



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**

MARIA DO SOCORRO EVANGELISTA COELHO

**CITOGENÉTICA E CULTIVO *IN VITRO* DE ESPÉCIES E HÍBRIDOS
DE *Passiflora* L.**

Feira de Santana - BA

2015

MARIA DO SOCORRO EVANGELISTA COELHO

**CITOGENÉTICA E CULTIVO *IN VITRO* DE ESPÉCIES E
HÍBRIDOS DE *Passiflora* L.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo
Coorientadora: Profa. Dra. Kyria Cilene de Andrade Bortoleti

Feira de Santana - BA

2015

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

Coelho, Maria do Socorro Evangelista
C618cCitogenética e cultivo *in vitro* de espécies e híbridos de *Passiflora* L.
/Maria do Socorro Evangelista Coelho. – Feira de Santana, 2015.
104f. : il.

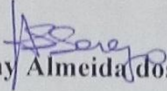
Orientador: Nataniel Franklin de Melo.
Coorientadora: Kyria Cilene de Andrade Bortoleti.

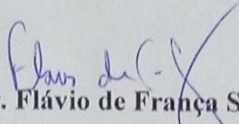
Tese (doutorado) –Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2015.

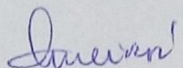
1. *Passiflora* - Citogenética. 2. Maracujá. I. Melo, Nataniel Franklin de, orient. II. Bortoleti, Kyria Cilene de Andrade, coorient.. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

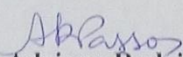
CDU: 582.842.7

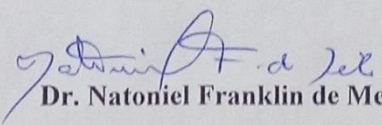
BANCA EXAMINADORA


Dr^a. Janay Almeida dos Santos Serejo
EMBRAPA/MANDIOCA E FRUTICULTURA


Dr. Flávio de França Souza
EMBRAPA/SEMIÁRIDO


Prof. Dr. Manoel Abílio de Queiroz
Universidade do Estado da Bahia


Prof^a. Dr^a. Adriana Rodrigues Passos
Universidade Estadual de Feira de Santana


Dr. Nataniel Franklin de Melo
EMBRAPA/SEMIÁRIDO
Orientador e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA

2015

À minha família pelo apoio constante e amor incondicional, em especial meus pais Afonso e Luiza e meu esposo Uberlandio!

AGRADECIMENTOS

A Deus todo poderoso pelo dom da vida e por sua infinita misericórdia.

Aos meus pais Afonso e Luiza, por todo amor, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao meu esposo Uberlandio, por todo amor, carinho, compreensão e apoio.

A meus irmãos pelo amor e constante incentivo. E a todos meus familiares, especialmente aos meus sobrinhos, por proporcionarem momentos de descontração maravilhosos.

Ao Dr. Nataniel Franklin de Melo, pela oportunidade oferecida desde a graduação, pela orientação, compreensão, profissionalismo e por todo ensinamento e apoio.

A Dra. Kyria Cilene de Andrade Bortoleti, pela amizade conquistada, apoio e por todo ensinamento e orientação.

Ao Dr. Francisco Pinheiro de Araújo por todo apoio, ensinamento e informações sobre o maracujazeiro.

Ao Dr. Viseldo Ribeiro de Oliveira por todo apoio e ensinamento.

À coordenação e professores da Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, que tanto se dedicam em prol do nosso crescimento pessoal e profissional. E ao secretário Alberto pelo apoio indispensável.

À Embrapa Semiárido, por toda infra-estrutura disponibilizada para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pela amizade, apoio e por todos os momentos que passamos juntos. Em especial a grande amiga Ângela Katiussia.

A Eliene Matos, pela amizade cultivada durante esses anos.

A Antonio Pereira, Elenicio Gomes, Francisco e Manoel Barbosa por todo apoio e ajuda.

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas contribuições.

A todos que direto ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho, minha eterna gratidão.

“... Minha força e vitória tem um nome, JESUS ...”

Eliana Ribeiro

Sem sonhos, a vida não tem brilho.

Sem metas, os sonhos não têm alicerces.

Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.

*Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos
para executar seus sonhos.*

Melhor é errar por tentar do que por omitir.

Augusto Pury

RESUMO

O Brasil é um dos principais centros de dispersão da variabilidade genética do gênero *Passiflora*. O presente trabalho objetivou caracterizar espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora*, através de técnicas citogenéticas e por marcadores ISSR, além de avaliar o estabelecimento e multiplicação *in vitro* de genótipos de maracujazeiro. Preparações citológicas foram submetidas à análise convencional, dupla coloração com os fluorocromos CMA₃/DAPI, FISH utilizando como sonda DNAr 5S/45S e GISH. O DNA genômico de *P. edulis* e *P. cincinnata* foram utilizados como sondas genômicas na GISH. Foram utilizados 20 primers ISSR na caracterização por marcadores moleculares. Para o estabelecimento do cultivo *in vitro*, segmentos nodais de *P. cincinnata*, *P. laurifolia*, *P. setacea* e *P. luetzelburgii* foram coletados e avaliados em meio de cultura WPM, DKW e MS, para a multiplicação *in vitro*, os explantes foram inoculados em meio DKW sob diferentes concentrações de citocininas BAP, KIN e 2iP. Os resultados mostraram $2n = 18$ cromossomos para as espécies e híbridos, além de meiose regular, um par de sítios de DNAr 5S e dois a três pares de sítios de DNAr 45S que co-localizaram as bandas CMA₃⁺/DAPI, sendo o primeiro registro de contagem para *P. luetzelburgii*. Na GISH foi observada a formação de três grupos cromossômicos distintos. A origem híbrida e a relação com as espécies parentais foram também confirmadas pelo uso dos marcadores ISSR. No cultivo *in vitro*, o meio DKW proporcionou melhor desenvolvimento dos explantes, em relação aos genótipos, *P. cincinnata* CPE16 mostrou melhor resposta morfogênica *in vitro* e KIN mostrou-se mais eficiente para obtenção de brotações com maiores comprimentos.

Palavras-chave: DNAr. Hibridização *in situ*. ISSR. Cultura de tecidos. Maracujá.

ABSTRACT

Brazil is one of the main centers of genetic diversity and dispersion of the genus *Passiflora*. In the present work, several species and interspecific hybrids of *Passiflora* were characterized through cytogenetic techniques and ISSR markers, as well as these genotypes were evaluated for *in vitro* multiplication and establishment. Chromosomal preparations were submitted to conventional staining, CMA₃/DAPI banding, FISH using 45S/5S rDNA probes and GISH. Genomic DNA of *P. edulis* and *P. cincinnata* were used as genomic probes in the GISH. Twenty ISSR primers were used for the characterization by molecular markers. Nodal segments of *P. cincinnata*, *P. laurifolia*, *P. setacea* and *P. luetzelburgii* were collected and evaluated in the WPM, DKM and MS culture media to establishment of *in vitro* culture; for *in vitro* multiplication, explants were inoculated in DKW culture media under different concentrations of BAP, KIN and 2iP cytokinins. The results showed $2n = 18$ chromosomes for the species and hybrids, regular meiosis, one pair of 5S rDNA sites and two or three pairs of 45S rDNA sites co-localized with the CMA₃⁺/DAPI bands. It is the first chromosomal counting recorded for *P. luetzelburgii*. Three groups distinct of chromosomes were revealed by GISH. The hybrid origin and the relationship with the parental species were also confirmed by using of the ISSR markers. DKW culture medium provided the better development of the explants, *P. cincinnata* CPE16 showed the better *in vitro* morphogenetic response, and KIN showed to be more efficient in obtaining increased shoots length.

Keywords: rDNA. *In situ* hybridization. ISSR. Tissue culture. Passion fruit.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
CAPÍTULO 1- CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES PARENTAIS E DO HÍBRIDO INTERESPECÍFICO <i>Passiflora edulis</i> Sims x <i>P. cincinnata</i> Mast.	30
1.1 Introdução	33
1.2 Material e Métodos	34
1.3 Resultados	39
1.4 Discussão	45
REFERÊNCIAS	48
CAPÍTULO 2- RELAÇÕES CARIOTÍPICAS ENTRE ESPÉCIES E HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE <i>Passiflora</i> L. COM POTENCIAL DE USO ECONÔMICO	54
2.1 Introdução	57
2.2 Material e Métodos	58
2.3 Resultados e Discussão	61
REFERÊNCIAS	67
CAPÍTULO 3- RESPOSTA <i>IN VITRO</i> DE GENÓTIPOS DE <i>Passiflora</i> L. EM FUNÇÃO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE MEIOS E CONCENTRAÇÕES DE CITOCININAS	70
3.1 Introdução	73
3.2 Material e Métodos	74
3.3 Resultados e Discussão	75
REFERÊNCIAS	80
CONCLUSÕES GERAIS	88
ANEXOS	90

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Passiflora* L.

Aspectos morfológicos, econômicos, distribuição e recursos genéticos

O maracujazeiro pertence ao gênero *Passiflora* L., numericamente o principal táxon da família Passifloraceae. É um gênero com expressiva diversidade, representado por aproximadamente 530 espécies (ULMER; MACDOUGAL, 2004; HANSEN et al., 2006), originário da América do Sul (VANDERPLANK, 1996), cujo maior centro de distribuição geográfica localiza-se no Centro-Norte do Brasil (LOPES, 1991).

A literatura apresenta três classificações para *Passiflora* baseada em características morfológicas e ecológicas devido, principalmente, à complexidade taxonômica do gênero. No entanto, a mais abrangente foi proposta por Killip (1938), em que propôs 22 subgêneros, e estes, subdivididos em seções e/ou séries. Posteriormente, Feuillet e MacDougal (1999) sugeriram uma nova classificação infragenérica de *Passiflora*, com apenas quatro subgêneros, substituindo os 22 propostos anteriormente por Killip (1938). Mais adiante, outros estudos levaram a uma nova organização taxonômica do gênero, propondo a utilização dos quatro subgêneros, apresentando os seguintes números cromossômicos: *Decaloba* $x = 6$, *Deidamioides* $x = 12$, *Astropheia* $x = 12$ e *Passiflora* $x = 9$ (FEUILLET; MACDOUGAL, 2003).

De modo geral, o gênero *Passiflora* compreende plantas trepadeiras herbáceas ou lenhosas com gavinhas axilares, ocorrendo também algumas espécies arbustivas (CERVI, 1997). As plantas do gênero possuem caules cilíndricos ou quadrangulares, muito ramificados, angulosos, suberificados, glabros, que em algumas espécies, podem apresentar pilosidade e atingir de 5 a 10 m de comprimento (KILLIP, 1938). Vários autores verificaram nectários extraflorais no pecíolo foliar, e que as folhas são alternas, geralmente simples e com morfologia bastante variável (JUDD et al., 1999; ULMER; MACDOUGAL, 2004; FARINAZZO; SALIMENA, 2007, ARAÚJO et al., 2008). As flores de *Passiflora* são vistosas e possuem características marcantes do gênero e diferem dos demais gêneros por apresentarem cinco estames, cinco pétalas, cinco sépalas e androginóforo ereto com estames de extremidades livres e três estigmas (CERVI, 1997) (Figura 1). O fruto é do tipo baga e indeiscente, com numerosas sementes e apresentam testa dura (FARINAZZO; SALIMENA, 2007). A polinização do maracujazeiro é dependente de agentes polinizadores, principalmente de grande porte, a exemplo dos mamangavas, vespas, mariposas, borboletas e morcegos

(SAZIMA; SAZIMA, 1978; VARASSIN et al., 2001), uma vez que o maracujazeiro é uma planta alógama com um sistema de autoincompatibilidade que favorece a polinização cruzada (GANGA et al., 2004; BRUCKNER et al., 2005), impedindo que plantas produtoras de gametas masculinos e femininos funcionais produzam sementes quando autopolinizadas (BRUCKNER et al., 2005).

Economicamente, a cultura do maracujazeiro possui grande importância para o setor agrícola, sendo que os cultivos comerciais de *Passiflora* adquiriram expressividade a partir de 1986 (RIZZI et al., 1998), concentrando-se basicamente na espécie *P. edulis* Sims (maracujá-amarelo ou azedo) (Figura 1C) (MELETTI et al., 2005). O Brasil destaca-se no cenário internacional como o maior produtor mundial de maracujá (IBGE, 2013), representando 95% dos pomares, devido à qualidade dos seus frutos, vigor, produtividade e rendimento em suco (MELETTI; BRUCKNER, 2001; FERREIRA, 2005; MELETTI, 2011). De acordo com o IBGE (2013), a região Nordeste vem liderando nos últimos anos a produção brasileira, sendo responsável por mais de 50% da produção. Dentre os Estados com a maior produção de maracujá, podem ser destacados: Bahia, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro, Ceará, Sergipe, Pará, Minas Gerais, Goiás e Alagoas.

Além de *P. edulis*, outras espécies do gênero possuem importância econômica, embora a comercialização seja restrita e bastante regionalizada, destacando: o maracujá-doce (*P. alata* Curtis) (Figura 1A), maracujá-melão (*P. quadrangularis* L.) (Figura 1G), maracujá-suspiro (*P. nitida* HBK), maracujá-azul (*P. caerulea* L.), maracujá-peroba (*P. laurifolia* L.) (Figura 1D), maracujá-do-mato (*P. cincinnata* Mast.) (Figura 1B) e o maracujá-do-sono (*P. setacea* DC) (Figura 1H) (MELETTI et al., 2003; MELETTI et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2010).



Figura 1. Flores das espécies de *Passiflora* L. estudadas. *P. alata* (A), *P. cincinnata* (B), *P. edulis* (C), *P. laurifolia* (C), *P. luetzelburgii* (E e F), *P. quadrangularis* (G) e *P. setacea* (H).

De acordo com Souza e Meletti (1997), muitas das espécies de *Passiflora* são cultivadas pelas propriedades alimentícias e medicinais, mas principalmente, pela qualidade de seus frutos, que, além de consumidos *in natura*, são utilizados para fazer sucos, doces, refrescos e sorvetes. Entretanto, o maracujá-amarelo tem maior importância comercial devido à qualidade dos frutos e aos rendimentos industriais. Já o maracujá-doce (*P. alata*), apesar da menor representatividade, atinge preços unitários mais expressivos nos segmento de frutas frescas (MELETTI; MAIA, 1999; BERNACCI et al., 2002). Outro mercado que vem ganhando expansão é o da floricultura. O valor ornamental é obtido pelas belas flores que a planta produz e que exercem atração pelo tamanho, exuberância de suas cores e originalidade de suas formas (SOUZA; MELETTI, 1997).

Por outro lado, diversos autores relataram a ampla variabilidade genética inter e intraespecífica existente em *Passiflora* (FERREIRA; OLIVEIRA, 1991; MELETTI et al., 2005; ARAÚJO et al., 2008). Grande parte dessa variabilidade está distribuída no território brasileiro, com aproximadamente 140 espécies (CERVI, 2006), dentre as quais, 87 são endêmicas do Brasil (CERVI et al., 2010). Isso coloca o país numa condição privilegiada quanto aos recursos genéticos das passifloras, uma vez que é o maior centro de diversidade genética do gênero (SOUSA; MELETTI, 1997).

Levando em consideração que o Brasil constitui um dos maiores centros de diversidade das passifloras e que os recursos genéticos definidos como uma fração da biodiversidade que tem previsão de uso atual ou potencial, compreendendo variedades tradicionais, variedades melhoradas, linhas avançadas e parentes silvestres (GIACOMETTI, 1993), faz-se necessária promover a proteção adequada desses recursos genéticos no país.

A conservação do germoplasma de *Passiflora* no Brasil é realizada principalmente, por meio de coleções de plantas no campo (conservação *ex situ*), sob a forma de sementes em câmaras frias (FERREIRA, 2005), além de conservação *in vitro* (VIEIRA; CARNEIRO, 2004). De acordo com Ferreira (2005), nos últimos anos houve um incremento considerável no total de coleções e acessos de *Passiflora*, a exemplo dos Bancos de Germoplasma existentes no CPAC (Embrapa Cerrados) (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2011), CNPMF (Embrapa Mandioca e Fruticultura), CPATSA (Embrapa Semiárido), UFPI (Universidade Federal do Piauí) e na UESC (Universidade Estadual de Santa Cruz) que vêm sendo mantidos, ampliados e caracterizados (RAMOS et al., 2008).

Por outro lado, existem várias espécies silvestres de *Passiflora* com potencial agrônomico que não foram exploradas, a exemplo de *P. cincinnata*, de ocorrência espontânea na região semiárida do Nordeste brasileiro (ARAÚJO et al., 2008). Estes autores verificaram

existência de grande variabilidade para vários caracteres de interesse agrônômico nesta espécie. A variabilidade intraespecífica encontrada entre os acessos de *P. cincinnata* coletados em diferentes estados do Nordeste, serviu de base para formação do BAG (Banco Ativo de Germoplasma) de Maracujá da Embrapa Semiárido, em Petrolina-PE (ARAÚJO, 2007; ARAÚJO et al., 2008), composto por 55 acessos, cujo início ocorreu no ano de 2004 (ARAÚJO et al., 2011). Posteriormente, 14 acessos foram inseridos, sendo quatro pertencentes à espécie *P. setacea*, três de *P. edulis*, dois de *P. luetzelburgii* Harms (Figuras 1E e F), e os outros referentes a acessos únicos das espécies *P. alata*, *P. caerulea*, *P. laurifolia*, *P. quadrangularis* e *P. subrotunda* Mast. Os acessos são conservados *in vivo* (campo e telado) e, para garantir regeneração futura, as sementes dos acessos são conservadas também em câmara fria. Além disso, mesmo com o incremento no número de acessos e espécies, há necessidade de fortalecer constantemente as ações para ampliação do BAG. O BAG foi criado visando à conservação dos recursos genéticos das espécies citadas, com posterior caracterização (ARAÚJO et al., 2011), uma vez que as espécies silvestres no semiárido do Nordeste brasileiro encontram-se ameaçadas de extinção e várias práticas desenvolvidas na região levam à perda de diversidade genética (ARAÚJO et al., 2008), como o desmatamento, o superpastejo e dentre outras (QUEIROZ et al., 1993).

Entre as espécies que compõem os Bancos de Germoplasma e o potencial que cada uma representa, as espécies silvestres são fontes de genes para o melhoramento do maracujá amarelo, podendo ser utilizado como porta enxerto e na obtenção de híbridos de maracujazeiro para diferentes finalidades, seja ornamental ou como fonte de resistência a doenças (FALEIRO et al., 2006; FALEIRO et al., 2008).

Para isso, a hibridação interespecífica torna-se uma técnica útil e frequentemente utilizada para a transferência de genes de um genótipo resistente para um susceptível (VANDERPLANK, 2000). Em *Passiflora*, de maneira geral, as hibridações interespecíficas têm sido voltadas basicamente para a transferência de caracteres favoráveis de outras espécies para *P. edulis*, especialmente genes de resistência (MELETTI et al., 2005), uma vez que é considerada altamente susceptível a várias doenças causadas por bactérias, fungos e vírus que ameaçam a expansão e a produtividade dos cultivos (MELETTI; BRUCKNER, 2001). Com isso, este maracujá tem sido alvo de hibridações em diversos programas de melhoramento genético (JUNQUEIRA et al., 2005; MELETTI, 2011), os quais utilizam espécies silvestres do gênero como alternativas para ampliação da base genética a resistência a diversas doenças, que podem ser combinadas com características de produtividade e qualidade de frutos (BELLON et al., 2007).

Neste sentido, vários autores relatam ter havido sucesso na obtenção de híbridos de *Passiflora*, através da utilização de técnicas de hibridação sexual e somática (BARBOSA; VIEIRA, 1997; SOARES-SCOTT et al., 2003; CUCO et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2005; BARBOSA et al., 2007; JUNQUEIRA et al., 2008), bem como, a obtenção de híbridos interespecíficos para fins ornamentais (ULMER; MACDOUGAL, 2004; CONCEIÇÃO et al., 2011; SANTOS et al., 2012).

Citogenética Vegetal

Técnicas, aplicações e citogenética no maracujazeiro

Considerando a expressiva variabilidade genética inter e intraespecífica de *Passiflora*, a análise citogenética permite selecionar espécies com genótipos promissores ao cruzamento interespecífico (OHRI, 1998). Além disso, as análises citogenéticas podem trazer contribuições indispensáveis no sentido de aumentar a eficiência das estratégias de conservação e na condução de programas de melhoramento com a espécie. Tais pesquisas, também, têm contribuído para o estudo da evolução, principalmente porque os cromossomos constituem o próprio material genético, o que os tornam significativos para o rumo evolutivo das espécies. Cada cromossomo ou par de cromossomos representa um papel decisivo no desenvolvimento de um indivíduo. Por isso, o número de cromossomos e as variantes que cada um deles apresenta, dentro de uma espécie, são dados importantes para a determinação da posição filogenética e taxonômica (GUERRA, 1988).

Dentre as técnicas citogenéticas, a análise do processo meiótico é considerada importante na confirmação do sucesso das hibridações. Tal análise fornece informações relevantes a respeito do pareamento entre os homeólogos, da recombinação cromossômica e do grau de irregularidades e viabilidade gamética (SOUZA et al., 2003). O estudo da estabilidade meiótica, juntamente com a análise da viabilidade do grão de pólen, permite indicar o potencial dos genótipos em possíveis cruzamentos, fornecendo subsídios para usos futuros em programas de seleção, cruzamento e produção de sementes viáveis (VARGAS et al., 2004).

Associadamente, técnicas de coloração diferencial com fluorocromos têm sido empregadas nos estudos citogenéticos, possibilitando uma análise mais detalhada dos cariótipos a partir de dados citomoleculares, como os bandeamentos com fluorocromos DAPI (4'-6' diamidino-2-10-fenilindol), que destaca regiões heterocromáticas ricas em bases AT (Adenina e Timina), e CMA₃ (cromomicina A₃), que tem afinidade por regiões

heterocromáticas ricas em bases CG (Citosina e Guanina). Os relatos de análise de cromatina com auxílio de fluorocromos indicam que em diversos grupos vegetais a heterocromatina constitutiva é rica em AT (FELIX e GUERRA, 2000; BESENDORFER et al., 2002; BARROS E SILVA; GUERRA, 2009; BORTOLETI et al., 2012; MORAES et al., 2013). Já a heterocromatina constitutiva rica em CG, tem sido frequentemente associada às RONS (Regiões Organizadoras de Nucléolos) (MOSCONE et al., 1996; FORNI-MARTINS; GUERRA, 1999; GUERRA et al., 2000; MELO et al., 2001; CUCO et al., 2005; MORAES; GUERRA, 2010; BORTOLETI et al., 2012; VIANA; SOUZA, 2012; BERNARDES et al., 2013).

Posteriormente, com o advento das técnicas de hibridização molecular *in situ*, é possível localizar diretamente nos cromossomos sítios específicos de DNA, entre os quais, sequências repetitivas arranjadas em tandem como as teloméricas, centroméricas e os genes ribossômicos. A localização de sequências ribossomais vem sendo empregada no estudo dos cariótipos de *Passiflora* (MELO; GUERRA, 2003), *Vigna Savi* (BORTOLETI et al., 2012), Asteraceae (MORAES; GUERRA, 2010; BERNARDES et al., 2013), *Epidendrum L.* (MORAES et al., 2013). Atualmente, através do emprego da GISH (*Genomic In Situ Hybridization*; Hibridização Genômica *in situ*), que é uma variação FISH (*Fluorescent situ Hybridization*; Hibridização *in situ* Fluorescente), a qual utiliza sondas genômicas, tem possibilitado a identificação de cromossomos em híbridos interespecíficos oriundos de diferentes parentais e em espécies aloploidoides (GUERRA, 2004), como observado nos gêneros *Epidendrum L.* (MORAES et al., 2013), *Jatropha L.* (SOUZA et al., 2014), *Spondias L.* (ALMEIDA et al., 2007) e *Passiflora* (MELO et al., 2015).

Em *Passiflora*, diversos trabalhos com citogenética foram desenvolvidos, mas ainda considera-se um número baixo em relação ao número de espécies existentes. Melo et al. (2001) verificaram, através da análise convencional e bandeamento com fluorocromos em 31 espécies de *Passiflora*, uma ampla variação no número cromossômico, sendo considerados três números básicos para o gênero: $x = 6$, $x = 9$ e $x = 12$. Posteriormente, Melo e Guerra (2003) identificaram quatro grupos cromossômicos para *Passiflora*, baseados na variação do número básico e na distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S. Particularmente, as espécies *P. edulis* e *P. cincinnata* foram incluídas no grupo cromossômico três, caracterizado por apresentar $x = 9$, dois pares de sítios de DNAr 45S, sendo consideradas citologicamente semelhantes. Em outro estudo, Viana e Souza (2012) mediante uso de diferentes técnicas citogenéticas, verificaram existir uma estreita relação entre as espécies *P. cacaoensis* Bernacci e Souza e *P. edulis*, embora sejam espécies diferentes.

Para híbridos somáticos e sexuais de *Passiflora*, os estudos cariotípicos realizados ainda são escassos. Na maioria dos híbridos obtidos, o número cromossômico obtido foi de $2n = 18$ ou $2n = 36$, por se tratarem de hibridações interespecíficas sexual ou somática envolvendo espécies de interesse agrônomico (SOARES-SCOTT et al., 2005). Outros híbridos foram caracterizados em termos de número cromossômico, verificando-se $2n = 18$ nos genótipos *P. moliformis* L. x *P. laurifolia* (STOREY, 1950), *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. amethystina* Mikan (BARBOSA; VIEIRA, 1997), *P. edulis* f. *flavicarpa* x *P. setacea* e *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. incarnata* L. (SOARES-SCOTT et al., 2003), *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. cincinnata* Master (BARBOSA et al., 2007), *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. amethystina* (CUCO et al., 2005), *P. edulis* f. *flavicarpa* x *P. cincinnata* (COELHO, 2009), sendo os dois últimos caracterizados também através da localização de bandas CMA⁺/DAPI e de sequências de DNAr 45S. Entretanto, outros números cromossômicos foram notados em *P. quadrangularis* x *P. racemosa* Brot. (BECKETT, 1960) com $2n = 27$, *P. palmeri* Rose var. *sublanceolata* Killip x *P. foetida* var. *foetida* L. com $2n = 22$ e $2n = 20$ (SANTOS et al., 2012).

Cultura de Tecidos Vegetal

Técnicas, aplicações e cultura de tecidos no maracujazeiro

A cultura de tecidos é considerada uma importante ferramenta biotecnológica, utilizada para vários estudos, como a compreensão dos fatores responsáveis pelo crescimento, metabolismo, diferenciação e morfogênese das células vegetais. Podendo, também, ser utilizada para estudos aplicados, como micropropagação, produção de compostos secundários, transformação genética, manutenção de germoplasma *in vitro* e limpeza clonal, baseando-se nos princípios da totipotencialidade e competência celular (SMITH, 2000).

A micropropagação é uma das técnicas da cultura de tecidos de maior impacto, com resultados promissores e tem sido amplamente utilizada na obtenção de plantas saudáveis e vigorosas em escala comercial (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), mediante a utilização de três etapas básicas: estabelecimento, multiplicação e enraizamento (MURASHIGE, 1977; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Além disso, esta técnica contribui para o melhor entendimento dos eventos de diferenciação celular e auxilia na obtenção de materiais vegetais que apresentam dificuldade de regeneração (LIMA et al., 2004; BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010).

O processo de desenvolvimento de uma nova planta pode ocorrer de duas formas: embriogênese somática ou organogênese. Na embriogênese somática ocorre a formação de um embrióide a partir de uma célula somática ($2n$). Por outro lado, a organogênese é uma via de desenvolvimento na qual, órgãos vegetais (explantes) são induzidos à diferenciação a partir de uma ou várias células, podendo ser direta ou indireta (MANTEL et al., 1994). Durante este processo, os fatores que mais influenciam na determinação da rota morfogenética são: o genótipo selecionado, a fonte de explante escolhida, e a condição da cultura (CALDAS et al., 1998). Além disso, o balanço durante a utilização de substâncias reguladoras de crescimento como as auxinas e as citocininas, que são as classes mais utilizadas, conduzirá o desenvolvimento do explante (GEORGE, 2008).

Em *Passiflora*, mesmo as espécies apresentando grande potencial morfogenético, os resultados em termos de eficiência de protocolos de estabelecimento, desenvolvimento, regeneração e conservação *in vitro* não foram obtidos para a maioria das espécies. Essa limitação se dá principalmente por alguns fatores, dentre eles, a variação da resposta entre genótipos quando são utilizadas espécies silvestres (FARIA et al., 2007). Dessa forma, torna-se necessário o estabelecimento de protocolo para cada espécie, uma vez que o sucesso do cultivo *in vitro* é dependente do genótipo (PINHAL et al., 2011). O estabelecimento *in vitro* é essencial quando se pretende fazer a manutenção de germoplasma usando procedimentos biotecnológicos em diversas espécies de maracujazeiro (PASSOS; BERNACCI, 2005). Os mesmos autores relataram que apenas 3% das espécies foram cultivadas *in vitro*, sendo *P. edulis* a mais cultivada, incluindo várias áreas de aplicação da técnica.

Santos et al. (2010), por exemplo, testaram diferentes meios de cultura e concentrações de sacarose na micropropagação de *P. setacea* e verificaram maior crescimento das brotações quando cultivados no meio MSM acrescido de aproximadamente 30 g L⁻¹ de sacarose. Em outra espécie, *P. foetida*, foi observado melhor desenvolvimento *in vitro* utilizando o meio (½) MS (Murashige Skoog) (SOARES et al., 2012). No entanto, em outras espécies de *Passiflora*, incluindo *P. edulis*, o melhor desenvolvimento *in vitro* foi observado no meio MS completo (FARIA et al., 2007). Para *P. cincinnata* e *P. edulis*, foi relatada obtenção de organogênese direta a partir da inoculação de segmentos de raízes em meio MS suplementado com GA₃ (Ácido Giberélico) (SILVA et al., 2011). Por outro lado, Melo et al. (1999) realizaram o estabelecimento *in vitro* em genótipos de aceroleira utilizando os meios MS, DKW e WPM e verificaram os melhores resultados para os meios DKW e WPM.

Marcadores moleculares ISSR no maracujazeiro

Os marcadores moleculares são definidos como qualquer fenótipo molecular derivado de um polimorfismo de sequência de DNA, referente ao sítio conhecido ou não no genoma, sendo considerados ferramentas úteis para detecção da variabilidade genética ao nível de sequência de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Nas últimas décadas, várias técnicas moleculares, foram introduzidas e utilizadas rotineiramente, tanto marcadores codominantes (polimorfismos de isoenzimas, microssatélites) quanto dominantes, dentre eles o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*; DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso), AFLP (*Amlified Fragment Length Polymorphism*; Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*; Sequências Simples Repetitivas Internas) (REDDY et al., 2002; GANGA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008).

ISSR é uma dentre muitas técnicas baseada em PCR (*Polymerase Chain Reaction*; Reação em Cadeia da Polimerase) que utiliza *primers* de sequência simples repetitiva (16 a 20 pb) para amplificar regiões entre sequências alvo. Essa técnica pode ser aplicada para analisar praticamente qualquer organismo, mesmo aqueles para os quais se dispõe de pouca ou nenhuma informação genética prévia (ARCADE et al., 2000), uma vez que não necessita de informações prévias da sequência do genoma da espécie. Tais marcadores permitem o uso em diferentes grupos, pois possuem alta reprodutibilidade, geram uma grande quantidade de fragmentos polimórficos, são bastante informativos, rápidos de usar e pouco onerosos (ZIETKIEWICZ et al., 1994, BORNET; BRANCHARD, 2001; BORNET et al., 2002). Além disso, possuem fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb (FALEIRO, 2007).

Os marcadores ISSRs têm se revelado bastante eficientes em diversos estudos de identificação da variabilidade genética intra e interespecíficas, a exemplo de várias frutíferas com importância econômica reconhecida ou não (ROCHA et al., 2012), dentre elas, videira (WU et al., 2009), umbu-cajazeira (SANTANA et al., 2011), manga (ROCHA et al., 2012), mamão (JESUS et al., 2013), dentre outras. Em jenipapeiro, os marcadores ISSRs foram utilizados na caracterização de germoplasma, confirmando a eficiência desse marcador, principalmente pela amplificação de 86% de loci polimórficos, permitindo com isso, avaliar a diversidade genética dos acessos estudados (SANTOS, 2012).

Em *Passiflora*, estes marcadores vêm sendo utilizados devido, principalmente, à ampla variabilidade existente, a exemplo de *P. edulis*. Santos et al. (2011) verificaram existir alto percentual de bandas polimórficas nas espécies *P. edulis* e *P. alata* (98%) e identificaram ainda, a grande utilidade dos ISSRs para estudos de diversidade genética.

Costa et al. (2012) relataram o uso potencial dos marcadores moleculares ISSR na determinação do polimorfismo molecular em germoplasma melhorado e não melhorado de maracujazeiro, sendo possível verificar alto polimorfismo independente do genótipo analisado, embora os genótipos não melhorados tenham apresentado maior percentual. Estes autores verificaram baixa porcentagem de bandas monomórficas, indicando alta variabilidade genética intraespecífica nos acessos analisados.

Neste contexto, o presente estudo objetivou caracterizar citogenética e molecularmente espécies parentais e híbridos interespecíficos, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Maracujá da Embrapa Semiárido, bem como avaliar o estabelecimento e multiplicação *in vitro* de genótipos de maracujazeiro, submetidos a diferentes formulações de meios de cultura e citocininas, visando subsidiar futuros trabalhos de caracterização de germoplasma e de pré-melhoramento do maracujazeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. C. S. et al. Karyotype differentiation among Spondias species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 155, p. 541-547, 2007.

ARAÚJO, F. P. **Caracterização da variabilidade morfoagronômica de maracujazeiro (*Passiflora cincinnata* Mast.) no semi-árido brasileiro**. 2007. 94 f. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômica, Botucatu, São Paulo, 2007.

ARAÚJO, F. P.; SILVA, N.; QUEIROZ, M. A. Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* Mast. com base em descritores morfoagronômicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, p. 723-730, 2008.

ARAÚJO, F. P.; VALERIANO, J. C.; COELHO, M. S. E.; MELO, N. F. Banco Ativo de Germoplasma de *Passiflora* da Embrapa Semiárido. In: SIMPÓSIO DA REDE DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS DA BAHIA, 2011, Juazeiro, BA. **Anais...** Juazeiro: UNEB, 2011.

ARCADE, A. F. et al. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 299-307, 2000.

BARBOSA, L. V.; VIEIRA, M. L. C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener – *P. amethystina* Mikan. **Euphytica**, Wageningen, v. 98, p.121-127, 1997.

BARBOSA, L. V. et al. Cytological behaviour of the somatic hybrids *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* + *P. cincinnata*. **Plant Breeding**, v. 126, p. 323-328, 2007.

BARROS E SILVA, A. E.; GUERRA, M. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 85, p. 115-125, 2009.

BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.) **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 15-50.

BECKETT, K. A. A hybrid passion flower. - **Journal of the Royal Horticultural Society**, v. 85, p. 184-186, 1960.

BELLON G. et al. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, p. 124-127, 2007.

BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; AZEVEDO FILHO, J. A.; LORENZI, H.; PEIXOTO, M. *Passiflora ischnoclada* Harms (Passifloraceae), uma espécie endêmica de São Paulo e em perigo de extinção. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE EDUCAÇÃO AMBIENTAL NA AGRICULTURA, 4., Campinas. **Anais...** Campinas: IAC, p.29-30, 2002.

BERNARDES, E. C. S. et al. Intra- and interspecific chromosome polymorphisms in cultivated *Cichorium* L. species (Asteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 36, p. 357-363, 2013.

BESENDORFER, V. et al. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss (Aliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 139, p. 99-108, 2002.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 209–215, 2001.

BORNET, B. et al. High informative nature of Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) sequences amplified with tri- and tetranucleotide primers from cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) DNA. **Genome**, Ottawa, v. 45, p. 890-896, 2002.

BORTOLETI, K. C. A. et al. Chromatin differentiation between *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek and *V. unguiculata* (L.) Walp. (Fabaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 298, p. 689-693, 2012.

BRUCKNER, C. H.; SUASSUNA, T. M. F.; RÊGO, M. M.; NUNES, E. S. Auto-incompatibilidade do maracujá – implicações no melhoramento genético. In: FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N. T. V., BBRAGA, M. F. (Eds) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p.316-338.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. M. (Ed) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, 1ª ed, Brasília: Embrapa-SPI & Embrapa-CNPH, 1998. p87-132.

CERVI, A. C. Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueira**, Madrid, v. 45, p. 1-92, 1997.

CERVI, Armando Carlos. O gênero *Passiflora* (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. **Adumbrationes ad Summae Editionem**, Madrid, v.16, p.1-5, 2006.

CERVI, A. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; BERNACCI, C. Passifloraceae. In: Forzza, R.C. et al. (eds.). Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000182>>. Acesso 20 Out 2012.

COELHO, M. S. E. **Caracterização citogenética de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg., *P. cincinnata* Mast. e seu híbrido interespecífico**. 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, 2009.

CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S. et al. Hybridization among wild passionflower species. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.34, n.2, p.237-240, 2011.

COSTA, J. L. et al. Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, 12: 253-260, 2012.

CUCO, S. M. et al. Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. **Caryologia**, Italy, v. 58, p. 220–228, 2005.

FARIA, G. A. et al. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n.4, p. 535-543, 2007.

FARINAZZO, N. M.; SALIMENA, F. R. G. Passifloraceae na Reserva Biológica da Represa do Grama, Descoberto, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 4, p. 823-833, 2007.

FALEIRO, F. G. Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102p.

FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; PIO VIANA, A.; BRUCKER, C.; LARANJEIRA, F. F.; DAMASCENO, F.; MELETTI, L. M. M.; CONSOLI, L.; SOUSA, M. A. F.; SILVA, M. S.; PEREIRA, M. G.; STENZEL, N.; SHARMA, R. D. Demandas para as pesquisas relacionadas ao melhoramento genético. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: demandas para a pesquisa**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. 54 p.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FÁVERO, A. P.; LOPES, M. A. Pré-melhoramento de plantas: experiências de sucesso. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q. (Eds). **Pré melhoramento, melhoramento e pós melhoramento: estratégias e desafios**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p.43-62.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. Recursos genéticos: conservação, caracterização e uso. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JÚNIOR, F. B. (Eds). **Bioteecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. p.511-551.

- FELIX, L. P.; GUERRA, M. S. O cariótipo de *Nhotoscordum pulchellum* (Alliaceae) com ênfase na heterocromatina e nos sítios de rDNA. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, Córdoba, v. 35, n. 3-4, p. 283-289, 2000.
- FERREIRA, F. R. Recursos Genéticos de *Passiflora*. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.40-51.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220 p.
- FERREIRA, F. R.; OLIVEIRA, J. C. Germoplasma de *Passiflora* no Brasil. In: SÃO JOSÉ, A. R. (Ed.) **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p.187-201.
- FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. **A new infrageneric classification of *Passiflora***. Paper presented at the IBC in August, St. Louis, USA, 1999.
- FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Passiflora**, v.14, n.1, p.34-38, 2003.
- FORNI-MARTINS, E. R.; GUERRA, M. Longitudinal differentiation in chromosomes of some *Sesbania* scop. Species (Fabaceae). **Caryologia**, Italy, v. 52, n.1-2, p.87-103, 1999.
- GANGA, R. M. D. et al. Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares fAFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 494-498, 2004.
- GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure: background. In: GEORGE, E. V.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. Springer, Dordrech, The Netherlands. 2008. p. 1-28.
- GIACOMETTI, D. C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: SIMPOSIO NACIONAL DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1992, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: Embrapa - CNPMF, 1993. p. 13-27.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. (1ª ed) Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998, p183-260.
- GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral**. Guanabara. Rio de Janeiro, 1988.
- GUERRA, M.; BARROS E SILVA, K. G. B.; EHRENDORFER, F. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae – A case of parallel chromosomal evolution. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 87, n. 5, p. 735-747, 2000.
- GUERRA, M. **FISH** – conceitos e aplicações na citogenética/ Organizado por Marcelo Guerra – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 184p.
- HANSEN, A. K. et al. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany**, v. 31, p. 138-150, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Banco de dados agregados: produção agrícola municipal. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613ez=p&o=23&i=P>. (Acesso em 15 janeiro 2013).

JESUS, O. N. et al. Use of morpho-agronomic traits and DNA profiling for classification of genetic diversity in papaya. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, p. 6646-6663, 2013.

JUDD, W. S. **Plant Systematics**. A Phylogenetic approach, New York: Inc. Press, 1999. 464p.

JUNQUEIRA, K. P. et al. Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 191-196, 2008.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L. C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.81-106.

JUNQUEIRA, N. T. V. et al. Características físico-químicas e produtividade de acessos de *Passiflora nitida* Kunth procedentes do Centro-Norte do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, p. 791-797, 2010.

KILLIP, E. P. The American species of Passifloraceae. Publications of the Field Museum of Natural History. **Botanical Series**, v. 19, p. 1-613, 1938.

LIMA, A. A. et al. Cultura de Tecidos em Maracujazeiros. In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P. **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 95-106.

LOPES, S. C. Citogenética do maracujá, *Passiflora* spp. In: SÃO JOSÉ, A. R., FERREIRA, F. R., VAZ, R. L. (Ed) **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 2001. p201-209.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. Técnicas de cultura de tecidos. In: _____. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p.101-181.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, Volume Especial, p.083-091, 2011.

MELETTI, L. M. M.; MAIA, M. L. **Maracujá: produção e comercialização**. Campinas: Instituto Agrônomo. (Boletim Técnico, 181), 1999. 62p.

MELETTI, L. M. M.; BRUCKNER, C. H. Melhoramento genético. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. (Ed.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p.345-385.

- MELETTI, L. M. M. et al. Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agronômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, p. 275-278, 2003.
- MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N. T. V. e BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 3, 2005. p. 55-78.
- MELO, N. F. et al. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.1, p-102-107, 1999.
- 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 DNAr Sites in Passifloraceae L. Species with Distinct Base Chromosome numbers. **Annals of Botany**, London, v. 92, p. 309-316, 2003.
- MELO, C. A. F.; SILVA, G. S.; SOUZA, M. M. Establishment of the genomic *in situ* hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora*. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14 (1), p. 2176-2188, 2015.
- MORAES, A. P.; GUERRA, M. Cytological differentiation between the two subgenomes of tetraploid *Emiliafosbergii* Nicolson and its relationship with *E. sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 287, p. 113-118, 2010.
- MORAES, A. P. et al. Interploidy hybridization in sympatric zones: the formation of *Epidendrum fulgens* x *E. puniceoluteum* hybrids (Epidendroideae, Orchidaceae). **Ecology and Evolution**, v. 3 (11), p. 3824–3837, 2013.
- MOSCONE E. A.; LAMBROU, M.; EHRENDORFER, A. Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 202, p. 37-63, 1996.
- MURASHIGE, T. Manipulation of organ initiation in plant tissue cultures. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 18, p. 1-24, 1977.
- OHRI, D. Genome size variation and plant systematics. **Annals of Botany**, London, v. 82 (Supl. A), p. 75-83, 1998.
- OLIVEIRA, E. J. et al. An integrated molecular map of yellow passion fruit based on simultaneous maximum-likelihood estimation of linkage and linkage phases. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 133, p. 35-41, 2008.
- PASSOS, I. R. S.; BERNACCI, L. C. Cultura de tecidos aplicada à manutenção de germoplasma *in vitro* e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora* spp.). In: FALEIRO, F.; JUNQUEIRA N.; BRAGA, M. (Org.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. 1ª ed. Planaltina, EMBRAPA Cerrados. 2005. p.361-383.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n.7, p. 1136-1142, 2011.

QUEIROZ, M. A. de; NASCIMENTO, C. E. de S.; SILVA, C. M. M. de; LIMA, J. L. dos S. Fruteiras nativas do semi-árido do Nordeste brasileiro: algumas reflexões sobre os recursos genéticos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1992, Cruz das Almas, BA. **Anais...** Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 1993. p. 87-92.

RAMOS, S. R. R.; QUEIROZ, M. A. de; ROMÃO, R. L.; SILVA JÚNIOR, F. J. Recursos genéticos vegetais: manejo e uso. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, p. 205-217, 2008.

REDDY, P. M; SARLA, N.; ANDSIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 128, p. 9–17, 2002.

RIZZI, L.C.; RABELLO, L. A.; MOROZINI FILHO, W.; SAVASAKI, E.T.; KAVATI, R. **Cultura do maracujá-azedo**. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, SAA, Boletim Técnico, 235, 23 p., 1998.

ROCHA, A. et al. Genetic Diversity of ‘Ubá’ Mango Tree Using ISSR Markers. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 50, n. 2, p. 108- 113, 2012.

SANTANA, I. B. B. et al. Variabilidade genética entre acessos de Uambu-Cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011.

SANTOS, P. A. **Manejo do jenipapeiro (*Genipa americana* L.) para produção de madeira e avaliação da diversidade genética por meio de marcadores moleculares**. 2012. 40 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – UFRB, Cruz das Almas, Bahia.

SANTOS, E. A. et al. Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. **Euphytica**, Wageningen, v. 184, p. 389-399, 2012.

SANTOS, F. C. et al. Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. **Ceres**, Viçosa, v. 57, n.1, p. 112-117, 2010.

SANTOS, L. F. et al. ISSR Markers as a Tool for the Assessment of Genetic Diversity in *Passiflora*. **Biochemical Genetics**, v. 49, p. 540-554, 2011.

SAZIMA, I.; SAZIMA, M. Bat pollination of the passion flower, *Passiflora mucronata*, in southeastern Brazil. **Biotropica**, v. 10, p. 100-109, 1978.

SILVA, C. V. et al. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 107, p. 407-416, 2011.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego, California: Academic Press, 2000. 231p.

- SOARES-SCOTT, M. D.; MELETTI, L. M. M.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Meiotic behaviour and pollen fertility in sexual and somatic hybrids of *Passiflora* species. **Caryologia**, Italy, v. 56, n. 1, p. 129-138, 2003.
- SOARES-SCOTT, M. D.; MELETTI, L. M. 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**. Embrapa Cerrados, Planaltina, Brazil, 2005. p 213–240.
- SOARES, W. S. et al. Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, número especial, p. 138-142, 2012.
- SOUZA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. **Maracujá: espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ. 1997. 177p.
- SOUZA, M. M. et al. Meiotic irregularities and pollen viability in *Passiflora edmundoi* Sacco (Passifloraceae). **Caryologia**, Italy, v. 56, p. 157-165, 2003.
- SOUZA, R. C.; MARQUES, D. A.; CARVALHO FILHO, M. M.; SIQUEIRA, W. J.; BENKO-ISEPPON, A. M.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C. Composição genômica de híbridos entre *Jatropha curcas* L. e espécies relacionadas. In: XX ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 2014, Campina Grande, PB. **Anais...** Campina Grande, 2014, p. 8.
- STOREY, W. B. Chromosome numbers of some species of *Passiflora* occurring in Hawaii. **Pacific Science**, v. 4, p. 37-42, 1950.
- ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. **Passiflora: Passionflower of the world**. Timber Press, Inc. Cambridge, 2004.
- VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. 2^a ed. Cambridge: The MIT, 1996. 224p.
- VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. 3^a ed. Cambridge: The MIT Press, 2000. 224p.
- VARASSIN, I. G.; TRIGO, J. R.; SAZIMA, M. The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in south-eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 136, p. 139-152, 2001.
- VARGAS, S. M. et al. Caracterização meiótica de *C. argentea*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 50., Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Costão do Santinho Resort, 2004.
- VIANA, A. J. C.; SOUZA, M. M. Comparative cytogenetics between the species *Passiflora edulis* and *Passiflora cacaoensi*. **Plant Biology**, v. 14, p. 820–827, 2012.
- VIEIRA, M. L. C.; CARNEIRO, M. C. *Passiflora* spp. Passionfruit. In: LITZ, R. (Ed). **Biotechnology of fruit and nut crops**. Oxford: CABI, p. 436-453, 2004.
- WU, Z. L. et al. Analysis of genetic diversity of *Vitis* by using ISSR markers. **Acta Horticulturae**, Leuven v. 827, p. 125-130, 2009.

ZIETKIEWICZ, I.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.

**CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES PARENTAIS
E DO HÍBRIDO INTERESPECÍFICO *Passiflora edulis* Sims x *P. cincinnata* Mast.**

Artigo submetido à revista Euphytica

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES PARENTAIS E DO HÍBRIDO INTERESPECÍFICO *Passiflora edulis* Sims x *P. cincinnata* Mast.

Maria do Socorro Evangelista Coelho^{1*}, Kyria Cilene de Andrade Bortoleti², Francisco Pinheiro de Araújo³, Nataniel Franklin de Melo³

¹Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Avenida Transnordestina S/N - Novo Horizonte, CEP: 44036-900 - Feira de Santana, BA, Brasil

²Colegiado de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, BR 407, km 12, Lote 543, CEP 56304-917, Petrolina, PE, Brasil

³Embrapa Semiárido - Rodovia BR-428, km 152, Zona Rural - Caixa Postal 23, CEP: 56302-970 - Petrolina, PE, Brasil

*Corresponding author. Email: msecelho@yahoo.com.br; Telephone number: +55 87 3866 3700

RESUMO

O gênero *Passiflora* L. é constituído por cerca de 530 espécies amplamente distribuídos, destacando-se *Passiflora edulis* pelo valor comercial e interesse agrônômico e *P. cincinnata* pelo maior período de florescimento e como fonte de resistência e/ou tolerância às principais doenças e pragas. No presente estudo, a segregação meiótica e a viabilidade polínica do híbrido interespecífico (*P. edulis* x *P. cincinnata*) e de seus parentais foram analisadas, bem como suas respectivas composições genômicas foram caracterizadas mediante a coloração com cromomicina A₃ (CMA₃)/ 4'-6' diamidino-2-fenilindole (DAPI), Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) com DNAr 5S/45S e Hibridização Genômica *in situ* (GISH), além do uso de marcadores moleculares Sequências Simples Repetitivas Internas (ISSR). Os resultados demonstraram $2n = 18$ cromossomos para as plantas híbridas e as espécies parentais, meiose regular, um par de sítios de DNAr 5S e dois pares de sítios de DNAr 45S, estando os dois últimos co-localizados com dois pares de bandas CMA₃⁺/DAPI. Na GISH foi observada a formação de três grupos cromossômicos distintos no híbrido interespecífico. A origem híbrida e a relação com as espécies parentais foram também confirmadas pelo uso dos marcadores ISSR.

Palavras-chave Coloração CMA₃/DAPI · Hibridização *in situ* · ISSR · Comportamento meiótico · Maracujá

ABSTRACT

The genus *Passiflora* L. consists of ca. 530 species widely spread highlighting the species *Passiflora edulis*, due to its commercial value and agronomical interest, and *P. cincinnata*, due to its long flowering period and its resistance and/or tolerance to the main diseases and pests. In the present study, the meiotic segregation and pollen viability of the interspecific hybrid (*P. edulis* x *P. cincinnata*) and its parental species were analyzed, and their respective genomic compositions were characterized by means chromomycin A₃ (CMA₃)/ 4'-6' diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining, Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) with 5S/45S ribosomal DNA (rDNA), Genomic *In Situ* Hybridization (GISH) and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. The results demonstrated $2n = 18$ chromosomes for hybrid plants and the parental species, regular meiosis, one pair of 5S rDNA sites and two pairs of 45S rDNA sites, with the last two being co-localized with two pairs from the CMA₃⁺/DAPI⁻ bands. The formation of three distinct chromosome groups was observed by GISH in the interspecific hybrid. The hybrid origin and the relationship with the parental species were also confirmed by means of ISSR markers.

Keywords CMA₃/DAPI staining · *In situ* hybridization · ISSR · Meiotic behavior · Passion fruit

INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) é constituído por aproximadamente 530 espécies (Ulmer e MacDougal 2004; Hansen et al. 2006), com cerca de 140 distribuídas no Brasil (Cervi 2006). Esta diversidade reflete-se na importância econômica do gênero, cujos representantes são explorados para fins ornamentais (Vanderplank 1996), medicinais (Tommonaro et al. 2007) e nas indústrias cosmética e alimentícia, podendo os frutos de várias espécies ser consumidos *in natura* ou processados para a fabricação de sucos, sorvetes, licores e doces, a exemplo do maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims). O Brasil tem se destacado no cenário internacional com a cultura do maracujazeiro (IBGE, 2013), representando mais de 95% dos pomares no país (Meletti 2011). No entanto, esta espécie apresenta alta susceptibilidade a várias doenças, a exemplo de bacterioses, fusarioses e viroses, o que ameaça a expansão e a produtividade dos cultivos. Consequentemente, esta espécie tem sido alvo de hibridações em diversos programas de melhoramento genético (Meletti 2011; Cerqueira-Silva et al. 2014), os quais utilizam espécies silvestres do gênero como alternativas para ampliação da base genética para resistência a diversas doenças, a qual pode ser combinada com características de produtividade e qualidade de frutos (Bellon et al. 2007).

Dentre as espécies silvestres de passifloras no Brasil, *P. cincinnata* Mast. apresenta potencial agrônomico, principalmente, por possuir frutos com sabor característico (Araújo et al. 2008; Cerqueira-Silva et al. 2010), além de apresentar expressiva variabilidade de caracteres de interesse agrônomico (Araújo et al. 2008) como tolerância a doenças (Meletti et al. 2005). Citogeneticamente, apresenta o número cromossômico $2n = 18$ e dois pares de sítios de DNAr 45S, sendo considerada citologicamente semelhante a *P. edulis* (Melo e Guerra 2003), tornando-a potencialmente importante em hibridações para uso em programas de melhoramento genético (Meletti et al. 2005; Cerqueira-Silva et al. 2012).

Embora existam barreiras reprodutivas, diversos autores relatam sucesso na obtenção de híbridos mediante a utilização de técnicas de hibridação sexual e somática em *Passiflora* (Barbosa e Vieira 1997; Soares-Scott et al. 2003; Cuco et al. 2005; Barbosa et al. 2007; Junqueira et al. 2008), bem como a obtenção de híbridos interespecíficos para fins ornamentais (Ulmer e MacDougal 2004; Conceição et al. 2011; Santos et al. 2012). Entretanto, para os programas de melhoramento genético, é de fundamental importância entender o potencial das espécies genitoras, bem como avaliar e caracterizar os híbridos interespecíficos mediante parâmetros genéticos e fenotípicos que permitam estimar a

diversidade genética, as taxas de viabilidade e fertilidade, bem como reconhecer as barreiras pré e pós-zigóticas.

Nesse caso, a constituição e o comportamento cromossômico dos genótipos promissores e dos híbridos podem ser avaliados pelas análises mitótica e meiótica (Soares-Scott et al. 2003; Barbosa et al. 2007; Santos et al. 2012), aplicando técnicas de bandeamento cromossômico (Moraes et al. 2013) e Hibridização *in situ* Fluorescente (Fluorescent *In Situ* Hybridization - FISH) (Souza et al. 2010; Moraes et al. 2013). Recentemente, a Hibridização Genômica *in situ* (Genomic *In Situ* Hybridization - GISH), a qual utiliza sondas genômicas, tem possibilitado a identificação de cromossomos em híbridos interespecíficos e em espécies aloploidos (Raina and Rani 2001), como observado, por exemplo, nos gêneros *Epidendrum* L. (Moraes et al. 2013), *Spondias* L. (Almeida et al. 2007) e *Passiflora* (Melo et al. 2015).

Por outro lado, os marcadores moleculares Sequências Simples Repetitivas Internas (Inter Simple Sequence Repeat - ISSR) têm demonstrado uso potencial na determinação do polimorfismo molecular em germoplasma melhorado e não melhorado de maracujazeiro (Costa et al. 2012), uma vez que possuem alta reprodutibilidade e geram uma grande quantidade de fragmentos polimórficos, permitindo a identificação de variabilidade tanto intra como interespecífica (Dantas et al. 2012).

No presente estudo, a segregação meiótica e a viabilidade polínica do híbrido interespecífico (*P. edulis* x *P. cincinnata*) e de seus parentais foram analisadas, bem como as respectivas composições genômicas mediante a coloração com cromomicina A₃ (Chromomycin A₃ - CMA₃)/ 4'-6'-diamidino-2-fenilindole (DAPI), FISH com DNAr 5S/45S e GISH, além do uso de marcadores moleculares do tipo ISSR, com o objetivo de caracterizar possíveis genótipos para a composição de programas de melhoramento genético do maracujazeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal e Hibridização Interespecífica

Indivíduos das espécies *P. cincinnata* (acesso CPI54) e *P. edulis* (acesso EBA55), pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Maracujá da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Semiárido (CPATSA/EMBRAPA), foram utilizados no cruzamento para obtenção do híbrido interespecífico (*P. edulis* x *P. cincinnata*). Para isso, botões florais em pré-antese dos genitores feminino (*P. edulis*) e masculino (*P. cincinnata*)

foram protegidos com sacos de papel, realizando-se a polinização controlada após 24 h. Após sete dias, foram realizadas as observações quanto à permanência ou abortamento do botão floral e de frutos em início de desenvolvimento.

As sementes pertencentes às espécies genitoras, obtidas anteriormente por polinização controlada, bem como dos seis indivíduos do híbrido interespecífico foram semeadas em substrato, sendo as plântulas germinadas e transplantadas para vasos plásticos contendo vermiculita, areia lavada e solo agrícola (1:1:1) e mantidas em casa de vegetação.

Análise Citogenética

Análise meiótica e viabilidade polínica

Para a análise meiótica, botões florais jovens dos genótipos foram coletados, fixados diretamente em solução Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1) por 24 h a TA e estocados a -20 °C. Para preparação das lâminas, os botões florais foram lavados em água destilada por 5 min e hidrolisados em HCl 5N por 5-10 min. Em seguida, as anteras foram maceradas separadamente em lâminas contendo ácido acético 45%, as quais foram congeladas em nitrogênio líquido, secas ao ar, coradas com Giemsa 2% e as lamínulas foram montadas com Entellan. A coloração convencional com Giemsa seguiu procedimento descrito por Guerra (1983). Para viabilidade dos grãos de pólen, as lâminas foram preparadas e coradas com carmim acético, conforme Radford et al. (1974). Foram contados os polens viáveis e inviáveis de cinco campos aleatórios em cinco lâminas, utilizando a objetiva com aumento de 20 x, totalizando cerca de 800 grãos. Posteriormente, o percentual médio dos grãos de pólen viáveis foi calculado, bem como seus respectivos desvios padrão.

Análise Mitótica

Pré-tratamento, fixação e preparação cromossômica

Para a análise mitótica, pontas de raízes foram coletadas, pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína 2 mM por 24 h à 8 °C ou por 4 h e 30 min à 20 °C, fixadas em etanol: ácido acético glacial (3:1) ou metanol: ácido acético (3:1) e estocadas a -20 °C até sua utilização.

As raízes estocadas em fixador foram lavadas duas vezes em água destilada por 5 min, hidrolisadas em HCl 5N por 20 min para uso na análise convencional, ou digeridos em solução enzimática celulase 2% (Onozuka) e pectinase 20% (v/v) em câmara úmida a 37 °C por 2 h e 30 min para as técnicas de bandeamento cromossômico, FISH e GISH.

Duas metodologias foram empregadas para a confecção das lâminas, de acordo com o fixador utilizado (Guerra 1983; Carvalho e Saraiva 1993). As raízes fixadas em etanol ou metanol: ácido acético (3:1) foram maceradas em lâmina contendo ácido acético 45% e esmagadas entre lâmina e lamínula e submetidas ao nitrogênio líquido. Após remoção das lamínulas, as lâminas foram secas ao ar, coradas com Giemsa 2% e as lamínulas foram montadas com Entellan para análise convencional ou estocadas a -20 °C. Posteriormente, as lâminas foram secas com bomba de ar, mergulhadas em ácido acético 45% por 12 s e secas novamente à temperatura de 37 °C.

As melhores lâminas foram selecionadas mediante coloração com uma solução de 2µg/mL de DAPI/glicerol (1:1, v/v). Logo após, foram descoradas em fixador por 30 min e imersas em álcool etílico absoluto por 1 h à temperatura ambiente, secas ao ar e estocadas a -20 °C até o momento do procedimento da coloração com os fluorocromos CMA₃/DAPI, FISH e/ou GISH.

Coloração com CMA₃/DAPI

A coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI seguiu o protocolo descrito por Schweizer e Ambros (1994). As preparações foram coradas com CMA₃ (0,5 mg/mL) por 1 h e DAPI (2µg/mL) por 30 min, montadas em tampão McIlvaine-glicerol e estocadas em câmara escura, por três dias, para posterior análise em microscópio de fluorescência.

Obtenção de sondas de DNAr 5S e 45S e de DNA genômico

Para localizar os sítios de DNAr 45S, foram utilizadas as sondas SK18S e SK25S, contendo o DNAr 18S e 25S de *Arabidopsis thaliana* L. (Unfried et al. 1989; Unfried e Gruendler 1990). O DNAr 5S foi obtido por PCR, a partir do DNA genômico de *P. edulis*, utilizando os primers 5'-GTGCGATCATAACCAGC(AG)(CT)TAATGCACCGG-3' e 5'-GAGGTGCAACACGAGGACTTCCCAGGAGG-3'. As sondas de DNAr 5S e 45S foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP e biotina-11-dUTP, por nick translation e bionick, respectivamente.

Para GISH, foram utilizados os DNAs genômicos de um dos parentais como sonda e o DNA do segundo parental como DNA de bloqueio. Para a extração de DNA genômico para preparação da sonda e do DNA bloqueio foram utilizadas folhas frescas, de acordo com o procedimento descrito por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações. Após a extração, as amostras foram quantificadas em gel de agarose 0,8% (p/v), usando como referência DNA lambda de pesos moleculares conhecidos. As sondas de *P. edulis* e *P.*

cincinnata foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP por nick translation e utilizadas separadamente tanto em metáfases do híbrido interespecífico como de *P. edulis* (sonda de *P. cincinnata*). A fragmentação do DNA bloqueio foi realizada em banho-maria a 100 °C por 20 min. Após a marcação, a sonda foi estocada a -20 °C até posterior utilização na mistura de hibridização na proporção de 1:20, em relação ao DNA bloqueador.

Hibridização *in situ* (FISH e GISH)

As lâminas estocadas a -20 °C foram pré-tratadas com álcool etílico absoluto: ácido acético glacial (3:1, v/v), seguido de uma série alcoólica 70% e 100% e secas em estufa a 60 °C para posterior utilização na FISH e GISH. A desnaturação dos cromossomos e das sondas, os banhos pós-hibridização e a etapa de detecção foram efetuados de acordo com Heslop-Harrison et al. (1991), modificado por Pedrosa et al. (2002). As misturas de hibridização consistiram de: formamida 50% (v/v), dextran sulfato 10% (p/v), 2x SSC e 2,5-5 ng/μL da sonda. As lâminas foram desnaturadas por 7 min a 75 °C, colocadas em câmara úmida e hibridizadas por 18 a 42 horas a 37 °C. As sondas marcadas com biotina foram detectadas com antibiotina produzida em camundongo em combinação com anticorpo anticamundongo conjugado com tetrametil-rodamina isotiocianato (TRITC) em BSA 1% (p/v). As sondas marcadas com digoxigenina foram detectadas utilizando antidigoxigenina produzida em ovelha conjugada com fluoresceína isotiocianato (FITC; Boehringer Mannheim) e amplificadas com anticorpo antiovelha conjugado com FITC, também em BSA 1% (p/v). As lâminas foram montadas com uma mistura de 2μg/mL DAPI em Vectashield H-1000 (Vector), na proporção 1:1.

Análise dos dados

As células foram analisadas utilizando um microscópio de epifluorescência Leica DM2000 e as imagens das melhores células foram capturadas com câmera Leica FX-350, usando o software Leica QFish. As imagens foram otimizadas para melhor brilho e contraste com o Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Incorporated). Na análise meiótica, as células foram avaliadas observando os estágios da meiose I e II. Cerca de 50 meiócitos para cada fase foram avaliados. As medições do diâmetro dos grãos de pólen viáveis e inviáveis foram realizadas com o auxílio do programa Dino Capture 2.0.

Para a identificação da morfologia cromossômica, cinco metáfases foram mensuradas por meio do programa UTHSCSA Image Tool (Donald et al. 2007), enquanto que a elaboração dos idiogramas foi realizada a partir do comprimento cromossômico mediante o

software Adobe Flash CS6 Professional. A partir das medições cromossômicas, foram estimados os parâmetros cariológicos: comprimento do lote haploide (LHC), comprimento absoluto dos cromossomos (C), razão entre braços (BL/BC) e fórmula cariotípica. Foi adotada a nomenclatura cromossômica sugerida por Guerra (1986) para indicar metacêntrico (M) e submetacêntrico (SM). Os cromossomos foram alinhados de acordo com o comprimento relativo (em relação ao comprimento do lote haploide) em ordem decrescente e identificados por números.

Marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*)

Extração e quantificação de DNA

Folhas frescas foram coletadas e utilizadas na extração de DNA, seguindo procedimento descrito por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações. Após a extração, as amostras foram quantificadas em gel de agarose 0,8% (p/v), através da comparação visual entre a intensidade de bandas do DNA extraído e bandas do DNA Lambda (Invitrogen) com concentrações conhecidas. As amostras de DNA foram diluídas para 20 ng/ μ L em H₂O milli-Q para os ensaios de PCR e armazenadas a -20 °C.

Reação, amplificação do DNA, resolução em gel de agarose e análise dos dados

Foi avaliado o padrão de amplificação para 20 iniciadores do tipo ISSR (Tabela 2). As reações de amplificação foram realizadas em placas para PCR, tendo como volume final 15 μ L por amostra, contendo: 20 ng de DNA, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 0,4 μ M dos iniciadores, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs e 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase. O programa de amplificação constou de uma etapa a 94 °C por 3 min, seguida de 39 ciclos de: 94 °C por 45 s, anelamento a 50 °C por 1 min, e amplificação a 72 °C por 1 min, com extensão final de 72 °C por 7 min. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) corado com brometo de etídio, em uma voltagem de 80 V por 170 min. Como padrão de peso molecular, utilizou-se o DNA ladder 1kb (Affymetrix). Após eletroforese, o gel foi exposto à luz ultravioleta para visualização dos fragmentos e fotografado em equipamento de fotodocumentação LPix-STi. Os produtos amplificados foram avaliados como presença (1) versus ausência (0) de bandas.

RESULTADOS

Análise Meiótica

Comportamento meiótico regular foi observado para todos os indivíduos do híbrido interespecífico (*P. edulis* x *P. cincinnata*) e seus parentais, sendo notada a presença de nove bivalentes em diplóteno e/ou diacinese (Figura 1a), resultando em segregação cromossômica regular durante a anáfase I (Figura 1b) e a anáfase II (Figura 1d), ambas sem formação de pontes anafásicas. No entanto, no híbrido, alguns bivalentes apresentaram pareamento parcial, indicando pequenas regiões homeólogas (setas na Fig. 1a).

A regularidade meiótica refletiu a alta taxa de viabilidade polínica observada nos genitores estudados, sendo o maior percentual apresentado por *P. cincinnata* com 96,9%, seguido de *P. edulis* 89,9% e *P. edulis* x *P. cincinnata* com 89,8% (Tabela 1), sugerindo-se seu uso efetivo em cruzamentos assistidos. Associadamente, esses grãos de pólen viáveis mostraram valores de diâmetro iguais a 82,64, 77,20 e 76,93 μm para os respectivos genótipos, enquanto que, para os grãos de pólen inviáveis, os valores mensurados foram de 58,29, 57,26 e 57,45 μm para de *P. cincinnata*, *P. edulis* e *P. edulis* x *P. cincinnata*, respectivamente (Tabela 1; Fig. 1e, f).

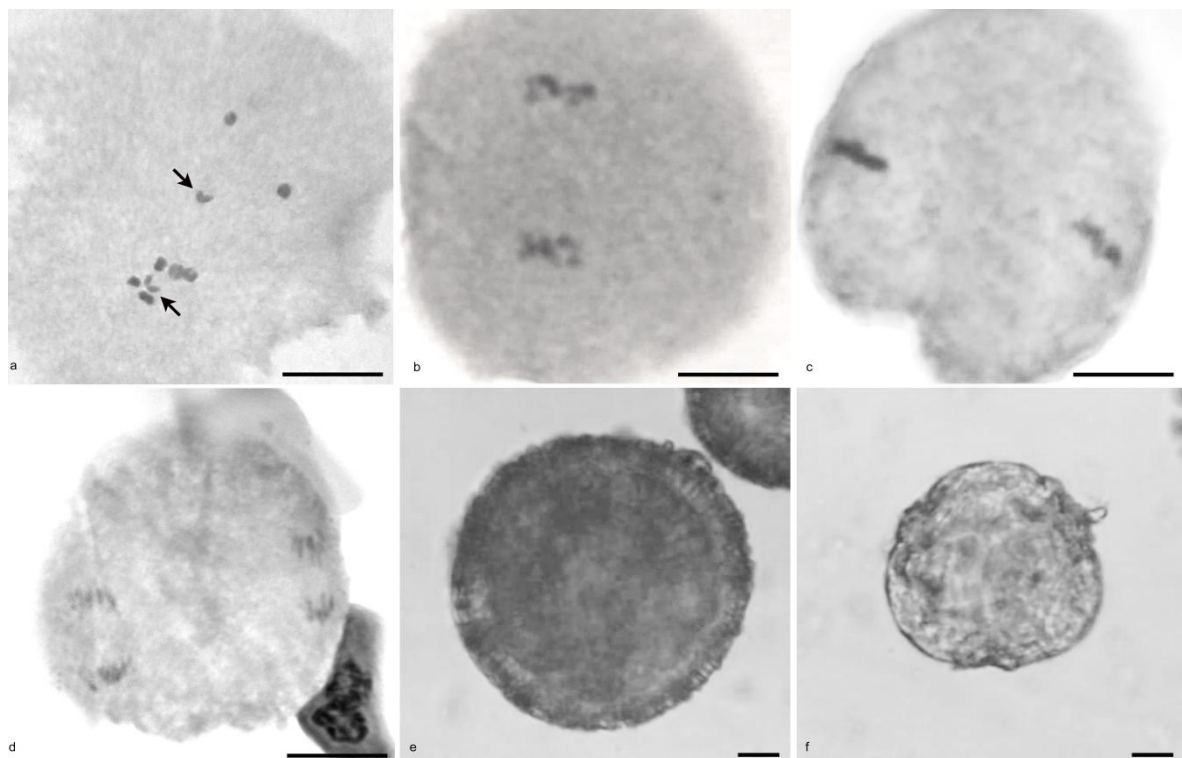


Figura 1 Meiose e viabilidade polínica do híbrido *P. edulis* x *P. cincinnata*: diplóteno com nove bivalentes, com dois cromossomos parcialmente pareados (a), anáfase I (b), metáfase II (c) e anáfase II (d); grão de pólen viável (e) e inviável (f). Barras equivalem a 10 μm .

Tabela 1 Espécies e híbrido interespecífico de *Passiflora* analisados, procedência e valores médios da VP (viabilidade polínica), DGPV (diâmetro do grão de pólen viável) e DGPIV (diâmetro do grão de pólen inviável).

Espécies/híbrido	Procedência	VP (%)	DGPV (μm)	DGPIV (μm)
<i>P. cincinnata</i> (CPI54)*	Genviniano – PI	96,9	82,64 \pm 3,66	58,29 \pm 2,94
<i>P. edulis</i> (EBA55)*	Cairu – BA	89,9	77,20 \pm 2,95	57,26 \pm 4,71
<i>P. edulis</i> x <i>P. cincinnata</i>	Cruzamento interespecífico	89,8	76,93 \pm 2,88	57,45 \pm 4,09

Legenda: *CPIB0554, EBAM0255 correspondem aos códigos no BAG (Banco Ativo de Germoplasma).

Análise mitótica

A análise cariotípica revelou características similares entre parentais e plantas híbridas, visualizando-se núcleos interfásicos semirreticulados (dado não mostrado) e número cromossômico diploide $2n = 18$ (Figura 2). O comprimento dos cromossomos variou de 4,24 a 3,06 μm , 4,12 a 2,73 μm e 4,15 a 3,03 μm para *P. edulis*, *P. cincinnata* e híbrido interespecífico, respectivamente, com a presença de 14 cromossomos metacêntricos e quatro cromossomos submetacêntricos nos três materiais analisados, representando cariótipos simétricos (Figura 3). Com relação aos comprimentos cromossômicos médios e total, *P. edulis* apresentou os maiores valores com 3,72 e 33,48 μm , seguido do híbrido interespecífico (3,66 e 32,94 μm) e *P. cincinnata* (3,37 e 30,34 μm).

A dupla coloração com CMA₃/DAPI revelou a presença de quatro bandas CMA₃⁺/DAPI⁻ no braço longo dos pares cromossômicos 6 e 8 de *P. cincinnata* (Figuras 2a e 3), *P. edulis* (Figuras 2b e 3) e do híbrido (Figuras 2c e 3), as quais se mostraram co-localizadas com os sítios de DNAr 45S revelados pela FISH (Figuras 2d-f). Entretanto, foi notado heteromorfismo em relação ao tamanho do bloco heterocromático dos menores pares cromossômicos (par 8 em *P. cincinnata*, *P. edulis* e no híbrido interespecífico). Em adição, foram observados dois sítios de DNAr 5S nas regiões subterminais do braço longo dos cromossomos 5 de todos os genótipos analisados (Figuras 2d-f e 3).

Nas metáfases mitóticas do híbrido, a GISH utilizando a sonda de *P. edulis* revelou uma marcação diferenciada, permitindo a identificação de três grupos cromossômicos: o primeiro grupo consistiu em oito cromossomos totalmente marcados, possivelmente, originados do parental *P. edulis* (Figura 2j₁); o segundo foi caracterizado pela presença de seis cromossomos parcialmente marcados (Figura 2j₂); e, o terceiro grupo apresentou quatro cromossomos sem marcação (Figura 2j₃), cuja provável origem parental seja de *P. cincinnata*, uma vez que a sonda genômica desta espécie hibridizou quatro cromossomos do híbrido em análise (Figuras 2n₁). Em adição, a sonda de *P. cincinnata* hibridizou parcialmente seis cromossomos das plantas híbridas (Figuras 2n₂), similarmente ao revelado pela marcação com

P. edulis, a exemplo dos cromossomos 6 e 8, portadores de sítios de DNAr. Tal fato ressalta a presença de sequências repetitivas e/ou homeólogas em ambas as espécies, não sendo possível confirmar a origem parental dos seis cromossomos. Também corresponde com os resultados obtidos para o diplóteno do híbrido, na qual alguns cromossomos apresentaram homologia parcial (setas na Fig. 1a), enquanto outros mostraram pareamento completo. Vale salientar que, quando a sonda de *P. cincinnata* (*P. edulis* usado como bloqueador) foi utilizada em metáfases de *P. edulis*, nenhuma marcação foi visualizada no complemento cromossômico (dados não mostrados).

Marcadores ISSR

Quinze dos 20 iniciadores ISSR testados (Tabela 2), foram selecionados resultando na amplificação de 125 fragmentos com tamanhos variando entre 250-1500 pb (média de 8,33 bandas). Oitenta e três fragmentos foram polimórficos (média de 5,53 bandas), representando um polimorfismo médio de 74,8% (Tabela 2).

O número de fragmentos obtidos variou de duas a 17 bandas para os iniciadores TriCAG e DiGT5'CR, respectivamente, sendo que o primeiro apresentou 100% de bandas polimórficas, similarmente ao observado para DiGT5'CY, TriGTG3'RC, TriTGT, TriGTA3'RC e TriGCA3'RC. Por sua vez, o primer DiGT5'CR amplificou apenas 29,4% de fragmentos polimórficos, como pode ser observado na Tabela 2.

De uma maneira geral, não foram observados percentuais discrepantes para a quantidade de bandas formadas por genótipo, sendo verificados 34,4% em *P. edulis* (43 bandas), 33,6% em *P. cincinnata* (42 bandas) e 32% no híbrido interespecífico (40 bandas). Entretanto, foram reveladas três bandas específicas para *P. edulis*, 20 para *P. cincinnata* e quatro para o híbrido interespecífico (Tabela 2). Os iniciadores utilizados permitiram, ainda, identificar marcadores da origem parental dos fragmentos no híbrido interespecífico, sendo verificadas duas bandas diagnósticas em *P. cincinnata* e 20 em *P. edulis*, conforme exemplo mostrado para o iniciador DiGA3'C (Figura 4).

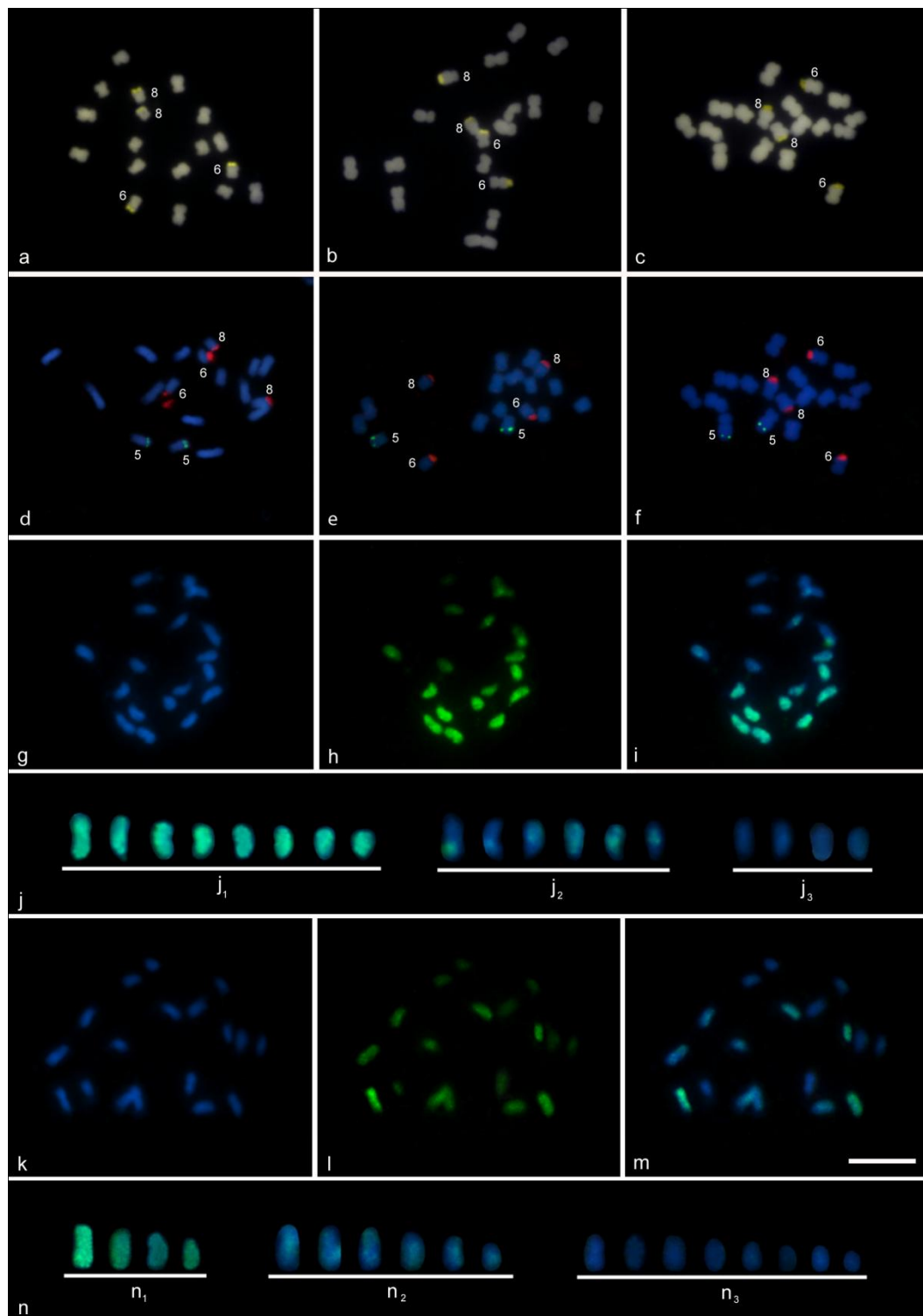


Figura 2 Bandeamento cromossômico (a-c), hibridização *in situ* fluorescente (d-f) e hibridização genômica *in situ* (g-n) em metáfases mitóticas de *P. cincinnata* (a, d), *P. edulis* (b, e) e híbrido interespecífico (c, f-n). Cromossomos 6 e 8 mostrando bandas CMA⁺ em todos os genótipos analisados (a-c), co-localizados com sítios de DNAr 45S (vermelho) e cromossomos 5 mostrando sítios de DNAr 5S (verde) (d-f). GISH no híbrido *P. edulis* x *P. cincinnata* utilizando DNA genômico de *P. edulis* como sonda (g-j) mostrando oito cromossomos completamente marcados (j₁), seis cromossomos parcialmente marcados (j₂) e quatro cromossomos não marcados (j₃). GISH usando *P. cincinnata* como sonda (k-n) revelando quatro cromossomos completamente marcados (n₁), seis cromossomos parcialmente marcados (n₂) e oito cromossomos não marcados (n₃). Barra = 10 μm.

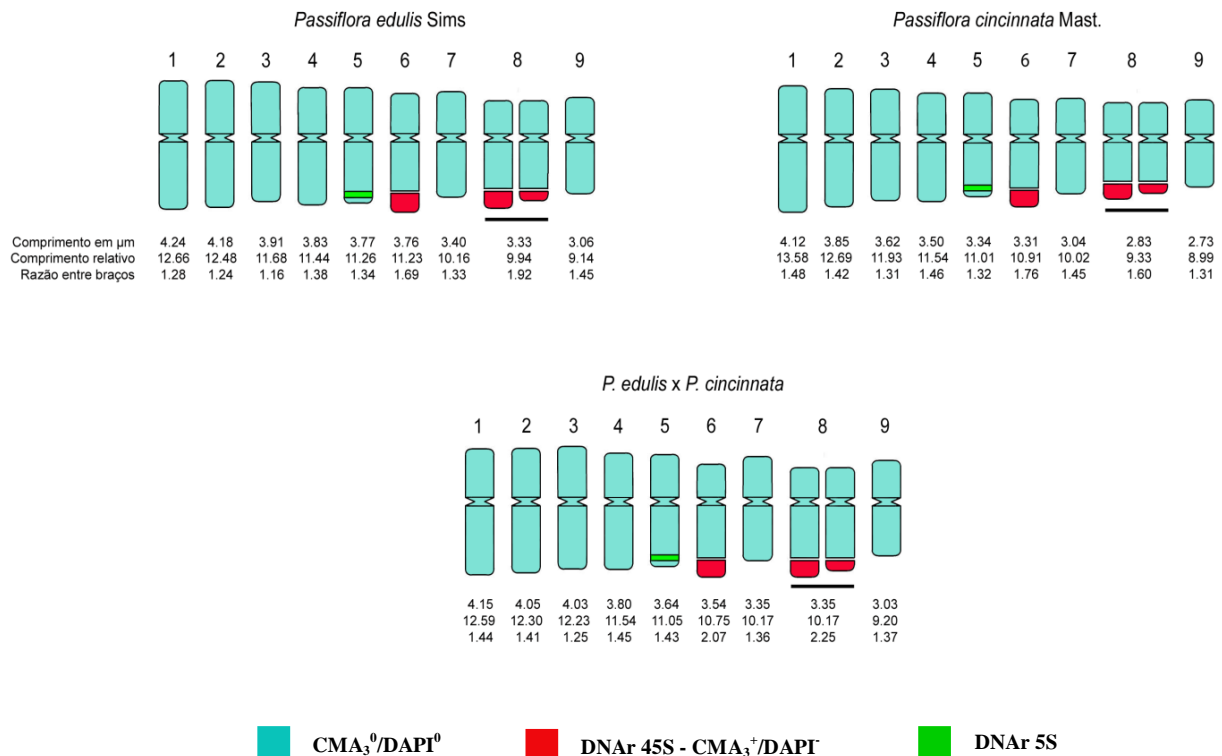


Figura 3 Idiogramas para *P. edulis*, *P. cincinnata* e *P. edulis* x *P. cincinnata* mostrando o comprimento cromossômico absoluto, comprimento relativo, posição centromérica (razão entre braços), distribuição da heterocromatina e loci de DNAr (45S co-localizado) para *P. edulis*, *P. cincinnata* e *P. edulis* x *P. cincinnata*. Os cromossomos foram alinhados de acordo com o comprimento, em ordem decrescente e identificados por números. Para os cromossomos que apresentaram heteromorfismo no tamanho das bandas, foram representados os dois homólogos.

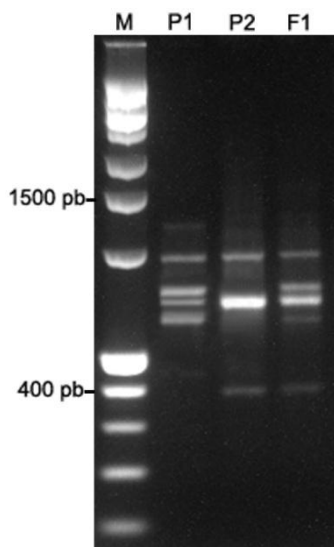


Figura 4 Perfil ISSR utilizando o primer DiGA3'C. M= marcador de peso molecular (1 kb DNA ladder). P1: *P. cincinnata* (parental masculino); P2: *P. edulis* (parental feminino); F1: híbrido interespecífico.

TABELA 2 Iniciadores ISSR utilizados na amplificação das espécies de *Passiflora* L. e do híbrido interespecífico, com suas respectivas sequências, número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), percentagem de polimorfismo (P %), número de bandas por genótipo (NBG) e amplitude de fragmentos (AF).

Primer	Sequência*	NTB	NBP	P (%)	NBG			AF (pb)
					<i>P. cincinnata</i>	<i>P. edulis</i>	Pe x Pc	
1- DiGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	12	6	50,0	4	3	5	400-1250
2- DiGT5'CR	CRGTGTGTGTGTGTGTGT	17	5	29,4	7	5	5	500-1500
3- DiGT5'CY	CYGTGTGTGTGTGTGTGT	3	3	100,0	-	1	2	500-1000
4- TriCAC3'YC	CACCACCACCACCACYC	10	7	70,0	3	5	2	600-1200
5- TriCAC5'CR	CRCACCACCACCACCAC	8	5	62,5	2	3	3	600-1500
6- TriCAC5'CY	CYCACCACCACCACCAC	-	-	-	-	-	-	-
7- TriCAG	CAGCAGCAGCAGCAG	2	2	100,0	2	-	-	550-1000
8- TriCAG3'RC	CAGCAGCAGCAGCAGRC	-	-	-	-	-	-	-
9- TriCAG3'YC	CAGCAGCAGCAGCAGYC	12	6	50,0	3	5	4	600-1250
10- TriGTG3'RC	GTGGTGGTGGTGGTGRC	6	6	100,0	-	3	3	600-900
11- TriTGT	TGTTGTTGTTGTTGT	4	4	100,0	1	1	2	550-1500
12- TriAAC 3'RC	AACAACAACAACAACRC	9	6	66,7	1	4	4	300-1100
13- TriACA 3'RC	ACAACAACAACAACARC	9	6	66,7	2	3	4	350-1100
14- TriACT 3'RC	ACTACTACTACTACTRC	-	-	-	-	-	-	-
15- TriACG 3'RC	ACGACGACGACGACGRC	7	4	57,1	1	3	3	500-1200
16- TriTCG 3'RC	TCGTCGTCGTCGTCGRC	-	-	-	-	-	-	-
17- DiGA5'CR	CRGAGAGAGAGAGAGAGA	10	7	70,0	3	4	3	250-550
18- TriAGT 3'RC	AGTAGTAGTAGTAGTRC	-	-	-	-	-	-	-
19- TriGTA 3'RC	GTAGTAGTAGTAGTARC	4	4	100,0	4	-	-	350-950
20- TriGCA 3'RC	GCAGCAGCAGCAGCARC	12	12	100,0	9	3	-	350-1500
Média		8,33	5,53	74,8				

*R = A + G; Y = C + T

DISCUSSÃO

A hibridização interespecífica tem sido apontada como uma estratégia fundamental em programas de melhoramento genético, uma vez que permite a transferência de características fenotípicas e adaptações genéticas (Slotte et al. 2008; Jorgensen et al. 2011), desempenhando papel fundamental na diversificação de espécies vegetais. No presente estudo, a constituição genômica de um híbrido interespecífico e seus parentais pertencentes ao gênero *Passiflora* foi avaliada mediante técnicas citogenéticas e moleculares, com o intuito de identificar genótipos potenciais para a composição de programas de melhoramento genético do maracujazeiro.

As análises citogenéticas indicaram a ausência de irregularidades meióticas e mitóticas em *P. cincinnata*, *P. edulis* e no híbrido interespecífico, sendo notada uma correta formação de bivalentes e a segregação normal dos cromossomos na anáfase I, bem como alta viabilidade dos grãos de pólen, sugerindo com isso, que os indivíduos híbridos sejam férteis, tornando necessária a realização de retrocruzamentos. Consequentemente, não foram observadas variações cromossômicas, as quais são indicadas como forte barreira pós-zigótica juntamente com a incompatibilidade genética (Moraes et al. 2013), indicando uma similaridade genômica entre os materiais analisados.

A maioria das espécies pertencentes ao gênero *Passiflora* apresenta-se como diploide, sendo classificada em grupos de acordo com o número cromossômico básico, presença de bandas $CMA_3^+/DAPI$ e número de sítios de DNAr 45S (Melo e Guerra 2003). Assim, considerando os resultados obtidos, os acessos parentais *P. cincinnata* e *P. edulis* foram classificados no grupo cromossômico representado pelo número básico $x = 9$ e quatro sítios de DNAr 45S co-localizados com bandas $CMA_3^+/DAPI$, confirmando dados relatados anteriormente na literatura (Melo et al. 2001; Melo e Guerra 2003). Entretanto, as bandas foram localizadas nos pares cromossômicos 6 e 8 em *P. cincinnata* e *P. edulis*, em vez de 4 e 6 (*P. cincinnata*) e 7 e 9 (*P. edulis*) (Melo et al. 2001; Melo e Guerra 2003), que pode ser devido a diferenças na metodologia durante a medição dos cromossomos.

Similarmente aos parentais, o híbrido sexual apresentou estabilidade quanto ao número cromossômico ($2n = 18$), provavelmente pela compatibilidade existente entre as espécies utilizadas no cruzamento interespecífico, fato também notado em outros híbridos interespecíficos deste gênero, a exemplo de *P. edulis* x *P. setacea* (Soares-Scott et al. 2003). Entretanto, essa estabilidade cromossômica nos híbridos nem sempre é mantida, principalmente, devido à ocorrência de conflitos intergenômicos pós-hibridização que levam a

rearranjos estruturais, como eliminação cromossômica e outras alterações no ciclo mitótico. Tal situação foi relatada em híbridos resultantes do cruzamento entre acessos de *P. subanceolata* ($2n = 22$) x *P. foetida* var. *foetida* ($2n = 22$), os quais apresentaram aneuploidia ($2n = 22 - 2$), possivelmente decorrente da inativação de cromossomos por nucleases, degradação de cromatina, supressão da função centromérica e assincronia de fases do ciclo celular (Santos et al. 2012). Por outro lado, é importante salientar que o número $2n = 20$ foi anteriormente relatado *P. foetida* (Melo et al. 2001; Melo e Guerra 2003), o que leva a duas hipóteses: a) erro de contagem, devido a distensão da constrição cromossômica proximal em *P. foetida* a qual frequentemente pode levar a contagem de $2n = 22$; ou b) tendência a estabilidade cariotípica no híbrido em $2n = 20$.

Os números de bandas CMA_3^+ e sítios de DNAr 45S do híbrido foram iguais aos dos parentais, estando estes marcadores localizados nos pares cromossômicos 6 e 8. Em híbridos somáticos ou envolvendo parentais com diferentes níveis de ploidia foi relatado ausência de redução na quantidade de sítios de DNAr 45S, fato descrito, por exemplo, em *Passiflora* (Cuco et al. 2005) e *Epidendrum* (Moraes et al. 2013), possivelmente relacionado a reorganização dinâmica do DNA repetitivo durante o processo de diploidização logo após o evento de hibridização (Leitch e Leitch 2008).

A ocorrência de heteromorfismo de tamanho do sítio de DNAr 45S foi relatada pela primeira vez em *Passiflora*, envolvendo um par cromossômico portador de DNAr 45S – $CMA_3^+/DAPI^-$ de cada material analisado. Provavelmente, esta heterozigidade cromossômica pode ser resultante de eventos de deleção e/ou amplificação da heterocromatina, os quais alteram os comprimentos das unidades de repetições de DNAr, mediante mecanismos de evolução em concerto, *crossing over* desigual, replicação *slippage* e/ou eventos de translocação (Eickbush e Eickbush 2007; Bhargava e Fuentes 2009; Mehrotra e Goyal 2014). Tais mecanismos são responsáveis pela dinâmica evolutiva deste tipo de cromatina, sendo associados à ocorrência de rearranjos cromossômicos em diferentes espécies vegetais, a exemplo de representantes do gênero *Maxillaria* R.P. (Cabral et al. 2006) e *Vigna* Savi (Bortoleti et al. 2012).

Na passicultura, a possibilidade de rearranjos genéticos entre espécies parentais e os seus próprios híbridos (*backcrossing*) tem sido bem explorada em programas de melhoramento genético. Tais rearranjos têm sido avaliados rotineiramente pela GISH, uma vez que esta técnica investiga a origem de diversos híbridos, permitindo a identificação da introgressão de material genético das espécies parentais (Raina e Rani 2001; Silva e Souza

2013), conforme observado nos gêneros *Spondias* L. (Almeida et al. 2007), *Emilia* Cass. (Moraes e Guerra 2010) e *Passiflora* (Melo et al. 2015).

No presente trabalho, a GISH diferenciou a presença de oito cromossomos advindos de *P. edulis*, sugerindo uma maior incorporação de sequências genômicas deste parental. Entretanto, não podemos confirmar a ocorrência de introgressão assimétrica no híbrido devido aos seis cromossomos parcialmente marcados observados. As pequenas marcações parciais podem também revelar a similaridade genômica entre as espécies utilizadas no cruzamento interespecífico (Risso-Pascotto et al. 2005), fato suportado pelo pareamento cromossômico completo de alguns cromossomos no híbrido sexual em análise, favorecendo a ocorrência de recombinação genética, segregação cromossômica regular e, conseqüentemente, a geração de indivíduos férteis, conforme visualizado no presente estudo e em outros trabalhos envolvendo espécies do gênero *Passiflora*, a exemplo de *P. subanceolata* e *P. foetida* var. *foetida* (Santos et al. 2012). A semelhança entre genomas pode ser devido a presença de retro-elementos e outros DNAs repetitivos, os quais compreendem 19,6% do genoma de *P. edulis* (Santos et al. 2014).

O sucesso reprodutivo dos híbridos de maracujazeiro também pode estar relacionado ao sistema de autoincompatibilidade apresentado pelas espécies alógamas, o qual favorece a polinização cruzada e, conseqüente, o fluxo de genes entre os genótipos (Ganga et al. 2004) gerando consideráveis níveis de polimorfismos genéticos. Nesse caso, considerando que a utilização de 7-30 primers de ISSR com geração de 50-200 bandas polimórficas são suficientes para estimar relações genéticas dentro e entre espécies (Colombo et al. 1998), esses marcadores ressaltaram um elevado percentual de polimorfismo entre os genótipos genitores e os indivíduos híbridos analisados no nosso trabalho.

Os marcadores ISSRs mostraram um grau de parentesco entre os genótipos estudados, mediante a identificação da origem dos fragmentos no híbrido em comparação aos parentais. O número de quatro e 20 bandas diagnósticas em *P. cincinnata* e *P. edulis*, respectivamente, confirma a introgressão de genes destas espécies no híbrido interespecífico, conforme anteriormente observado em acessos de *P. edulis* e *P. alata* (Santos et al. 2011; Costa et al. 2012) e outras espécies como *Psammochloa villosa* (Poaceae) (Li e Ge 2001) e no gênero *Vitis* L. (Wu et al. 2009), comprovando a efetividade desses cruzamentos em programas de melhoramento genéticos (Melo et al. 2015).

Tais análises comprovaram a origem híbrida dos genótipos resultantes do cruzamento entre *P. edulis* x *P. cincinnata*, apontando-o como um indivíduo fértil com potencial para uso

posterior em retrocruzamentos com a espécie cultivada ou para compor um novo ativo tecnológico em programas de melhoramento genético do maracujazeiro.

CONCLUSÕES

✓ O híbrido interespecífico (*P. edulis* x *P. cincinnata*) constitui indivíduos férteis, sendo possível a sua utilização na obtenção de novos materiais de maracujá.

✓ Os resultados da GISH permitem confirmar a origem híbrida e distinguir o genoma do híbrido em relação aos parentais. Além disso, o uso da GISH em *Passiflora* mostrou-se muito útil para a identificação de híbridos interespecíficos, sendo um método rápido e confiável, contribuindo tanto para estudos evolutivos como apoio aos programas de melhoramento genético.

✓ Os marcadores do tipo ISSR selecionados possuem grande potencial para detecção de polimorfismos moleculares em genótipos de maracujazeiro, indicando possível parentesco entre os genótipos e podem ser utilizado como ferramenta em trabalhos de caracterização do BAG-Maracujá e de pré-melhoramento.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de Doutorado a Coelho, M.S.E. e PQ-DT a Melo, N.F. e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pelo suporte as atividades da pesquisa.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

Almeida CCS, Lemos Carvalho PC, Guerra M (2007) Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Uumbu-cajá (Anacardiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 155: 541-547. doi: 10.1111/j.1095-8339.2007.00721.x

- Araújo FP, Silva N, Queiroz MA (2008) Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* Mast. com base em descritores morfoagronômicos. *Revista Brasileira Fruticultura* 30:723-730. doi:10.1590/S0100-29452008000300027
- Barbosa LV, Vieira MLC (1997) Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener – *P. amethystina* Mikan. *Euphytica* 98:121-127. doi: 10.1023/A:1003099709021
- Barbosa LV, Mondin M, Oliveira CA, Souza AP, Vieira MLC (2007) Cytological behaviour of the somatic hybrids *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* + *P. cincinnata*. *Plant Breeding* 126:323-328. doi:10.1111/j.1439-0523.2007.01362.x
- Bellon G, Faleiro FG, Junqueira KP, Junqueira NTV, Santos EC, Braga MF, Guimarães CT (2007) Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims com base em marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura* 29:124-127. doi:10.1590/S0100-29452007000100027
- Bhargava A, Fuentes FF (2009) Mutational dynamics of microsatellites. *Mol Biotechnol* 44: 250-266. doi: 10.1007/s12033-009-9230-4
- Bortoleti KCA, Benko-Iseppon AM, Melo NF, Brasileiro-Vidal AC (2012) Chromatin differentiation between *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek and *V. unguiculata* (L.) Walp. (Fabaceae). *Plant Systematics and Evolution* 298:689–693. doi: 10.1007/s00606-011-0551-y
- Cabral JS, Felix LP, Guerra M (2006) Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Biology* 29:659-664. doi: 10.1590/S1415-47572006000400015
- Carvalho CR, Saraiva LS (1993) An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. *Biotechnic and Histochemistry* 68 (3): 142-145. doi: 10.3109/10520299309104684
- Cerqueira-Silva CBM, Conceição LDHCS, Santos ESL, Cardoso-Silva CB, Pereira AS, Oliveira AC, Corrêa RX (2010) Genetic variability in wild genotypes of *Passiflora cincinnata* based on RAPD markers. *Genetics and Molecular Research* 9(4): 2421-2428
- Cerqueira-Silva CBM, Santos ESL, Souza AM, Mori GM, Oliveira EJ, Corrêa RX, Souza AP (2012) Development and characterization of microsatellite markers for the wild south american *Passiflora cincinnata* (Passifloraceae). *American Journal of Botany*: e170–e172, 2012. doi:10.3732/ajb.1100477
- Cerqueira-Silva CBM, Jesus ON, Santos ESL, Corrêa RX, Souza AP (2014) Genetic Breeding and Diversity of the Genus *Passiflora*: Progress and Perspectives in Molecular and Genetic Studies. *International Journal Molecular Sciences* 15: 14122-14152. Doi:10.3390/ijms150814122
- Cervi AC (2006) O gênero *Passiflora* (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. *Adumbrationes ad Summae*. Editionem 16:1-5

- Colombo C, Second G, Valle TL, Charrier A (1998) Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz) with RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 21:105-113. doi:10.1590/S1415-47571998000100018
- Conceição LDHCS, Souza MM, Belo GO, Santos SF, Freitas JCO (2011) Hybridization among wild passionflower species. *Revista Brasileira de Botânica* 34:237-240. doi:10.1590/S0100-84042011000200011
- Costa JL, Jesus ON, Oliveira GAF, Oliveira EJ (2012) Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 12: 253-260. doi:10.1590/S1984-70332012000400004
- Cuco SM, Vieira MLC, Mondim M, Aguiar-Perecin MLR (2005) Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. *Caryologia* 58:220–228. doi: 10.1080/00087114.2005.10589454
- Dantas ACA, Nunes GHS, Araújo SI, Albuquerque LB (2012) Caracterização molecular de acessos de melão coletados no Nordeste brasileiro. *Revista Brasileira de Fruticultura* 34:183-189
- Donald C, Brent DS, McDavid WD, Greer DB (2007) UTHSCSA ImageTool (IT) – Version 3.0. <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/download.html>. Acessado em 26 de julho de 2007
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15
- Eickbush TH, Eickbush DG (2007) Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* 175:477-485. doi:10.1534/genetics.107.071399
- Ganga RMD, Ruggiero C, Lemos EGM, Grili GVG, Gonçalves MM, Chagas EA, Wickert E (2004) Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares fAFLP. *Revista Brasileira de Fruticultura* 26: 494-498
- Guerra M (1983) O uso de Giemsa na citogenética vegetal – comparação entre a coloração simples e o bandeamento. *Ciência e Cultura* 35: 190-193.
- Guerra M (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética* 9:741-743
- Hansen AK, Gilbert LE, Simpson BB, Cervi AC, Jansen RK (2006) Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. *Systematic Botany* 31:138–150. doi:10.1600/036364406775971769
- Heslop-Harrison JS, Schwazarcher T, Ananthawat-Jónsson K, Leitch AR, Shi M (1991) *In situ* hibridization with automated chromosome desaturation. *Technique* 3:109-115
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Banco de dados agregados: produção agrícola municipal. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613ez=p&o=23&i=P>. (Acesso em 15 janeiro 2013).

- Jorgensen MH, Ehrich D, Schmickl R, Koch MA, Brysting AK (2011) Interspecific and interploidal gene flow in Central European Arabidopsis (Brassicaceae). *BMC Evol. Biol.* 11:346. doi:10.1186/1471-2148-11-346
- Junqueira KP, Faleiro FG, Junqueira NTV, Bellon G, Ramos JD, Braga MF, Souza LS (2008) Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura* 30:191-196. doi:10.1590/S0100-29452008000100035.
- Leitch A R, Leitch IJ (2008) Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science* 320:481-483. doi: 10.1126/science.1153585
- Li A, Ge S (2001) Genetic variation and clonal diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR Markers. *Annals of Botany* 87: 585-590
- Mehrotra S, Goyal V (2014) Repetitive Sequences in Plant Nuclear DNA: Types, Distribution, Evolution and Function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 12:164-171. Doi: 10.1016/j.gpb.2014.07.003
- Meletti LMM, Soares-Scott MD, Bernacci LC, Passos IRS (2005) Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (eds) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Embrapa Cerrados, Planaltina, pp 55-78
- Meletti LMM (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura Volume Especial*: 83-91. Doi:10.1590/S0100-29452011000500012
- Melo CAF, Silva GS, Souza MM (2015) Establishment of the genomic *in situ* hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora*. *Genetics and Molecular Research* 14(1): 2176-2188. doi.org/10.4238/2015
- Melo NF, Cervi AC, Guerra M (2001) Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Plant Systematics and Evolution* 226:69-84. Doi: 10.1007/s006060170074
- Melo NF, Guerra M (2003) Variability of the 5S and 45S DNAr Sites in *Passiflora* L. Species with Distinct Base Chromosome numbers. *Annals of Botany* 92:309-316. Doi:10.1590/S0100-29452011000500012
- Moraes AP, Guerra M (2010) Cytological differentiation between the two subgenomes of tetraploid *Emiliafosbergii* Nicolson and its relationship with *E. sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 287: 113-118. Doi 10.1007/s00606-010-0302-5
- Moraes AP, Chinaglia M, Palma-Silva M, Pinheiro F (2013) Interploidy hybridization in sympatric zones: the formation of *Epidendrum fulgens* x *E. puniceoluteum* hybrids (Epidendroideae, Orchidaceae). *Ecology and Evolution*, 3: 3824–3837. doi: 10.1002/ece3.752
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A (2002) Chromosomal map of the model legume *Lotes japonicus*. *Genetics* 161:1661-1672
- Radford AE, Dickison WC, Massey JR, Bell CR (1974) *Vascular plant systematics*. Harper and Row, New York

Raina SN, Rani V (2001) GISH- technology in plant genome research. *Methods in Cell Science* 23:83-104. doi: 10.1023/A:1013197705523

Risso-Pascotto C, Pagliarini MC, Valle CB (2005) Meiotic behavior in interespecific hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria brizantha* (Poaceae). *Euphytica* 145:155-159. doi: 10.1007/s10681-005-0893-z

Santos AA, Penha HA, Bellec A, Munhoz CF, Pedrosa-Harand A, Berges H, Vieira MLC (2014) Begin at the beginning: A BAC-end view of the passion fruit (*Passiflora*) genome. *Genomics* 15:816. doi:10.1186/1471-2164-15-816

Santos EA, Souza MM, Abreu PP, Conceição LDHCS, Araújo IS, Viana AP, Almeida AAF, Freitas JCO (2012) Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. *Euphytica* 184:389–399. doi: 10.1007/s10528-011-9429-5

Santos LF, Oliveira EJ, Silva AS, Carvalho FM, Costa JL and Padua JG (2011) ISSR Markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. *Biochemical Genetics* 49: 540-554

Schweizer D, Ambros PF (1994) Chromosome banding. In: Gosden JR (ed) *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, pp 97-112

Silva GS, Souza MM (2013) Genomic *in situ* hybridization in plants. *Genetics and Molecular Research* 12:2953-2965

Slotte T, Huang H, Lascoux M, Ceplitis M (2008) Polyploid speciation did not confer instant reproductive isolation in *Capsella* (Brassicaceae). *Mol. Biol. Evol.* 25:1472-1481. doi: 10.1093/molbev/msn092

Soares-Scott MD, Meletti LMM, Recco-Pimentel SM (2003) Meiotic behaviour and pollen fertility in sexual and somatic hybrids of *Passiflora* species. *Caryologia* 56:129-138. doi: 10.1080/00087114.2003.10589315

Souza MM, Urdampilleta JD, Forni-Martins ER (2010) Improvements in cytological preparations for fluorescent *in situ* hybridization in *Passiflora*. *Genetics and Molecular Research* 9 (4): 2148-2155. doi: 10.4238/vol9-4gmr951.

Tommonaro G, Segura Rodríguez CS, Santillana M, Immirzi B, Prisco RD, Nicolaus B, Poli A (2007) Chemical composition and biotechnological properties of polysaccharide from the peels and antioxidant content from the pulp of *Passiflora ligularis* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:7427–7433. doi:10.1021/jf0704615

Ulmer T, MacDougal JM (2004) *Passiflora: passionflower of the World*. Timber Press, Portland

Unfried I, Stocker U, Guendler P (1989) Nucleotide sequence of the 18S rRNA gene from *Arabidopsis thaliana* Co10. *Nucleic Acids Research* 17: 7513

Unfried I, Guendler P (1990) Nucleotide sequence of the 5.8S and 25S rRNA genes and of the internal transcribed spacers from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* 18: 4011

Vanderplank J (1996) Passion flowers. The MIT, Cambridge.

Wu ZL, Fang LY, Wang J, Shen YJ (2009) Analysis of genetic diversity of *Vitis* by using ISSR markers. Acta Horticulturae 827: 125-130

**CAPÍTULO 2 - RELAÇÕES CARIOTÍPICAS ENTRE ESPÉCIES E HÍBRIDOS
INTERESPECÍFICOS DE *Passiflora* L. COM POTENCIAL DE USO ECONÔMICO**

Artigo a ser submetido à revista Genetics and Molecular Research

Relações cariotípicas entre espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora L.* com potencial de uso econômico

Maria do Socorro Evangelista Coelho¹, Kyria Cilene de Andrade Bortoleti², Francisco Pinheiro de Araújo³, Nataniel Franklin de Melo³

¹Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais - Avenida Transnordestina S/N - Novo Horizonte, CEP: 44036-900 - Feira de Santana, BA, Brasil

²Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas, Campus Ciências Agrárias, BR 407, km 12, Lote 543, CEP 56304-917, Petrolina, PE, Brasil

³Embrapa Semiárido - Rodovia BR-428, km 152, Zona Rural - Caixa Postal 23, CEP: 56302-970 - Petrolina, PE, Brasil

RESUMO

Com o intuito de caracterizar genótipos promissores para os programas de melhoramento do maracujazeiro, o presente trabalho relata o padrão de bandas CMA₃/DAPI e distribuição dos sítios de DNAr 45S em seis espécies e dois híbridos interespecíficos de *Passiflora* (*P. laurifolia* x *P. edulis* e *P. laurifolia* x *P. luetzelburgii*), assim como a análise do comportamento meiótico e a viabilidade polínica em *P. luetzelburgii*. Preparações citológicas foram submetidas à análise convencional, dupla coloração com os fluorocromos CMA₃/DAPI e FISH utilizando sonda de DNAr 45S. Os resultados mostraram $2n = 18$ cromossomos para as espécies e híbridos interespecíficos analisados, dois a três pares de sítios de DNAr 45S, estando esses últimos co-localizados com as bandas CMA₃⁺/DAPI. Sendo este o primeiro registro de contagem cromossômica e caracterização citogenética para a espécie *P. luetzelburgii*, na qual os dados mostraram os menores valores para o comprimento dos cromossomos, além disso, revelou comportamento meiótico regular com formação de nove bivalentes. O número e a posição terminal das bandas heterocromáticas e sítios de DNAr 45S mostraram-se bastante conservadas, sendo a origem híbrida suportada cariologicamente mediante relação com os parentais.

Palavras-chave: Maracujazeiro; Espécies silvestres; CMA₃/DAPI; Hibridização *in situ*.

ABSTRACT

In order to characterize promising genotypes for passion fruit breeding programs, this paper reports the CMA₃/DAPI banding pattern and distribution of rDNA 45S sites in six species and two interspecific hybrids of *Passiflora* (*P. laurifolia* x *P. edulis* and *P. laurifolia* x *P. luetzelburgii*), as well as the analysis of meiotic behavior and pollen viability in *P. luetzelburgii*. Cytological preparations were submitted to conventional analysis, CMA₃/DAPI staining and FISH using 45S rDNA probe. The results showed $2n = 18$ chromosomes for the species and interspecific hybrids analyzed, whereas the number of 45S rDNA sites ranged between two and three pairs co-localized with the CMA₃⁺/DAPI⁻ bands. By comparison with other species, *Passiflora luetzelburgii* performed the lowest values of the chromosome complement and it also showed regular meiotic behavior being visualized nine bivalents. The number and terminal position of heterochromatic bands and 45S rDNA sites were maintained in the species and hybrids, supporting the parental relation between genotypes analyzed.

Keywords: Passion fruit; Wild species; CMA₃/DAPI; *In situ* hybridization.

INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* L. é constituído por aproximadamente 530 espécies (Ulmer e MacDougal, 2004; Hansen et al., 2006), cujo centro de distribuição geográfica localiza-se no Centro-Norte do Brasil (Lopes, 1991). Morfologicamente, as passifloras são reconhecidas com bastante facilidade, uma vez que apresentam gavinhas axilares, hastes cilíndricas ou quadrangulares, nectários extraflorais no pecíolo foliar, flores com androginóforo ereto, três estigmas e cinco estames (Ulmer e MacDougal, 2004). Além disso, o número restrito de espécies pode apresentar pilosidade, a exemplo de *Passiflora luetzelburgii* Harms (Vitta e Bernacci, 2004).

Algumas espécies deste gênero são importantes economicamente, com destaque para a espécie *P. edulis* Sims (maracujá amarelo), cujos plantios representam 95% da área cultivada com maracujazeiros no território brasileiro. Entretanto, mesmo que restrita, outras espécies são cultivadas não só pelas propriedades alimentícias e medicinais, mas principalmente pela qualidade de seus frutos (Souza e Meletti, 1997), a exemplo do maracujá-doce (*P. alata* Curtis), maracujá-melão (*P. quadrangularis* L.), maracujá-peroba (*P. laurifolia* L.), maracujá-do-sono (*P. setacea* DC.), maracujá-do-mato (*P. cincinnata* Mast.), maracujá-suspiro (*P. nitida* HBK) e o maracujá-azul (*P. caerulea* L.) (Meletti et al., 2003; Meletti et al., 2005; Junqueira et al., 2010).

Simultaneamente, várias dessas espécies silvestres têm sido consideradas como fonte de genes para o melhoramento do maracujá amarelo, sendo exploradas em hibridações interespecíficas, técnica útil e frequentemente utilizada para a introgressão de genes entre espécies afins (Vanderplank, 2000). De uma maneira geral, em *Passiflora*, os cruzamentos interespecíficos têm sido voltados para a obtenção de plantas com resistência a patógenos (Meletti et al., 2005; Faleiro et al., 2006; Faleiro et al., 2008) ou plantas ornamentais com melhor adaptação às condições edafoclimáticas regionais (Vanderplank, 2000; Conceição et al., 2011; Santos et al., 2012).

Entretanto, para a implantação de um programa de melhoramento genético, a coleta, introdução, caracterização, avaliação e conservação do germoplasma são primordiais para sua eficácia, salientando que é fundamental conhecer a composição genética dos genótipos existentes, auxiliando assim na identificação de genótipos promissores (Brasileiro, 2010). Considerada uma ferramenta suporte em programas de melhoramento, a citogenética tem contribuído para a caracterização de germoplasma, bem como para as etapas de planejamento, coleta e seleção de genótipos, mediante o entendimento da organização e estrutura de

cromossomos mitóticos e meióticos revelando dados sobre a diversidade genética em várias culturas, como por exemplo, no gênero *Manihot* Mill. (Carvalho et al., 2009) e *Jatropha* L. (Souza, 2014).

A maioria das espécies do gênero *Passiflora* cariologicamente estudadas apresenta-se como diploide, havendo a predominância do número cromossômico $2n = 18$. Foram classificadas em quatro grupos de acordo com o número cromossômico básico, presença de bandas $\text{CMA}_3^+/\text{DAPI}^-$ e número de sítios de DNAr 45S (Melo et al., 2001; Melo e Guerra, 2003). O grupo $x = 6$ encontra-se predominantemente constituído por espécies diploides ($2n = 12$) contendo dois sítios de DNAr 5S e dois a quatro sítios de DNAr 45S; o grupo $x = 9$ apresenta representantes exclusivamente diploides ($2n = 18$), com dois sítios de DNAr 5S e quatro ou seis sítios de DNAr 45S; o grupo $x = 12$ é representado por espécies diploides ($2n = 24$) contendo dois e quatro sítios de DNAr 5S e 45S, respectivamente (Melo e Guerra, 2003). Por fim, o grupo $x = 10$ é representado pela espécie *P. foetida* L. com $2n = 20$, e presença de quatro e seis sítios de DNAr 5S e 45S, respectivamente (Melo e Guerra, 2003).

Por outro lado, os estudos cariotípicos envolvendo híbridos sexuais de *Passiflora* ainda são escassos, limitando-se a determinação do número cromossômico (Soares-Scott et al., 2005). Neste contexto, com o intuito de caracterizar genótipos promissores para os programas de melhoramento do maracujazeiro, o presente trabalho relata o padrão de bandas CMA_3/DAPI e distribuição dos sítios de DNAr 45S em seis espécies e dois híbridos interespecíficos de *Passiflora* (*P. laurifolia* x *P. edulis* e *P. laurifolia* x *P. luetzelburgii*), assim como a análise do comportamento meiótico e a viabilidade polínica em *P. luetzelburgii*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Os genótipos estudados citogeneticamente são representantes de acessos promissores das espécies *P. alata* (ABA63), *P. edulis* (EBA55); *P. laurifolia* (LCE67), *P. luetzelburgii* (LBA57), *P. quadrangularis* (QPE68) e *P. setacea* (SBA58), além dos híbridos interespecíficos (*P. laurifolia* x *P. edulis*) e (*P. laurifolia* x *P. luetzelburgii*), pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Maracujá da Embrapa Semiárido.

Análise mitótica

Pré-tratamento, fixação e preparação cromossômica

Para a análise mitótica, pontas de raízes foram coletadas, pré-tratadas com 8-HQ (8-hidroxiquinoleína) 2 mM por 24 h à 8 °C ou por 4 h e 30 min à 20 °C, fixadas em etanol: ácido acético glacial (3:1) ou metanol: ácido acético (3:1) e estocadas a -20 °C até sua utilização.

As raízes estocadas em fixador foram lavadas duas vezes em água destilada por 5 min, hidrolisadas em HCl 5N por 20 min para uso na análise convencional, ou então digeridas em solução enzimática celulase 2% (Onozuka) e pectinase 20% (v/v) em câmara úmida a 37 °C por 2,5 h para uso nas técnicas de bandeamento cromossômico e FISH.

Para a confecção das lâminas, as raízes fixadas em etanol ou metanol: ácido acético (3:1) foram maceradas em lâmina contendo ácido acético 45% e esmagadas entre lâmina e lamínula e submetidas ao nitrogênio líquido. Após remoção das lamínulas, as lâminas foram secas ao ar, coradas com Giemsa 2% e montadas com Entellan para análise convencional (Guerra 1983; Carvalho e Saraiva 1993) ou estocadas a -20 °C. Posteriormente, as lâminas foram secas com bomba de ar, mergulhadas em ácido acético 45% por 12 s e secas novamente à temperatura de 37 °C.

As melhores lâminas foram selecionadas mediante coloração com uma solução de 2µg/mL de DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenilindole)/glicerol (1:1, v/v). Logo após, foram descoradas em fixador por 30 min e imersas em álcool etílico absoluto por 1 h à temperatura ambiente, secas ao ar e estocadas a -20 °C até o momento do procedimento da coloração com os fluorocromos CMA₃ (Cromomicina A₃)/DAPI e FISH.

Coloração com CMA₃/DAPI

A coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI seguiu o protocolo descrito por Schweizer e Ambros (1994). As preparações foram coradas com CMA₃ (0,5 mg/mL) por 1 h e DAPI (2µg/mL) por 30 min, montadas em tampão McIlvaine-glicerol e estocadas em câmara escura, por três dias, para posterior análise em microscópio de fluorescência.

Obtenção de sondas de DNAr 45S

Para localizar os sítios de DNAr 45S, foram utilizadas as sondas SK18S e SK25S, contendo o DNAr 18S e 25S de *Arabidopsis thaliana* L. (Unfried et al. 1989; Unfried e Gruendler 1990). As sondas foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP, por *nick translation* (Invitrogen).

Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

As lâminas estocadas a -20 °C foram pré-tratadas com álcool etílico absoluto: ácido acético glacial (3:1, v/v), seguido de uma série alcoólica 70% e 100% e secas em estufa a 60 °C para posterior utilização na FISH. A desnaturação dos cromossomos e das sondas, os banhos pós-hibridização e a etapa de detecção foram efetuados de acordo com Heslop-Harrison et al. (1991), modificado por Pedrosa et al. (2002). As misturas de hibridização consistiram de: formamida 50% (v/v), dextran sulfato 10% (p/v), 2x SSC e 2,5-5 ng/μL de sonda. As lâminas foram desnaturadas por 7 min a 75 °C, colocadas em câmara úmida e hibridizadas por 18 a 42 h a 37 °C. As sondas marcadas com digoxigenina foram detectadas utilizando antidigoxigenina produzida em ovelha conjugada com fluoresceína isotiocianato (FITC; Boehringer Mannheim) e amplificadas com anticorpo antiovelha conjugado com FITC, também em BSA 1% (p/v). As lâminas foram montadas com 2μg/mL DAPI em Vectashield H-1000 (Vector), na proporção 1:1.

Análise meiótica e viabilidade polínica

Para a análise meiótica, botões florais jovens de *P. luetzelburgii* foram coletados, fixados diretamente em solução Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1) por 24 h a TA e estocados a -20 °C. Para preparação das lâminas, os botões florais foram lavados em água destilada por 5 min e hidrolisados em HCl 5N por 5-10 min. Em seguida, as anteras foram maceradas separadamente na lâmina contendo ácido acético 45%, as quais foram congeladas em nitrogênio líquido, secas ao ar, coradas com Giemsa 2% e montadas com Entellan (Guerra 1983). Para viabilidade dos grãos de pólen, as lâminas foram preparadas e coradas com carmin acético, conforme Radford et al. (1974). Foram contados os polens viáveis e inviáveis de cinco campos aleatórios em cinco lâminas, utilizando a objetiva com aumento de 20x, totalizando cerca de 800 grãos. Posteriormente, o percentual médio dos grãos de pólen viáveis foi calculado, bem como seus respectivos desvios padrão.

Análise dos dados

As células foram analisadas utilizando um microscópio de epifluorescência Leica DM2000 e as imagens das melhores células foram capturadas com câmera Leica FX-350, usando o software Leica QFish. As imagens foram otimizadas para melhor brilho e contraste com o Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Incorporated). Na análise meiótica, cerca de 50 meiócitos foram avaliados observando os estágios da meiose I e II.

Para a identificação da morfologia cromossômica, cinco metáfases foram mensuradas por meio do programa UTHSCSA Image Tool (Donald et al., 2007), enquanto que a elaboração dos idiogramas foi realizada a partir do comprimento cromossômico mediante o software Adobe Flash CS6 Professional. A partir das medições cromossômicas, foram estimados os parâmetros cariológicos: comprimento do lote haploide (LHC), comprimento absoluto dos cromossomos (C), razão entre braços (BL/BC) e fórmula cariotípica. Foi adotada a nomenclatura cromossômica sugerida por Guerra (1986) para indicar metacêntrico (M) e submetacêntrico (SM). Os cromossomos foram ordenados de acordo com o comprimento relativo (em relação ao comprimento do lote haploide) em ordem decrescente e identificados por números.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As seis espécies de *Passiflora* e híbridos interespecíficos analisados apresentaram $2n = 18$ cromossomos, sendo este o primeiro registro de contagem cromossômica para *P. luetzelburgii* (Tabela 1; Figura 1A). Esse resultado confirma dados anteriormente publicados para as outras espécies em estudo (Soares-Scott, 1998; Melo et al., 2001; Melo e Guerra, 2003; Souza et al., 2003), incluindo-as no grupo cariológico $x = 9$, proposto por Melo e Guerra (2003).

Os cariótipos mostraram-se simétricos com a morfologia cromossômica variando de metacêntrica (M; R= 1 – 1,49) a submetacêntrica (SM; R= 1,5 - 2) (Figuras 1 e 2), de acordo com nomenclatura proposta por Guerra (1986). Entretanto, a média do comprimento absoluto dos cromossomos (C), o comprimento do lote haploide (LHC) e a relação entre braços (BL/BC) apresentaram variações entre os genótipos, conforme mostrado na Tabela 1 e Figura 2.

Dentre as espécies estudadas, *P. luetzelburgii* foi caracterizada citogeneticamente pela primeira vez, na qual os resultados mostraram os menores valores para o comprimento médio dos cromossomos (3,08 μm) e comprimento do lote haploide (27,72 μm), com dez e oito cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, respectivamente, cujos tamanhos variaram entre 3,54 μm a 2,6 μm (Tabela 1; Figuras 1A e 2).

Tabela 1. Número cromossômico diploide e morfologia cromossômica de oito genótipos de *Passiflora*, bem como identificação dos pares cromossômicos portadores de DNAr 45S - CMA₃⁺/DAPI e seus respectivos sítios de localização.

Genótipo	Número cromossômico (2n)	Morfologia cromossômica			Cromossomos portadores de DNAr 45S - CMA ₃ ⁺ /DAPI	Localização (BC/BL)
		C (µm)	LHC (µm)	Fórmula cariotípica (M + SM)		
<i>P. alata</i>	18	4,97	44,75	12M + 6SM	4; 8	BL; BC
<i>P. edulis</i>	18	3,72	33,48	14M + 4SM	6; 8	BL; BL
<i>P. laurifolia</i>	18	4,11	36,96	14M + 4SM	5; 8	BL; BL
<i>P. luetzelburgii</i>	18	3,08	27,72	10M + 8SM	5; 7	BC; BL
<i>P. quadrangularis</i>	18	4,28	38,53	8M + 10SM	5; 7; 9	BL; BL; BL
<i>P. setacea</i>	18	3,09	27,84	14M + 4SM	3; 6	BL; BL
<i>P. laurifolia</i> x <i>P. edulis</i>	18	4,14	37,26	12M + 6SM	6; 8	BL; BL
<i>P. laurifolia</i> x <i>P. luetzelburgii</i>	18	3,46	31,13	12M + 6SM	5; 8	BC; BL

Legenda: C – Comprimento Médio dos Cromossomos; LHC - Comprimento do Lote Haploide; M – Metacêntrico; SM – Submetacêntrico; BC – Braço Curto; BL - Braço Longo.

Por outro lado, a espécie *P. alata* apresentou maior C (4,97 µm) e LHC (44,75 µm) (Tabela 1). O tamanho cromossômico variou entre 5,9 a 4,12 µm, visualizando-se 12 e cromossomos metacêntricos e seis submetacêntricos (Figura 2). Por sua vez, *P. quadrangularis* mostrou C (4,28 µm) e LHC (38,53 µm) menores que *P. alata*, com comprimento cromossômico variando de 4,94 a 3,67 µm distribuídos em oito cromossomos metacêntricos e dez submetacêntricos (Tabela 1; Figura 2). Os dados mostrados diferem dos resultados apresentados por Souza et al. (2003), os quais revelaram que *P. quadrangularis* teria o complemento cromossômico maior que *P. alata*. Curiosamente, esses táxons pertencem a Série *Quadrangularis* (Harms) Killip sendo muito próximos morfologicamente, mas facilmente identificados pela diferença no número de pares de glândulas peciulares, sendo dois pares em *P. alata* e três em *P. quadrangularis* (Araújo e Alves, 2013).

Para *P. setacea*, os dados de C (3,09 µm) e LHC (27,84 µm) obtidos, também, foram divergentes aos relatados anteriormente (Soares-Scott, 1998), observando-se cariótipo com tamanho cromossômico variando de 3,5 a 2,44 µm e a presença de 14 cromossomos metacêntricos e quatro submetacêntricos (Tabela 1; Figura 2). Tais diferenças estão relacionadas a alguns fatores, a exemplo dos níveis de condensação das células, divergências entre os materiais analisados e/ou, até mesmo, a possíveis alterações cromossômicas estruturais intraespecíficas.

Passiflora laurifolia apresentou o terceiro maior LHC (36,96 µm) entre as espécies analisadas, verificando-se uma variação de tamanho cromossômico entre 4,71 a 3,51 µm e um cariótipo constituído por 14 e quatro cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, respectivamente. Em *P. edulis*, o tamanho cromossômico variou de 4,24 a 3,06 µm, C de 3,72

e LHC de 33,48 μm , com a presença de 14 e quatro cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (Tabela 1; Figura 2).

Nos híbridos interespecíficos, os C e LHC, também, variaram entre si e frente aos seus respectivos parentais. Em *P. laurifolia* x *P. edulis*, os valores foram superiores (4,14 e 37,26 μm) às espécies parentais; enquanto que, para *P. laurifolia* x *P. luetzelburgii*, esses valores foram intermediários (3,46 e 31,13 μm). Os comprimentos cromossômicos variaram de 4,95 a 3,42 μm e 4,3 a 2,72 μm para *P. laurifolia* x *P. edulis* e *P. laurifolia* x *P. luetzelburgii*, respectivamente. Os híbridos apresentaram o complemento cromossômico constituído por 12 metacêntricos e seis submetacêntricos (Tabela 1; Figura 2).

Embora apresentem estabilidade em termos de número e morfologia cromossômica, a possibilidade da ocorrência de variações cariotípicas entre os representantes de *Passiflora* não deve ser descartada, principalmente, em relação ao número e posição das bandas heterocromáticas CMA_3^+ (Melo et al., 2001).

A presença de bandas $\text{CMA}_3^+/\text{DAPI}^-$ foi visualizada em dois pares cromossômicos das espécies e híbridos analisados, com exceção de *P. quadrangularis* que apresentou blocos heterocromáticos ricos em GC (Guanina-Citosina) em seis cromossomos. Em todos os casos, as bandas CMA_3^+ apresentaram co-localizadas com os sítios de DNAr 45S revelados pela FISH (Figuras 1 e 2).

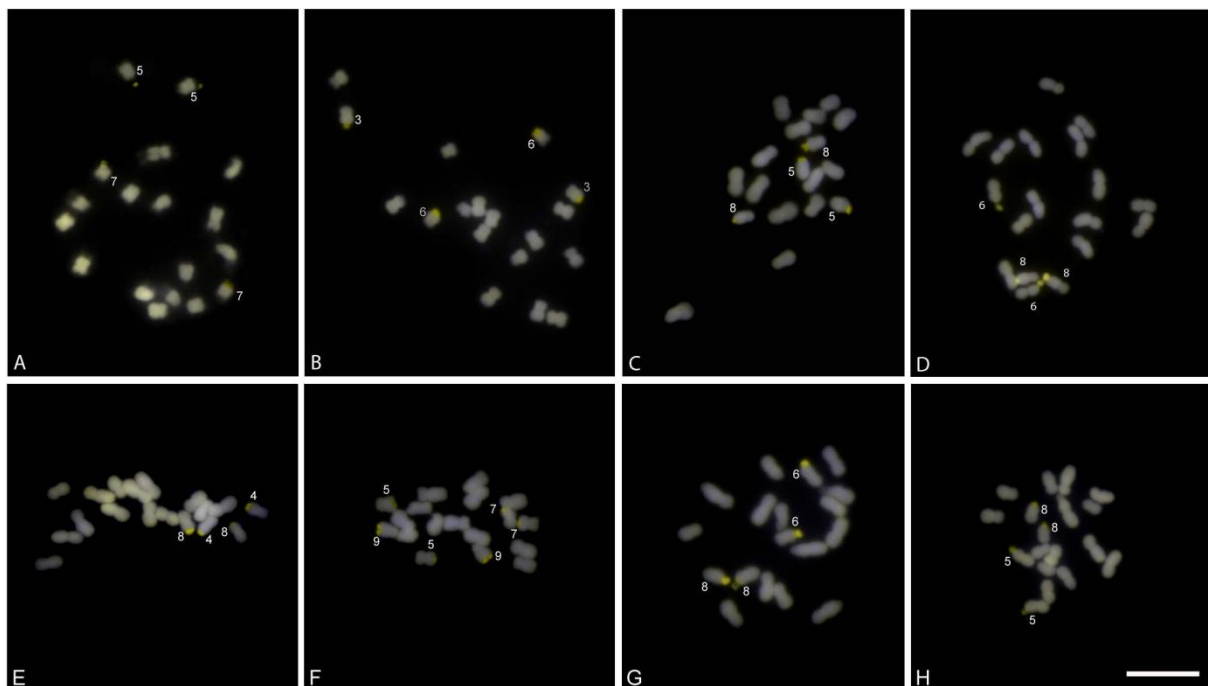


Figura 1. Coloração com CMA_3/DAPI em espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* L. (A) *P. luetzelburgii*; (B) *P. setacea*; (C) *P. laurifolia*; (D) *P. edulis*; (E) *P. alata*; (F) *P. quadrangularis*; (G) *P. laurifolia* x *P. edulis*; (H) *P. laurifolia* x *P. luetzelburgii*. Os números indicam os cromossomos identificados pela distribuição das bandas CMA^+ . Barra = 10 μm .

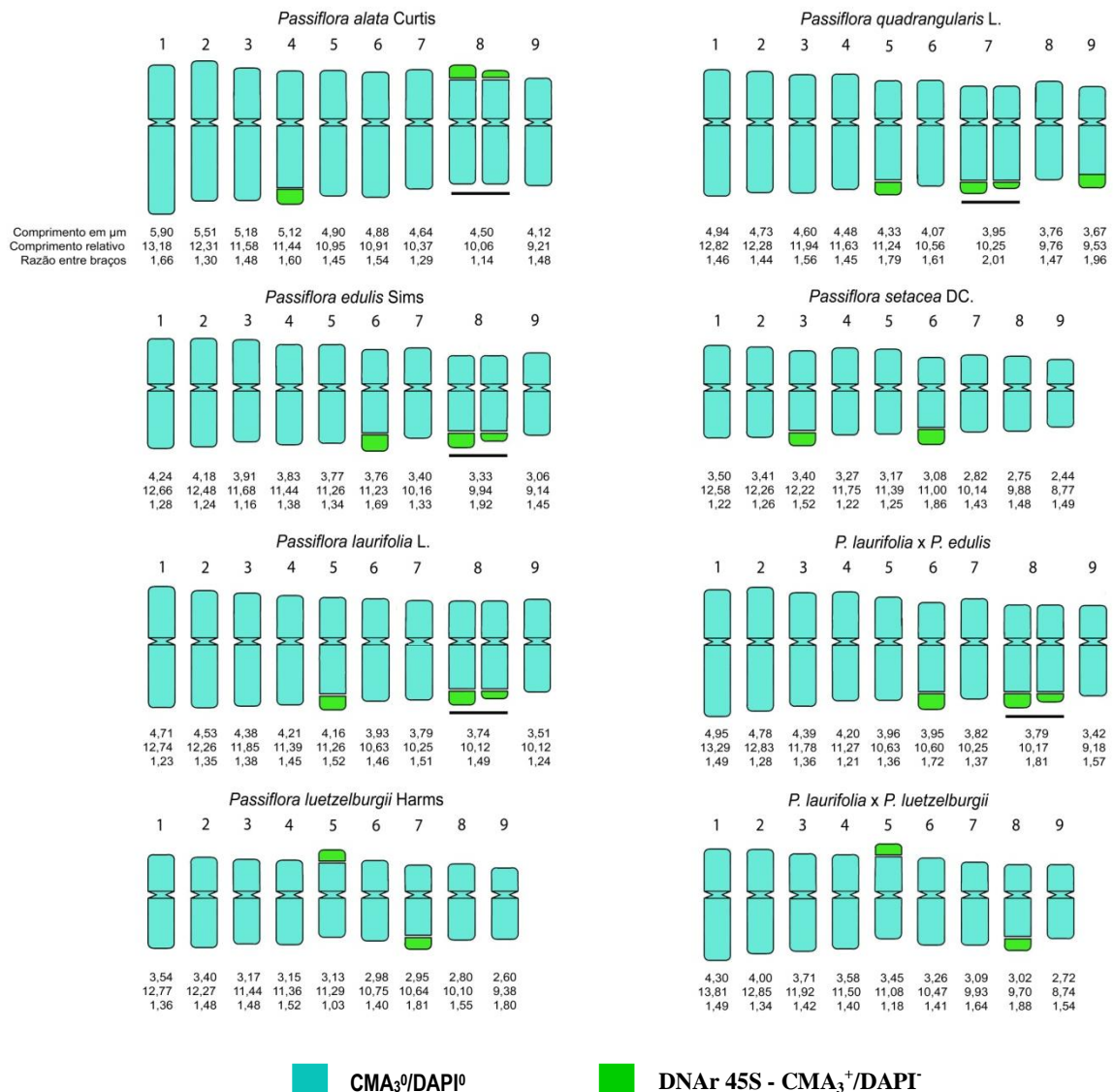


Figura 2. Idiogramas das espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* analisados, mostrando o comprimento absoluto, comprimento relativo, posição centromérica, distribuição da heterocromatina e localização dos loci de DNAr. Os cromossomos foram alinhados de acordo com o comprimento, em ordem decrescente e identificados por número. Para os cromossomos que apresentaram heteromorfismo no tamanho das bandas, foram representados os dois homólogos.

Entretanto, foram visualizadas variações em relação à localização e tamanho das bandas CMA₃⁺/DAPI⁰ entre os genótipos avaliados. Em *P. alata*, os pares cromossômicos 4 e 8 mostraram bandas CMA₃⁺/DAPI⁰ nas regiões terminais do braço longo e curto, respectivamente, sendo notada em algumas células a presença de heteromorfismo em relação ao tamanho do bloco entre os cromossomos homólogos do menor par cromossômico (Figuras 1E e 2). Este padrão de bandas foi similar ao observado para *P. laurifolia* (Figuras 1C e 2), exceto para a localização do bloco heterocromático no braço longo dos cromossomos 5 e 8. Além de *P. alata* e *P. laurifolia*, o citado heteromorfismo também foi notado no braço longo

do cromossomo 8 de *P. edulis*, a qual apresentou outro par de bandas localizado no cromossomo 6 (Figuras 1D e 2).

Nas espécies *P. luetzelburgii* e *P. setacea*, os blocos heterocromáticos encontravam-se distribuídos terminalmente nos braços curto e longo dos cromossomos 5 e 7 (Figuras 1A e 2), bem como nos braços longos dos cromossomos 3 e 6 (Figuras 1B e 2), divergindo da localização previamente reportada por Soares-Scott (1998) para a última espécie.

Em ambos híbridos interespecíficos, visualizou-se a presença de quatro bandas $\text{CMA}_3^+/\text{DAPI}^-$ terminais, bem como possíveis rearranjos cromossômicos pós-hibridizações. No híbrido *P. laurifolia* x *P. edulis*, tais blocos foram localizados nos braços longos dos pares cromossômicos 6 e 8 (Figura 1G), sendo este último par considerado heteromórfico, uma vez que as bandas apresentaram tamanhos diferenciados (Figura 2) similarmente ao observado nas espécies parentais (Figuras 1C e D). Por sua vez, o híbrido *P. laurifolia* x *P. luetzelburgii* apresentou bandas $\text{CMA}_3^+/\text{DAPI}^-$ no braço curto do par cromossômico 5 e no braço longo do par cromossômico 8 (Figuras 1H e 2). Associada à regularidade mitótica, que revelou uma compatibilidade genômica entre as espécies parentais, estes marcadores cromossômicos (bandas CMA_3/DAPI e FISH com DNAr) fornecem um suporte a origem híbrida dos genótipos, embora não permitam inferir sobre a introgressão de genes entre as espécies genitoras conforme visualizado pela GISH (*Genomic In Situ Hybridization*) (Guerra 2004; Souza et al., 2014).

Diferentemente dos outros genótipos analisados, *P. quadrangularis* mostrou a presença de seis bandas $\text{CMA}_3^+/\text{DAPI}^-$ localizadas nos braços longos dos pares cromossômicos 5, 7 e 9 (Figuras 1F e 2). Tais blocos apresentaram tamanhos diferenciados, sendo dois com tamanho maior e não distendidos (par 9) e quatro com tamanho reduzido e distendidos na maioria das metáfases analisadas (pares 5 e 7) (Figuras 1F e 2). Entretanto, em algumas células, a presença das bandas foi imperceptível no par cromossômico 7 em um ou ambos homólogos, possivelmente devido ao seu tamanho diminuto. Tal característica pode estar relacionada à diferença do número de bandas observadas no presente trabalho frente à presença de apenas quatro bandas $\text{CMA}_3^+/\text{DAPI}^-$ relatada por Melo et al. (2001) e Souza et al. (2003) (cromossomos 1 e 8) na referida espécie.

Desta forma, os dados permitiram observar diferenças na localização dos blocos $\text{CMA}_3^+/\text{DAPI}^-$ em cromossomos de *P. alata*, *P. setacea* e *P. quadrangularis*, ao compará-los com dados previamente publicados na literatura (Souza et al. 2003). Estas divergências podem estar relacionadas à ocorrência de alterações estruturais, a exemplo das translocações (Viana e Souza, 2012), que propiciam reorganizações cromossômicas em termos de

diferenciação cariotípica a nível intra e interespecífico. Entretanto, não se pode descartar a hipótese que essas diferenças refletem a dificuldade de identificação dos pares cromossômicos, especialmente em *Passiflora*, cujos cromossomos apresentam alta similaridade em tamanho e morfologia.

Associadamente, os tamanhos diferentes dos sítios de DNAr 45S observados nas espécies e híbridos, bem como a variação numérica notada entre *P. quadrangularis* e demais genótipos avaliados, pode ser explicada pela amplificação e/ou deleção de algumas unidades de repetições decorrentes do processo de recombinação não alélica (Hanson et al. 1996), como descrito para *Vigna unguiculata* (L.) Walp. e *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek (Bortoleti et al., 2012). Embora o heteromorfismo não tenha sido relatado anteriormente para estas espécies, a presença de quatro a seis bandas CMA₃⁺/DAPI⁻, co-localizadas com sítios de DNAr 45S, respalda a classificação dos genótipos estudados no grupo cromossômico três do gênero *Passiflora* (Melo et al., 2001; Melo e Guerra, 2003), inclusive *P. luetzelburgii*, a qual não tinha sido anteriormente classificada.

Por outro lado, a análise meiótica em *P. luetzelburgii* revelou um pareamento normal, com a formação de nove bivalentes em diplóteno e/ou diacinese (dados não mostrados), resultando em uma segregação regular dos cromossomos nas anáfases. Não foi notada a presença de multivalentes, pontes anafásicas, cromossomos retardatários e/ou anáfases multipolares, similarmente ao visualizado em outras passifloras, a exemplo de *P. setacea*, *P. edulis*, *P. cincinnata* e *P. alata* (Soares-Scott et al., 2003; Barbosa et al., 2007; Souza e Pereira, 2011; Coelho et al., em preparação). Esta meiose regular refletiu no alto percentual de grãos de pólen viáveis, com valores médios em torno de 97%.

As características supracitadas indicam *P. luetzelburgii* como um genitor potencial em hibridações interespecíficas, sendo assim um genótipo promissor para programas de melhoramento genético inclusive com fins ornamentais (Freire et al., 2014), por apresentar floração contínua, além da exuberância, durabilidade e coloração vermelha em suas flores.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de Doutorado a Coelho, M.S.E. e PQ-DT a Melo, N.F. e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pelo suporte as atividades da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo D, Alves M (2013). Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Passifloraceae s.s. *Rodriguésia* 64(2): 247-254.
- Barbosa LV, Mondin M, Oliveira CA, Souza AP, Vieira MLC (2007). Cytological behaviour of the somatic hybrids *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* + *P. cincinnata*. *Plant Breeding* 126: 323-328.
- Brasileiro BP (2010) Conservação e melhoramento genético do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). Dissertação. UFRB, Cruz das Almas-BA.
- Bortoleti KCA, Benko-Iseppon AM, Melo NF, Brasileiro-Vidal AC (2012). Chromatin differentiation between *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek and *V. unguiculata* (L.) Walp. (Fabaceae). *Plant Systematics and Evolution* 298: 689–693.
- Carvalho CR, Saraiva LS (1993). An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. *Biotechnic and Histochemistry* 68 (3): 142-145.
- Carvalho R, Silva KVP, Oliveira IF, Alves AAC (2009). Citogenética como ferramenta para o melhoramento genético vegetal: análise mitótica e meiótica em espécies de *Manihot*. *Revista Raízes e Amidos Tropicais* 5: 645-650.
- Conceição LDHCS, Souza MM, Belo GO, Santos SF, Freitas JCO (2011). Hybridization among wild passionflower species. *Revista Brasileira de Botânica* 34: 237-240.
- Donald C, Brent DS, McDavid WD, Greer DB (2007). UTHSCSA ImageTool (IT) – Version 3.0. <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/download.html>. Acessado em 26 de julho de 2007
- Faleiro FG, Peixoto JR, Pio Viana A, Brucker C, Laranjeira FF, Damasceno F, Meletti LMM, Consoli L, Sousa MAF, Silva MS, Pereira MG, Stenzel N, Sharma RD (2006) Demandas para as pesquisas relacionadas ao melhoramento genético. In: Maracujá: demandas para a pesquisa (Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF, eds). Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 25-34.
- Faleiro FG, Junqueira NTV, Fávero AP, Lopes MA (2008) Pré-melhoramento de plantas: experiências de sucesso. In: Pré melhoramento, melhoramento e pós melhoramento: estratégias e desafios (Faleiro FG, Farias Neto AL, Ribeiro Júnior WQ eds). Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 43-62.
- Freire AJCS, Silva TDF, Valeriano JC, Coelho MSE, Melo NF, Araújo FP (2014). Caracterização Morfológica de *Passiflora luetzelburgii* Harms. IX Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE, 65-71.
- Guerra M (1986). Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética* 9:741-743.
- Guerra M (2004) FISH – Conceitos e aplicações na citogenética. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto.

- Guerra M, Souza MJ (2002). Como Observar os Cromossomos: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal, Animal e Humana. In: Como analisar os cromossomos mitóticos (Guerra M, Souza MJ, eds). FUNPEC, São Paulo, 23-32.
- Hansen AK, Gilbert LE, Simpson BB, Cervi AC, Jansen RK (2006). Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. *Systematic Botany* 31:138–150.
- Hanson RE, Islam-Faridi MN, Percival EA, Crane CF, Ji Y, McKnight TD, Stelly DM, Price HJ (1996) Distribution of 5S and 18S–28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma* 105: 55–61.
- Heslop-Harrison JS, Schwazarcher T, Anamthawat-Jónsson K, Leitch AR, Shi M (1991). *In situ* hibridization with automated chromosome desnaturation. *Technique* 3:109-115.
- Junqueira NTV, Santos EC, Junqueira KP, Faleiro FG, Bellon G, Braga MF (2010) Características físico-químicas e produtividade de acessos de *Passiflora nitida* Kunth procedentes do Centro-Norte do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32:791-797.
- Lopes SC (1991). Citogenética do maracujá, *Passiflora* spp. In: São José AR, Ferreira FR, Vaz RL (ed) A cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEP, p.201-209.
- Meletti LMM, Bernacci LC, Soares-Scott, MD, Azevedo Filho JA, Martins ALM (2003). Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agrônômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis.). *Revista Brasileira de Fruticultura* 25: 275-278.
- Meletti LMM, Soares-Scott MD, Bernacci LC, Passos IRS (2005). Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (ed) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético, 1ª ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 55-78.
- Melo NF, Cervi AC, Guerra M (2001). Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Plant Systematics and Evolution* 226:69-84.
- Melo NF, Guerra M (2003). Variability of the 5S and 45S DNAr Sites in *Passiflora* L. Species with Distinct Base Chromosome numbers. *Annals of Botany* 92:309-316.
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A (2002). Chromosomal map of the model legume *Lotes japonicus*. *Genetics* 161:1661-1672.
- Radford AE, Dickison WC, Massey JR, Bell CR (1974). Vascular plant systematics. Harper and Row, New York.
- Santos EA, Souza MM, Abreu PP, Conceição LDHCS, Araújo IS, Viana AP, Almeida AAF, Freitas JCO (2012). Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. *Euphytica* 184:389–399.
- Schweizer D, Ambros PF (1994). Chromosome banding. In: Gosden JR (ed) Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa, 97-112.

- Soares-Scott MD (1998). Caracterização citogenética de algumas espécies e híbridos inter-específicos de *Passiflora*. Dissertação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Soares-Scott MD, Meletti LMM, Bernacci LC, Passos IRS (2005) Citogenética clássica e molecular em passifloras. In: Maracujá: Germoplasma e Melhoramento Genético. (Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF, Eds), Embrapa Cerrados, Planaltina, Brazil, 213–240.
- Soares-Scott MD, Meletti LMM, Recco-Pimentel SM (2003). Meiotic behaviour and pollen fertility in sexual and somatic hybrids of *Passiflora* species. *Caryologia* 56:129-138.
- Souza RC (2014) Caracterização citogenética de híbridos de *Jatropha curcas* L. e espécies relacionadas. Dissertação, UFRPE, Recife, PE.
- Souza JSI, Meletti LMM (1997). Maracujá: espécies, variedades, cultivo. Piracicaba: FEALQ. 177p.
- Souza MM, Pereira TNS, Viana AP, Pereira MG, Bernacci LC, Sudré CP, Silva LC (2003). Meiotic irregularities and pollen viability in *Passiflora edmundoi* Sacco (Passifloraceae). *Caryologia* 56:157-165.
- Souza MM, Pereira TNS, Vieira MLC (2008). Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasizing Brazilian species. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51: 247–258.
- Souza MM, Pereira TNS (2011). Meiotic behavior in wild and domesticated species of *Passiflora*. *Revista Brasileira de Botânica* 34:63-72.
- Souza RC, Marques DA, Carvalho Filho MM, Siqueira WJ, Benko-Iseppon AM, Brasileiro-Vidal AC (2014) Composição genômica de híbridos entre *Jatropha curcas* L. e espécies relacionadas. In: XX Encontro de Genética do Nordeste, Campina Grande, p 8.
- Ulmer T, MacDougal JM (2004) *Passiflora*: passionflower of the World. Timber Press, Portland.
- Unfried I, Stocker U, Guendler P (1989) Nucleotide sequence of the 18S rRNA gene from *Arabidopsis thaliana* Co10. *Nucleic Acids Research* 17: 7513.
- Unfried I, Guendler P (1990) Nucleotide sequence of the 5.8S and 25S rRNA genes and of the internal transcribed spacers from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* 18: 4011.
- Vanderplank J (2000) *Passion flowers*. The MIT Press, Cambridge, MA, USA.
- Viana AJC, Souza MM (2012) Comparative cytogenetics between the species *Passiflora edulis* and *Passiflora cacaoensis*. *Plant Biology* 14:820–827.
- Vitta FA, Bernacci LC (2004). A new species of *Passiflora* in section *Tetrastylis* (Passifloraceae) and two overlooked species of *Passiflora* from Brazil. *Brittonia* 56(1): 89–95.

**CAPÍTULO 3 – RESPOSTA *IN VITRO* DE GENÓTIPOS DE *Passiflora* L. EM
FUNÇÃO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE MEIOS E CONCENTRAÇÕES
DE CITOCININAS**

Artigo submetido à revista Scientia Agricola

Resposta *in vitro* de genótipos de *Passiflora* L. em função de diferentes formulações de meios e concentrações de citocininas

Maria do Socorro Evangelista Coelho¹, Francisco Pinheiro de Araújo², Geraldo Milanez de Resende² e Nataniel Franklin de Melo²

¹Universidade Estadual de Feira de Santana, Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais - Avenida Transnordestina S/N - Novo Horizonte, CEP: 44036-900 - Feira de Santana, BA, Brasil

²Embrapa Semiárido - Rodovia BR-428, Km 152, Zona Rural - Caixa Postal 23, CEP: 56302-970 - Petrolina, PE, Brasil

RESUMO

A propagação das passifloras ocorre, principalmente, através de sementes e por estaquia e/ou enxertia. Entretanto, é crescente o interesse pelo uso da micropropagação como um método alternativo de propagação vegetativa, existindo a necessidade de ajustar protocolos, uma vez que os maracujazeiros apresentam elevada variabilidade genética. No presente trabalho, objetivou-se avaliar a resposta de genótipos de maracujazeiro, sob a influência de diferentes formulações de meios de cultura, além de avaliar o efeito de citocininas na multiplicação *in vitro*. Para isso, segmentos nodais de *Passiflora cincinnata* Mast., *P. laurifolia* L., *P. setacea* DC. e *P. luetzelburgii* Harms foram inoculados em meio de cultura Woody Plant Medium (WPM), Driver Kuniyuki Walnut Medium (DKW/Junglans) e Murashige Skoog (MS), todos suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e avaliados após 60 dias de cultivo. Em seguida, segmentos nodais de *P. cincinnata*, *P. laurifolia* e *P. setacea* estabelecidos em meio de cultura DKW foram avaliados sob diferentes concentrações (0; 0,125; 0,25; 0,50 e 1,0 mg L⁻¹) das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN) e isopenteniladenina (2iP). Os dados foram submetidos análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. De maneira geral, os melhores resultados para as variáveis em estudo foram obtidos com a formulação do meio DKW. Em relação aos genótipos, *P. cincinnata* CPE16 mostrou melhor resposta morfogênica *in vitro* e KIN mostrou-se mais eficiente para obtenção de brotações com maiores comprimentos.

Palavras-chave: maracujazeiro, cultura de tecidos, estabelecimento *in vitro*, micropropagação, espécies silvestres

ABSTRACT

The propagation of passion fruit occurs principally through seeds and by cutting and/or grafting. However, there is a growing increase in the use of micropropagation as an alternative means to vegetable propagation, which requires an adjustment of the protocols once the passion fruit plants have high genetic variability. The objective of the present study was to examine the response of passion fruit genotypes under the influence of different culture medium formulations, apart from examining the effect of cytokinins on *in vitro* multiplication. For this purpose, nodal segments of *Passiflora cincinnata* Mast., *P. laurifolia* L., *P. setacea* DC. and *P. luetzelburgii* Harms were inoculated in Woody Plant Medium (WPM), Driver Kuniyuki Walnut Medium (DKW/Junglans) and Murashige Skoog (MS) culture media, all supplemented with 30 g L⁻¹ of sucrose, 6 g L⁻¹ of agar and examined 60 days after cultivation. Subsequently, nodal segments of *P. cincinnata*, *P. laurifolia* and *P. setacea* established in DKW culture media were examined under different concentrations (0; 0.125; 0.25; 0.50 and 1.0 mg L⁻¹) of cytokinins 6-benzylaminopurine (BAP), kinetin (KIN) and isopentenyladenine (2iP). Data were submitted for variance analysis and the means were compared by the Tukey test at 5% probability. In a general manner, the best results for the studied variables were obtained with the formulation of the DKW medium. In relation to the genotypes, *P. cincinnata* CPE16 showed a better morphogenetic response *in vitro*, and KIN showed to be more efficient for obtaining increased shoots length.

Keywords: passion fruit, culture tissues, *in vitro* establishment, micropropagation, wild species

INTRODUÇÃO

Passiflora L. é um gênero com expressiva diversidade sendo considerado o mais importante economicamente da família Passifloraceae (Vanderplank, 1996). Diversos autores têm relatado a ampla variabilidade genética inter e intraespecífica existente no gênero (Araújo et al., 2008; Cerqueira-Silva et al., 2014), sendo que grande parte dessa variabilidade está distribuída no território brasileiro, com cerca de 140 espécies (Cervi, 2006), dentre as quais, 87 são consideradas endêmicas do Brasil (Cervi et al., 2010). Entretanto, essa diversidade tem sua sobrevivência ameaçada devido à expressiva redução das áreas florestais (Bernacci et al., 2005). Diante dessa realidade, algumas ações de proteção dos recursos genéticos vêm sendo feitas, sendo a conservação do germoplasma de *Passiflora* realizada, principalmente, por meio de coleções de plantas no campo (conservação *ex situ*), sob a forma de sementes em câmaras frias (Ferreira, 2005), além de conservação *in vitro* (Vieira e Carneiro, 2004).

Neste aspecto, a cultura de tecidos apresenta-se com uma alternativa na obtenção de plantas saudáveis e vigorosas em escala comercial por meio de diferentes técnicas. Dentre elas, a micropropagação é uma das mais importantes, contribuindo para o melhor entendimento dos eventos de diferenciação celular, e auxiliando na obtenção de materiais vegetais que apresentam dificuldade de regeneração (Barrueto Cid e Teixeira, 2010).

Em *Passiflora*, diversos estudos têm sido realizados sobre técnicas de cultivo *in vitro*, principalmente para a espécie cultivada *Passiflora edulis* Sims. Dentre esses trabalhos, podemos citar alguns exemplos relacionados com o desenvolvimento de protocolos para o estabelecimento de plantas *in vitro* (Passos e Bernacci, 2005) e a indução e multiplicação de gemas através de segmentos nodais e internodais (Biasi et al., 2000; Santos et al., 2010; Silva et al., 2011). Entretanto, estudos sobre o cultivo *in vitro* para a maioria das espécies do gênero, são insuficientes, principalmente em decorrência da variação da resposta morfogênica entre genótipos de espécies silvestres (Faria et al., 2007). Para o estabelecimento *in vitro* em maracujazeiro, estudos sobre os meios de cultura constituem parte essencial desta técnica, necessitando de constante aprimoramento, visto que a maioria desses estudos utiliza a formulação com os sais MS na concentração normal ou com diluições (Dornelas e Vieira, 1994; Santos et al., 2010; Silva et al., 2011).

No presente trabalho, objetivou-se avaliar a resposta de genótipos de maracujazeiro, sob a influência de diferentes formulações de meios de cultura, além de avaliar o efeito de citocininas na multiplicação *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o estabelecimento do cultivo *in vitro* foram utilizados seis acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Maracujazeiro da Embrapa Semiárido, localizada em Petrolina-PE (experimento 1), sendo três pertencentes à espécie *P. cincinnata* Mast. (CBA10, CPE16 e CPI54), e os outros referentes a acessos únicos das espécies *P. laurifolia* L. (LCE67), *P. luetzelburgii* Harms (LBA57) e *P. setacea* DC. (SBA58). Em uma segunda etapa (experimento 2), avaliou-se a multiplicação *in vitro* de todos os genótipos, com exceção da espécie *P. luetzelburgii* (LBA57).

Experimento 1: Estabelecimento do cultivo *in vitro*

Antes da coleta dos explantes, as plantas matrizes de cada genótipo foram pulverizadas com cloridrato de kasugamicina 0,3%, visando diminuir a população de microorganismos simbiotes. Ainda no viveiro, os ramos principais foram cortados após a quarta gema axilar em relação ao ápice, sendo feito um corte medial transversal das folhas e colocados em recipientes contendo água destilada, acrescido de 0,1 g L⁻¹ de PVP (polivinilpirrolidona) e levados para o laboratório. Posteriormente, os ramos foram transferidos para novos recipientes contendo água destilada autoclavada (ADA) + 0,1 g L⁻¹ de PVP e levados para a capela de fluxo laminar. Em seguida, os ramos foram desinfestados em solução de álcool etílico 70%, durante 1 min, cloridrato de kasugamicina 1%, por 20 min, e imersos em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5%, por 20 min, seguido de três lavagens com ADA, ambos sob agitação.

Após o processo de desinfestação, explantes contendo gema apical ou gemas axilares com aproximadamente 1 cm foram inoculados em diferentes meios de cultura. Foram testados três meios nutritivos: Murashige Skoog (MS) (Murashige e Skoog, 1962), Driver Kuniyuki Walnut Medium (DKW/Juglans) (McGranahan, Driver e Tulecke, 1987) e Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd e McCown, 1980), todos suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,9, autoclavados a 121 °C (1 kgf/cm²) e sem adição de regulador de crescimento. As avaliações foram realizadas aos 60 dias após a inoculação dos explantes em meio de cultura, sem subcultivos. Foram observadas as seguintes variáveis: percentagem de contaminação, comprimento das brotações (cm), número de gemas formadas e distância dos entrenós. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Experimento 2: Multiplicação *in vitro*

Foram utilizados explantes do tipo gema apical ou gema axilar de plantas estabelecidas *in vitro*, com aproximadamente 1 cm, contendo uma gema. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura DKW/Juglans, suplementados com três tipos de citocininas (cinetina - KIN, 6-benzilaminopurina – BAP ou isopenteniladenina - 2iP), nas concentrações 0; 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹. O pH foi ajustado para 5,9 e, posteriormente, autoclavado a 121 °C (1 kgf/cm²). Após a inoculação, os explantes, foram transferidos para a sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1°C, luminosidade de 46 μmols.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

As avaliações foram realizadas aos 60 dias após a inoculação dos explantes em meio de cultura, sem subcultivos. Foram mensuradas as seguintes variáveis: número de brotações, comprimento das brotações (cm) e número de gemas formadas.

Análise estatística

Experimento 1: O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 6 x 3, sendo composto por seis genótipos (três genótipos de *P. cinnamomum*, e um de *P. laurifolia*, *P. luetzelburgii* e *P. setacea*, respectivamente) e três formulações de meio de cultura (WPM, DKW e MS), perfazendo um total de 18 tratamentos em quatro repetições.

Experimento 2: O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 3 x 5, sendo composto por cinco genótipos (três genótipos de *P. cinnamomum*, e um de *P. laurifolia* e *P. setacea*, respectivamente), três tipos de citocininas (KIN, BAP e 2iP) e cinco concentrações de citocininas (0; 0.125; 0.25; 0.50 e 1.0 mg L⁻¹), perfazendo um total de 75 tratamentos com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias dos tratamentos dos genótipos e tipos de reguladores de crescimento comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e as médias dos tratamentos referentes à concentração de reguladores de crescimento comparadas por regressão com base no modelo polinomial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1: Estabelecimento do cultivo *in vitro*

A análise de variância permitiu observar respostas com interação significativa dos genótipos e meios de cultura (P≤0,05) para as variáveis em estudo, exceto para o número de gemas, onde houve efeito significativo dos fatores isoladamente.

A formulação do meio DKW resultou nos maiores valores de comprimento das brotações para os genótipos em função dos meios de cultura testados. Nesse meio de cultura, o genótipo *P. cincinnata* CBA10 apresentou maior comprimento das brotações (5,73 cm), diferindo significativamente dos genótipos *P. luetzelburgii* LBA57 (1,35 cm) e *P. setacea* SBA58 (2,65 cm). No meio MS, apenas *P. cincinnata* CPE16 diferiu estatisticamente dos demais genótipos, enquanto no meio WPM não foram obtidas diferenças significativas (Tabela 1). Esses resultados revelaram respostas diferenciadas de crescimento *in vitro* entre as espécies, e até mesmo, variação intraespecífica (Figura 1). Comportamento diferenciado semelhante ao observado no presente trabalho foi relatado por Faria et al. (2007), estudando o efeito de concentrações dos meios de cultura em *P. edulis*, *P. giberti* e *P. laurifolia*.

Para distância dos entrenós, a resposta dos genótipos em função do meio de cultura foi semelhante ao observado no comprimento das brotações, cujos valores médios mostraram a distância máxima no genótipo *P. cincinnata* CPE16 cultivado no meio MS (0,85 cm), diferenciando significativamente dos demais genótipos. De maneira geral, o meio DKW apresentou o maior valor médio de distância dos entrenós (0,47 cm), sendo *P. cincinnata* CPI54 o genótipo que apresentou maior distância (0,73 cm) não diferindo estatisticamente de *P. cincinnata* CBA10, *P. cincinnata* CPE16 e *P. laurifolia* LCE67 (Tabela 1). Essas informações são importantes estrategicamente, pois os meios que resultam em maiores valores para distância dos entrenós possuem maior interesse na micropropagação, enquanto os que produzem os menores valores são relevantes para conservação de diferentes espécies.

Em relação ao número de gemas, os meios de cultura diferiram estatisticamente ($P=0,00007$), sendo o meio DKW o que apresentou maior valor médio (2,83). Considerando a análise em função dos genótipos, o melhor desempenho foi observado para *P. setacea* SBA58 (2,80) e *P. cincinnata* CPE16 (2,63), que diferiram significativamente de *P. luetzelburgii* - LBA57, demonstrando, com isso, grande potencial para multiplicação *in vitro* (Tabela 2).

Por outro lado, cada genótipo pode apresentar exigências específicas quanto aos nutrientes minerais. Neste sentido, diferentes formulações têm sido utilizadas em espécies de *Passiflora*, mas de maneira geral, o meio MS tem sido o mais utilizado (Guzzo et al., 2004; Faria et al., 2007; Silva et al., 2011; Soares et al., 2012), destacando-se ainda o meio MSM em *P. setacea*, proveniente da região do cerrado (Santos et al., 2010). Entretanto, dentre as formulações utilizadas nas passifloras, não foi verificado anteriormente o uso do meio DKW.

No presente trabalho, o comportamento diferenciado de resposta aos meios de cultura provavelmente relaciona-se às diferentes formulações, uma vez que o meio DKW, por exemplo, é menos concentrado que os demais, principalmente na relação entre formas iônicas

de nitrogênio. O efeito dessa relação iônica dos meios de cultura foi estudado por Melo et al. (1999) em aceroleira, sugerindo-se haver influência da concentração salina no desenvolvimento de brotações, principalmente na relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ entre diferentes meios. Para Santos et al. (2010), a disponibilidade do N e a forma em que este é fornecido pode influenciar diretamente no crescimento e na morfogênese em culturas *in vitro*.

Por outro lado, não foi observada oxidação dos explantes nas condições em que o experimento foi realizado. Entretanto, observaram-se cerca de 10% (CBA10), 20% (CPE16, CPI54 e LBA57) e 25% (LCE67) de contaminação bacteriana de origem endofítica nos explantes, fator este que tem dificultado a realização de alguns trabalhos de estabelecimento *in vitro* de *Passiflora*. Não houve registro de contaminação em *P. setacea* SBA58.

Levando em consideração as variáveis analisadas, o meio de cultura DKW foi o mais adequado para o estabelecimento do cultivo *in vitro* dos genótipos estudados, sendo *P. cincinnata* CPE16, o genótipo que obteve desempenho superior aos demais.

Experimento 2: Multiplicação *in vitro*

Na análise de variância foi possível observar respostas com interação significativa dos genótipos x citocininas, genótipos x concentrações de citocininas, e citocininas x concentrações ($P \leq 0,05$) para as variáveis em estudo.

Para a variável número de brotações, a 6-benzilaminopurina (BAP) e a cinetina (KIN) mostraram os maiores valores entre os genótipos avaliados, diferindo significativamente de isopenteniladenina (2iP) que resultou nos menores valores. No entanto, avaliando-se o efeito do BAP, o genótipo *P. cincinnata* CPE16 apresentou maior número de brotações (1,79), diferindo estatisticamente dos demais genótipos. Já com o uso da cinetina (KIN), não houve diferença significativa entre os genótipos. Para avaliação comparativa dos genótipos, *P. cincinnata* (CPE16) apresentou maior número de brotações (1,46) (Tabela 3).

Observou-se efeito significativo para a interação genótipos e concentrações de citocininas na variável número de brotações. Pela análise de desdobramento dos genótipos em função das concentrações de citocininas, constatou-se que a formação de brotações nos genótipos foi estimulada pelo aumento das concentrações de citocininas. Para os genótipos CBA10 e CPI54, observa-se um comportamento linear ascendente, ou seja, com o aumento na concentração, aumenta-se o número de brotações. Já para o genótipo CPE16, a formação de maior número de brotações foi estimulada pelo aumento das concentrações, sendo obtido com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de citocinina, com o ponto máximo em $0,65 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 2A), cujo

comportamento da curva foi quadrático, indicando que houve aumento até o ponto de máxima, com posterior decréscimo.

Para o desdobramento dos tipos de citocinina em função das suas concentrações, observou-se para BAP tendência similar a observada para o genótipo CPE16, com o ponto máximo obtido em $0,74 \text{ mg L}^{-1}$. Para KIN, notou-se comportamento linear similar aos genótipos CBA10 e CPI54 (Figura 2B). Em experimento realizado com espécies nativas de *Passiflora*, Garcia et al. (2011) não verificaram diferença significativa no número de brotos formados em *P. suberosa* cultivada em meio MS com diferentes concentrações de BAP. De acordo com Santos-Serejo et al. (2006), o tipo e a concentração de citocinina são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*.

Para a variável comprimento das brotações, a cinetina proporcionou os maiores valores para os genótipos entre as citocininas testadas. Com essa citocinina, o genótipo *P. cincinnata* CPE16 mostrou maior comprimento das brotações (2,13 cm), diferindo significativamente dos genótipos SBA58 (1,52 cm), CPI54 (1,36 cm) e LCE67 (1,12 cm) (Tabela 4).

Na interação genótipos e concentrações de citocininas, observou-se comportamento diferenciado para os genótipos CBA10 e CPI54 no comprimento das brotações. Maior comprimento foi observado sem adição de citocinina. Em relação ao CBA10, constatou-se comportamento linear descendente com o aumento das concentrações, indicando que, com o aumento das concentrações, há uma redução no comprimento das brotações. Essa tendência mostrou-se economicamente viável, uma vez que determinados reguladores tornam-se onerosos para o cultivo *in vitro*. No genótipo CPI54, a tendência da curva foi quadrático negativa, mostrando decréscimo do comprimento médio das brotações até a concentração de $0,59 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 3A).

De uma maneira geral, o comprimento das brotações dos genótipos foi estimulado pelo aumento das concentrações de cinetina, a qual proporcionou comportamento linear ascendente. Efeito contrário foi observado para BAP e 2iP, em que o maior comprimento foi verificado sem adição de citocinina no meio de cultura. Com a adição desses reguladores, o comportamento quadrático foi negativo, sugerindo que, com adição de tais reguladores, há uma redução no comprimento das brotações (Figura 3B). Calculando-se a derivada da equação, o menor valor estimado para o comprimento das brotações é, aproximadamente, 0,5 cm, em relação às diferentes concentrações de citocininas BAP e 2iP, sendo obtido com o emprego de $0,65$ e $0,63 \text{ mg L}^{-1}$ desses reguladores de crescimento, respectivamente. Essa tendência pode estar relacionada com as diferentes respostas proporcionadas pelas citocininas,

uma vez que existe diferença no seu metabolismo. Segundo Hu e Wang (1983), entre as diferentes citocininas, o BAP destaca-se por ser mais utilizado e bastante eficiente para induzir a formação de elevado número de brotações e taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação. A cinetina e a isopenteniladenina, por outro lado, permitem o crescimento normal sem múltiplas brotações.

Em geral, para os genótipos estudados, segmentos nodais apresentaram respostas antagônicas quando se compara o número e comprimento das brotações, principalmente em relação às concentrações de BAP. Com isso, observa-se que concentrações mais elevadas dessa citocinina proporcionam a formação de maior número de brotações, enquanto concentrações mais baixas ou a sua ausência favorecem o crescimento das brotações. No entanto, para o 2iP essa tendência não foi observada, uma vez que o desdobramento da equação para número de brotações não foi significativo.

A resposta das citocininas em função dos genótipos para a variável número médio de gemas foi similar ao observado no comprimento das brotações. Entretanto, os maiores valores para os genótipos dentro do fator cinetina foram 2,72 e 2,49 cm, para *P. setacea* (SBA58) e *P. cincinnata* (CBA10), respectivamente, diferindo significativamente dos genótipos CPI54 e LCE67. Para o BAP, os maiores valores foram observados em *P. cincinnata* CBA10 e CPE16, diferindo significativamente de *P. setacea* (SBA58). Em relação ao 2iP, SBA58 diferiu significativamente dos genótipos, exceto para *P. laurifolia* LCE67, sendo o maior valor notado em CPE16 (Tabela 5).

O número médio de gemas observado para o desdobramento dos genótipos em função das concentrações de citocininas mostrou efeito contrário ao verificado no genótipo CPE16 para número de brotações. Com o aumento das concentrações de citocininas em CBA10 e CPI54, pode-se constatar que houve redução no número de gemas, verificando o ponto mínimo em 0,61 e 0,62 mg L⁻¹, respectivamente (Figura 4A). Para o desdobramento das citocininas dentro das concentrações, para o número de gemas, constatou-se comportamento semelhante ao observado para a variável comprimento das brotações (Figura 4B). Entretanto, foi observado ponto mínimo de 0,6 e 0,62 mg L⁻¹ para 2iP e BAP, respectivamente.

Os resultados mostraram respostas diferenciadas dos genótipos na multiplicação *in vitro*, e até mesmo, para as diferentes citocininas. Tais respostas podem ter ocorrido em decorrência da variação genética intra e interespecífica, por se tratarem de espécies silvestres (Passos e Bernacci, 2005; Faria et al., 2007).

Diante do exposto, pode-se observar que os genótipos de maracujazeiro estudados possuem quantidade de citocinina e auxina endógena suficiente para iniciar o processo de

micropropagação, uma vez que foi notada resposta satisfatória para o desenvolvimento de explantes sem a adição de reguladores de crescimento.

De forma geral, pode-se perceber que diferentes reguladores de crescimento e suas concentrações, atuam de forma diferenciada de acordo com o genótipo estudado. Entretanto, é necessário determinar as melhores formas de obtenção de brotações e de crescimento *in vitro*, a depender do objetivo de cada estudo. Por fim, o meio de cultura DKW permite melhor desenvolvimento *in vitro* para as espécies estudadas. Este meio com adição de 6-benzilaminopurina induz maior número de brotações e com cinetina possui maior eficiência na obtenção de brotações com maiores comprimentos em genótipos de maracujazeiro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de Doutorado a Coelho, M.S.E. e PQ-DT a Melo, N.F. e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pelo suporte as atividades da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo, F.P.; Silva, N.; Queiroz, M.A. 2008. Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* Mast. com base em descritores morfoagronômicos. Revista Brasileira Fruticultura 30: 723-730.
- BarruetoCid, L.P.; Teixeira, J.B. 2010. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. p. 15-50. In: BarruetoCid, L.P.; ed. Cultivo *in vitro* de plantas. Embrapa, Brasília, DF, Brazil.
- Bernacci, L.C.; Meletti, L.M.M.; Soares-Scott, M.D.; Passos, I.R.S. 2005. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. p. 559-586. In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. org. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brazil.
- Biasi, L.A.; Falco, M.C.; Rodriguez, A.P.M.; Mendes, B.M.J. 2000. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. Scientia Agricola 57: 661-665.
- Caldas, L.S.; Haridasan, P.; Ferreira, M.E. 1998. Meios nutritivos. p. 87-132. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.M. ed. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Embrapa-SPI & Embrapa-CNPq, Brasília, DF, Brazil.

- Cervi, A.C.; Milward-de-Azevedo, M.A.; Bernacci, L.C. 2010. Passifloraceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000182>. (Acesso em 31/7/2010).
- Cervi, A.C. 2006. O gênero *Passiflora* (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. *Adumbrationes ad Summae* 16: p.1-5.
- Dornelas, M.C.; Vieira, M.L.C. 1994. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 211-217.
- Faria, G.A.; Costa, M.A.P.C.; Ledo, C.A.S.; Junghans, T.G.; Souza, A.S.; Cunha, M.A.P. 2007. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. *Bragantia* 66: 535-543.
- Ferreira, F.R. 2005. Genetic resources of *Passiflora*. p. 40-51. In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. org. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brazil.
- Garcia, R.; Pacheco, G.; Falcão, E.; Borges, G.; Mansur, E. 2011. Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 106: 47-54.
- Guzzo, F.; Ceoldo, S.; Andretta, F.; Levi, M. 2004. *In vitro* culture from mature seeds of *Passiflora* species. *Scientia Agricola* 61: 108-113.
- Hu, C.Y.; Wang, P.J. 1983. Meristem, shoot tip and bud culture. p. 117-227. In: Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V.; Yamada, Y. ed. Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding. New York: Macmillan.
- Lloyd, G.; McCown, B. 1980. Use of micro culture for production and improvement of *Rhododendron* spp. *Hort Science* 15: 416.
- McGranahan, G.H.; Driver, J.A.; Tulecke, W. 1987. Tissue culture of Juglans. p. 261-271. In: Bonga, J.M.; Durzan, D.J. eds. Cell and tissue culture in forestry: Case histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms. Dordrecht: Martinus Nijhoff.
- Meletti, L.M.M.; Soares-Scott, M.D.; Bernacci, L.C.; Passos, I.R.S. 2005. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. p. 55-78. In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. org. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brazil.
- Melo, N.F.; Okasaki, W.Y.; Leite, C.B.; Fári, M. 1999. Estabelecimento do cultivo *in vitro* de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). *Ciência e Agrotecnologia* 23: 102-107.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479.
- Passos, I.R.S.; Bernacci, L.C. 2005. Cultura de tecidos aplicada à manutenção de germoplasma *in vitro* e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora* spp.). p. 360-383.

In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. org. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brazil.

Santos, F.C.; Ramos, J.D.; Pasqual, M.; Rezende, J.C.; Santos, F.C.; Villa, F. 2010. Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. *Revista Ceres* 57: 112-117.

Santos-Serejo, J.A; Junghans, T.G.; Soares, T.L.; Silva, K.M. 2006. Meios Nutritivos para Micropropagação de plantas. p. 79-98. In: Souza, A.S.; Junghans, T.G. ed. Introdução Micropropagação de plantas. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, Brazil.

Silva, C.V.; Oliveira, L.S.; Loriato, V.A.P.; Silva, L.C.; Campos, J.M.S.; Viccini, L.F.; Oliveira, E.J.; Otoni, W.C. 2011. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passion fruit species, *P. cincinnata* Masters. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 107: 407–416.

Soares, W.S.; Rêgo, M.M.; Rêgo, E.R.; Barroso, P.A.; Nascimento, K.S.; Ferreira, K.T. 2012. Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 14: 138-142.

Vanderplank, J. 1996. Passion flowers. The MIT, Cambridge.

Vieira, M.L.C.; Carneiro, M.C. 2004. *Passiflora* spp. Passion fruit. p. 436-453. In: Litz, R. ed. Biotechnology of fruit and nut crops. Oxford: CABI.

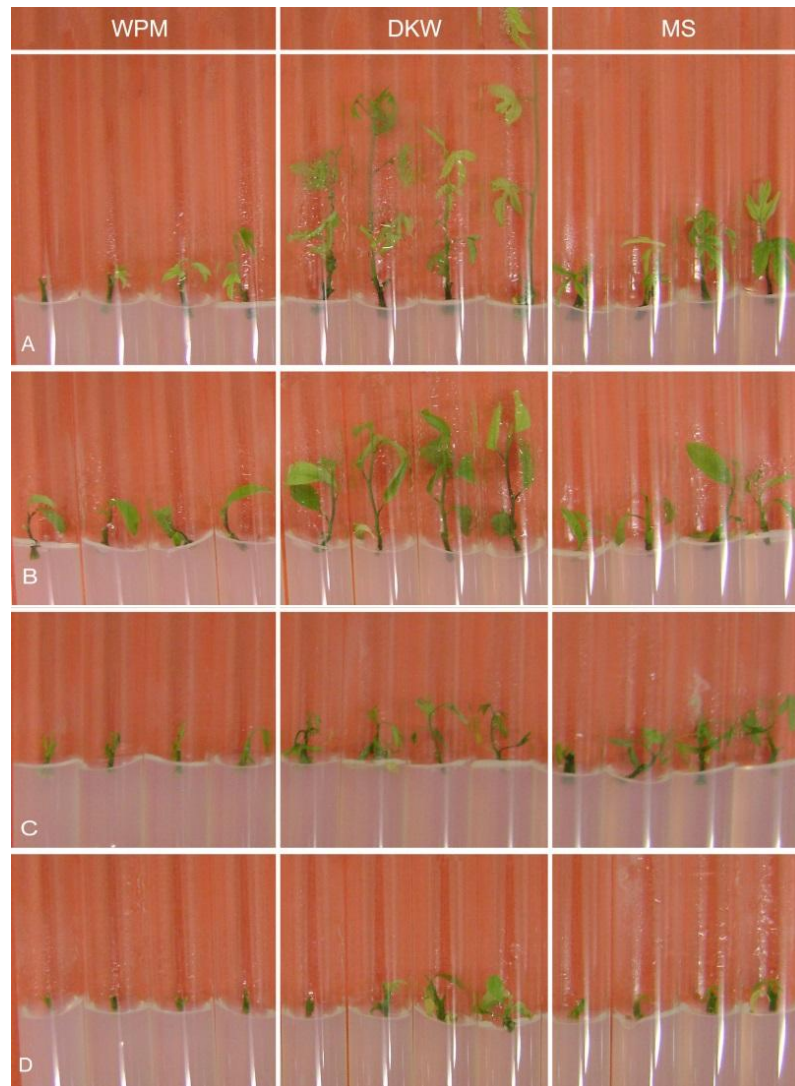


Figura 1. Respostas diferenciadas de crescimento no cultivo *in vitro* de genótipos de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) sob três formulações de meios de cultura. A- *P. cincinnata* (CBA10), B- *P. laurifolia* (LCE67), C- *P. setacea* (SBA58) e D- *P. luetzelburgii* (LBA57).

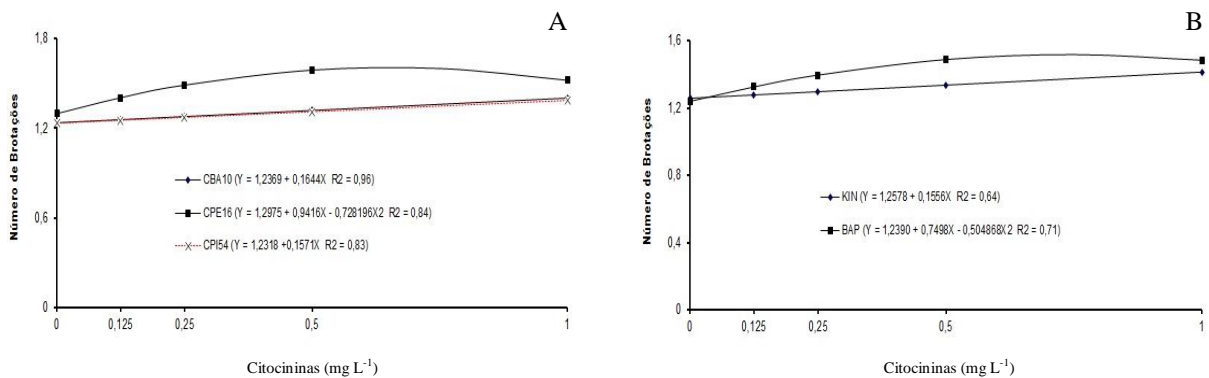


Figura 2. Número médio de brotações obtido no cultivo *in vitro* de genótipos de maracujazeiro. *P. cinnamata* Mast. (CBA10, CPE16, CPI54) em função das concentrações de citocininas (A) e tipo de citocinina em função das concentrações (B).

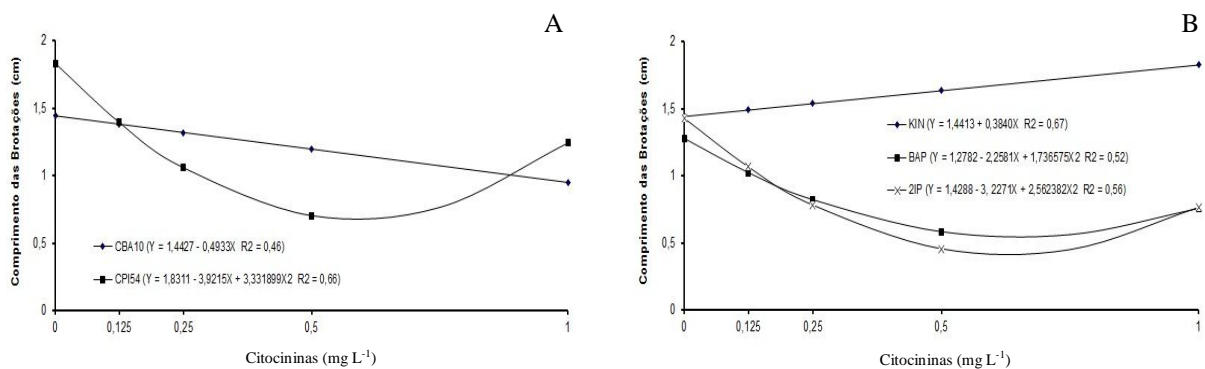


Figura 3. Comprimento médio das brotações (cm) obtido no cultivo *in vitro* de genótipos de maracujazeiro. *P. cinnamata* Mast. (CBA10 e CPI54) em função das concentrações de citocininas (A) e tipo de citocinina em função das concentrações (B).

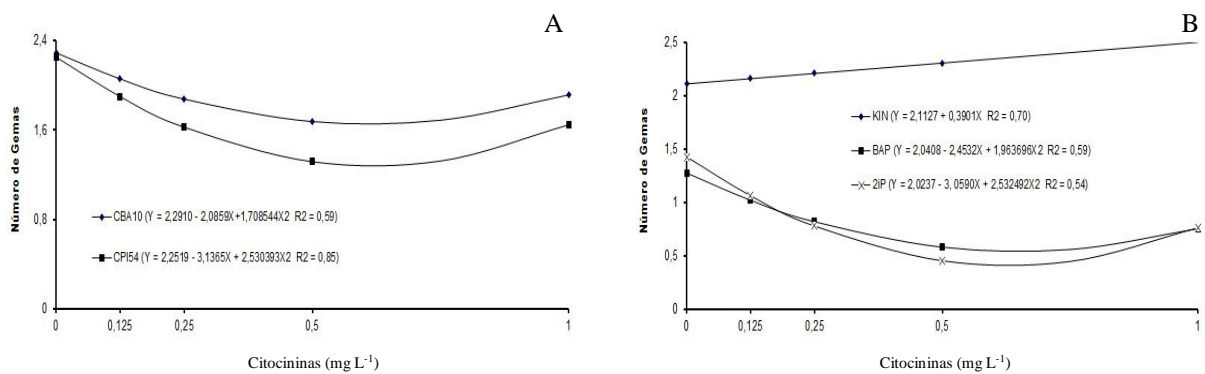


Figura 4. Número médio de gemas obtido no cultivo *in vitro* dos genótipos de maracujazeiro. *P. cinnamata* Mast. (CBA10 e CPI54) em função das concentrações de citocininas (A) e tipo de citocinina em função das concentrações (B).

Tabela 1. Valores médios para o comprimento das brotações e distância dos entrenós, obtidos no cultivo *in vitro* das espécies *P. cincinnata* Mast. (CBA10, CPE16, CPI54), *P. laurifolia* L. (LCE67), *P. luetzelburgii* Harms (LBA57) e *P. setacea* DC (SBA58) em função dos meios de cultura.

Meios	Genótipos						Média
	CBA10	CPE16	CPI54	LCE67	LBA57	SBA58	
Comprimento das brotações (cm)							
WPM	1,18 aB	1,50 aB	1,65 aB	1,45 aA	0,73 aA	1,43 aA	1,32 C
DKW	5,73 aA	3,78 abcAB	5,70 abA	3,43 abcA	1,35 cA	2,65 bcA	3,77 A
MS	2,25 bB	5,43 aA	2,33 bB	1,93 bA	1,13 bA	2,10 bA	2,53 B
Média	3,05 a	3,57 a	3,23 a	2,27 ab	1,07 b	2,06 ab	
Distância dos entrenós (cm)							
WPM	0,05 aB	0,30 aB	0,15 aB	0,25 aA	0,00 aA	0,13 aA	0,15 C
DKW	0,70 aA	0,55 abAB	0,73 aA	0,45 abcA	0,13 cA	0,25 bcA	0,47 A
MS	0,33 bB	0,85 aA	0,25 bB	0,25 bA	0,10 bA	0,18 bA	0,33 B
Média	0,36 ab	0,57 a	0,38 ab	0,32 b	0,08 c	0,18 bc	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Valores médios para número de gemas obtidas no cultivo *in vitro* de genótipos de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) e nos meios de cultura.

Genótipos	Número de gemas
<i>P. cincinnata</i> - CBA10	2,42 ab
<i>P. cincinnata</i> - CPE16	2,63 a
<i>P. cincinnata</i> - CPI54	2,41 ab
<i>P. laurifolia</i> - LCE67	2,31 ab
<i>P. luetzelburgii</i> - LBA57	1,79 b
<i>P. setacea</i> - SBA58	2,80 a
Meios	Número de gemas
WPM	1,96 c
DKW	2,83 a
MS	2,39 b

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Valores médios para o número de brotações, obtidos no cultivo *in vitro* das espécies *P. cincinnata* Mast. (CBA10, CPE16, CPI54), *P. laurifolia* L. (LCE67) e *P. setacea* DC (SBA58) em função das citocininas.

Citocininas	Genótipos					Média
	CBA10	CPE16	CPI54	LCE67	SBA58	
	Número de Brotações					
KIN	1,25 a A	1,33 a B	1,30 a A	1,27 a A	1,43 a A	1,32 A
BAP	1,40 b A	1,79 a A	1,33 bc A	1,25 bc A	1,17 c B	1,39 A
2iP	1,25 a A	1,25 a B	1,25 a A	1,22 a A	0,97 b C	1,19 B
Média	1,30 b	1,46 a	1,29 b	1,25 b	1,19 b	-

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Valores médios para o comprimento das brotações (cm), obtidos no cultivo *in vitro* das espécies *P. cincinnata* Mast. (CBA10, CPE16, CPI54), *P. laurifolia* L. (LCE67) e *P. setacea* DC (SBA58) em função das citocininas.

Citocininas	Genótipos					Média
	CBA10	CPE16	CPI54	LCE67	SBA58	
	Comprimento das Brotações (cm)					
KIN	1,80 ab A	2,13 a A	1,36 bc A	1,12 c A	1,52 bc A	1,58 A
BAP	1,07 a B	0,97 ab B	1,15 a A	0,77 ab A	0,51 b B	0,90 B
2iP	0,91ab B	1,35 a B	1,22 ab A	0,69 bc A	0,33 c B	0,89 B
Média	1,26 a	1,48 a	1,25 a	0,86 b	0,79 b	-

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 5. Valores médios para o número de gemas, obtidos no cultivo *in vitro* das espécies *P. cincinnata* Mast. (CBA10, CPE16, CPI54), *P. laurifolia* L. (LCE67) e *P. setacea* DC (SBA58) em função das citocininas.

Citocininas	Genótipos					Média
	CBA10	CPE16	CPI54	LCE67	SBA58	
	Número de Gemas					
KIN	2,49 ab A	2,27 bc A	1,93 c A	1,88 c A	2,72 a A	2,26 A
BAP	1,80 a B	1,89 a B	1,64 ab A	1,54 ab AB	1,35 b B	1,64 B
2iP	1,59 ab B	1,95 a AB	1,68 ab A	1,42 bc B	1,11 c B	1,55 B
Média	1,96 ab	2,03 a	1,75 bc	1,61 c	1,73 bc	-

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho contribui para o conhecimento das variáveis citogenéticas de espécies e híbridos interespecíficos, e do cultivo *in vitro* de espécies silvestres de *Passiflora* com uso potencial, permitindo obter as seguintes conclusões:

✓ Os dados referentes ao comportamento cariológico, processo meiótico e viabilidade polínica do híbrido interespecífico revelam um indivíduo fértil, tornando possível a sua utilização na obtenção de novos materiais para o programa de melhoramento.

✓ As características citogenéticas, suportadas pelos resultados da GISH permitem confirmar a origem híbrida e distinguir o genoma do híbrido em relação aos parentais.

✓ O número e a posição terminal das bandas heterocromáticas/DNAr 45S são bastante conservadas no subgênero *Passiflora*.

✓ *Passiflora luetzelburgii* revela número cromossômico similar às passifloras com importância agrônômica, além de bandas CMA₃⁺/DAPI⁻ co-localizadas com DNAr 45S.

✓ Os marcadores do tipo ISSR selecionados possuem grande potencial para detecção de polimorfismos moleculares em genótipos de maracujazeiro.

✓ Os iniciadores ISSR revelam a origem dos fragmentos entre os genótipos, podendo ser utilizados como ferramenta em trabalhos de caracterização do BAG-Maracujá e de pré-melhoramento.

✓ Os genótipos utilizados no estabelecimento *in vitro*, de maneira geral, possuem grande potencial para trabalhos de micropropagação.

✓ O meio de cultura DKW permite um melhor desenvolvimento *in vitro* para as espécies estudadas.

✓ *Passiflora cincinnata* CBA16 possui maior potencial de resposta morfogênica *in vitro*.

✓ O meio de cultura DKW com adição de cinetina possui maior eficiência na obtenção de brotações com maiores comprimentos em genótipos de maracujazeiro e com adição de BAP induz maior número de brotações.

ANEXOS

INSTRUÇÕES PARA AUTORES

Normas para publicação

Euphytica



Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

Scientific style

Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

Scientific style

Genus and species names should be in italics.

Scientific style

Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols etc.:

- Italic for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities
- Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative)
- Bold for vectors, tensors, and matrices.

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
- Article by DOI
- Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- Online document
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. *IOP Publishing PhysicsWeb*. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- Dissertation
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

Tables

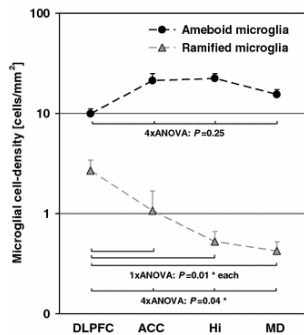
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

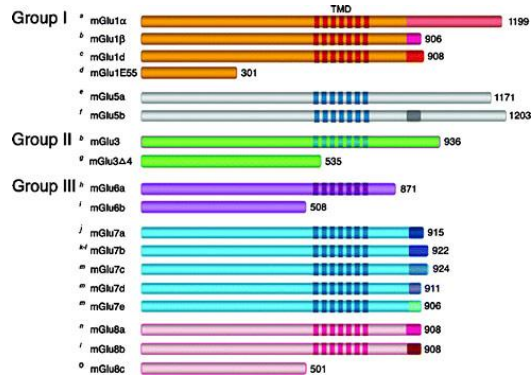


- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Resolution: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Does Springer provide English language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in:

- [Edanz English editing for scientists](#)

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

- **Important note:** the journal may use software to screen for plagiarism.
- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

- Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.
- The author's institution may be informed.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor

- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

- here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.



Instructions for Authors

Genetics and Molecular Research (GMR) publishes Book Review, Brief Note, Case Report, Comment, Correction, Errata, Homage, *In Memoriam*, Letter to the Editor, Methodology, Mini-Review, Obituary, Opinion, Point of View, Research Note, Retraction, Review, Review Article, Short Communication, and Thesis Abstract, with regard to genetics, evolution, molecular biology, and bioinformatics. Review articles are normally received by invitation only. If you would like for us to consider a review article, please consult the editor first; send a proposed title, a brief outline and a list of papers relevant to the review published by the author(s). GMR is an exclusively online journal.

The journal is maintained by the not-for-profit scientific foundation **Ribeirão Preto Foundation for Scientific Research (FUNPEC-RP)** and the articles are open access. **The fee per accepted submission is R\$ 1.780,00 for Brazilian authors and US\$ 1,060.00 for authors from other countries. The US dollar amount reflects the approximate current foreign exchange rate and is subject to change.** This fee covers part of the expenses for final language and technical revision, for page setup, and for publishing online.

Payment of the publishing fee should be made by the authors only after receiving a preliminary acceptance. After payment is received by our office, the manuscript will be processed further for publication, depending on the final approval of our Editorial Board.

Payment, both from within or outside Brazil, should be made by bank transfer (Banco do Brasil or City Bank).

[Instructions for payment \(Brazil\).](#)

[Instructions for payment \(Outside Brazil\).](#)

Please contact the editorial office [gmr@geneticsmr.com] if you have any questions.

All GMR articles must meet the highest standards of scientific quality, both in terms of originality and significance, and the research findings reported should make substantial advances. As it is a journal serving a wide and varied scientific community, article abstracts, introductions and conclusions should be comprehensible to the non-specialist, stressing any wider implications of the study. However, the papers should not compromise on the scientific rigor and detail demanded by an international research journal. The broad readership that GMR attracts gives authors an opportunity to convey to a large audience, as well as to specialists, the importance of their research. The journal is currently indexed in over 64 services; see [<http://www.geneticsmr.com>].

Contributions should be sent either by e-mail as attachments to [gmr@geneticsmr.com].

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been previously published and will not be simultaneously published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries. The use of registered names, trademarks, etc., in this publication does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use. All papers should be prepared in U.S. English. An initial evaluation of the language will be made upon receipt of each manuscript. Those that are considered inadequate for initial review will be returned or sent out for correction, at the discretion of the author. The manuscript will be considered officially received when the corrected version is ready to be sent to the referees.

Before final acceptance, a submission letter with the title of the article and names and signatures of all the authors should be sent by e-mail to gmr@geneticsmr.com. Galley proofs will be sent in “pdf” form via e-mail for final revision. All authors are co-responsible for their submissions and they should make every effort to check the paper before this final step to avoid costly reformatting and possible introduction of new errors.

GMR articles have no rigid length restrictions. They should contain sufficient technical detail for an expert reader to understand and assess the methods and results. There is no page limit for GMR articles, but authors should still be concise, for two main reasons. First, our electronic refereeing system relies on e-mail, and very large files occasionally cause problems. Second, lengthy manuscripts can be cumbersome to read and study. Referees tend to dislike them, and they take longer to process. In addition, readers of electronic journals often print articles to read them. Remember that a 10,000-word article takes up around 11 pages.

How many pages would you be willing to read on-screen or print out?

Editorial policies: GMR is a refereed journal. Only original manuscripts will be considered for publication. Manuscripts will be reviewed by at least two independent reviewers before a decision is made on

publication. The whole process is conducted electronically to speed progress and final publication. Papers will be published (placed online), once were fully processed. Papers accepted in their final form from January 1 to March 31 constitute the first issue of each volume, and so on. There are four issues per year.

Manuscripts (in U.S. English), together with a cover letter from the author responsible for all correspondence, should be submitted to the Editor at [gmr@geneticsmr.com] in electronic format as .doc files saved in Microsoft Word 97 for Windows, or later version. Do not use formatting such as Word's "Heading" or "Style Sheets". Spelling, punctuation, sentence structure, spacing, length, and consistency of usage in form and descriptions should be checked before submission. Please also check references for accuracy. Ensure that all figures and tables are mentioned in the text, and that all references are cited in the text. Figure and table files (see below) should be separate.

Submission information

Authors are required to provide the following information with their electronic submissions:

Author submitting the article; article title; authors (full list); article type and session; status of article (e.g., new, revised, etc.); postal address; e-mail address; phone number; fax number; names and types of the files sent.

Brazilian authors should not translate their institutional addresses. These should remain in the original (Portuguese) language.

Revised versions: Authors submitting a revised version of an article, must remember to include a list of changes, and replies to the referees (or technical editor). All the files, not just those revised, for the final draft of paper should be sent.

Acknowledgment of electronic submissions: Successful receipt and processing of the author's submission will be acknowledged by e-mail when the submitted manuscript has been checked. If no reply has been received within one week, the author should contact the editor at [gmr@geneticsmr.com].

Review: Articles are reviewed anonymously by independent referees. Authors are encouraged to suggest names of expert reviewers, but selection remains the prerogative of the editors. To facilitate the review process, the authors can send supplementary material, such as cited accepted but not yet published papers, which may be important for assessment of the manuscript.

A review article should contain: an abstract of 250 words or less, no more than six key words, a running title and no more than 60 references. It should be divided into sections with appropriate titles and subtitles.

Preparation of the manuscript

Order the sections comprising the manuscript as follows: title, running title, author, address, abstract, key words, introduction, material and methods, results, discussion, acknowledgments, and references.

Title Page: The title page should include the title of the article, authors' names (names and initials (only) thinking in indexing services), and authors' affiliation. The affiliation should comprise the department, institution (usually university or company), city, and state (or nation). The title page should include the name and complete mailing address, telephone number, fax number, and e-mail address of the author designated to review proofs. A running title of no more than 60 characters (including spaces) should be provided.

Abstract: An abstract of up to 250 words, single-spaced, is required of research articles and reports and should be arranged in one paragraph. The following information (without headings) should be included: purpose, methods, results (please report numerical data (means \pm SE) for significant results), and conclusions. Review articles also require an abstract, which need not include all of these items.

Key words: A list of key words or indexing terms (up to six) should be included.

Text

Format: Headings should be bold, and first letters capitalized and left-aligned. All text should be set in Times New Roman font, 12 point, left-aligned, single-spaced. Do not justify the right margin. Leave only one (1) space after periods. Paragraphs should not be indented; there should not be any blank lines between them. Use line returns only at the end of paragraphs. Do not use tabs or spaces to create indents. Use the Symbol font for symbols and special characters. Do not use equation editors or footnoting utilities. Save equations as images. Equations should be numbered consecutively with Arabic numerals in parentheses on the right hand side of the page.

Footnotes: Footnotes should be avoided. When their use is absolutely necessary, footnotes should be numbered consecutively using Arabic numerals and should be placed at the bottom of the page to which they refer. Place a line above the footnote, so that it is set off from the text.

Tables/Charts: Special care should be taken to ensure that all tables are properly formatted. Scientific symbols used should be in Symbol or Times New Roman. Tables should be on a separate page, numbered consecutively (with Arabic numerals) referred to by number in the text and designed to fit the column or page size of the journal. Use tables with cells to separate columns. Do not use spaces, tabs or vertical lines. Left justify the title above the table.

Indicate each table's location within the manuscript.

Illustrations: Illustrations/figures (photographs, drawings, diagrams, and charts) should each be in a single file, numbered in a consecutive series of Arabic numerals in the order in which they are cited in the text. Illustrations must be submitted as separate files. All illustrations are to be supplied in JPEG (jpg) format in either color or black and white. Images must be saved as separate, stand-alone files. The image resolution should be 300 dpi. Do not embed images within the text file. Indicate each figure's location within the text. Do not forget to send the legend in a separate page. The authors should also send, by mail, a printed version of the figures. These should be at least 10 x 15 cm, up to US letter size, so that figures can be scanned (in case the figure files are not adequate) to guarantee good quality for publishing online.

Abbreviations: Try to use abbreviations in the text sparingly. Write out abbreviations in full before the first time they are used in the text. Use the metric system for all measurements without periods (cm, mL, s). Define all symbols used in equations and formulas. Do not abbreviate the word "Figure" or "Table" in titles or text.

Acknowledgments: All acknowledgments (including those for grant and financial support) should be typed in one paragraph directly preceding the reference section. Authors of manuscripts submitted to GMR are requested to state the source of all funding that enabled the described research to be undertaken.

References: References in the text should include the name of the author and the year in parentheses, e.g. (Searle, 1961) or (King and Wilson, 1975). When a reference with more than two authors is cited, only the first author is named, e.g. (Comstock et al., 1958). The references must be cited in the text in chronological order, e.g. (Ideber, 2001; Uetz, 2002; Ottavai, 2004). References to "unpublished results" and "submitted papers" should appear in the text in parentheses following the name(s) of the individual(s). Example: (Pereira KS, Martins PK and Silva TM, unpublished results). **No more than 40 references should be cited in a Full-length paper, 20 references in a Short Communication and 60 references in a Review article.**

References, under the heading "References", should include only works referred to in the text. This section should be arranged in alphabetical order under the first author's last name. References should be cited as follows: journal papers - names and initials of the first four authors (after that using et al.), year, journal title abbreviated according to PubMed or Web of Science, volume number, first and last page numbers; books - names of authors, year, full title, edition, publishers, address (city); articles published in symposia - names of authors, year, full title of book, name(s) of editor(s) in parentheses, publisher, address (city), first and last page numbers.

The references should consist mainly of articles from indexed journals. References for techniques that are essential for understanding or repeating the methods should always be in easily accessible (indexed) journals.

Reference style: The list of references at the end of the paper should follow the format requested by GMR. The link below can be accessed to see how the references should appear.

Examples of reference style
General information of GMR style

SCIENTIA AGRICOLA

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Objetivos e política editorial

Scientia Agricola é uma publicação da Universidade de São Paulo, Campus "Luiz de Queiroz" em Piracicaba, uma cidade situada no estado de São Paulo, região sudeste do Brasil. *Scientia Agricola* tem por objetivo publicar artigos originais que contribuam ao avanço científico das Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

A revista possui amplo espectro de temas, abrangendo Produção Vegetal, Produção Animal, Engenharia Agrícola, Tecnologia Agroindustrial, Ciências Florestais e aplicações nas Ciências Agrárias, Ambientais, do Solo e Biológicas.

Quatro tipos de manuscritos podem ser submetidos: artigos de pesquisa originais, revisões, notas e pontos de vistas.

Artigos originais são agrupados por assunto nas seguintes categorias: Engenharia Agrícola; Microbiologia Agrícola; Agrometeorologia; Ciência Animal e Pastagens; Biometria, Modelagem e Estatística; Fitotecnia; Ecologia; Entomologia; Ciência e Tecnologia de Alimentos; Ciência Florestal; Genética e Melhoramento de Plantas; Fitopatologia; Fisiologia Vegetal e Bioquímica; Solos e Nutrição de Plantas; e Zoologia.

A revista encontra-se indexada no Current Contents[®]/Agriculture, Biology, and Environmental Sciences, Science Citation Index Expanded (SciSearch[®]), CAB Abstracts, SciELO, AGRIS, AGROBASE, Chemical Abstracts, INIS, e Tropag & Rural. Artigos originais avaliados pela Comissão Editorial podem ser submetidos para avaliação por revisores especialistas no tema ou rejeitados sem revisão pelos pares

Instruções gerais

SUBMISSÃO DO MANUSCRITO

- Comece a submissão revendo na íntegra as Instruções aos Autores para garantir que o artigo esteja de acordo com as normas da *Scientia Agricola*. Para submissão de [revisão](#) os autores devem verificar as instruções específicas. Uma vez que estas páginas são atualizadas periodicamente, recomenda-se fortemente que o autor leia as normas antes da submissão, mesmo que já tenha feito isso anteriormente.
- Por favor, leia a [lista de checagem](#) de conformidade antes de submeter seu manuscrito.
- Os autores devem submeter os manuscritos pelo sistema on-line, acessando o site <http://www.scielo.br/sa>, clicando em "submissão online".
- Manuscritos deverão ser organizados em MS Word para Windows ou num software compatível. Evite o uso de recursos de processamento de texto automatizados, tais como listas e numeração, cabeça e formatação subtítulo, links internos, ou estilos.
- Ao submeter um artigo, os autores devem recomendar cinco revisores qualificados que são especialistas na área de conhecimento abordada, e fornecer os email e filiação. No mínimo dois dos revisores devem ter nacionalidade distinta do autor correspondente. Revisores oriundos da mesma instituição do autor correspondente devem ser evitados.
- A publicação de um resumo ou resumo expandido em um evento científico não é considerada publicação anterior da pesquisa. Entretanto, resultados de pesquisas publicados anteriormente como trabalhos completos em eventos científicos não serão aceitos.

CARTA DE APRESENTAÇÃO (deve ser escrita em inglês)

- O conteúdo da [carta](#) deve apresentar a garantia de que o artigo é original, não foi publicado anteriormente e não está sendo considerado para publicação na sua forma final em outro lugar, tanto em veículo impresso quanto eletrônico. O autor correspondente deve assinar a carta de apresentação em nome de todos os autores. A carta deve ser inserida em arquivo separado, na área designada dentro do sistema.
- Os autores devem incluir cinco destaques (máximo de 100 caracteres incluindo espaços para cada destaque) explicando a importância do trabalho e como e porque os destaques principais se relacionam com o escopo da revista.

ESTILO DO MANUSCRITO

- Defina o significado das abreviaturas na primeira vez que forem citadas no resumo e no texto, e novamente nas tabelas e figuras. Uma vez que uma abreviação for citada, ela deve ser usada em todo o manuscrito, exceto no início de uma frase.
- O nome latino ou nomenclatura binomial (ou trinomial) e autoria deve ser utilizado quando mencionado pela primeira vez que se menciona todas as plantas, insetos, patógenos e animais.
- Tanto o ingrediente ativo quanto o nome químico da substância de pesticidas devem ser inseridos quando mencionado pela primeira vez.
- Identifique os solos utilizando a taxonomia de solos do USDA (<http://soils.usda.gov/technical/classification/osd/index.html>) até o segundo nível (subordem) ou até o quarto nível (subgrupo). A classificação da FAO também pode ser utilizada até o segundo nível. A tradução livre do nome e da classificação do solo não é permitida.
- Utilize o Sistema Internacional de Unidades em todo texto.
- Verifique os caracteres gregos e figuras cuidadosamente.
- Certifique-se que exceto quando seguidos por unidades, números de um a dez sejam escritos por extenso. Para quantidades decimais <1, coloque um zero antes do ponto decimal.
- Use ponto (.) como separador decimal.
- Porcentagens devem ser expressas como números inteiros, por exemplo: 35 % em vez de 35,4 %, 48%, em vez de 47,5 %, 79 %, em vez de 78,9 %.
- Utilizar o formato potência negativa para notar e inter-relacionar unidades, e.g.: kg ha⁻¹; não inter-relacione unidades usando a barra vertical, e.g.: kg/ha.
- Utilize um espaço simples entre as unidades, g L⁻¹, e não g.L⁻¹, ou gL⁻¹.
- Use o sistema horário de 24 h, com quatro dígitos para horas e minutos: 09h00, 18h30.
- As datas devem ser escritas: primeiro o dia, depois o mês e o por último o ano: 18 mar. 2000, 01 fev. 1987.
- Abreviar os meses com mais de quatro letras: jan.; fev.; mar. etc.

PREPARAÇÃO DO MANUSCRITO

- Texto e ilustrações submetidos à apreciação pelo corpo editorial devem ser escritos em língua inglesa, segundo as regras ortográficas e gramáticas norte-americanas.
- Manuscritos devem ser organizados em um arquivo denominado documento principal. MS Word ou software compatível devem ser utilizados para preparar o documento principal, fonte Times New Roman 12, 3.0 cm de margens e duplo espaço. Organize o documento principal na seguinte ordem: Página de rosto, Resumo (máximo de 250 palavras), Palavras-chave (máximo de cinco palavras), Introdução (30 linhas), Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos (opcional), Referências, Figuras e Tabelas com suas respectivas legendas.
- O item Conclusão é opcional e, quando utilizado deverá vir após a seção de discussão. O item Resultados e Discussão podem ser combinados e, a conclusão pode ser incorporada à discussão.
- O manuscrito deve ter um máximo de 30 páginas (papel A4); linhas e páginas devem ser numeradas sequencialmente, ilustrações e tabelas inclusive.
- Tabelas e Figuras devem ser incluídas no final do documento principal.

Página de rosto:

- Cada artigo deve conter uma página de rosto contendo o título (máximo de 15 palavras), os nomes completos dos autores, e afiliações completas em inglês.
- Deverá ser fornecido um título abreviado de 40 caracteres ou menos (além do título do trabalho completo).
- Os autores devem selecionar uma categoria: Engenharia Agrícola; Microbiologia Agrícola; Agrometeorologia; Ciência Animal e Pastagens; Biometria, Modelagem e Estatística; Fitotecnia; Ecologia; Entomologia; Ciência e Tecnologia de Alimentos; Ciências Florestais; Genética e Melhoramento de Plantas; Fitopatologia; Fisiologia Vegetal e Bioquímica; Solos e Nutrição de Plantas; e Zoologia.
- O autor correspondente deve ser identificado(a) por um asterisco e um endereço eletrônico institucional do autor(a) correspondente deve ser informado.
- A afiliação/endereço atual dos autores(as) deve ser informado da maneira mais detalhada possível.
- O autor correspondente deverá assumir a responsabilidade plena pelo manuscrito, incluindo o cumprimento das políticas do periódico, e será o contato prioritário com a revista. O autor que submete o artigo pode assumir essa função se indicado na carta de apresentação.

Submissão de imagem para a capa:

A capa da *Scientia Agricola* poderá utilizar uma imagem representativa de um artigo publicado no volume. Os

autores são convidados a submeter imagens para a capa que tenham apelo visual e que sejam cientificamente interessantes. As imagens devem ter alta resolução (300dpi) e medir 17 x 17cm. As imagens para a capa podem ser de organismos, habitat, montagens de diferentes imagens, diagramas, mapas ou dados. As ilustrações não precisam estar nos artigos, devem sim ser representativas do trabalho publicado. As imagens devem ser originais e os autores cedem os direitos de publicação exclusivamente a *Scientia Agricola*. Carregue o arquivo contendo a imagem como um arquivo suplementar junto com um arquivo texto que deverá conter uma breve descrição de um parágrafo da imagem relacionando-a com o manuscrito publicado. Se o autor não tiver os direitos autorais da imagem submetida, ele é responsável por obter a permissão necessária para poder utilizá-la.

Tabelas e Figuras

Tabelas:

- Devem ser numeradas sequencialmente com algarismos arábicos, e geradas com a ferramenta "Tabela" do MS Word ou MS Excel (manuscritos contendo tabelas coladas como figuras serão devolvidos aos autores).
- Os títulos das tabelas devem aparecer imediatamente acima do corpo das tabelas.
- Numere figuras e gráficos sequencialmente usando algarismos arábicos.

Figuras/Gráficos:

- Gráficos devem ser gerados em MS Excel.
- Fotografias devem ser apresentadas como arquivo "tagged image format [TIFF]", 300 DPI.
- Numere figuras e gráficos sequencialmente na ordem em que aparecem no texto.
- As figuras devem fornecer informações suficientes para que o leitor possa compreendê-las sem que haja a necessidade da leitura do texto que se refere a elas.
- Para as figuras que contêm mais de um painel, designar os painéis com letras maiúsculas (sem parênteses e sem pontos após as letras) no canto superior esquerdo de cada painel, se possível.
- As palavras utilizadas nas figuras devem ser iguais as utilizadas no manuscrito no que diz respeito à capitalização, itálico e símbolos.

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

- Manuscritos que avaliem a bioatividade de produtos químicos e/ou biológicos, incluindo reguladores do crescimento, em insetos, ácaros, fungos, bactérias, nematóides e plantas daninhas, não serão objeto de análise para publicação na *Scientia Agricola*.
- Manuscritos que avaliem melhorias ou protocolos de cultura de tecidos baseados no teste de aditivos, explantes ou condições de crescimento, ou ainda que falhem em mostrar uma melhoria substancial que não poderia ser deduzida da literatura existente, não serão considerados para publicação na *Scientia Agricola*.
- Os manuscritos devem obedecer aos critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais de cada área.
- Os conceitos e opiniões contidos nos artigos são de exclusiva responsabilidade dos (as) autores(as).
- Todos os trabalhos recebidos serão submetidos à política da revista para detecção de plágio e autoplágio.

Referências Bibliográficas

A citação de resumos de congressos, artigos técnicos, dissertações e teses não é permitida. Referências em Português ou outras línguas além do inglês devem ser evitadas. Referências escritas em outras línguas serão permitidas somente se os autores providenciarem uma explicação por mantê-las no texto. Se permitido pelo Editor Associado, tais referências devem ser citadas em inglês, mantendo a citação na língua original no final da referência, no seguinte formato (in Portuguese, with abstract in English).

Scientia Agricola não recomenda que os autores citem análises estatísticas ou soluções de softwares como referências. Essas ferramentas devem ser mencionadas no texto (Material e Métodos) ao incluir a análise específica e o nome do software, sua versão e/ou ano de lançamento. Por exemplo, "... a análise estatística foi realizada utilizando o PROC NLIN no SAS (Statistical Analysis System, versão 9.2)".

As referências e citações para artigos da *Scientia Agricola* serão formatadas utilizando o estilo de formato mínimo 'autor, ano' ou 'nome (ano)'. Checar se todas as citações no texto constam da lista de referências bibliográficas. Os exemplos:

1. Apenas um autor: Reichardt (2000) ou (Reichardt, 2000).
2. Dois autores: Fiorio and Demattê (2009) ou (Fiorio and Demattê, 2009).
3. Três ou mais autores: Rosso et al. (2009) ou (Rosso et al., 2009).
4. Organizar as referências em ordem alfabética e cronologicamente dentro de parênteses, e use (;) ponto e vírgula para separar citações múltiplas dentro de parênteses, por exemplo: (Boleli, 2003; Boerjan, 2006; Muraroli and Mendes, 2003).
5. Identificar múltiplas citações 'mesmo autor, mesma data' com a ajuda de letras minúsculas, por exemplo: (Cyrino, 2004a, b).
6. Usar o estilo "autor-ano" para ordenar a lista de referências, e: (i) abreviar os primeiros e segundos nomes dos

autores, mas nenhuma outra palavra; (ii) usar letras maiúsculas para todos os acrônimos, isto é, quando o autor for uma organização; (iii) utilizar letras maiúsculas para a 1ª letra do sobrenome e demais iniciais dos autores, que deverão ser separados por um ponto (.); (iv) separar autores por ponto-e-vírgula; (v) não usar "e comercial" (&) nas citações, nem na lista de referência; (vi) não usar caracteres grifados ou negritos para destacar qualquer parte da referência; (vii) usar letras maiúsculas na 1ª letra dos títulos de livros e de periódicos; (viii) não usar vírgula (,) para separar o título e o volume do periódico; (ix) separar os números de volume do periódico das páginas por dois pontos (:); (x) usar os números completos das páginas; (xi) separar os números de página por um traço (-); (xii) separar os grupos de páginas por uma vírgula se o artigo foi publicado em páginas descontínuas; (xiii) indicar o número da edição de um livro ou manual como "2ed", por exemplo; (xiv) sobre livros e manuais, indicar os editores ou a editora antes de discriminar a localidade sede dos editores ou da editora; (xv) separar os editores ou a editora da localidade por meio de uma vírgula (;) e (xvi) nestes casos, declarar os nomes da cidade, do estado e do país.

6.1 Revistas/Periódicos Científicos

Guillard, R.R.L.; Wangersky, P. 1958. The production of extracellular carbohydrates by some marine flagellates. *Limnology and Oceanography* 3: 449-454.

6.2 Livros

6.2.1 Livros com autores

Pais, I.; Jones Jr., J.R. 1998. *The Handbook of Trace Elements*. St. Lucie Press, Boca Raton, FL, USA.

6.2.2 Livros com editores/organizadores

Day, W.; Atkin, R.K., eds. 1985. *Wheat Growth and Modelling*. Plenum Press, New York, NY, USA.

6.2.3 Livros (e manuais) com organização/instituição como autor ou editora/organizadora
Association of Official Analytical Chemists - International [AOAC]. 2005. *Official Methods of Analysis*. 18ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.

6.3 Capítulo de Livro

Sharpley, A.N.; Rekolainen, S. 1997. Phosphorus in agriculture and its environmental implications. p. 1-53. In: Tunney, H.; Carton, O.T.; Brookes, P.C.; Johnston, A.E., eds. *Phosphorus loss from soil to water*. CAB International, New York, NY, USA.

6.4 Fontes eletrônicas

6.4.1 Elementos necessários para listar citações disponíveis on-line:

A autoria, autor ou fonte. Ano. O título do documento da web ou página da web (isto é, título principal da página). [meio] (data de atualização). Disponível em: endereço completo para localizar o recurso (URL / endereço) [Accessed Sept 19, 1992]

6.4.2 Elementos necessários para listar publicações disponíveis on-line:

A autoria, autor ou fonte. Ano. O título do documento ou página da web. [meio] Produtor/Editor. Disponível em: endereço completo para localizar o recurso [Accessed Sept 19, 1992]

6.5 Listagem de referências não escritas em inglês

Fornecer o título em inglês e indicar a língua original de publicação da revista ao final da referência, como exemplo abaixo:

Baretta, D.; Santos, J.C.P.; Figueiredo, S.R.; Klauberg-Filho, O. 2005. Effects of native pasture burning and Pinus monoculture on changes in soil biological attributes on the Southern Plateau of Santa Catarina – Brazil. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 29: 715-724 (in Portuguese, with abstract in English).

Mingoti, A.S. 2005. *Data analysis using multivariate statistics methods: an applied approach*. = *Análise de Dados Através de Métodos de Estatística Multivariada: uma abordagem aplicada*. Editora UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil (in Portuguese).