



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL

Wesley Henrique Figueiredo Bezerra

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR EM
ACESSOS DE MARACUJÁ NATIVO (*Passiflora cincinnata*
Mast.)**

Petrolina

2020

WESLEY HENRIQUE FIGUEIREDO BEZERRA

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR EM
ACESSOS DE MARACUJÁ NATIVO (*Passiflora cincinnata*
Mast.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal do Campus de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agronomia – Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo

Petrolina

2020

Bezerra, Wesley Henrique Figueiredo

B574c Caracterização citogenética e molecular em acessos de maracujá nativo (*Passiflora cincinnata*Mast.) / Wesley Henrique Figueiredo Bezerra. Petrolina, 2020.
54f. : il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina – PE, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo.

Inclui referências.

1. Genética vegetal. 2. Biotecnologia vegetal. 3. Maracujá – Semiárido. I. Título. II. Melo, Nataniel Franklin de. III. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 581.15

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

Wesley Henrique Figueiredo Bezerra

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR EM ACESSOS DE
MARACUJÁ NATIVO (*Passiflora cincinnata* Mast.)

Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em
Agronomia – Produção Vegetal,
pela Universidade Federal do
Vale do São Francisco.

Aprovada em: 20 de Maio de 2020.

Banca Examinadora



Dr. Nataniel Franklin de Melo

Embrapa Semiárido.



Dr. Roberta Lane de Oliveira Silva

UNIVASF



Dr. Rafaela Priscila Antonio

Embrapa Semiárido

Dedicatória

A minha família por me apoiar incondicionalmente em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo dom da vida e por ter me capacitado me dando inteligência e sabedoria.

Aos meus pais, Sandro Oliveira e Luciana Oliveira, por toda dedicação, lealdade e companheirismo. Ajudando-me em todas as decisões tomadas, dando todo suporte necessário para alcançar meus objetivos e obter êxito.

A toda a minha família por sempre estarem do meu lado, me apoiando sempre. Em especial a minha avó Rosa e a minha avó Lúcia por acreditarem em mim em todos os momentos, ajudando de todas as formas possíveis, por ser a minha base. As minhas tias por todo carinho dedicado, por me ouvirem em momentos difíceis, contribuindo para as minhas conquistas.

Aos meus amigos de mestrado, por toda ajuda e companheirismo, em horas decisivas. Por toda amizade.

Ao doutorando Tiago Lima e a técnica Ângela katiussia do laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido por todo suporte, apoio e ajuda no desenvolvimento da pesquisa.

Ao meu orientador Dr. Nataniel Franklin de Melo por ter desempenhado seu papel com todo profissionalismo, ajudando-me em todos os momentos, com palavras de confiança e execução das atividades.

A Facepe - Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco, pelo apoio financeiro fornecido.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, por disponibilizar o local e os recursos necessários ao desenvolvimento da pesquisa.

A Universidade Federal do Vale do São Francisco, pela qualidade do programa de pós-graduação fornecida.

A todas as pessoas que contribuíram positivamente na minha vida, amigos, família, conhecidos e professores, enfim a todos que torcem por mim.

RESUMO

O maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) é uma frutífera nativa do semiárido do nordeste brasileiro que se destaca por possuir mecanismos de tolerância ao déficit hídrico e bom desenvolvimento a condições adversas. O presente trabalho objetivou caracterizar, por meio de marcadores citogenéticos e moleculares do tipo ISSR, a diversidade genética entre acessos de maracujá da Caatinga pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Foram avaliados 53 acessos com 10 *primers* para marcadores ISSR obtendo-se um total de 301 bandas polimórficas, representando uma média de 30,1 bandas por acesso, com polimorfismo médio de 84,31%. Os valores da dissimilaridade genética foram obtidos através do índice de Jaccard, com variação entre 0,30 e 0,771. A menor distância genética (0,30) foi observada entre os acessos A34 e A35, enquanto a maior distância genética (0,771) foi entre os acessos A1 e A35. Através da análise de agrupamento pelo método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method Arithmect Mean) foi observado à formação de nove grupos. As análises citogenéticas foram realizadas em cinco acessos de *P. cincinnata*, sendo observado $2n=18$ cromossomos para todos os acessos. A coloração com os fluorocromos CMA/DAPI permitiu identificar quatro blocos com regiões heterocromáticas CMA⁺. A coloração CMA/DAPI foi eficiente, revelando regiões de heterocromatina, com a presença das bandas CMA⁺ e com variações estruturais entre os cromossomos dos presentes acessos. Os marcadores moleculares ISSR foram eficientes mostrando variabilidade genética entre os acessos avaliados e os citogenéticos revelaram diferenças estruturais entre os acessos com heteromorfismo.

Palavras-chave: Cromossomo. Maracujá da Caatinga. Variabilidade genética.

ABSTRACT

The Caatinga passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) is a semi-arid fruit from northeastern Brazil and qualified for fruit production and for breeding plants with tolerance to water deficit and good development under adverse conditions. The present study aims to characterize, through cytogenetic and molecular markers of the ISSR type, a genetic diversity among passion fruit accessions from the Caatinga belonging to the Active Germplasm Bank of Embrapa Semiárido. 53 accessions were evaluated with 10 *primers* for ISSR markers, resulting in a total of 301 polymorphic bands, representing an average of 30,1 bands per access, with an average polymorphism of 84.31%. The values of genetic dissimilarity were displayed using the Jaccard index, with a variation between 0.30 and 0.771. The smallest genetic distance (0.30) was observed between accessions A34 and A35, while the greatest genetic distance (0.771) was between accessions A1 and A35. Through the cluster analysis by the UPGMA method (Arithmet Average of the Unweighted Pair Group Method), the formation of nine groups was observed. The cytogenetic analyzes were performed in five accessions of *P. cincinnata* and $2n = 18$ chromosomes were observed for all accessions. Staining with CMA/DAPI fluorochromes allowed the identification of four blocks with heterochromatic CMA⁺ regions. The CMA/DAPI staining was efficient, revealing heterochromatin regions, with the presence of the CMA⁺ bands and with structural variability among the chromosomes of the *P. cincinnata* accessions. The molecular markers ISSR were efficient, showing genetic variability between the evaluated accessions and the cytogenetics revealed structural differences between the accessions with heteromorphism.

Keywords: Chromosome. Passion fruit from Caatinga. Genetic variability.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Flores das espécies de <i>Passiflora</i> L. presentes no BAG – Embrapa Semiárido. <i>P. cincinnata</i> (A), <i>P. laurifolia</i> (B), <i>P. edulis</i> (C), <i>P. quadrangularis</i> (D) e <i>P. alata</i> (E).	15
Figura 2. Produção Brasileira de maracujá por região fisiográfica em 2018. Fonte: IBGE, 2018.	20
Figura 3. Dendrograma da dissimilaridade genética dentre os 53 acessos de <i>Passiflora cincinnata</i> Mast. provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido, obtido pelo método UPGMA e coeficiente de Jaccard Correlação cofenética ($r > 0,91$).	32
Figura 4. Coloração CMA e DAPI em metáfases mitóticas com $2n=18$ em acessos de maracujazeiro. Setas indicam regiões de cromatina mais evidentes com coloração CMA. Alguns blocos CMA estão distendidos dos cromossomos. Barras equivalem a 5 μm .	40
Figura 5. Amplificação do DNA genômico em 53 acessos de <i>P. cincinnata</i> , com a utilização de marcadores ISSR.	52
Figura 6. Quantificação do DNA genômico em 34 acessos de maracujazeiro (<i>Passiflora cincinnata</i> Mast.) e DNA do fago lambda de 50, 100 e 200 ng (poços 1,2 e 3, respectivamente).	53
Figura 7. Germinação de acessos de <i>Passiflora cincinnata</i> Mast, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de sementes localizado na Embrapa Semiárido-PE.	54

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Identificação dos 53 acessos de <i>Passiflora</i> para avaliação da diversidade genética utilizando marcadores ISSR.	23
Tabela 2. Primers ISSR e sua sequência (5' – 3') utilizados para análise da diversidade genética em acessos de <i>Passiflora cincinnata</i> do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido.	26
Tabela 3. Marcadores ISSR usados na amplificação em 53 acessos de <i>P. cincinnata</i> Mast., número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), percentagem de polimorfismo (P%), número de bandas por genótipos (NGB) e amplitude dos fragmentos (AF).	30
Tabela 4. Acessos (AC), Par de cromossomos (PC); Comprimento absoluto (C); Comprimento relativo (CR); Comprimento cromossômico médio (CM); Comprimento cromossômico total (CT); Comprimento do lote haploide (LHC); Número de cromossomos portadores de bandas CMA+/DAPI (RH) em cinco acessos de <i>Passiflora cincinnata</i> presentes no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido.	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1. <i>Passiflora cincinnata</i> - origem, aspectos morfológicos e conservação em Banco Ativo de Germoplasma.	14
2.2. Caracterização molecular	16
2.3. Caracterização citogenética	18
2.4. Produção e importância do Maracujá.....	19
2.5. A importância dos recursos genéticos vegetais	20
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo Geral	22
3.2. Objetivos Específicos	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

O maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) é uma frutífera nativa do nordeste brasileiro que se destaca por possuir mecanismos de tolerância ao déficit hídrico e bom desenvolvimento em condições adversas. Dentre as espécies nativas de *Passiflora* no Brasil, a que apresenta maior potencial de mercado é *P. cincinnata* por possuir frutos com sabor característico e diferenciado em relação ao maracujá azedo, vantagens no cultivo pela sua natureza duradoura e tolerância à seca, expressiva variabilidade de caracteres de interesse agrônômico (ARAÚJO et al. 2007), resistência a doenças ou a pragas, longevidade e amplo período de florescimento, além de componentes químicos de interesse para indústria farmacêutica (MELETTI et al. 2005; JUNQUEIRA et al. 2005).

A variabilidade intraespecífica encontrada entre os acessos de *P. cincinnata* coletados em diferentes estados do Nordeste serviu de base para formação de um Banco Ativo de Germoplasma de Maracujá na Embrapa Semiárido, Petrolina-PE, sendo composto por 55 acessos dessa espécie (Araújo et al., 2012). Sendo inseridos mais 4 acessos das espécies *P. laurifolia*, *P. edulis*, *P. quadrangularis* e *P. alata*. Os BAG's são de total importância para os programas de melhoramento, com a função de armazenar e conservar os materiais, permitindo a realização de estudos de diversidade e caracterização de indivíduos, com a seleção dos mais promissores (uniformes) para serem utilizados em possíveis pesquisas no âmbito do melhoramento genético. Inúmeros estudos de diversidade têm sido desenvolvidos objetivando uma melhor seleção dos materiais para obtenção de gerações mais tolerantes a condições adversas e com maior rentabilidade para agricultura.

Dentro do pré-melhoramento e melhoramento genético, estudos voltados para o uso da genética molecular e citogenética vêm sendo realizados com a utilização de algumas técnicas, contribuindo assim para uma seleção minuciosa dos melhores genótipos a serem utilizados em estudos genéticos. O emprego de marcadores moleculares permite estimar a diversidade genética a nível molecular entre os acessos de uma mesma espécie. Como umas das

técnicas moleculares, os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), têm sido empregados com bastante sucesso, revelando polimorfismo molecular em inúmeras espécies vegetais (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2008). O ISSR é usado em estudos de variabilidade e diversidade genética por não precisar de informações prévias da sequência de DNA, sendo que esta técnica pode revelar um alto grau polimórfico, alta reprodutibilidade e com custos baixos (BRAGA, 2013). Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A citogenética, por sua vez, pode ser utilizada para caracterizar acessos ou indivíduos de uma espécie mediante o estudo da variação numérica e estrutural dos cromossomos. Nesse caso, uma das técnicas mais utilizadas é o bandeamento cromossômico, que possibilita a visualização de blocos de coloração diferenciada (bandas) utilizando fluorocromos base-específicos como a cromomicina A (CMA) e o 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) (BRASILEIRO-VIDAL ; GUERRA, 2002).

O presente trabalho objetivou caracterizar, por meio de marcadores citogenéticos e moleculares do tipo ISSR, a diversidade genética entre acessos de maracujá da Caatinga (*P. cincinnata*) pertencente ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. *Passiflora cincinnata* – origem, aspectos morfológicos e conservação em Banco Ativo de Germoplasma.

O termo Maracujá é uma denominação indígena de origem tupi que significa alimento em forma de cuia. Sendo um fruto silvestre muito apreciado pelos nativos que os primeiros descobridores conheceram nas Américas (MELETTI, 1995; MELETTI, 2000). O Brasil é um país rico em espécies da família Passifloraceae, no qual possui centenas de espécies nativas brasileiras, muitas apresentando frutos de excelente sabor para consumo “in natura”, sucos, sorvetes e geleias; outras com características ornamentais, trepadeiras vigorosas com gavinhas de fixação; e outras apresentando potencial farmacológico (OLIVEIRA et al. 1988; CUNHA et al., 2004; FEITOZA et al., 2006).

Dentre as várias espécies de Passifloraceae, destaca-se *P. cincinnata*, com ocorrência frequente e espontânea na região semiárida do Nordeste brasileiro, onde sua exploração ocorre basicamente de forma extrativista (ARAÚJO, 2002). Por apresentar uma composição nutricional rica em potássio, ferro, fósforo e vitaminas A e C, os frutos são usados no preparo de suco, licor, picolé, sorvete, mousse e geleia. As atividades de produção de doces e geleias ocorrem principalmente nas indústrias de beneficiamento instaladas nos municípios de Curaçá, Uauá e Canudos, no estado da Bahia (ARAÚJO et al., 2006), com os frutos de *P. cincinnata*, sendo os mesmos comercializados também nas feiras das cidades do interior.

O maracujazeiro é uma alógama obrigatória com mecanismos de autoincompatibilidade que induzem a alogamia (MAY ; SPEARS 1988), sendo assim uma planta de fecundação cruzada (VASCONCELLOS et al., 2001). A polinização é realizada principalmente por insetos, tendo como principal polinizador a mamangava (AKAMINE ; GIROLAMI, 1959).

P. cincinnata é uma espécie trepadeira alta subarborescente, medindo de 2 a 12 m de comprimento, com caule cilíndrico estriado. Os ramos são cilíndricos ou subangulados com gavinhas espiraladas estriadas, com estípulas filiformes persistentes. As folhas são simples, 3-5 palmipartidas verdes escuras e pálidas nas faces adaxial e abaxial, respectivamente. Os frutos possuem casca esverdeada e polpa esbranquiçada, tendo uma flor atrativa (exuberante) a polinizadores, propiciando a sua reprodução. *P. cincinnata* possui flores axilares de 7-12 cm de diâmetro, com o início da abertura floral a partir das 5 horas da manhã, mantendo-se abertas até o final da tarde (ARAÚJO, 2007).

Por outro lado, considerando a ampla distribuição geográfica de *P. cincinnata*, percebeu-se a necessidade de reunir vários exemplares da espécie em um único Banco Ativo de Germoplasma (BAG de Maracujá), visando sua conservação, caracterização e uso (ARAÚJO, 2007; ARAÚJO et al., 2008). Os acessos do BAG de Maracujá foram coletados em diferentes estados do Nordeste, em decorrência da variabilidade intraespecífica encontrada nos mesmos, totalizando 55 acessos de *P. cincinnata*. Além dos acessos de *P. cincinnata*, são mantidos outros acessos de quatro espécies do gênero *Passiflora*: *P. alata* Curtis, *P. edulis*, *P. laurifolia* L. e *P. quadrangularis* L. (ARAÚJO et al., 2012). Flores dessas espécies podem ser observadas na Figura 1.



Figura 1. Flores das espécies de *Passiflora* L. presentes no Banco Ativo de Germoplasma de Maracujá da Embrapa Semiárido. (A) *P. cincinnata*, (B) *P. laurifolia*, (C) *P. edulis*, (D) *P.*

quadrangularis, e (E) *P. alata*. Foto: Wesley Bezerra, Gerson L. Lopes, Abotanical, Tropicalflowers.

O BAG tem como objetivo a conservação de materiais vegetais para possíveis estudos voltados para o melhoramento genético, como por exemplo, os estudos de diversidade (ARAÚJO et al., 2011), uma vez que a diversidade genética das espécies nativas dessa região encontram-se ameaçadas por conta de ações como o desmatamento, a implantação de projetos de irrigação, dentre outras (QUEIROZ et al., 1993; ARAÚJO et al., 2008). Vale ressaltar que os bancos de conservação de germoplasma funcionam principalmente por meio de coleção de plantas no campo (conservação *ex situ*), sob o armazenamento de sementes em câmaras frias (FERREIRA, 2005), além de conservação *in vitro* (VIEIRA ; CARNEIRO, 2004).

A manutenção e caracterização dos acessos do BAG de Maracujá são de fundamental importância para conservação desses acessos, pois além de apresentarem tolerância aos baixos índices pluviométricos da região semiárido, possuem características de resistência ao ataque de patógenos presentes no solo, como por exemplo, a fusariose (ARAÚJO et al., 2012). Castro et al (2012), relataram a grande importância de estudos de caracterização de germoplasma de maracujazeiros silvestres, como morfológica, citológica e molecular, objetivando obter informações para aumento da produtividade e qualidade dos frutos. Essas características podem ser utilizadas em estudos de melhoramento genético para possíveis cruzamentos com espécies de maracujazeiros suscetíveis a fatores bióticos e abióticos como, por exemplo, o maracujá amarelo *P. edulis* (FALEIRO et al., 2005, FALEIRO et al., 2006, FALEIRO et al., 2011a; 2011b).

2.2. Caracterização molecular

A caracterização molecular utilizando dados de DNA vem se tornando uma ferramenta cada vez mais útil na caracterização entre os acessos de BAGs e na estimativa do grau de polimorfismo existente. A utilização de marcadores moleculares mostra-se como um método seguro, pois não sofre influência do ambiente e permite descrever com maior eficiência as diferenças

entre os acessos, além de poder ser analisado juntamente com técnicas citológicas, bioquímicas e morfológicas (WEISING et al., 2005).

Existem inúmeros marcadores moleculares que podem ser classificados como codominantes, como os SSR (*Simple Sequence Repeat*; Repetição de Sequência Simples), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*; Polimorfismo no Comprimento do fragmento de Restrição), e dominantes, como os AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphic DNA*; Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos Amplificados), RAPD (*Random Amplified Fragment Length Polymorphic DNA*; DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*; Sequências Simples Repetitivas Internas) (REDDY et al., 2002; GANGA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008)

O marcador ISSR é uma técnica baseada em PCR (Polymerase Chain Reaction; Reação em Cadeia da Polimerase), com o uso de *primers* de sequência simples repetitivas onde busca-se amplificar regiões entre sequências alvo. Essa técnica pode ser utilizada em inúmeros organismos, mesmo para aqueles em que não se dispõem de informações genéticas anteriores (ARCADE et al., 2000). Sendo assim os marcadores dominantes do tipo ISSR são eficientes quando usados em estudos de diversidade genética, revelando alto grau de polimorfismo (maracujá, mandioca, mangueira), com a diferenciação entre indivíduos homozigotos.

No gênero *Passiflora* observa-se uma considerável variabilidade fenotípica, o que vem sendo comprovado também geneticamente com estudos utilizando marcadores moleculares ISSR (Sequências Simples Repetitivas Internas). Santos et al. (2011), por exemplo, verificaram existir alto percentual de bandas polimórficas (98%) entre acessos de *P. edulis* e *P. alata*, enfatizando a grande utilidade dos ISSR para estudos de diversidade genética. Nesse caso, foi possível estimar a diversidade genética mediante o emprego principalmente de métodos de análise fenética, com análise do grau de similaridade entre os caracteres (SOUZA et al., 2008).

Os marcadores do tipo ISSR revelaram-se eficientes em inúmeros estudos de análise da diversidade genética em espécies frutíferas, como por exemplo, a mangueira (ROCHA et al., 2012) e o umbu-cajazeira (SANTANA et

al., 2011). Em maracujazeiro, esses marcadores apresentam-se como um dos mais eficientes na detecção do polimorfismo molecular tanto em germoplasma melhorado como não melhorado (COSTA et al. 2012). Santos et al., (2011) estimaram a variabilidade genética de maracujá-doce e azedo, usando marcador ISSR, identificando um alto grau de polimorfismo entre os acessos e uma ampla diversidade genética, constatando a eficiência do marcador utilizado.

2.3. Caracterização citogenética

Os estudos citogenéticos permitem a caracterização de genótipos pela identificação do número e tamanho dos cromossomos, presença de constrição secundária e satélites, e também por suas propriedades de coloração. A união dessas informações possibilita a comparação de espécies diferentes ou permite avaliar a variação entre indivíduos de uma mesma espécie (SOARES-SCOTT, 1998; MELO; 2002; SOARES-SCOTT et al., 2005). No gênero *Passiflora*, alguns estudos cromossômicos tem possibilitado uma caracterização mais eficiente dos indivíduos dentro e entre vários grupos taxonômicos (MELO et al., 2001; CUCCO et al., 2005).

Considerando a variabilidade genética potencial inter e intraespecífica em *Passiflora*, a análise citogenética pode possibilitar a seleção de indivíduos com genótipos promissores ao cruzamento interespecífico (OHRI, 1998). Por exemplo, foi relatado por Melo e Guerra (2003) que *P. cincinnata* apresentava número cromossômico $2n=18$ e dois pares de sítios de DNAr, com muitas semelhanças cariomorfológicas com *P. edulis*, tornando *P. cincinnata* uma importante opção como fonte de transferência de genes nos programas de melhoramento genético (MELETTI et al., 2005; CERQUEIRA-SLIVA et al. 2012).

Através da técnica de bandeamento com fluorocromos é possível visualizar os blocos com coloração diferenciada. O emprego de fluorocromos permite realizar uma análise citogenética mais detalhada dos cariótipos, por meio da coloração com a utilização dos fluorocromos DAPI (4', 6' – diamidino – 2 – fenilindol, e CMA (cromocinina A3). Nessa análise o CMA realça regiões

heterocromáticas ricas em bases GC e o DAPI identifica regiões heterocromáticas ricas em AT (GUERRA, 2000; SOUZA, 2002). Melo et al. (2001) relataram, por meio da análise convencional e bandeamento com fluorocromos em 31 espécies de *Passiflora*, uma grande diferenciação no número cromossômico, considerando três números básicos para o gênero: $x = 6$, $x = 9$ e $x = 12$, sendo aneuploidia e poliploidia mencionados como principais mecanismos evolutivos. A poliploidia refere-se a todas as variações naturais ou induzidas ao número de cromossomos, ocorrendo no número do genoma. Já a aneuploidia são variações no número de cromossomos individuais. Nesse caso, a espécie *P. cincinnata* apresentou $2n=18$ e dois pares de sítios de DNAr 45S (MELO, 2002; GUERRA, 2003). A utilização das técnicas citogenéticas (fluorocromos) permitem uma análise mais minuciosa, a nível cromossômico, identificando diferenças cromossômicas no número de cromossomos dentre e entre as espécies, como também no número de bandas (blocos) e a presença de heteromorfismo, observando diferenças estruturais entre os mesmos.

2.4. Produção e importância do Maracujá

A produção mundial de maracujá é de aproximadamente 640.000 toneladas, das quais 70% são produzidas no Brasil, sendo nosso país considerado o maior produtor do mundo (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016). Internamente, a região Nordeste é responsável por mais de 50% da produção do país (Anuário da Agricultura Brasileira, 2018). Dos plantios comerciais no Brasil, cerca de 95% são de áreas ocupadas pelo maracujá amarelo ou maracujá azedo (*P. edulis* Sims), seguido do maracujazeiro doce (*P. alata* Curtis).

A produção do maracujá amarelo se destaca devido à qualidade de seus frutos, vigor, rendimento do suco e produtividade (MELETTI, 1998). Apesar dessa produtividade, há demanda por novos materiais que apresentem maior tolerância a estresses bióticos e abióticos, bem como com sabores diferentes.

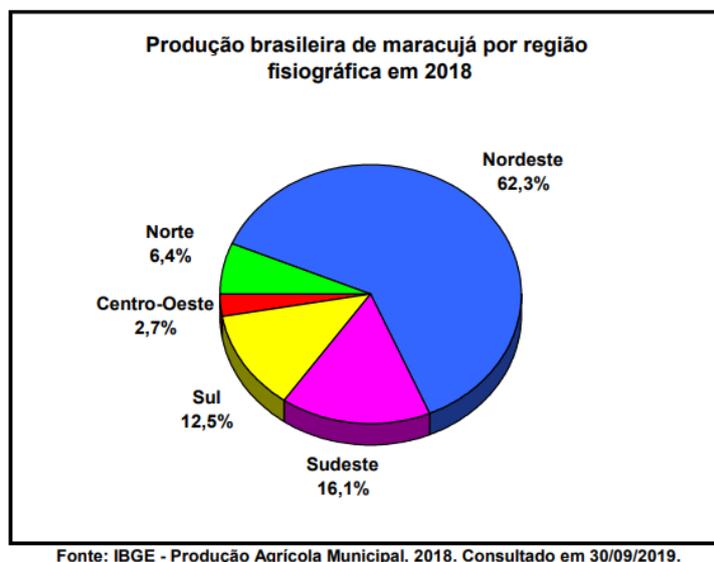


Figura 2. Produção Brasileira de maracujá por região fisiográfica em 2018. Fonte: IBGE, 2018.

Nesse caso, maracujá da Caatinga tem sido uma das espécies de *Passiflora* que apresenta maior potencial para cultivo. Os frutos dessa espécie são usados principalmente no preparo de suco, licor, picolé, sorvete, mousse e geleia. Vale salientar que o Brasil é um país rico em espécies da família Passifloraceae, tendo sido descritas centenas de espécies nativas brasileiras, muitas apresentando frutos de excelente sabor para consumo “in natura”, sucos, sorvetes e geleias; outras com características ornamentais, trepadeiras vigorosas com gavinhas de fixação; e outras apresentando potencial como plantas ornamentais (OLIVEIRA et al., 1988).

De maneira geral, os frutos do maracujá são ricos em sais minerais e vitaminas, sobretudo a A, C e vitaminas do complexo B, apresentando também propriedades farmacológicas e de valor ornamental (FERREIRA; OLIVEIRA, 1991; LORENZI; MATOS, 2002). Sendo utilizados nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e ornamentais.

2.5. A importância dos recursos genéticos vegetais

O Brasil possui uma grande biodiversidade natural, ou seja, inúmeras espécies vegetais e animais, que enriquecem a flora e fauna brasileira. Essa

riqueza natural permite o desenvolvimento de várias linhas de pesquisa visando encontrar espécies que possuam resistência a doenças e a condições adversas (fatores bióticos e abióticos), que promovam a movimentação econômica. Dentre as várias espécies que compõem a vasta biodiversidade brasileira temos a família Passifloraceae, com registros de muitas espécies nativas. Inúmeros estudos (descrições) botânicos foram conduzidos, classificando o gênero *Passiflora* com aproximadamente 530 espécies, no qual 150 são originárias no Brasil (MEDINA et al., 1980).

Dentre as espécies do gênero *Passiflora*, *P. cincinnata* possui inúmeras características relevantes para o desenvolvimento socioeconômico brasileiro, com destaque para as propriedades medicinais (fitoterápicos), resistência a microrganismos patogênicos do solo, e produção de frutos, o que beneficia a saúde e economia nacional. As plantas dessa espécie são vigorosas, apresentando algumas características de resistência a estresses bióticos e abióticos (COELHO, 2009; FREITAS et al., 2011). Nas cidades interioranas do Nordeste brasileiro, o fruto é mais visado, surgindo como uma opção rentável para os pequenos agricultores, já que possui melhor adaptação às condições da região por ser uma espécie nativa (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2010).

A Embrapa vem desenvolvendo pesquisas para encontrar plantas com genótipos mais adaptados para uma seleção cada vez mais minuciosa de genes que promovam melhor adaptação às condições do semiárido, buscando organizar sua conservação, caracterização e uso através dos bancos ativos de germoplasma. Os estudos de diversidade são de grande importância para os Bancos Ativos de Germoplasma, pois através dos mesmos é realizada a caracterização dos materiais com as seguintes seleções dos genótipos mais promissores para serem utilizados em futuras pesquisas dentro do melhoramento genético.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Investigar a diversidade genética em acessos de maracujá nativo (*Passiflora cincinnata* Mast.), presentes no BAG da Embrapa Semiárido, visando contribuir com ações voltadas ao seu uso em programas de melhoramento.

3.2. Objetivos Específicos:

Avaliar a diversidade genética de acessos de *P. cincinnata* por meio de marcadores moleculares ISSR;

Realizar a caracterização cromossômica através da coloração por meio de fluorocromos CMA/DAPI.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização molecular

Material Vegetal

O material vegetal utilizado no presente trabalho 53 acessos de *P. cincinnata* (Tabela 1) foi proveniente do Banco Ativo de Germoplasma – BAG de Maracujá, localizado na Embrapa Semiárido, Petrolina-PE.

Foram utilizados marcadores moleculares ISSR para estimar a variabilidade genética entre os acessos de *P. cincinnata* presentes no BAG de maracujazeiro da Embrapa Semiárido. Foram coletadas folhas jovens pela manhã de cada acesso, sendo acondicionadas e identificadas em sacos plásticos, levadas ao laboratório de Biotecnologia Vegetal, e armazenadas em freezer - 80° C até o uso para extração de DNA.

Tabela 1 – Identificação e nome de 53 acessos de *Passiflora* para avaliação da diversidade genética utilizando marcadores ISSR.

Acesso	Acessos
1	Tremedal
2	Tremedal
3	Condeuba
4	Condeuba
5	Jaguarari
6	Guareju
7	Jaguarari
8	Juazeiro
9	Juazeiro
10	Juazeiro
11	Juazeiro
12	Juazeiro
13	Juazeiro
14	Jaguarari
15	Jaguarari
16	Petrolina
17	Lagoa Grande
18	Santa Cruz
19	Ouricuri
20	Ouricuri
21	Exu
24	Crato
25	Crato
26	Campo Sales
28	Potengi
29	Assaré
30	Bodocó
31	Curaçá
32	Petrolina
33	Uauá

34	Uauá
35	Petrolina
36	S.J. do Belmonte
37	Juru
38	Juru
39	Exu
40	Matureia
42	Boa vista
44	Afrânio
46	Paulistana
48	Patos
49	Jaícos
50	Picos
51	Santo Antônio
52	Francisco Santos
53	Monsenhor Hipólito
54	Uauá
55	Ouricuri
64	Afrânio
65	Lagoa Grande
68	Paulistana
69	Francisco Santos
73	Bodocó

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo descrito por Doyle; Doyle (1990) a partir de tecidos de folhas jovens armazenadas a -80 °C. A lise celular dos tecidos (0,35g) foi realizada em um disruptor de células da marca Loccus, utilizando microtubos de 2 ml contendo 7 esferas de aço de 3mm de diâmetro e 700 µl do tampão de extração CTAB 2% e β-Mercaptoetanol. Após a maceração, as amostras foram levadas ao banho maria a 65 °C durante 50 minutos com inversões realizadas a cada 10 minutos. Em seguida, as amostras foram retiradas, resfriando por aproximadamente 5 minutos, sendo adicionados 700 µl de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 24:1, com agitação para mistura das soluções, seguida de uma centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. Em capela de exaustão foram retirados 470 µl do sobrenadante, transferindo para microtubos de 1,5 ml, sendo adicionados 320 µl de álcool isopropílico gelado, e misturando-se para formação do precipitado gelatinoso. Após transferência foram colocadas no gelo por 20 minutos, sendo, em seguida, realizada uma centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. Observando-se a formação do pellet, procedeu-se o descarte do sobrenadante, sendo os microtubos lavados com 500 µl de etanol (70%) seguidos de uma

centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos. Repetiu-se outra lavagem utilizando etanol absoluto sendo realizada a centrifugação por 5 segundos com descarte da solução de lavagem (etanol) e secagem do precipitado em temperatura ambiente por duas horas. No mesmo dia as amostras foram ressuspensas em 30 µl de solução TE (Tris base e EDTA). No dia seguinte as amostras foram tratadas com 8 µl de RNase (10 mg/ml), no qual permaneceram uma hora na temperatura de 37°C dentro da estufa.

Quantificação das amostras

A quantificação do DNA genômico foi realizada a uma voltagem 76 V durante uma hora e meia com a visualização das bandas através da eletroforese. Realizou-se uma comparação visual entre as bandas do DNA extraído com padrões de DNA do fago lambda de 50, 100 e 200 ng. Sendo o registro feito em fotodocumentador modelo LPix Image (Loccus Biotecnologia), estimando assim a quantidade de DNA extraída. Após esse procedimento as amostras foram diluídas para 20 ng/µl (solução de trabalho) em água ultrapura e armazenadas em temperatura – 20 °C.

Reações de PCR

Nas reações para amplificação de PCR foram utilizados 10 iniciadores moleculares do tipo ISSR (Tabela 2) utilizando microtubos de 200 µl para PCR, por um volume final de 10 µl, contendo: 2 µL de DNA genômico numa concentração final de 20ng; 1 µL de primer (0,63 Mm); 1 µL de solução tampão (1X); 0,8 µL de dNTP's (0,2 mM), 0,14 µL de TaqPolimerase (7U); 0,6 µL de MgCl₂ (3 mM) e 4,46 µL de água Ultrapura. A programação do termociclador constou com uma etapa de 94 °C por 3 minutos, seguido de 39 ciclos de 94 °C por 45s, 50 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto. Uma extensão a 72 °C por 7 minutos, finalizando o produto das reações a 4 °C. Os fragmentos foram separados em gel de agarose a 2% (p/v) juntamente com um ladder de 1kb submetidos à voltagem constante de 100 V por 2,5 h e corados com brometo

de etídio. A visualização das bandas foi realizada sob luz ultravioleta sendo o registro feito com auxílio de um fotodocumentador LPix-STi (Loccus).

Tabela 2 – Lista de *primers* ISSR e sua sequência (5' – 3') utilizados para análise da diversidade genética em acessos de *Passiflora cincinnata* do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido.

Primer	Sequência (5' – 3')
1 - DiGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAC
2 - DiGT5'CR	CRGTGTGTGTGTGTGTGT
3 - DiGT5'CY	CYGTGTGTGTGTGTGTGT
4 - TriCAG3'YC	CACCACCACCACCACYC
5 - TriCAC5'CR	CRCACCACCACCACCC
7 – TriCAG	CAGCAGCAGCAGCAG
9 - TriCAG3'YC	CAGCAGCAGCAGCAGYC
10 - TriGTG3'RC	GTGGTGGTGGTGGTGRC
12 - TriAAC3'RC	AACAACAACAACAARC
13 TriACA3'RC	ACAACAACAACAACARC

Análise dos dados

Os produtos amplificados foram convertidos para dados binários, sendo avaliados com presença (1) ou ausência (0) de bandas. A comparação genética entre os pares de indivíduos foi estimada por meio dos índices de dissimilaridade baseados na complementaridade do coeficiente de Jaccard. Em seguida, foi determinado o número de agrupamentos genéticos pelo método Unweighted Pair-Group Method Average (UPGMA). O ponto de corte para o dendrograma obtido foi estabelecido pelo método proposto por Mojema (1977), cuja fórmula é descrita como $P_c = m + kdp$, com valor de $k = 1,25$. O ajuste entre a matriz de distância e o dendrograma foi verificado pelo coeficiente de correlação cofenética (CCC). Todas as análises descritas acima foram realizadas com o programa GENES (Cruz, 2013).

Citogenética Vegetal

Local de avaliação e Material vegetal

As análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, localizado na Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. Dentre os acessos presentes

no Banco Ativo de Germoplasma foram selecionados cinco genótipos, como segue: 02, 11, 13, 22 e 32. A seleção dos acessos foi feita baseada em fatores morfológicos como estrutura foliar e formato dos frutos. Para as análises citogenéticas foram coletadas raízes obtidas a partir de sementes germinadas em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido com água destilada.

As raízes foram pré-tratadas em 8-hidroxiquinoleína 0,002 M durante 24 horas a temperatura aproximada de 8°C, sendo, em seguida, fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial, v/v). Após a fixação o material ficou por 2-24 horas em temperatura ambiente, sendo em seguida armazenado em freezer a - 20 °C até sua utilização. As análises citogenéticas foram realizadas com base protocolo escritas por Guerra ; Souza (2002). As raízes fixadas foram digeridas com a solução enzimática (2% celulase - 20% pectinase) a 37°C durante 1 hora. Em seguida foi realizada a preparação das lâminas através do isolamento do meristema apical radicular, sendo o mesmo esmagado entre lâmina e lamínula em ácido acético 45%, congelado em nitrogênio líquido para retirada da lamínula, sendo as lâminas secas a temperatura ambiente. Depois de secas, as lâminas foram coradas com o DAPI/glicerol (1 µg mL⁻¹), onde foram observadas em microscópio de fluorescência Leica DM 2000, sendo realizada a seleção das melhores lâminas. As mesmas foram descoradas em fixador Carnoy 3:1 durante 30 minutos, lavadas com álcool 70% e absoluto 1 minuto em cada, sendo deixadas para envelhecer durante 3 dias.

Passados os três dias, as lâminas foram submetidas à coloração com os fluorocromos CMA (cromomicina 0,5 mg mL⁻¹) por uma hora, seguida da dupla coloração com DAPI por 30 minutos (2 µg mL⁻¹), sendo montadas em meio de montagem MacIlvaine seguindo o protocolo descrito por (Schweizer e Ambros, 1994). As melhores células foram capturadas utilizando o microscópio de fluorescência Leica DM 2000 por meio da câmera fotográfica digital FX350 acoplada ao mesmo. Na avaliação foram visualizadas pelo menos 10 metáfases por acesso, utilizando as melhores células para realização da visualização e contagem do número de cromossomos e bandas CMA/DAPI.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização molecular

Dos 10 iniciadores moleculares do tipo ISSR utilizados, três foram do tipo dinucleotídeos (DiGA3'C, DiGT5'CR e DiGT5'CY) e 7 trinucleotídeos (TriCAG3'YC, TriCAC5'CR, TriCAG, TriCAG3'YC, TriGTG3'RC, TriAAC3'RC e TriACA3'RC) gerando um total de 357 bandas, com uma média de 35,7 bandas por marcador e variação no tamanho das mesmas entre 100-1000 pb. O número total de fragmentos variou entre 23 e 47 bandas (Tabela 3).

Do total de bandas obtidas, 301 foram polimórficas, representando uma média de 30,1 bandas por marcador, com polimorfismo médio de 84,31% (Tabela 3). Os primers 1 - DiGA3'C e 3 - DiGT5'CY foram os mais polimórficos, dentre os utilizados. O percentual de bandas polimórficas variou entre 65% e 96% (Tabela 3).

Alguns autores investigando a variabilidade genética dentro do gênero *Passiflora* observaram baixo grau de monomorfismo e alto percentual de marcadores polimórficos. Bellon et al. (2007), por exemplo, trabalhando com maracujazeiro usando 13 primers RAPD, propuseram que a alta porcentagem de marcadores polimórficos pode estar vinculada com a alta diversidade genética intraespecífica da espécie *P. edulis*. Costa et al. (2012) estudaram 63 acessos de maracujá amarelo, utilizando 23 marcadores microssatélites do tipo ISSR, no qual 22 foram polimórficos, obtendo uma média de 11,56 bandas por primer. Santos et al., (2014) analisando 45 acessos de *Passiflora* (três de *P. alata* e 42 acessos *P. edulis*) usando 18 primers ISSR, geraram um total de 227 bandas polimórficas com uma média de 12,61 bandas por *primer*. Comparado ao estudo em questão, os presentes resultados mostraram um aumento no número de bandas polimórficas com uma média de 30,1 bandas por *primer*, confirmando a eficiência dos ISSR, na detecção de polimorfismo.

SOUZA et al. (2015) utilizando marcador ISSR analisando 25 espécies silvestres de *Passiflora* provenientes do Banco de Germoplasma da UESC (Ilhéus), obtiveram 20 primers polimórficos dos 31 utilizados, representando um total de 331 bandas com média de 16 bandas por *primer*. Esse resultado

reforça o uso dos marcadores ISSR como umas das melhores ferramentas para estimar a diversidade genética intraespecífica, mostrando-se extremamente útil para detecção de polimorfismo dentro do gênero *Passiflora*.

Santos et al. (2011), caracterizando várias espécies de maracujazeiros do Brasil utilizando 18 primers ISSR, sendo seis dinucleotídeos (DiGT30 YG, DiCA30 G, DiGA30 C, DiGA50 CY, DiGA30 YC, e DiCA30 RG) e sete trinucleotídeos (TriAAG3RC, TriACA3RC, TriCAA3RC, TriAAC3RC, TriAGC3RC, TriAGG3RC, e TriCAG30 RC), obtiveram 227 marcadores com grau polimórfico de 98%. Corroborando com os resultados do presente trabalho, no qual apresentaram um grau polimórfico de 84,31%, revelando eficiência para os iniciadores ISSR nas espécies de maracujazeiros. Outros autores também têm relatado marcadores como eficientes para detectar a variabilidade genética intraespecífica em *Passiflora*. Junqueira et al. (2007), por exemplo, observaram 63,8% de polimorfismo em 17 acessos de *P. nitida* usando marcadores do tipo RAPD, e Ganga et al. (2004) estimaram 93,9% de polimorfismo utilizando iniciadores AFLP em 36 acessos de *P. edulis*.

Em um relato de caracterização de acessos de *P. cincinnata* com marcadores ISSR, Carmo et al. (2017) obtiveram 81 bandas, sendo que 53 mostraram-se polimórficas representando um percentual de 65,43% de polimorfismo com uma média 4,81 bandas por marcador. No nosso trabalho foi possível obter um número maior de bandas polimórficas por marcador (30,1) e percentual de polimorfismo bem mais elevado (84,31%), provavelmente devido a maior representatividade da amostra dos acessos que foram coletados em todas as regiões do semiárido brasileiro. Assim, os iniciadores ISSR são eficientes para revelar a diversidade genética, podendo ser usados com sucesso na diferenciação entre os acessos.

Por outro lado, o alto índice de polimorfismo observado reforça ainda mais a alogamia nas espécies de maracujazeiro, com ênfase em *P. cincinnata*, vinculado ao sistema de autoincompatibilidade, sendo possível apenas com polinizações cruzadas. Nesse caso a polinização é realizada principalmente por insetos, sendo a mamangava (*Xylocopa frontalis*) o principal agente polinizador (AKAMINE ; GIROLAMI, 1959).

Tabela 3 – Marcadores ISSR (*primers*) usados na caracterização molecular em 53 acessos de *Passiflora cincinnata* Mast. Número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), percentagem de polimorfismo (P%), número de bandas por genótipos (NGB) e amplitude dos fragmentos (AF).

		<i>Primers</i>										Total	P(%)	Média
		1	2	3	4	5	7	9	10	12	13			
		1	2	8	3	5	3	4	6	3	6			
2	2	2	3	1	6	3	4	6	4	4	35	2,02	3,5	
3	2	6	7	3	3	3	5	2	5	7	43	2,5	4,3	
4	-	4	3	4	-	3	2	4	4	3	27	1,56	2,7	
5	3	4	2	3	3	3	4	2	5	3	32	1,85	3,2	
6	1	1	2	3	3	3	4	2	4	6	29	1,67	2,9	
7	3	8	3	2	1	5	5	4	3	5	39	2,25	3,9	
8	2	4	4	4	1	4	6	3	6	5	39	2,25	3,9	
9	2	2	4	3	2	6	6	4	4	4	37	2,14	3,7	
10	5	6	4	3	2	-	7	2	5	4	38	2,2	3,8	
11	4	4	5	4	4	6	6	3	3	6	45	2,6	4,5	
12	-	4	3	2	2	7	6	4	4	5	37	2,14	3,7	
13	4	2	1	4	2	6	3	1	3	4	30	1,73	3	
14	8	3	1	2	1	-	6	3	4	5	33	1,9	3,3	
15	8	5	3	3	2	2	6	1	5	4	39	2,25	3,9	
16	6	3	1	3	3	3	3	1	3	3	29	1,67	2,9	
17	5	1	4	2	2	6	3	3	4	2	32	1,85	3,2	
18	3	7	2	4	3	5	4	2	2	5	37	2,14	3,7	
19	1	3	1	1	3	3	4	2	2	4	24	1,4	2,4	
20	2	8	5	4	3	3	4	2	4	3	38	2,2	3,8	
21	2	10	1	3	3	3	5	2	2	3	34	1,96	3,4	
24	2	6	5	2	4	5	6	5	3	3	41	2,37	4,1	
25	4	6	-	4	5	5	2	2	4	4	36	2,1	3,6	
26	3	6	1	2	3	5	3	2	3	4	32	1,85	3,2	
28	3	8	3	-	4	5	3	2	5	3	36	2,1	3,6	
29	1	3	1	-	3	5	2	2	5	4	26	1,5	2,6	

30	1	1	-	4	3	5	5	2	7	2	30	1,73	3
31	1	2	1	1	2	1	3	1	1	2	15	0,86	1,5
32	2	7	1	-	4	3	5	3	4	3	32	1,85	3,2
33	2	4	2	-	4	3	7	1	4	3	30	1,73	3
34	3	3	3	-	5	3	5	3	4	4	33	1,9	3,3
35	3	5	3	1	4	3	6	2	4	3	34	1,96	3,4
36	2	7	1	1	4	3	6	2	5	4	35	2,02	3,5
37	1	5	1	1	3	4	5	2	5	4	31	1,8	3,1
38	1	3	0	1	-	5	6	3	2	3	24	1,4	2,4
39	1	3	3	-	4	4	6	1	4	3	29	1,67	2,9
40	3	7	4	-	4	3	7	2	3	3	36	2,1	3,6
42	2	3	3	-	4	3	7	2	3	3	30	1,73	3
44	2	5	2	-	-	2	2	-	3	3	19	1,1	1,9
46	5	3	2	2	4	3	5	1	3	3	31	1,8	3,1
48	2	5	2	1	3	2	3	2	7	7	34	1,96	3,4
49	3	1	1	1	-	2	3	1	2	4	18	1,04	1,8
50	5	9	3	3	2	4	2	1	7	5	41	2,37	4,1
51	1	2	7	2	3	3	3	1	4	3	29	1,67	2,9
52	1	3	3	1	4	2	4	2	4	4	28	1,62	2,8
53	1	2	3	-	3	2	6	1	4	3	25	1,44	2,5
54	4	5	3	1	2	1	6	2	3	6	33	1,9	3,3
55	5	6	1	1	2	4	4	3	5	3	34	1,96	3,4
64	2	4	4	1	2	3	4	1	3	2	26	1,5	2,6
65	4	6	3	1	4	3	5	3	5	8	42	2,43	4,2
68	4	9	5	1	1	2	3	1	6	6	38	2,2	3,8
69	5	7	4	1	2	2	3	2	5	5	36	2,1	3,6
73	4	6	1	1	1	1	2	1	1	1	19	1,1	1,9
AF(pb)	100-700	100-650	100-500	100-700	100-350	100-500	100-600	100-500	100-700	100-700	Total	Média	
NTB	29	47	47	39	38	23	36	28	34	31	357	35,7	
NBP	28	37	43	37	33	15	26	20	32	26	301	30,1	
P(%)	96,55	78,72	91,48	94,87	86,84	65,21	72,22	71,42	94,12	83,87	84,31		

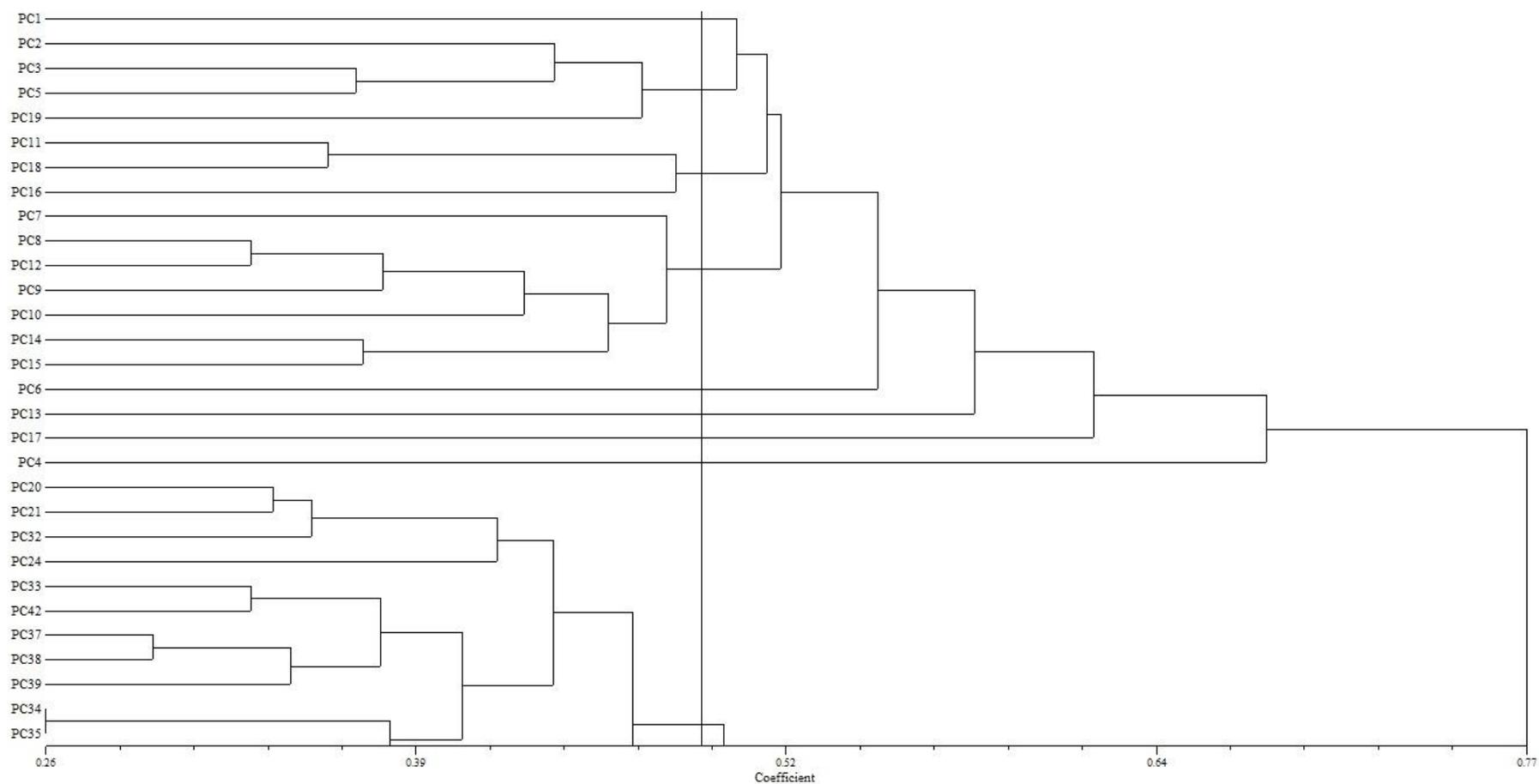


Figura 3. Dendrograma da dissimilaridade genética dentre os 53 acessos de *Passiflora cincinnata* Mast. provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido, obtido pelo método UPGMA e coeficiente de Jaccard. Correlação cofenética ($r > 0,91$).

A partir do polimorfismo de bandas identificado entre os acessos avaliados, foi possível obter a formação de grupos e subgrupos, e calcular a dissimilaridade genética, conforme pode ser observado no dendrograma da Figura 4. As distâncias genéticas entre os 53 acessos variaram entre 0,30 e 0,771. A menor distância genética (0,30) observada foi entre os acessos PC34 e PC35, enquanto a maior distância genética (0,771) foi obtida entre os acessos PC1 e PC35 (Figura 4).

O coeficiente de correlação cofenética do dendrograma foi de 91% ($r=0,91$), indicando boa correlação com os dados. Este parâmetro mede o nível de distorção da representação gráfica, indicando uma discrepância de 9%.

Cerqueira-Silva et al., (2010), trabalhando com *P. cincinnata*, observaram uma variabilidade intraespecífica cuja distância genética entre os acessos (genótipos) variou de 0,20 a 0,85, o que reforça os dados obtidos no nosso trabalho e corroboram com os valores de variabilidade encontrada em outras espécies, como, por exemplo a pitanga, cujos valores foram de 0,26 a 0,75 (Nogueira et al., 2007). Essa variabilidade também vem sendo relatada em várias outras espécies de *Passiflora* como descrito por Faleiro et al. (2004), Pio Viana et al. (2003) e Crochemore et al. (2003). Entretanto, para *P. cincinnata* há apenas um relato com valores estimativos baseados em poucas amostras (Carmo et al., 2017). Em outros trabalhos de variabilidade envolvendo *Passiflora* ssp., foram observados os seguintes valores para as distâncias genéticas (dg): *P. edulis* ($0,09 < dg < 0,50$) (Bellon et al. 2007), *P. alata* ($0,086 < dg < 0,32$) (Bellon et al., 2009) and *P. nitida* ($0,031 < dg < 0,0471$) (Junqueira et al., 2007). Comparado ao estudo em questão, os resultados do presente trabalho demonstram um considerável aumento nas distâncias genéticas, comprovando variabilidade entre os acessos de *P. cincinnata*.

O considerável número de grupos (9) gerados no presente trabalho revela a variabilidade genética presente nos acessos avaliados, pois quando é obtida a formação de poucos grupos, supõe-se que haja uma baixa dissimilaridade entre os acessos (MARTINS et al., 2011). O grupo I foi formado por 11 indivíduos, os grupos II, III, IV e V por um 1 indivíduo cada, o grupo VI por 7 indivíduos, o grupo VII por 3 indivíduos, o grupo VIII por 4 indivíduos e o

grupo IX por 1 indivíduo. Na análise de agrupamento, foram percebidos que alguns grupos não tiveram sua composição vinculada às localidades de origem, grupos VII e VIII. Já nos grupos I (para alguns membros) e VI foi observado uma relação direta no agrupamento, associando os locais de origem com acessos, nesse caso oriundos dos estados da Bahia e Paraíba. Os grupos II, III, IV e V apresentam sua composição com apenas um indivíduo, no qual todos mostram-se diferentes para o local de origem dos referentes genótipos. No grupo VI nota-se a presença de sete indivíduos sendo 4 coletados em Juazeiro e 3 em Jaguarari, sendo observado que as maiores distâncias são entre os acessos de locais diferentes, referentes aos acessos PC7 e o PC10. Exemplificando a presença de diversidade genética intraespecífica entre os indivíduos, com ressalvas para as maiores distâncias genéticas que foram observadas entre os acessos PC1 e PC35, com diferentes localidades.

Diante da formação de nove grupos na avaliação do presente trabalho, é observado a presença de uma relativa riqueza entre os indivíduos, em contrapartida com outros estudos contendo inúmeros acessos de maracujazeiro, como os realizados por Ganga et al. (2004) e Crochemore et al. (2003b). Bellon et al. (2006) verificando a variabilidade em acessos de *P. alata*, constatou a presença da diversidade genética entre acessos de diferentes regiões geográficas. Constatação similar feita por Junqueira et al., (2006) estudando acessos de *P. nitida* provenientes de locais distintos, observando uma variabilidade alta entre esses acessos.

Sendo assim, essa variabilidade intraespecífica encontrada nos presentes acessos pode estar associada às distintas áreas coletadas, compostas pelos diferentes estados do Nordeste que serviu de base para formação do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Semiárido Petrolina-PE.

Citogenética vegetal

Foram analisados cinco acessos (02, 11, 13, 22 e 32) de *P. cincinnata* sendo observados $2n=18$ cromossomos em todos os materiais (Tabela 4). Esse número cromossômico já foi relatado para outros acessos da espécie, corroborando com o número básico secundário $x=9$ (MELO et al., 2001, COELHO, 2009, AZEVEDO et al., 2011), considerando que os números cromossômicos encontrados no gênero *Passiflora* são principalmente $2n=12$, 18, 20, 22 e 24, variação associada a processos evolutivos como aneuploidia e poliploidia (MELO et al., 2001).

Na avaliação morfométrica dos acessos, observou-se que o comprimento absoluto dos cromossomos variou entre 2,33 a 2,78 μm , 1,91 a 4,09 μm , 3 a 3,72 μm , 3,05 a 4,14 μm , 2,41 a 3,14 μm para os genótipos 02, 11, 13, 22 e 32, respectivamente (Tabela 4). Os menores valores de medidas cromossômicas foram observados no acesso 02, com comprimento cromossômico médio de 2,57 μm , comprimento total de 23,09 μm e do lote haploide 11,54 μm . Em contrapartida o acesso 22 obteve os maiores valores para o comprimento cromossômico médio (3,48 μm), comprimento total (31,31 μm) e do lote haploide (15,65 μm) (Tabela 4). Essas diferenças podem estar associadas a fatores como possíveis alterações estruturais intraespecíficas e diferentes níveis de condensação das células. Coelho (2009), realizando estudos citogenéticos com *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg., e *P. cincinnata*, relatou que acessos de *P. cincinnata* apresentaram diferenças em relação ao tamanho cromossômico, para o comprimento cromossômico total valores de 16,03 μm no acesso B0549 e 23,36 μm no acesso T0336. Em espécies do gênero *Passiflora* foi observado um valor de 32,9 μm para o comprimento cromossômico total (SOUZA et al., 2003, VIEIRA ; CARNEIRO, 2004). Os valores citados corroboram com os do presente trabalho para o comprimento cromossômico total, nos acessos 02 e 22, sendo que os materiais utilizados foram coletados em diferentes localidades, podendo estar em associação a essas diferenças.

Soares-Scott et al. (2005) relataram que o gênero *Passiflora* apresenta uma amplitude relativa para a estrutura cromossômica (número e tamanho), relatando comprimentos médios entre 1,63 μm a 3,73 μm . No entanto, comprimentos maiores foram verificados dentro do gênero, como observado na espécie *P. quadrangularis* o valor de 4,51 μm para o maior comprimento médio (SOUZA et al., 2003). Coelho (2016) também relatou valores do comprimento cromossômico médio em *P. cincinnata* registrando 2,73 μm como o menor valor e 4,12 μm como o maior. Essas variações nos comprimentos dos cromossomos podem ser vinculadas a possíveis mudanças cromossômicas estruturais dentro e entre as espécies. Como observado nos valores do trabalho em questão, com variações entre 2,57 μm a 3,48 μm para comprimentos médios.

Outros autores analisando o comprimento dos cromossomos em *P. edulis*, relataram variações entre 3,16 μm (par 1) e 1,82 μm (par 9), com um comprimento haploide total de 22,66 μm (SILVIA et al., 2005). Sendo que, na espécie *P. alata* foi observado no cromossomo 9 um comprimento absoluto de 1,98 μm e um comprimento haploide total de 22,88 μm (MELLETTI et al., 2003). Azevedo et al. (2011) em estudo citogenético de parentais e híbridos interespecíficos entre *Passiflora edulis* Sims x *Passiflora cincinnata*, relataram que o comprimento cromossômico haploide total foi de 18,56 μm e 21,52 μm , respectivamente.

Apesar dos relatos de tamanho cromossômico absoluto serem importantes para caracterização cromossômica, os valores relativos (percentuais) são mais confiáveis para comparação entre os acessos devido a normalização dos dados. Nesse caso, observamos na Tabela 4 que o comprimento relativo (CR) dos cromossomos demonstra cariótipos simétricos com a maioria dos valores não superando uma diferença de 30% entre o maior e o menor par cromossômico. Uma exceção foi observada no acesso 11, cujo menor valor relativo foi de 6,61% para o par 1, enquanto o maior valor relativo foi de 14,61% para o par nove, diferença que reflete um valor mais que 2 vezes entre o menor e o maior par cromossômico. Possivelmente podemos supor que ocorreram eventos de amplificação ou recombinações cromossômicas desiguais ao longo do tempo para esse acesso.

Tabela 4. Acessos (AC), Par de cromossomos (PC); Comprimento absoluto (C); Comprimento relativo (CR); Comprimento cromossômico médio (CM); Comprimento cromossômico total (CT); Comprimento do lote haploide (LHC); Número de cromossomos portadores de bandas CMA+/DAPI (NC) em cindo acessos de *Passiflora cincinnata* presentes no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido.

AC	PC	C (µm)	CR	NC	AC	PC	C (µm)	CR	NC	AC	PC	C (µm)	CR	NC	AC	PC	C (µm)	CR	NC	AC	PC	C (µm)	CR	NC
2	1	2,33 ± 0,29	10,09	4	11	1	1,91 ± 1,04	6,61	4	13	1	3 ± 0,28	10,16	4	22	1	3,05 ± 0,74	9,74	4	32	1	2,41 ± 0,40	9,39	4
	2	2,42 ± 0,65	10,48			2	2,67 ± 1,31	9,24			2	3,09 ± 0,38	10,47			2	3,15 ± 0,31	10,06			2	2,54 ± 0,42	9,9	
	3	2,49 ± 1,39	10,78			3	2,87 ± 0,51	9,94			3	3,13 ± 0,68	10,61			3	3,37 ± 0,24	10,76			3	3,72 ± 0,51	10,6	
	4	2,55 ± 0,52	11,04			4	3,14 ± 0,25	10,87			4	3,19 ± 0,98	10,81			4	3,42 ± 0,64	10,92			4	2,80 ± 0,52	10,9	
	5	2,59 ± 0,14	11,22			5	3,38 ± 1,42	11,71			5	3,27 ± 0,27	11,1			5	3,44 ± 0,84	10,98			5	2,87 ± 0,25	11,2	
	6	2,6 ± 0,59	11,26			6	3,51 ± 0,36	12,15			6	3,32 ± 1,04	11,25			6	3,45 ± 1,20	11,01			6	3,06 ± 0,58	11,9	
	7	2,6 ± 0,82	11,26			7	3,53 ± 1,20	12,23			7	3,33 ± 0,61	11,28			7	3,58 ± 0,98	11,43			7	3,06 ± 0,64	11,9	
	8	2,74 ± 0,85	11,87			8	3,77 ± 1,11	13,05			8	3,45 ± 1,19	11,65			8	3,70 ± 0,76	11,81			8	3,06 ± 0,97	11,9	
	9	2,78 ± 0,52	12			9	4,09 ± 1,17	14,16			9	3,72 ± 1,64	12,61			9	4,14 ± 0,74	13,22			9	3,14 ± 1,01	12,2	
CM		2,57 ± 0,36				3,21 ± 0,43					3,28 ± 0,46					3,48 ± 0,32					2,85 ± 0,25			
CT		23,09				28,87					29,5					31,31						25,68		
LHC		11,54				14,44					14,75					15,65						12,84		

Por meio da dupla coloração CMA/DAPI foi observada a presença de quatro bandas CMA⁺, identificando regiões de heterocromatina ricas em bases CG (citosina e guanina) presentes em todos os acessos avaliados (Figura 6). Os blocos CMA⁺ (blocos brilhantes) foram localizados nas porções terminais dos cromossomos, provavelmente associadas à região organizadora dos nucléolos (RONs).

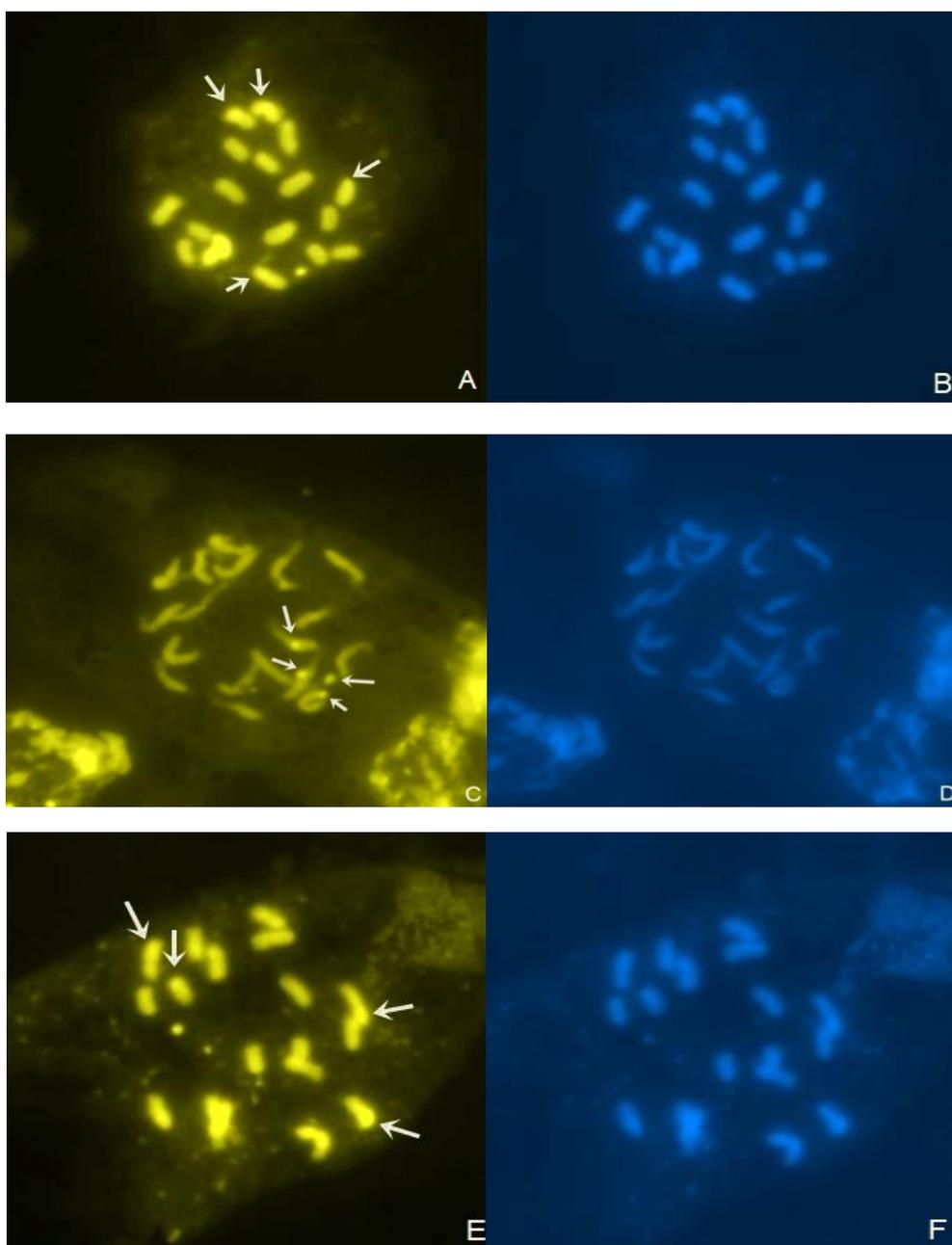
Os quatro blocos de CMA⁺ nos acessos avaliados apresentaram diferentes tamanhos (heteromorfismo), sendo algumas bandas observadas distendidas dos pares de cromossomos (Figura 6). A diferença de tamanho dos blocos CMA⁺ (heteromorfismo) aponta a presença de variação cromossômica estrutural dentre acessos de *P. cincinnata*, que certamente podem ocorrer advindos de mudanças estruturais entre diferentes acessos (SOARES-SCOTT et al., 2005).

Melo et al. (2001), em estudos citogenéticos, realizaram a dupla colocação CMA/DAPI em oito espécies de maracujazeiros: *P. amethystina*, *P. caerulea*, *P. capsularis*, *P. edulis f edulis*, *P. foetida*, *P. racemosa*, *P. rubra* e *P. tricuspis*, as mesmas apresentaram entre um e três pares de blocos CMA⁺, porém não apresentaram a heterocromatina DAPI. Dentro do gênero foram identificados indivíduos de algumas espécies com alterações estruturais, sendo observado em um único indivíduo da espécie *P. racemosa* cinco blocos CMA⁺, com um bloco maior e quatro blocos menores (MELO et al., 2001). Foram observadas também diferenças na quantidade de blocos CMA/DAPI em *P. mucronata*, nesse caso com a presença de bandas DAPI e cinco blocos CMA⁺ e, em *P. galbana*, com quatro blocos CMA⁺ (PASSOS, 2007). Segundo Souza (2002), mudanças estruturais, como translocações, inversões, deleções e duplicações, possivelmente acarretam importante fonte de variabilidade nessas espécies. Comparado ao presente estudo é identificado diferenças estruturais entre as espécies citadas com a *P. cincinnata*, observando o número de bandas CMA. Como também diferenças estruturais (intraespecíficas) no tamanho dos blocos formados.

Localização e padrão de distribuição de regiões heterocromáticas são muito variáveis nos vegetais, podendo ocorrer em uma mesma espécie

polimorfismo para tamanho e número de bandas, sendo observado com mais frequência mediante o padrão de bandas CMA+/DAPI- (GUERRA, 2000).

No presente trabalho foram observadas diferenças no tamanho dos cromossomos bem como no tamanho das bandas CMA⁺ entre diferentes acessos. Isso pode estar relacionado aos diferentes genótipos (Oriundos de: Tremedal, Juazeiro, Exu e Petrolina) utilizados para realização das análises citológicas, sendo que os acessos que compõem o Banco Ativo de Germoplasma de Maracujá da Embrapa Semiárido foram coletados em regiões distintas. Possivelmente essas diferenças podem estar vinculadas ao início de diferentes processos evolutivos, nas diversas localidades, que resultou nas diferenças estruturais cromossômicas relacionadas.



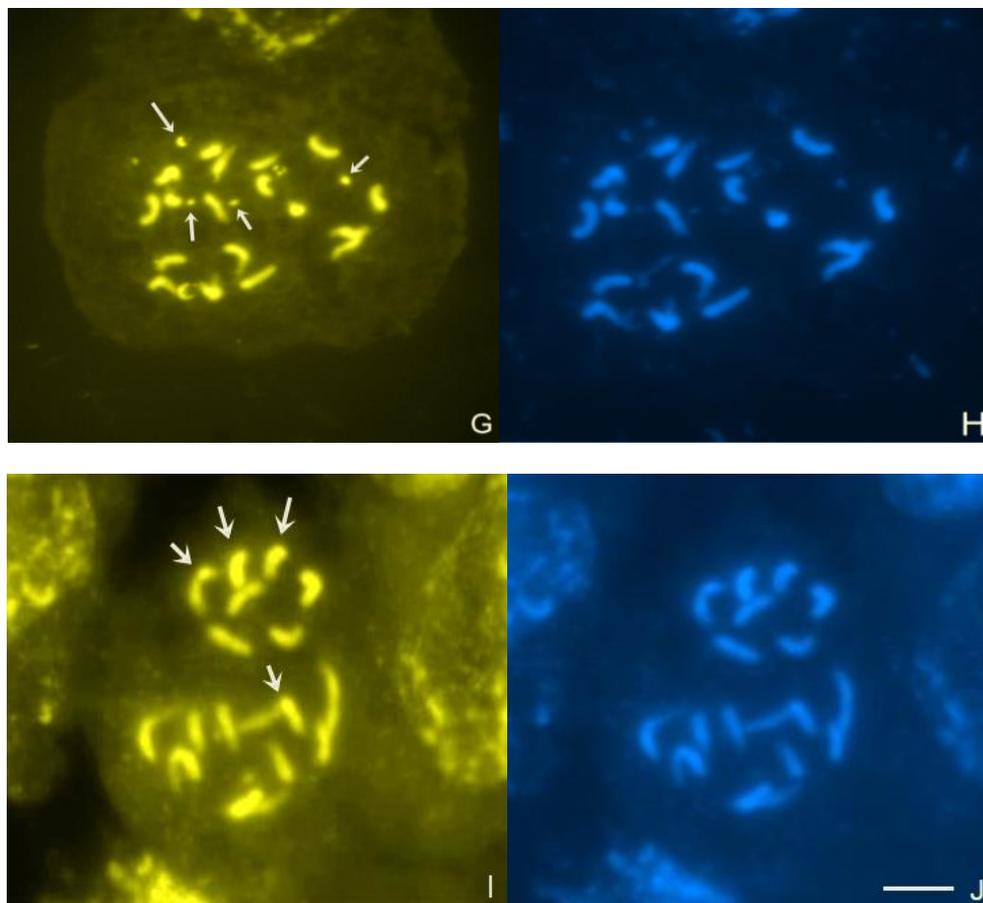


Figura 4. Coloração CMA e DAPI em metáfases mitóticas com $2n=18$ em acessos de maracujazeiro *P. cincinnata* com $2n=18$. Setas indicam regiões de cromatina mais evidentes com coloração CMA⁺. Alguns blocos CMA estão distendidos dos cromossomos como pode se observar em E e G. Barras equivalem a $5\mu\text{m}$. Acesso 2 (A e B); Acesso 11 (C e D); Acesso 13 (E e F); Acesso 22 (G e H) e Acesso 32 (I e J).

6. CONCLUSÕES

A variabilidade estimada nos acessos avaliados presentes no BAG de maracujá da Embrapa Semiárido de *P. cincinnata* sugere que a espécie tem uma ampla base genética;

A dupla coloração CMA/DAPI permitiu a identificação heteromorfismo de regiões heterocromáticas nos acessos avaliados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAMINE, E.K.; GIROLAMI, G. **Pollination and fruit set in the yellow passion fruit**. Havai, EUA: University of Hawaii, 1959. 44p. (University Hawaii. Technical Bulletin, 39)

Almeida Junior, E.B. de. 2008. Diversidade de Manilkara A dans. (Sapotaceae) para o Nordeste do Brasil. 158. (Tese de Doutorado)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

Anuário da Agricultura Brasileira. 2018. Maracujá. São Paulo: Agra FNP Pesquisas.

ARAÚJO, F. P. de; SANTOS, C. A. F. ; SILVA, G. C.; ASSIS, J. S. de. **Caracterização de frutos de maracujá do mato (Passiflora cincinnata Mast.) cultivado em condições de sequeiro**. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 53.; REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 25., 2002, Recife. Resumos... Recife: SBB - Seção Regional Pernambuco/UFRPE/UFPE, 2002. p. 10. Resumo 6.

ARAÚJO, F. P. de; SILVA, N. de; QUEIRÓZ, M. A. de; MELO, N. F. de. Estabelecimento de acessos de Passiflora cincinnata Mast.. por organogênese direta in vivo de segmentos radiculares. In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 17., 2006, Recife. Conhecimentos para o novo milênio: [resumos]. Recife : SBG, 2006. 1 CD-ROM.

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

ARAÚJO, F. P. de; MELO, N. F. de; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; QUEIROZ, M. A. de; COELHO, M. do S. E.2012b. **Seleção de acessos de maracujazeiros silvestres visando resistência à fusariose**. Artigo em anais de congresso (ALICE) URL:

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.

AZEVEDO, T. P.; COELHO, M. S. E.; ARAUJO, F. P.; MELO, N. F. Citogenética de parentais e híbridos interespecíficos de Passiflora edulis Sims X Passiflora cincinnata Mast. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 6., 2011, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semiárido, p. 155-160. 2011.

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

BRASILEIRO-VIDAL, A. N.; GUERRA, M. Citogenética molecular em cereais. In: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J. (Org.). **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p. 277-298.

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.

BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SANTOS, E. C.; BRAGA, M. F.; GUIMARÃES, C. T. **Variabilidade genética de acessos comerciais e silvestres de Passiflora edulis Sims. com base em marcadores RAPD.** *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal – SP, v.29, n.1, p. 124-127. 2007.

BELLON, G.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, K.P.; PAULA, M.S.; BRAGA, M.F.; JUNQUEIRA, N.T.V.; PEIXOTO, J.R. Diversidade genética de acessos comerciais e silvestres de maracujazeiro-doce com base nos marcadores RAPD. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). **REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISAS EM MARACUJAZEIRO**, 4., 2006. Planaltina Distrito Federal: Embrapa Cerrados, 2006. p.118-121.

BELLON, G.; FALEIRO, FG.; PEIXOTO, JR.; JUNQUEIRA, KP.; JUNQUEIRA NTV, FONSECA, KG.; and BRAGA, MF (2009) Variabilidade genética de acessos obtidos de populações cultivadas e silvestres de maracujazeiro-doce com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura** 31 197-202.

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.

BORBA, R. DA S.; GARCIA, M. S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; BRANCO, J. S. C.; MALONE, G. 2005. **Dissimilaridade genética de linhagens de Trichogramma Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR.** *Neotropical Entomology* 34: 565-569

BRAGA, I. **Discriminação varietal de cultivares em *Urochoa brizantha* por marcador molecular ISSR.** 52 f. Dissertação (Mestrado de Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2013.

BRASILEIRO-VIDAL, A. N.; GUERRA, M. Citogenética molecular em cereais. In: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J. (Org.). **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p. 277-298.

APDEVILLE, G.D; SOUZA JÚNIOR, M.T.; SZINAY, D.; DINIZ, L.E.C.; WIJNKER, E.; SWENNEN, R.; KEMA, G.H.J.; JONG, H.D. (2009) **The potential of high-resolution BAC-FISH in banana breeding**. *Euphytica*, Wageningen, 166: 431-443.

CARMO, T. V. B., MARTINS, L. S. S.; MUSSER, R. S.; SILVA, M. M.; SANTOS, J. P. O. Genetic diversity in accessions of *Passiflora cincinnata* Mast. based on morphoagronomic descriptors and molecular markers. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 30, n. 1, p. 68 – 77, jan. – mar., 2017

CASTRO, J.A.; NEVES, C.G.; De JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J. (2012) Definition of morpho-agronomic descriptors for the characterization of yellow passion fruit. *Scientia Horticulturae*, 145:17–22.

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

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

COELHO, M. S. E.; BORTOLETI, K. C. A.; ARAÚJO, F. P.; MELO, N. F. Cytogenetic characterization of the *Passiflora edulis* Sims x *Passiflora cincinnata* Mast. interspecific hybrid and its parents. **Euphytica**, Wagening, v. 210, p. 93-104, 2016.

COSTA, J.L.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, G.A.F.; OLIVEIRA, E.J.; (2012) **Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit**. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 12: 253-260.

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.

CUCCO, S. M.; VIEIRA, M. L. C.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. (2005) Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases

mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). *Acta Botanica Brasilica*. 17: 1-7.

CUNHA, M.A.P.; BARBOSA, L.V., FARIA, G.A. Botânica. IN: Lima, A. De A., Cunha M.A.P. **Maracujá: Produção e Qualidade na Passicultura, Embrapa Mandioca e Fruticultura**, 2004.

CRUZ, C. D. **Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics**. *Acta Scientiarum. Agronomy* Maringá, v. 35, n. 3, p. 271-276, July-Sept., 2013

FALEIRO, F. **Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p

FALEIRO, F .G. et al. In:3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Passo Fundo, 2005. Anais...2005a. (Artigo 4398).

FALEIRO, F.G. et al. **Maracujá: demandas para a pesquisa**. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2006a. 54p. il.

FALEIRO, F.G. et al. **Pré-melhoramento do maracujá**. In: LOPES, M.A.; FAVERO, A.P.;

FERREIRA, M.A.J.F.; FALEIRO, F.G.; FOLLE, S.M. (Eds.) **Pré-melhoramento de plantas: estado da arte e experiências de sucesso**. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, DF. 2011a. p. 550-569.

Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., 2016. **Maracujá : O produtor pergunta, a Embrapa responde Brasília**, DF : Embrapa.

FALEIRO et al. **Germoplasma e melhoramento do maracujazeiro – histórico e perspectivas**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011b. (Documentos) no prelo

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BELLON, G.; BORGES, T.A.; ANJOS, J.R.N.; PEIXOTO, J.R.; BRAGA, M.F.; SANTOS, D.G. Diversidade genética de espécies silvestres de maracujazeiro com resistência múltipla a doenças com base em marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p. S325, 2004.

FEITOZA, E. A.; MONTEIRO, S. P.; LEMOS, I. B.; KILL, L, H. P.; MELO, N. F. & ARAÚJO, F. P. 2006. **Fenologia de *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae) na região do Vale do São Francisco**, Petrolina-PE. In: REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 29, Mossoró. Diversidade,

conservação e uso sustentável da flora nordestina: resumos. Mossoró: UERN, 1CD-ROM.

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 Botanica, Córdoba, v. 35, n. 3-4, p. 283-289, 2000

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 220p. 1998.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. p.220. (EMBRAPA-CENARGEM. Documentos, 20).

FERREIRA, F.R.; OLIVEIRA, J.C. **Germoplasma de passiflora.** In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.). A cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p.187-200.

FREITAS, J. P. X. et al. **Avaliação de recursos genéticos de maracujazeiro-amarelo.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 46, n. 09, p. 1013-1020, 2011.

GANGA RMD, Ruggiero C, Lemos EGM, Grili GVG, Gonçalves MM, Chagas EA, Wickert E (2004) **Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares fAFLP.** Rev Brasil Frutic 26:494–498

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. S. **Introdução à citogenética geral.** Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.

GUERRA, M. **Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in Citrus species revealed by CMA/DAPI staining.** *Heredity* 71: 234–241. 1993.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana.** São Paulo, editora FUNPEC, 131 p. 2002.

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 dez 2016).

JUNQUEIRA KP, FALEIRO FG, RAMOS JD, BELLON G, JUNQUEIRA NTV, BRAGA MF (2007) **Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares**. Rev Brasil Frutic 29:571–575

JUNQUEIRA, N. T. V. et al. 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, K.P.; FALEIRO, F.G.; RAMOS, J.D.; BELLON, G.; PAULA, M.S.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Variabilidade genética de acessos de maracujá 57 suspiro (*Passiflora nitida* Kunth.) com base nos marcadores moleculares. In: **REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISAS EM MARACUJAZEIRO**, 4., 2006. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. p.122-127.

LORENZ, T. C. **Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies**. Journal of Visualized Experiments, n. May, p. 1–15, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarium, 2002. 511p.

MARTINS, A. B. G.; RODRIGUES, M. G. F.; PAULA, D. R.; MENDES, H. S. J.; ARANTES, F. C.; SILVA, C. L. S. P. Caracterização molecular e diversidade genética de diferentes variedades de abacate por marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 4, p. 1178-1184, Dezembro 2011

MAY, P.G.; SPEARS, JUNIOR, E.E. Andromonoecy and variation in phenotypic gender of *Passiflora incarnata* (Passifloraceae). **American Journal of Botany**, Gainsville, v.75, p.1830-1841, 1988.

MELETTI, L. M. M. **Caracterização agrônômica de progênies de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Degener)**. 1998. 92f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1998.

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, L.M.M. **Maracujá: produção e comercialização**. São Paulo. Campinas: IAC, 1995. (Boletim técnico, n.158)

MELETTI LMM, BERNACCI LC, SOARES-SCOTT MD, et al (2003) Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agrônômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). *Rev Bras Frutic* 25:275–278. doi: 10.1590/S0100-29452003000200023

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. **Caracterização citogenética de espécies silvestres e cultivadas de maracujazeiro (*Passiflora* spp.)**. 2002. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

MOJEMA R. **Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation**. *The Computer Journal* 20: 359-363. 1977.

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.

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

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. **Utilização de marcadores cito-moleculares na identificação de cromossomos mitóticos em *Citrus* e *Poncirus***. 2007. 143 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

NASCIMENTO, W. M. O.; TOMÉ, A. T.; OLIVEIRA, M. do S. P. de; MULLER, C. H.; CARVALHO, J. E. U. Seleção de progênies de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) quanto a qualidade de frutos. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 186- 188, 2003.

NOGUEIRA LR, BUTTOW MV, CASTRO CM, COSTA RR, et al. (2007). Avaliação da Diversidade Genética entre Seleções de *Eugenia uniflora* L. Através de Marcadores AFLP. In: XVI Congresso de Iniciação Científica,

Pesquisa e Responsabilidade Ambiental, IX Encontro de Pós Graduação, 27-29 de Novembro UFPel (Universidade Federal de Pelotas), Pelotas.

OHRI, D. **Genome size variation and plant systematics**. *Annals of Botany*, London, v. 82 (Supl. A), p. 75-83, 1998.

PASSOS VM (2007) Delimitação específica de *Passiflora galbana* Mast. E *Passiflora mucronata* Lam. Através de marcadores moleculares e dados morfométricos Tese (Doutorado em Botânica) Universidade Estadual de Feira de Santana-BA.

PIO VIANA, A.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, M. M.; MALDONADO, F.; AMARAL JÚNIOR, A. T. Diversidade entre genótipos de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras determinada por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v.25, n.3, p.489-493, 2003.

OLIVEIRA, J. C., RUGGIERO, C. **Espécies de Maracujá com potencial agrônomo**. In: FALEIRO, F. G. JUNQUEIRA, N. T. V. BRAGA, M. F. (eds). 19. 30 Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético. Embrapa Cerrados, p.141 – 158, 2010.

OLIVEIRA, J.C., CARNIER, P.E., ASSIS, G.M. **Preservação de germoplasma de maracujazeiros**. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1, 1988. Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: FUNEP, 1988.p.200.

RAJENDRAN MAHEASWARI, JAISHREE TUKARAM KSHIRSAGAR, AND N. L. **Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology**. *J Indian Soc Periodontol*, v. 20, n. 2, p. 128–135, 2016.

ROCHA, A.; SALOMÃO, L.C.C.; SALOMÃO, T.M.F.; CRUZ, C.D.; SIQUEIRA, D.L. Genetic Diversity of 'Ubá' Mango Tree Using ISSR Markers. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v.50, n.2, p.108- 113, 2012.

SANTANA, I.B.B.; OLIVEIRA, E.J.; SOARES FILHO, W.S.; RITZINGER, R.; AMORIM, E.P.; COSTA, M.A.P.C.; MOREIRA, R.F.C. Variabilidade genética entre acessos de Umbu-Cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.3, p.868-876, 2011.

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

SANTOS, L. F.; OLIVEIRA, E. J.; SILVA, A. S.; CARCALHO, F. M.; COSTA, J. L.; PÁDUA, J. G. (2011) ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. *Biochemical Genetics*, v.49, p. 540–554.

SANTOS, E.A.; VIANA, A.P.; FREITAS, J.C.O.; SOUZA, M.M.; PAIVA, C.L.; RODRIGUES, D.L.; TAVARES, R.F. (2014a) Phenotyping of *Passiflora edulis*, *P. setacea*, and their hybrids by a multivariate approach. *Genet. Mol. Res.*13: 9828-9845.

SANTOS, E. A. et al. **INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA AMBIENTE NA ANÁLISE DO TERMOCICLADOR**. XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, p. 1522–1525, 2014.

SILVIA MC, VIEIRA MLC, MONDIN 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

SOUZA MM (2002) Estudos genômico e reprodutivo em espécies de *Passiflora* Tese (Doutorado em produção Vegetal) Universidade Estadual do Norte Fluminense (UFNF) Campos dos Goytacazes-RJ.

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

SOUZA, G. A., CARVALHO, M. R. O., MARTINS, E. R., GUEDES, R. N. C., & OLIVEIRA, L. O. (2008). **Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus***. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(7), 843-849.

SOUZA, M. M. et al. **Meiotic irregularities and pollen viability in *Passiflora edmundoi* Sacco (Passifloraceae)**. *Caryologia*, Italy, v. 56, p. 157-165, 2003.

SOUZA MM, PALOMINO G, PEREIRA TNS, PEREIRA MG, VIANA AP, SILVA LC, Sudré CP (2003) **Varição interespecífica do tamanho do genoma em *Passiflora* spp. (Passifloraceae)**. In: 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas SBMP Livro eletrônico, 297-302.

VARGAS, S. M. et al. Caracterização meiótica de *C. argentea*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 50., Florianópolis. Anais... Florianópolis: Costão do Santinho Resort, 2004.

Sousa, A.G.R.; Souza, M.M.; Melo, C. A. F.; Sodré, G. A. (2015). ISSR markers in wild species of *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) as a tool for taxon selection in ornamental breeding. *Genetics and Molecular Research* 14 (4): 18534-18545.

SOARES-SCOTT, M. D. **Caracteriza o citogenética de algumas espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora***. 1998. 89 f. Tese (Doutorado em

Ciências Biológicas - Biologia Celular). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1998.

SOARES-SCOTT, M. D et al. Citogenética clássica e molecular em Passifloras. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. cap. 9, p. 211-240.

VASCONCELLOS, M. A. S.; BRANDÃO FILHO, J. U. T.; VIEITES, R. L. Maracujá-doce. In: BRÜCKNER, C. H.; PICANÇO, M.C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 472p. 2001.

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.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLF, K., KAHL, G. **DNA finger printing in plants: Principles, Methods, and Applications**. 2ed. CRC Press, Taylor & Francis, 2005. 444p.

8. APÊNDICES

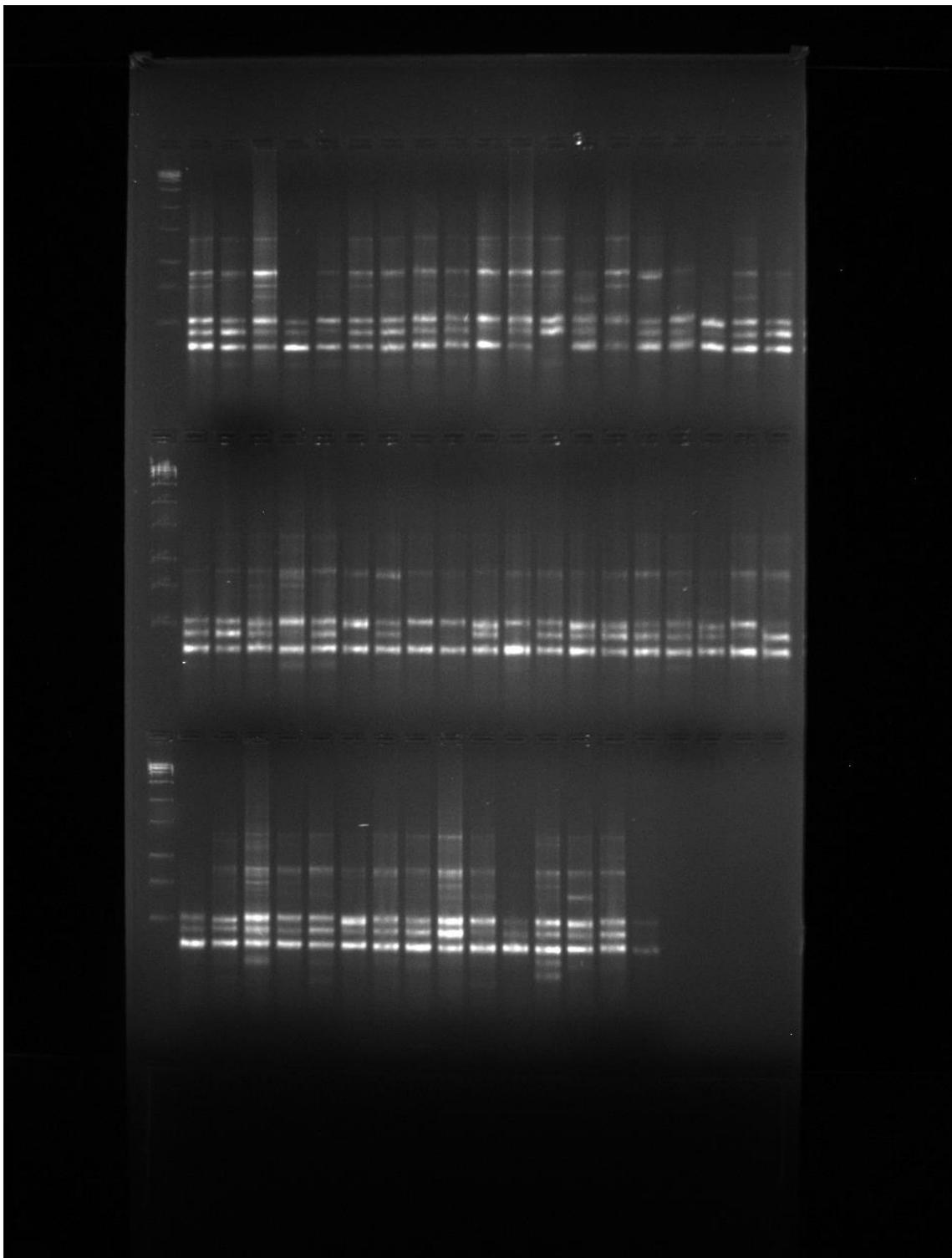


Figura 5. Amplificação do DNA genômico em 53 acessos de *P. cincinnata*, com a utilização de marcadores ISSR.

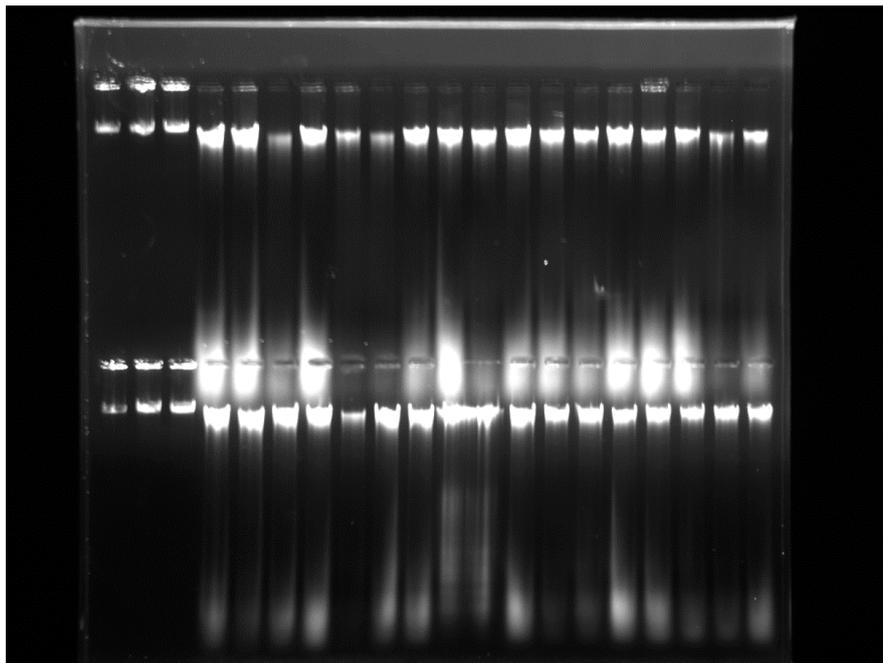


Figura 6. Quantificação do DNA genômico em 34 acessos de maracujazeiro (*Passiflora cincinnata* Mast.) e DNA do fago lambda de 50, 100 e 200 ng (poços 1,2 e 3, respectivamente).



Figura 7. Germinação de acessos de *Passiflora cincinnata* Mast, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de sementes localizado na Embrapa Semiárido-PE.