentes a 9 cultivares distintas de maracujazeiro azedo (22 indivíduos de cada cultivar). As cultivares escolhidas representam algumas das variedades com maior produção no Brasil (MELETTI, 2011). Se observou uma amplificação dos loci RGAs em *Passiflora edulis* de regiões conservadas próximas dos genes *R* para resistência a fitopatógenos mostrando assim os loci envolvidos nos processos de virulência e avirulência propostos por Flor (1947). Além disso, essas regiões também mostram as homologias relacionadas dos genes *R* nas diferentes famílias de angiospermas como *Nicotiana tabacum*, *Linum usitatissimum*, *Arabidopsis thaliana* pela transferibilidade dos marcadores (KANAZIN *et al.*, 1996; LEISTER *et al.*, 1996). Isto indica que o surgimento e coevolução dos genes *R* com os genes de virulência é basal nas angiospermas. As principais classes de genes *R* são compartilhadas entre vários gêneros de plantas, onde as variações nas sequências dos loci são responsáveis pela resistência, tolerância ou susceptibilidade em alguns sistemas de fitopatógenos (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997).

Paula *et al.*, 2010, encontrou a presença de monomorfismos utilizando RGA em diferentes espécies do gênero *Passiflora* (*P. setacea*, *P. nitida*, *P. serratodigitata*, *P. caerulea*, *P. gibertii*, *P. edulis*, *P. odontophylla*, e *P. coccinea* incluindo um híbrido *P. setacea* x *P. coccinea*), o qual coincide com o encontrado neste trabalho para as combinações de 1F/S2 e 1R/S2 (Figura 1). A pouca quantidade de polimorfismos indica que os marcadores RGA tem limitações para estudos intraespecíficos de genética de populações, além de que as cultivares escolhidas tem experimentado processos de melhoramento clássico onde certa parte da diversidade intrínseca da espécie é perdida visando deixar os alelos fixos em homozigose (BOREM, 2005). Se recomenda complementar os estudos de marcadores dominantes com codominantes para poder examinar de maneira mais específica o grau de endogamia das cultivares e assim entender de melhor maneira os processos de melhoramento.

As variedades de *P. edulis* analisadas foram agrupadas no mesmo mega-grupo A, observando-se maior similaridade genética na análise intraespecífica deste táxon e, conseqüentemente, menor diversidade genética em regiões de genes conferindo resistência às doenças, indicando dificuldades na obtenção de novos acessos como fonte de resistência às doenças. As duas cultivares oriundas de produtores locais (Livramento de Nossa Senhora - BA e São Francisco de Itabapoana - RJ) apresentaram maior semelhança no perfil de diversidade dado pelo loci de genes *R* o qual pode ser um reflexo dos processos de cruzamento e fluxo gênico entre os indivíduos das diferentes populações da região respectivamente. Pelo fato de não serem provenientes de programas de melhoramento estritos, seguramente os loci estão em heterozigose sendo essa característica refletida nas agrupações. Ao contrário das outras cultivares que provem de programas mais estritos, elas foram menos similares.

O gráfico do PCA agrupou as variedades em dois agrupamentos mostrando pouca variabilidade para as regiões de RGAs de domínios ou motivos no grupo amostral estudado. Os indivíduos da primeira agrupação provêm de programas de melhoramento mais estritos (FB 200, IAC 275, Amarelo redondo – Isla Sementes e BRS RC). O gráfico de PCA pode auxiliar na escolha de genitores contrastantes para as várias regiões genômicas analisadas pelos marcadores RGAs obtidos, permitindo cruzamentos e o uso dessas progênies em programas de pré-melhoramento de maracujazeiro para obter progênies de sargentos para as regiões associadas com genes de resistência.

A variabilidade genética intraespecífica foi refletida pelos marcadores RGA entre as cultivares avaliadas, estes podem ser usados em programas de melhoramento direcionados à

resistência a doenças na cultura, já que estes análogos são prováveis sequências de genes de resistência (PAULA *et al.*, 2010). O uso de marcadores RGA também fornece informações para a construção de mapas de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) (YU *et al.*, 1996; XIAO, 2007). Assim, procurar análogos dos genes *R* é uma boa estratégia para análises de germoplasma e melhoramento genético da cultura do maracujá. A análise da diversidade genética em regiões análogas para genes resistentes em *Passiflora* através de PCR heteróloga (utilizando primers degenerados entre espécies) permitiu a construção de um perfil dos RGAs dispostos nas nove variedades distintas, corroborando a hipótese de variabilidade intraespecífica em a população estudada.

5. CONCLUSÕES

Os marcadores RGAs podem ser utilizados para estudos de análise da diversidade genética intraespecífica visando a resistência a doenças na cultura do maracujazeiro azedo. Conseguiu-se obter o perfil RGA para as nove cultivares de maracujazeiro azedo avaliadas. Se comprovou a transferibilidade dos marcadores desenvolvidos em outras espécies (*Nicotiana tabacum*, *Linum usitatissimum*, *Arabidopsis thaliana*) amplificando análogos de genes *R* em *Passiflora edulis* o que mostra as homologias relacionadas à história evolutiva dos genes *R* em diferentes famílias de angiospermas. Existe pouca variabilidade genética nas cultivares melhoradas, o qual era o esperado pelos processos de endogamia nos programas de melhoramento. Se observou a maior variabilidade genética nas variedades oriundas de produtores locais (Livramento de Nossa Senhora - BA e São Francisco de Itabapoana – RJ), o qual pode ser um reflexo dos processos de cruzamento e fluxo gênico entre os indivíduos das diferentes populações da região.

6. AGRADECIMENTO

À CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro à pesquisa; à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida. À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) pela infraestrutura do Laboratório de Melhoramento de Plantas (LAMEP).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASINS, M. QTL analysis in plant breeding. In: Jain SM, Brar DS (eds) Molecular techniques in crop improvement. Springer Science. **Business Media BV**. 2009.
- BERTRAND, C. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Phil. Trans. R. Soc. B**. v.363, p.557–572, 2008.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa MG: UFV. p.25-38, 2005.
- BORO, M. C., BERIAM, L. O. S., & GUZZO, S. D. Induced resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in passion fruit plants. **Tropical Plant Pathology**, v.36, n.2, p.74–80, 2011.
- DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro-desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá Germoplasma e Melhoramento Genético**. Embrapa, p.187-209, 2005.
- FLOR, H. Inheritance of reaction to rust in flax. **J. Agric. Res.**, v.74, p.241-262, 1947.
- GUERRA, M. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto-Brasil, v.9, p.741-743, 1986.
- HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES J. D. G. Plant Disease Resistance Genes. **Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Bio.** v.48, p.575-607, 1997.
- HUZIWARA, Y. Karyotype analysis in some genera of Compositae. VIII. Further studies on the chromosome of Aster. **American Journal of Botany**. v.49, p.116-119, 1962.
- JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.** v.37, p.547-579, 1901
- JONES, J.D. Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. **Curr. Opin. Plant Biol.** v.4, p.281–287, 2001.
- KANAZIN V, MAREK LF, SHOEMAKER RC. Resistance genes analogs are conserved and clustered in soybean. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v.93, p.11746-11750, 1996.
- LEISTER, D.; AGIM, B.; SALAMINI, F.; GEBHARDT, C. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. **Nat. Gen.** v.14, p.421-429, 1996.

MCDOWELL, J; WOFFENDEN, B. Plant disease resistance genes: recente insights and potential applications. **Trends in Biotenology**. v.21, n.4, p.178-183, 2003.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Volume Especial, p.83-91, 2011.

MELETTI, L. M. M. Maracujá ‘Joia’ (IAC-277), ‘Maracujá-Maçã’, ‘Maracujá-Maravilha’ (IAC-275), ‘Maracujá-Monte-Alegre’ (IAC-273). In: DONADIO, L. C. (Ed.). Novas variedades brasileiras de frutas. Jaboticabal: **Sociedade Brasileira de Fruticultura**. p.152-159, 2001.

MELETTI, L. M. M.; DOS SANTOS, R.; MINAMI, K. Melhoramento do Maracujazeiro-Amarelo: Obtenção do Cultivar “Composto IAC-27”. **Scientia Agricola**, v.57, n.3, p.491-498, 2000.

MELO, C. A. F.; SOUZA, M. M.; SILVA, G. S. Establishment of the genomic *in situ* hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora*. **Genet Mol Res**, v.14, p.2176-2188, 2015.

NASCIMENTO, A. V. S., SOUZA, A. R. R., ALFENAS, P. S., ANDRADE, G. P., CARVALHO, M. G., PIO-RIBEIRO, G., & ZERBINI, F. M. Análise filogenética de potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.4, p.378-383, 2004.

OLIVEIRA, O.L. **Análises Genéticas e Citogenética em espécies de *Passiflora* L. Existentes No Banco Ativo De Germoplasma (Bag-Passifloras) Da UESC**. 133p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2017.

PAULA, M. S., FONSECA, M. E. N., BOITEUX, L. S., & PEIXOTO, J. R. Caracterização genética de espécies de *Passiflora* por marcadores moleculares análogos a genes de resistência. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.32, n.1, p.222-229, 2010.

PEREIRA, G. S.; NUNES, E. S.; LAPERUTA, L. D. C.; BRAGA, M. F. Molecular polymorphism and linkage analysis in sweet passion fruit, an outcrossing species. **Ann App. Bio**. v.162, p.347-361, 2013.

PINK, D. Strategies using genes for non-durable disease resistance. **Euphytica**. v.124, n.2, p.227–236, 2002.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. New York: Exeter Software 83, 2000.

SILVA, L. A., GARCÊZ, R. M., LEVI, A., CHAVES, R., COLARICCIO, A., & EIRAS, M. Transmissão experimental revela novos potenciais reservatórios do Cowpea aphid-borne mosaic virus. **Summa Phytopathologica**, v.38, n.2, p.168–169, 2012.

SILVA, A. S., OLIVEIRA, E. J., HADDAD, F., LARANJEIRA, F. F., JESUS, O. N., OLIVEIRA, S. A. S. Identification of passion fruit genotypes resistant to *Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae*. **Tropical Plant Pathology**, v.38, n.3, p.236-242, 2013.

STEUERNAGEL, B. *et al.* Rapid cloning of disease-resistance genes in plants using mutagenesis and sequence capture. **Letters Nature Biotechnology**. Advance Online Publication, p.1-7, 2016.

VIEIRA, M. L. C.; OLIVEIRA, E. J.; MATTA, F. P.; PADUA, J. G.; MONTEIRO, M. Métodos biotecnológicos aplicados ao melhoramento genético do maracujá. In. FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá Germoplasma e Melhoramento Genético. Embrapa**, p.411-453. 2005.

XIAO, W. *et al.* Mapping of genome-wide resistance gene analogs (RGAs) in maize (*Zea mays* L.). **Theor Appl Genet.** v.115, n.4, p.501-8, 2007.

YU, Y.G.; BUSS, G.R.; SAGHAI MAROOF, M. A. Isolation of a super family of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. **PNAS**, v.93, p.11751-11756, 1996.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Deve ser ressaltado que pela primeira vez foi comparada a diversidade genética, a citogenética convencional e molecular de nove cultivares de Maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims). Foi encontrada uma alta variação tanto a nível cromossômico como com marcadores RGA.

A nível cromossômico foi encontrada um alto grau de variação entre as variedades de *P. edulis* avaliadas. Foi observado um heteromorfismo no tamanho do sítio do DNAr 45S o qual indica uma alta diversidade intraespecífica. Esta variação cariotípica é provavelmente um reflexo dos processos evolutivos dentro do gênero *Passiflora* já que a filogenia esta intimamente ligada aos eventos cromossômicos. Os dados apresentados sugerem que a diversificação intraespecífica é algo que ocorre normalmente dentro da espécie, não somente pelo melhoramento genético, senão também provavelmente como um fenômeno natural nas populações silvestres. Isto seguramente acontece em outras espécies do subgênero e reitera a história evolutiva da família Passifloraceae. Além disso, os sítios de DNAr 45S e 5S podem ser utilizados como marcadores citogenéticos muito informativos. Estes podem chegar a esclarecer os processos evolutivos e de variação cariotípica no gênero. Finalmente para os estudos cariotípicos, a citogenética convencional em conjunto com a citogenética molecular são complementarias em estudos filogenéticos e taxonômicos.

A diversidade genética intraespecífica de *Passiflora edulis* pode ser avaliada utilizando marcadores RGAs. Se conseguiu transferir marcadores RGAs obtidos em outras espécies (*Nicotiana tabacum*, *Linum usitatissimum*, *Arabidopsis thaliana*) amplificando análogos de genes *R* em *Passiflora edulis*. Observou-se pouca variabilidade genética nas cultivares estudadas, isto provavelmente pelos processos de melhoramento. A maior variabilidade genética intraespecífica foi observada nos genótipos obtidos de produtores locais (Livrimento de Nossa Senhora - BA e São Francisco de Itabapoana – RJ) o qual indica um maior fluxo gênico entre os indivíduos das diferentes populações da região. Finalmente, entender a variação cariotípica e genética complementa os estudos dos recursos genéticos, o que enriquece os programas de melhoramento de maracujazeiro azedo.

REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

- ABREU, P. P.; SOUZA, M. M.; SANTOS, E. A.; PIRES, M. V.; PIRES, M. M.; ALMEIDA, A. A. F. Passionflower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**, v.166, p.307-315, 2009.
- ALMEIDA, C. & E. AMORIM, F. BARBOSA, J. CARDOSO, M. DE MELO. Genetic variability in populations of sweet corn, common corn and teosinte. **Crop breeding and applied biotechnology**. v.11, p.64-69, 2011.
- ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA - AGRIANUAL. **Agrianual** 2015. São Paulo: Informa Economics FNP. p.362, 2016.
- ASINS, M. *et al.* QTL analysis in plant breeding. In: Jain SM, Brar DS (eds) Molecular techniques in crop improvement. Springer Science. **Business Media BV**. 2009.
- BERNACCI, L. *et al.* *Passiflora edulis* SIMS: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, Volume Especial, E. p.083-091, 2011.
- BERNACCI, L. C.; VITTA, F. A.; BAKKER, Y. V. Passifloraceae. In: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPPERD G. J.; MELHEM T. S.; GIULIETTI A. M.; KIRIZAWA M. (Eds.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**, RiMa/FAPESP, São Paulo, v.3, p.247- 274, 2003.
- BERTRAND, C. *et al.* Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Phil. Trans. R. Soc. B**. v.363, p.557–572, 2008.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa MG: UFV. p.25-38, 2005.
- CATUNDA, P.H.A., VIEIRA, H.D., SILVA, R.F., POSSE, S.C.P. Influência no teor de água, da embalagem e das condições de armazenamento na qualidade de sementes de maracujá amarelo, **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, n.1, p.65-71, 2003.
- CERVI, A. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; BERNACCI, L. C.; NUNES, T. S. Passifloraceae. In: JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Lista de espécies da flora do Brasil**. 2013
- CHEN Y. *et al.* Genome-wide analysis of the gene families of resistance gene analogues in cotton and their response to Verticillium wilt. **BMC Plant Biology** v.15, p.148, 2015.
- CHO, Y. & T. ISHII, S. TEMNYKH, X. CHEN, L. LIPOVICH, S. MCCOUCH, J. PARK, N. AYRES, S. Cartinhour. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor Appl Genet**. v.100, p.713-722, 2002.
- COELHO, M.S.E.; BORTOLETI, K. C.; ARAUJO, F. P. MELO, N. F. Cytogenetic characterization of the *Passiflora edulis* Sims x *Passiflora cincinnata* Mast. interspecific hybrids and its parents. **Euphytica**. DOI 10.1007/s10681-016-1704-4. 2016.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**. v.19, p.299-306, 2001.

CUCO S.M., VIEIRA M.L.C., MONDIN M., AGUIAR-PERECIN M.L.R. Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. **Caryologia**, v.58, p.220–228, 2005.

DANGL, J.L. AND JONES, J.D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v.411, p.826–833, 2001.

DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15. 1990.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro-desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá Germoplasma e Melhoramento Genético**. Embrapa, p187-209, 2005

FERRAZ, J.V.; LOT, L. Fruta para consumo in natura tem boa perspectiva de renda. In: **AGRIANUAL 2007: anuário da agricultura brasileira. Maracujá**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio. p.387-388, 2007.

FERREIRA, F.R. Recurso genético de *Passiflora*. In. FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds). **Maracujá Germoplasma e Melhoramento Genético**. Embrapa. p.41-51, 2005.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. EMBRAPA-CENARGEN, Documento 20, p.220, 1995.

FLOR H. Inheritance of reaction to rust in flax. J. **Agric. Res.**, v.74, p.241-262, 1947.

FREITAS, J. *et al.* Genetic basis of the resistance of a passion fruit segregant population to Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). **Trop. Plant. Pathol.** v.40, p.291-297, 2015.

FREITAS, T. & P. WIETHOLTER, C. ALMEIDA, S. DELMAR, F. BERED, M. DE MELO, J. BARBOSA. Genetic variability in maize and teosinte populations estimated by microsatellites markers. **Ciacia Rural**, Santa Maria. v.41, p.205-211, 2011.

GALO, L. **Nova variedade de maracujá resistente a virose**. Frutas Benassi, 2008. Disponível em: http://www.benassis.com.br/noticias/novo_maracuja.htm#. Acesso em 20 nov. 2017.

HAMMOND-KOSACK, K; JONES, J. Plant Disease Resistance Genes. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v.48, p.575-607, 1997.

- HULBERT, S.H. Resistance gene complexes: evolution and utilization. **Annu. Rev. Phytopathol.** v.39, p.285–312, 2001.
- INGALE, A. G.; HIVRALE, A. U. Pharmacological studies of *Passiflora* sp. and their bioactive compounds. **African Journal of Plant Science**, v.4, n.10, p.417-426, 2010.
- JONES, J.D. 2001. Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. **Curr. Opin. Plant Biol.** v.4, p.281–287, 2001.
- JUANSHENG R. *et al.* Application of resistance gene analog markers to analyses of genetic structure and diversity in rice. **Genome**, v.56, p.377–387, 2013.
- JUNQUEIRA, N.T.V., VERAS, M.C.M., NASCIMENTO, A.C., CHAVES, R.C., MATOS, A.P., JUNQUEIRA, K.P. **Importância da polinização manual para aumentar a produtividade do maracujazeiro**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.18, 2001.
- KANAZIN, V.; FREDERICK, M.L.; SHOEMAKER, R.C. **Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean**. PNAS, v.93, p.11746-11750, 1996.
- KAWCHUK LM, HACHEY J, LYNCH DR, *et al.* Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.98, n.11, p.6511-6515, 2001.
- KILLIP, E.P. The american species of Passifloraceae. **Field Museum of Natural History**, v.19, p.613-656, 1938.
- LEISTER, R.T., AUSUBEL, F.M.; KATAGIRI, F. Molecular recognition of pathogen attack occurs inside of plant cells in plant disease resistance specified by the Arabidopsis genes RPS2 and RPM1. **PNAS**, v.93, p.15497-15502, 1996.
- MATUS I. & P. HAYES. Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. **Genome**, v.45, p.1095-1106, 2002.
- MCDOWELL, J; WOFFENDEN, B. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. **Trends in Biotechnology**. v.21, n.4, p.178-183, 2003.
- MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Volume Especial, p.83-91, 2011.
- MELETTI, L. M. M. Maracujá ‘Joia’ (IAC-277), ‘Maracujá-Maçã’, ‘Maracujá-Maravilha’ (IAC-275), ‘Maracujá-Monte-Alegre’ (IAC-273). In: DONADIO, L.C. (Ed.). Novas variedades brasileiras de frutas. Jaboticabal: **Sociedade Brasileira de Fruticultura**. p.152-159, 2001.
- MELO, C. A. F.; SILVA, G. S.; SOUZA, M. M. Establishment of genomic in situ hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora*. **Genetics and Molecular Research**, v.14, p.2176-2188, 2015.

MELO, N. F.; CERVI, A. C.; GUERRA, M. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae), **Plant Systematics and Evolution**, v.226, p.69-84, 2001.

MELO, N. F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA Sites in *Passiflora* L. Species with Distinct Base Chromosome Numbers. **Annals of Botany**, v.92, p.309-316, 2003

NEVES, N.; DELGADO, M.; SILVA, M.; CAPERTA, A.; MORAIS-CECÍLIO, L.; VIERGAS, W. Ribosomal DNA Heterochromatin in plants. **Cytogenet Genome Res.** v.109 n.1, p.104-11, 2005

OLIVEIRA E.J., PÁDUA J., ZUCCHI M. CAMARGO L. Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Mol. Ecol. Notes** v.5, p.331-333, 2005.

OLIVEIRA, O.L. **Análises Genéticas e Citogenética em espécies de *Passiflora* L. Existentes No Banco Ativo De Germoplasma (Bag-Passifloras) Da UESC.** 133p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2017.

ORTIZ, *et al.* Evaluating purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) genetic variability in individuals from commercial plantations in Colombia. **Genet Resour Crop Evol.** v.59, p.1089–1099, 2012.

PAULA, M. S *et al.* Caracterização Genética de Espécies de *Passiflora* por Marcadores Moleculares Análogos a Genes de Resistência. **Rev. Bras. Frutic.** v.32, n.1, 2010.

PEREIRA, G. S. *et al.* 2013. Molecular polymorphism and linkage analysis in sweet passion fruit, an outcrossing species. **Ann Appl Biol**, v.162, p.347–36, 2013.

PINK, D. Strategies using genes for non-durable disease resistance. **Euphytica**. v.124, n.2, p.227–236, 2002.

PIRES, M.; SÃO JOSE, A. R.; DA CONCEIÇÃO, A. **Maracujá: Avanços tecnológicos e sustentabilidade.** Ilhéus: Editus. 237p. 2011.

REGISTRO NACIONAL DE CULTIVARES – RCN. Disponível em: http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php - Acesso em 20 de nov de 2017.

REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISAS EM MARACUJAZEIRO (4). **Trabalhos apresentados na 4ª. Reunião Técnica de Pesquisas em Maracujazeiro**, Planaltina, DF. Embrapa Cerrados. 2005.

RUGGIEIRO, C.; SÃO JOSÉ, A.R.; VOLPE, C.A. **Maracujá para exportação: aspecto técnico da produção.** Brasília: EMBRAPA-SPI: FRUPEX. 64p. (Frupep publicações Técnicas, 19). 1996.

SÃO JOSÉ, A. R. Pesquisa em maracujazeiro no Brasil. In: CUNHA, M. A. S. P. da (Org) **Reunião Técnica: Pesquisa em maracujazeiro no Brasil. Cruz das Almas:** Embrapa-CNPMF, v.77, p.54-57, 1996.

SILVA, F. M., CORRÊA, L.S., BOLIANI, A.C., SANTOS, P.C. Enxertia de mesa em *P. edulis* Sims f. flavicarpa Deg. sobre *Passiflora alata* Curtis, em ambiente de nebulização intermitente. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, p.98–101, 2005.

SILVA, G. S. **Citogenética clássica e molecular na progênie híbrida F1 do cruzamento *Passiflora gardneri* MAST x *Passiflora gibertii* N.E. BROW.** 87p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2014.

SILVA, G. S. **Análises genômicas (GISH) e citogenômicas comparativas em espécies do gênero *Passiflora* L.** 118p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2017.

SILVA, M. *et al.* **Analysis of transferability of microsatellite primers (SSR) in wild *Passiflora* species and intraspecific genetic diversity in *Passiflora alata*.** Genetics and Molecular Research, v.13, n.3, p.5908-5918, 2014.

SOUZA, L. S., JUNQUEIRA, N. T. V., LIMA, C. A., SILVA, D. G. P., FALEIRO, F. G., CAMPOS NETO, F. C., BERNACCI, L. C. Determinação da compatibilidade genética entre espécies de Passifloras visando a obtenção de híbridos resistentes a doença. **Anais do IX Simpósio Nacional do Cerrado**, Brasília, DF, Brasil. 2008.

SOUZA, M. M., PEREIRA, T. N. S., SILVA, L. C., REIS, D. S. S., SUDRÉ, C. P. Karyotype of six *Passiflora* species collected in the state of Rio de Janeiro. **Cytologia**, v.68, p.165-171, 2003.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIEIRA, M. L. C. Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasising Brazilian species. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v.51, p.247-258, 2008.

SOUZA, M. M.; URDAMPILLETA, J. D.; FORNI-MARTINS, E. R. Improvements in cytological preparations for fluorescent *in situ* hybridization in *Passiflora*. **Genetics and Molecular Research**, v.9, p.2148-2155, 2010.

SOARES-SCOTT M. D., MELETTI L. M., BERNACCI L. C., PASSOS I. R. S. Citogenética clássica e molecular em passifloras. Em: Faleiro F.G., Junqueira N.T.V., Braga M.F. (Eds), **Maracujá: Germoplasma e Melhoramento Genético**. Embrapa Cerrados, Planaltina, Brazil, p.213–240, 2005.

STEUERNAGEL, B. *et al.* Rapid cloning of disease-resistance genes in plants using mutagenesis and sequence capture. **Letters Nature Biotechnology**. Advance Online Publication. p.1-7, 2016.

SUMMER, H., GRÄMER, R., & DRÖGE, P. Denaturing Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Urea PAGE). **Journal of Visualized Experiments**. JoVE, Advance online publication. v.32, p.1485, 2009.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. *Passiflora*: Passionflowers of the world. Portland: **Timber Press**, p.430, 2004.

VANDERPLANK, J. **Passion Flowers**. 3ed., The MIT Press, Cambridge. p.224, 2000.

VIANA, A. *et al.* Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas determinada por marcadores RAPD. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v.25, n.3, p.489-493, 2003.

VIANA, A. *et al.* Genetic diversity in yellow passion fruit populations. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.6, p.87-94, 2006.

VIANA, A. J. C.; SOUZA, M. M. Comparative cytogenetic between the species *Passiflora edulis* and *Passiflora cacaoensis*. **Plant Biology**, v.14, p.820-827, 2012.

VIEIRA, M. L. C.; OLIVEIRA, E. J.; MATTA, F. P.; PADUA, J. G.; MONTEIRO, M. Métodos biotecnológicos aplicados ao melhoramento genético do maracujá. In. FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá Germoplasma e Melhoramento Genético**. Embrapa, p.411-453, 2005.

XIAO, S., *et al.* The Arabidopsis genes RPW8.1 and RPW8.2 confer induced resistance to powdery mildew diseases in tobacco. **Mol. Plant Microbe Interact.** v.16, n.4, p.289-94, 2003.

XIAO, W. *et al.* Mapping of genome-wide resistance gene analogs (RGAs) in maize (*Zea mays* L.). **Theor Appl Genet.** v.115, n.4, p.501-8, 2007.

YU, Y. G.; BUSS, G. R.; SAGHAI MAROOF, M. A. Isolation of a super family of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. **PNAS**, v.93, p.11751-11756, 1996.