



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**



LARISSA EMANUELLE DA SILVA ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE
ACESSOS DE MARACUJÁ DA CAATINGA (*Passiflora
cincinnata* Mast.)**

LARISSA EMANUELLE DA SILVA ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE
ACESSOS DE MARACUJÁ DA CAATINGA (*Passiflora
cincinnata* Mast.)**

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

Orientador: Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo

Feira de Santana – BA
2018

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

A444c Almeida, Larissa Emanuelle da Silva

Caracterização citogenética e molecular de acessos de maracujá da caatinga (*Passiflora cincinnata Mast.*) / Larissa Emanuelle da Silva Almeida. – Feira de Santana, 2018.

59f.: il.

Orientador: Nataniel Franklin de Melo

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2018.


1. *Passiflora cincinnata Mast.* 2. Maracujá – Diversidade genética. 3. Técnicas citogenéticas - CMA3/DAP. 4. Marcadores moleculares - ISSR. I. Melo, Nataniel Franklin de, orient. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 582.842.7

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Rita Mércia Estigarribia Borges Faustino
(EMBRAPA Semiárido)


Prof. Dr. José Geraldo de Aquino Assis
(Universidade Federal da Bahia - UFBA)


Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo
(EMBRAPA Semiárido)
Orientador e Presidente da Banca

**Feira de Santana – BA
2018**

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Recursos Genéticos vegetais.

Ao Dr. Nataniel Franklin de Melo, pela orientação.

À Embrapa Semiárido, por conceder o local e apoio às atividades de pesquisa para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa durante o mestrado.

A todos do Laboratório de Biotecnologia.

As minhas amigas Bruna e Evelyn que foram companheiras durante o mestrado

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho

Obrigada!

RESUMO

Passiflora cincinnata Mast. é uma espécie nativa do Brasil com ampla distribuição geográfica, que pode ser explorada como fonte de resistência a estresses bióticos e abióticos, apresentando boa produtividade, bem como alta qualidade nutricional para a alimentação humana, além de outros usos. Por outro lado, a caracterização tanto molecular como citogenética é uma etapa importante para conservação e uso de genótipos, considerando a diversidade genética potencial da espécie. O presente trabalho objetivou caracterizar a diversidade genética entre acessos de maracujá da caatinga (*P. cincinnata*) conservados no Banco Ativo de Germoplasma de maracujá da Embrapa Semiárido, utilizando técnicas citogenéticas de análise convencional, dupla coloração CMA₃/DAPI e utilizando marcadores moleculares do tipo ISSR. Os diferentes marcadores moleculares ISSR mostraram eficiência na detecção de polimorfismo, revelando variabilidade intraespecífica entre os acessos. Foram observados números cromossômicos diploides $2n=18$, sendo classificados no grupo cromossômico com número básico $x=9$. A dupla coloração CMA/DAPI, permitiu identificar quatro bandas CMA positivo, núcleos interfásicos semirreticulados com presença de blocos CMA⁺. A colorabilidade dos grãos de pólen utilizando carmim acético e reativo de Alexander permitiu estimar uma alta viabilidade polínica com valores acima de 98% para ambos os corantes analisados, indicando o uso potencial dessa espécie em programas de melhoramento.

Palavras-chave: Fluorocromo. CMA₃/DAPI. ISSR. Diversidade genética.

ABSTRACT

Passiflora cincinnata Mast. is a native species of Brazil with a wide geographic distribution, which can be exploited as a source of resistance to biotic and abiotic stresses, presenting good productivity, as well as high nutritional quality for human consumption, besides other uses. On the other hand, both molecular and cytogenetic characterization is an important step for the conservation and use of genotypes, considering the potential genetic diversity of the species. The objective of this work was to characterize the genetic diversity among the passion fruit of the caatinga (*P. cincinnata*), conserved in the active bank of passion fruit germplasm of Embrapa Semiárido, using cytogenetic techniques of conventional analysis, double CMA³/DAPI staining and using molecular markers from type ISSR. The different ISSR molecular markers showed efficiency in detecting polymorphism, revealing intraspecific variability among the accessions. Diploid chromosome numbers $2n=18$ were observed, being classified in the chromosomal group with basic number $x=9$. The double CMA/DAPI staining allowed the identification of four CMA positive bands, semi-reticulated interphase nuclei with presence of CMA⁺ blocks. The colorability of the pollen grains using acetic carmine and Alexander reactive allowed to estimate high pollen viability with values above 98% for both dyes analyzed, indicating the potential use of this species in breeding programs.

Keywords: Fluorochrome. CMA₃/DAPI. ISSR. Genetic diversity.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	7
CAPÍTULO 1- CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE PASSIFLORA CINCINNATA MAST. POR MEIO DE TÉCNICAS CONVENCIONAIS E USO DE COLORAÇÃO CROMOSSÔMICA COM FLUOROCROMOS	23
1. Introdução	26
2. Material e Métodos	27
3. Resultados e Discussão	30
4. Conclusões	38
REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO 2- ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE DIFERENTES ACESSOS DE PASSIFLORA CINCINNATA MAST. COM A UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ISSR.	42
1. Introdução	44
2. Material e Métodos	45
3. Resultados e Discussão	48
4. Conclusões	55
REFERÊNCIAS	55
CONCLUSÃO GERAL	58

INTRODUÇÃO GERAL

Botânica

A família Passifloraceae é formada por 18 gêneros e cerca de 630 espécies, destacando-se o gênero *Passiflora* com 400 a 465 espécies de maracujazeiro. Destas, estima-se que aproximadamente 150 espécies de *Passiflora* sejam de ocorrência brasileira (CERVI, 1997; CUNHA et al., 2004; JUNQUEIRA et al. 2005).

O maracujazeiro é uma planta trepadeira herbácea ou lenhosa, perene, de crescimento rápido, vigoroso e contínuo, podendo atingir de 5 a 10 m de comprimento com raízes superficiais (RUGGIERO et al., 1996; LIMA et al., 2006). Possuem caules cilíndricos, angulares, subangulares ou quadrangulares em geral estriados longitudinais. As gavinhas, comumente solitárias e axilares, robustas ou tênues. As folhas são alternas, normalmente simples, inteiras ou lobadas, com forma altamente variada (CERVI, 1997; CUNHA et al., 2004). As flores são hermafroditas, apresentam coloração diversificada, contendo cinco sépalas, cinco pétalas, tubo andrógino de onde se destacam estames com cinco anteras dorsifixas versáteis e gineceu normalmente com três estigmas (MANICA, 1981; CUNHA et al., 2004; SILVA et al., 2014). Os frutos são do tipo baga, indeiscentes, podem ser globosos, ovóides ou elipsóides (CERVI, 1997). As sementes apresentam forma oval, testa endurecida, faveolada ou estriada (CUNHA et al., 2004).

Por ser uma planta alógama, autoincompatível, normalmente o grão de pólen produzido pela flor não pode autofecundá-la ou fecundar as flores da mesma planta, favorecendo assim a polinização cruzada (LIMA et al., 2011; SILVA et al., 2014), que ocorre principalmente por agentes polinizadores como abelhas, vespas, borboletas, mariposas, morcegos e pássaros (ZAMBERLAN, 2007; SOUSA;PEREIRA, 2011). Entretanto, a polinização pode ser realizada de forma artificial, tendo o homem como agente polinizador (LIMA; CUNHA, 1999).

A propagação pode ocorrer na forma sexuada, com o uso de sementes, e assexuada através da propagação vegetativa pelo método de estaquia, enxertia, alporquia ou pela cultura de tecidos *in vitro* (FERREIRA, 2000).

Produção de maracujá no Brasil

O maracujazeiro foi introduzido no Brasil na década de 70, inicialmente na região do triângulo mineiro, porém, com rápida expansão, passou de 120 hectares

no ano de 1971 (MANICA, 1981; JOSÉ, 1996) para 50.837 hectares até ano de 2015 (IBGE, 2015). Logo o país passou a ser o maior produtor e consumidor do mundo de maracujá (PRAÇA, 2005; SILVA, 2016, ARAYA, 2016). A produção mundial é de aproximadamente 640.000 toneladas, das quais o Brasil produz cerca de 70% desse total (FURLANETO et al., 2010). Dentro do país, as principais regiões produtoras são o Nordeste e o Sudeste, sendo o Nordeste, responsável por 64,9 % da produção nacional (IBGE, 2015). Entre as unidades federativas que se destacam como produtoras de maracujá estão os estados da Bahia, Ceará e Espírito Santo, com valores em torno de 42,81%, 13,40% e 5,43%, respectivamente (IBGE, 2015).

O Brasil é um dos países com maior diversidade dessa espécie com ocorrência de aproximadamente 145 espécies (SILVA et al., 2014). Entretanto 95% da área plantada comercialmente no Brasil é ocupada pelo maracujazeiro amarelo (*P. edulis* Sims f. *flavicarpa*), seguida pelo maracujazeiro doce (*P. alata* Curtis) maracujá roxo (*P. edulis* Sims f. *edulis*) (LIMA et al. 2006; ARAUJO, 2007). O maracujazeiro amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa*), quando comparado a outros cultivos oferece um rápido retorno econômico e maior oportunidade de distribuição de renda (SILVA et al., 2014).

Economicamente a produção de maracujá destaca-se pela demanda de mão de obra que gera aproximadamente de 3 a 4 empregos diretos por hectare, fomentando os mercados locais. Além disso, por possuir ciclos curtos e colheita continuada, é uma cultura que se desenvolve em pequenas propriedades sendo fonte de renda para pequenos produtores que vivem da agricultura familiar. Outro ponto positivo é a questão da disseminação da cultura pelo país, podendo ser produzida em quase todo o território nacional, e gerando emprego nas indústrias e nos serviços de comercialização. Vale salientar que o Brasil trabalha não só com mercado interno, mas também com o mercado externo, exportando maracujá sob forma de fruta fresca, fruta conservada e suco concentrado (JUNIOR et al., 2003; PIRES; MATA, 2004; COSTA, 2010; LIMA et al., 2011; MELETTI, 2011; PIRES et al., 2011; SILVA, 2016).

Principais formas de uso/consumo do maracujazeiro

O principal produto obtido a partir do maracujá é o suco, que pode ser consumido *in natura* ou processado. O resíduo formado durante a produção do suco

é aproveitado industrialmente, uma vez que cerca de 60% - 70% do peso total do fruto são representados pela casca e sementes que apresentam elevado valor de pectina e óleo, respectivamente (MATSUURA; FOLEGATII, 2004). Os produtos decorrentes da casca são as geléias, farinha de pectina e o doce em calda produzido com base nos carboidratos e proteínas igualmente presentes na casca. O óleo pode ser utilizado na indústria de cosméticos, tintas, sabões, alimentos e outros. O farelo gerado durante a extração do óleo ou até mesmo o uso da semente de forma direta pode compor a ração animal (SIMIONATO, 2007).

Diferentes espécies do gênero *Passiflora* já vêm sendo estudadas em relação ao seu potencial medicinal como *P. alata*, *P. edulis*, *P. incarnata*, *P. quadrangularis*, e *P. coerulea* (SOUSA et al., 2008). Muitas espécies do gênero também são utilizadas pela indústria farmacêutica e na medicina popular. Os estudos etnofarmacológicos indicam o seu uso como tranquilizante suave, na forma de infusão, no combate à insônia, convulsões e também no alívio das contrações musculares bruscas. A farmacologia relaciona os seus efeitos como depressor do sistema nervoso central, já sendo comprovada sua ação ansiolítica (CERVI, 1997; FAUSTINO et al., 2010; CONCEIÇÃO; ARAUJO, 2011).

Em 1909 foram registradas substâncias denominadas de “passiflorina” e “maracujina” em algumas espécies de *Passiflora*. Normalmente as espécies estudadas são ricas em alcaloides indólicos (harmalina, harmina, harmanol), polifenólicos conhecidos por flavonóides (vitexina, isovitexina, saponarina, orientina, homorientina, apigenina, issorientina), esteróis (stigmasterol, sitosterol) e liganos (ácido caféico e ferrúlico) (FREITAS, 1985; FREITAS, 1987; COSTA; TUPINAMBÁ, 2005; GOSMANN et al., 2011; RODRIGUES, 2013) registrados em diferentes quantidades e espécies.

A ampla variedade de cores e formas apresentada pelas plantas de *Passiflora* e a combinação de cores exóticas e perfume marcante nas suas flores promovem o uso ornamental em áreas grandes e médias, como cercas vivas, utilizando espécies que apresentam folhas pequenas e grande quantidade de flores abertas simultaneamente, para coberturas de lugares expostos ao sol, optando-se por plantas que produzem grande massa foliar. Em residências podem ser cultivadas em vasos grandes e médios escolhendo espécies que além de flores exibem folhas decorativas e variegadas (PEIXOTO, 2005; FALEIRO et al., 2007).

Doenças e pragas do maracujazeiro

O fato de o Brasil ser centro de diversidade do maracujazeiro torna a passicultura uma atividade importante, entretanto, essa mesma razão faz com que a passicultura seja vulnerável a doenças e pragas que estão ligadas evolutivamente as passifloras. As principais doenças que afetam o maracujazeiro são o endurecimento-dos- frutos, a pinta-verde-do-maracujazeiro, a mancha-bacteriana, a podridão-do-colo, verrugoses, antracnoses, septorioses, fusarioses e bacterioses. Alguns insetos são considerados pragas na passicultura, por diminuírem a produção de forma direta, destacando-se as lagartas, percevejos, moscas, pulgões e besouros (FANCELLI; ALMEIDA, 2002; LIMA et al., 2006; FISCHER et al., 2007; GARCIA et al., 2007).

A susceptibilidade das espécies comerciais age como fator limitante da expansão da cultura no Brasil. Entretanto, algumas espécies silvestres de passiflora apresentam resistência a doenças e pragas. Com base nessa informação, estratégias biotecnológicas estão sendo desenvolvidas, com a finalidade de identificar esses genes. Aliado a isso, a caracterização e avaliação dessas espécies silvestres são necessárias para que possam ser utilizadas em programas de melhoramento genético como alternativas para ampliação da base genética, incorporando características agrônômicas desejáveis em espécies comerciais (MELETTI et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2005; FERREIRA; RANGEL, 2005).

Potencial das espécies silvestres

Espécies silvestres são estratégicas para os programas de melhoramento genético. Considerando que as mesmas são mantidas na natureza pela seleção natural, é provável que contenham genes úteis de interesse agrônômico não encontrados em espécies de *Passiflora* com valor comercial (ARAUJO, 2007; PAIVA et al., 2014).

As espécies silvestres de *Passiflora* são utilizadas como porta-enxerto para produção de mudas de maracujazeiro amarelo por apresentarem, por exemplo, resistência a nematóides e fungos do solo. Apresentam ainda características interessantes, como longevidade, autocompatibilidade e maior adaptação a

condições climáticas adversas (ARAUJO, 2007; ARAUJO et al., 2008; FALEIRO et al., 2012).

Outra característica das espécies silvestres é possuir o androginóforo mais curto, reduzindo a distância entre os estigmas e à coroa, facilitando a polinização por insetos pequenos (JUNQUEIRA et al., 2005). Quanto ao período de florescimento, algumas espécies silvestres florescem e frutificam durante o período de dias mais curtos do ano, o que permite que seus frutos sejam colhidos durante a entressafra do maracujá-azedo. Essa característica aliada ao maracujá comercial possibilita a produção de frutos durante o ano todo em diferentes regiões do país. Além disso, muitas espécies apresentam maior concentração de componentes químicos de interesse da indústria farmacêutica (JUNQUEIRA et al., 2005; ARAUJO, 2007).

A diversidade genética das espécies silvestres de *Passiflora* encontra-se ameaçada no Semiárido do Nordeste brasileiro. Práticas como a formação de pastagens, a implantação de projetos de irrigação, uso da vegetação nativa para produção de energia a fim de serem empregadas em diferentes atividades, e as queimadas têm contribuído para a perda da diversidade, sejam elas praticadas em conjunto ou isoladamente (QUEIROZ et al., 1993).

Dentre as espécies silvestres com potencial econômico, *P. cincinnata*, conhecida vulgarmente como maracujá do mato, maracujá da caatinga ou maracujá mochila, é de ocorrência espontânea no semiárido brasileiro com ampla distribuição, observando-se acessos com forma e tamanho de frutos variados (OLIVEIRA; RUGGIERO, 2005; CARMO et al., 2017). As folhas são simples, 3-5 palmatipartidas, quando tripartidas, os segmentos laterais em geral profundamente bilobados com coloração verde escuro, possuem flores com sépalas oblongo-lanceoladas, verdes externamente, coloração interna roxa ou azul-rosadas e pétalas linear-lanceoladas, azul-rosadas e violeta. Filamentos da coroa: parte inferior púrpura, meio listrado de azul-rosado e azul-pálido, parte superior azul-pálido ou escuro (CUNHA et al., 2004; CARMO, 2017). Paiva et al., (2014) constataram que a *P. cincinnata* apresentou androginóforo mais curto quando comprado a outras espécies de passiflora. As plantas são vigorosas, apresentando alguns genes de resistência aos estresses bióticos e abióticos (AZEVEDO et al., 2011). Os seus frutos podem ser consumidos *in natura* e serem utilizados como matéria-prima para doces e sorvetes (ARAYA, 2016). A comercialização ainda é feita em pequena escala, ocorrendo, em sua maior parte nos estados de Pernambuco e Bahia, sendo comercializado em feiras livres.

Apresentam substâncias bioativas, com propriedades medicinais e tolerância a nematóides e à bacteriose (CARMO et al., 2017).

Os bancos de germoplasma de *Passiflora* no Brasil ainda são incipientes, considerando-se a ampla distribuição geográfica das espécies no país, bem como a ocorrência em outros países da América do Sul e na região Neotropical. No caso de *P. cincinnata*, Araújo (2007) coletou diversos acessos em diferentes partes do Nordeste brasileiro e observou a existência de variabilidade intraespecífica nessa espécie, servindo de base para a formação do BAG de maracujá da Embrapa Semiárido.

Caracterização Citogenética

Os estudos citogenéticos dirigem a sua atenção para os cromossomos, sendo utilizados para definir as relações filogenéticas e citotaxonômicas entre grupos de plantas. A forma e o número cromossômico são os parâmetros mais utilizados para a caracterização citológica de uma espécie determinando seu cariótipo. Outros pontos importantes é o estabelecimento do nível de ploidia, avaliação do comportamento meiótico e fertilidade de pólen (SOARES-SCOTT 1998; PRAÇA, 2005; BRANDÃO, 2015).

A análise cariotípica abrange avaliação de elementos como número e tamanho dos cromossomos, relação entre os braços cromossômicos, presença de contração secundária e satélite e propriedades de coloração. A reunião de todos esses dados permite realizar análise de comparação de diferentes espécies ou possibilita examinar a variação entre indivíduos de uma mesma espécie (SOARES-SCOTT, 1998; MELO, 2002; SOARES-SCOTT et al., 2005).

Análise meiótica é umas das técnicas citogenéticas que provém informações sobre a recombinação cromossômica, o pareamento entre cromossomos homólogos e homeólogos (SOUZA et al., 2003) e mostra a ocorrência de irregularidades meióticas que interferem de forma direta na fertilidade dos gametas (SOARES-SCOTT et al., 2005; POZZOBON et al., 2011). Através da viabilidade polínica é possível determinar a fertilidade de diferentes espécies e, associada à meiose, fornecer informações sobre o potencial de reprodução das plantas, selecionando genótipos para uso futuro em programas de cruzamento e produção de sementes viáveis (MARTINS et al., 2010; MELO, 2016; HISTER; TEDESCO, 2016).

Outra metodologia de análise citogenética é a visualização de blocos com coloração diferenciada (bandas) realizada através da técnica de bandeamento com fluorocromos. A dupla coloração com os fluorocromos CMA/DAPI permite a diferenciação dos tipos de heterocromatina, parte mais condensada da cromatina, que resulta nessas regiões densamente coradas. Nesse caso os fluorocromos mais utilizados são o 4'-6' diamidino-2-10-fenilindol (DAPI), que reconhece regiões heterocromáticas ricas em bases AT, e a cromomicina A3 (CMA₃), que destaca regiões heterocromáticas ricas em bases GC (GUERRA, 2000; GUERRA; SOUZA, 2002). Os estudos de análise de cromatina com auxílio de fluorocromos indicam que a heterocromatina constitutiva presente nos diversos grupos vegetais é rica em AT. Já a heterocromatina constitutiva rica em CG, tem sido frequentemente associadas às regiões formadoras de nucléolos (RON's) (COELHO, 2009).

O gênero *Passiflora* demonstra ampla variação morfológica o que sugere a ocorrência de variabilidade genética tanto inter como intraespecífica. O uso das diferentes técnicas citogenéticas existentes, sejam elas convencionais ou moleculares tem proporcionado um melhor entendimento dos processos evolutivos, fornecendo informações sobre a origem, organização genômica e estabelecimento de padrões cariotípicos para esse gênero (LOPES, 1994; MELO, 2002; VIEIRA et al., 2004; PRAÇA, 2005; PEÑALOZA; POZZOBON, 2007; COELHO, 2015).

As espécies de *Passiflora* com base em análises cariológicas estão divididas em quatro grupos de acordo com o seu número cromossômico básico: $x=6$, $x=9$, $x=10$, $x=12$. O número $x=6$ tem sido considerado o número básico mais provável para o gênero, sendo os demais números básicos considerados como secundários (MELO et al., 2001; MELO; GUERRA, 2003). *Passiflora cincinnata* apresenta $2n=18$, um par de sitio de DNAr 5s e dois pares de sítios de DNAr 45s (MELO, 2002; MELO, GUERRA, 2003).

De uma forma geral as informações a respeito da caracterização citogenética de espécies silvestres são insuficientes, sendo ainda pouco exploradas por programas de pré-melhoramento de espécies com maior importância econômica (PEÑALOZA; POZZOBON, 2007).

Marcadores moleculares

A busca do melhor conhecimento e caracterização de germoplasma tem sido um objetivo comum para os melhoristas que enfrentam desafios como a natureza

poligênica das características de importância agrônômica e a interação do genótipo com o ambiente. Nesse caso, uma importante ferramenta da biotecnologia que tem contribuído para a caracterização dos bancos ativos de germoplasma de diferentes espécies, são os marcadores moleculares. Os marcadores moleculares podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de segmento específico do DNA. (AGUIAR, 2012), que possibilitam acessar o genótipo sem influência do meio ambiente, permitindo selecionar variabilidade em nível de DNA (FEDERIZZI, 1998; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; HOFFMANN; BARROSO, 2006; DANTAS, et al., 2012; FREIRE, 2012).

A comparação de distintos genótipos através dos marcadores moleculares promove um padrão de polimorfismo singular. Após ser definida a identificação molecular de um conjunto de genótipos, é possível inferir relações entre genótipos e fenótipos, avaliar a diversidade genética dentro e entre populações diferentes, estando essas devidamente representadas por uma amostra de indivíduos (HOFFMANN; BARROSO, 2006; MARTINS et al., 2011).

Existem diversos tipos de marcadores moleculares, podendo ser codominantes como os RFLP (*Restriction fragment length polymorphism; Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição*) e SSR (*simple sequence repeat; Repetição de sequência simples*), e dominantes como os RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA; DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso*), AFLP (*Amplified fragment length polymorphism; Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat; Sequências Simples Repetitivas Internas*). A escolha do marcador utilizado vai depender principalmente do objetivo do trabalho, estrutura genética e infraestrutura disponível (AGUIAR, 2012; COELHO, 2015; BRONDANI et al., 2003; FERRÃO et al., 2011).

Um marcador que tem se destacado por apresentar rapidez e confiabilidade em seus resultados e baixo custo quando comparado a outros marcadores, é o marcador molecular ISSR, amplificado via técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction; Reação de Cadeia da Polimerase) (BORBA et al., 2005; AMORIM, 2016). Os seus resultados advêm de regiões que estão localizadas entre dois locos SSRs, tornando esse marcador apropriado para uso em análise de diversidade por gerar marcação de multilocos (SILVA, 2015; SILVA, 2016).

Esses marcadores utilizam primers de sequência simples repetitiva de 16-20 pb baseados em microssatélites, com fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb,

altamente polimórficos, gerando grande número de bandas informativas por reação, não havendo necessidade de conhecimento prévio da sequência de DNA, tornando essa técnica apta a analisar quase todos os organismos (SANTOS, 2012; AMORIM, 2016).

Trabalhos realizados com meloeiro, tucumanzeiro, jenipapeiro, mini-tomateiro, dendezeiro, etc., têm demonstrado a eficiência desse marcador molecular em analisar diversas espécies, identificando polimorfismo e variabilidade intra e interespecífica (BORBA et al., 2005; SANTOS, 2012; PRECZENHAK, 2013; SILVA, 2015; CHAGAS et al., 2015; AMORIM, 2016).

Estudos realizados em *Passiflora* com o uso do marcador molecular ISSR têm demonstrado a eficiência desse marcador. Costa et al. (2010) constataram que os marcadores ISSR mostraram-se uma ferramenta valiosa para estudo de diversidade genética dentro de *P. edulis*, mediante a geração de um total de 320 bandas polimórficas. Reis et al. (2011) também observaram considerável variabilidade genética intrapopulacional em maracujazeiro amarelo.

Costa et al. (2012) relataram resultados pela alta detecção de polimorfismo em maracujazeiro amarelo, onde dos 23 iniciadores ISSR testados, 22 detectaram polimorfismo, resultando em baixa percentagem de marcadores monomórficos, indicando alta variabilidade genética intraespecífica.

Da mesma forma, Coelho (2015) também relatou que os marcadores do tipo ISSR possuem grande potencial para detecção de polimorfismos moleculares em genótipos de maracujazeiro, bem como também o seu uso eficiente na caracterização do BAG-Maracujá.

O presente estudo objetivou caracterizar a diversidade genética entre acessos de *P. cincinnata* conservados no Banco Ativo de Germoplasma de maracujá da Embrapa Semiárido, por meio de técnicas citogenéticas de análise convencional, dupla coloração CMA₃/DAPI e através do uso marcadores moleculares do tipo ISSR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, M. S. Marcadores moleculares como ferramenta no melhoramento genético de plantas. In: Ciclo de Palestras sobre o Uso de Marcadores Moleculares na Pesquisa Agropecuária, 2012, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. V.1 p. 10-14.

- AMORIM, C. C. **Caracterização em acessos de melão do banco ativo de germoplasma de cucurbitáceas para o nordeste brasileiro.** 2016. 63 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2016.
- 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 Agrônômica, 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.
- ARAYA, S. **Desenvolvimento, validação, transferibilidade e aplicação de marcadores microssatélites em estudos genéticos das passifloras.** 2016. 283 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2016.
- AZEVEDO, T. P et al. 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, 2011.
- BORBA, R. S et al.. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**. vol.34, n.4, p.565-569, 2005.
- BRANDÃO, L. P. **Caracterização molecular e citogenética de acessos de capim buffel (*Cenchrus Ciliaris* L.).** 2015. 67 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias, Fitotecnia). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2015.
- BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P.; RANGEL, P. H. N. **Utilização de marcadores moleculares em programas de ampliação da base genética de espécies cultivadas.** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. (Documentos, 155). 2003. 36p.
- CARMO, T. V. B et al.. 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
- CERVI, A. C. **Passifloraceae do Brasil. estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*.** Madrid: Fontqueria XLV, 1997. 92 p. II
- CHAGAS, K. P. T et al.. A. Seleção de marcadores issr e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.10, n.1, p.147-152, 2015.
- 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 - Ecologia Vegetal e Meio Ambiente). Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, 2009.

COELHO, M. S. E. **Citogenética e cultivo *in vitro* de espécies e híbridos de *Passiflora* L.** 2015. 104 f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2015.

CONCEIÇÃO, A. O.; ARAUJO, L. M. Maracujá: etnofarmacologia e ciência. In: PIRES, M. M.; JOSÉ, A. R. S.; CONCEIÇÃO, A. O. (Ed.). **Maracujá: avanços tecnológicos e sustentabilidade.** Ilhéus: Editus, 2011. p. 69-80.

COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. O maracujá e suas propriedades medicinais – estado da arte. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. cap. 20, p. 475-506.

COSTA, J. L et al. Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.12, n.4, p. 253-260, 2012.

COSTA, J. L. **Marcadores issr: diversidade genética e correlação com heterose em genótipos de *Passiflora edulis* Sims.** 2010. 49 f. TCC (Graduação em Biologia) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2010.

CUNHA, M. A. P.; BARBOSA, L. V.; FARIA, G. A. Botânica. In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P. (Ed.). **Maracujá: produção e qualidade na passicultura.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. cap. 1, p.15-35.

DANTAS, A. C. A et al.. Caracterização molecular de acessos de melão coletados no nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 34, n. 1, p. 183-189, 2012.

FALEIRO, F. G et al.. **Conservação e caracterização de espécies silvestres de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) e utilização potencial no melhoramento genético, como porta-enxertos, alimentos funcionais, plantas ornamentais e medicinais – resultados de pesquisa.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. (Documento, 312), 2012. 34 p.

FALEIRO, F. G et al. BRS Estrela do Cerrado: Híbrido de *Passiflora* para uso como planta ornamental. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 13, p. 334, 2007.

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

FANCELLI, M.; ALMEIDA, A. Insetos-Praga e seu controle. In: LIMA, A. de A. (Ed.) **Maracujá produção aspectos técnicos.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. Cap. 10, p. 57-66.

FAUSTINO, T. T.; ALMEIDA, R. B.; ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, vol. 32, n. 4, dez. 2010.

FEDERIZZI, L. C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S. C. K. Milach, 1998. 141p.

FERRÃO, L. F. V et al. Estudo comparativo do nível de polimorfismo e informatividade acessado pelos marcadores RAPD, AFLP e SSR, no estabelecimento de relações genéticas em *Coffea canephora*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 7., 2011, Araxá. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Café, 2011.

FERREIRA, G. **Propagação do maracujazeiro**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 21, n. 206, p.18-24, 2000.

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

FERREIRA, M. E.; RANGEL, P. H. N. Emprego de espécies silvestres no melhoramento genético vegetal: experiência em outras espécies com análise de retrocruzamento avançado de QTLs (AB-QTL). In: FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N. T. V. e BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 5, 2005. p. 111-140

FISCHER, I. H.; AMEIDEIA, A. M.; GARCIA, M. J. M. Doenças importantes do maracujazeiro. In: SAMPAIO, A. C.; FUMIS, T. de F.; KAVATI, R.; ALMEIDA, A. M. de; GARCIA, M. J. De M. (Ed.). **Maracujazeiro-amarelo: do plantio à comercialização**. Campinas: Instituto Agrônômico. (Documento técnico, 115), 2007. 11-15p.

FREIRE, K. C. S. Caracterização de germoplasma. In: Ciclo de Palestras sobre o Uso de Marcadores Moleculares na Pesquisa Agropecuária, 2012, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. V.1 p. 15-20

FREITAS, P. C. D. **Estudo farmacognóstico comparativo de espécies brasileiras de gênero *Passiflora L.*** 133 f. 1985. Dissertação (Mestrado em Fármaco e medicamento). Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

FREITAS, P. C. D. Possibilidades farmacológicas. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Maracujá**. Ribeirão Preto: Unesp: Legis Summa, 1987. p. 210-217.

FURLANETO, F. P B et al. **Características Técnicas e econômicas do Cultivo de Maracujazeiros**. 2010. Artigo em Hypertexto Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/maracuja/index.htm>. Acesso em: 16/2/2017

GARCIA, M. J. M.; AMEIDEIA, A. M.; FISCHER, I. H. Pragas importantes do maracujazeiro. In: SAMPAIO, A. C.; FUMIS, T. de F.; KAVATI, R.; ALMEIDA, A. M. de; GARCIA, M. J. de M. (Ed.). **Maracujazeiro-amarelo: do plantio à**

comercialização. Campinas: Instituto Agrônomo. (Documento técnico, 115), 2007. p. 17-24

GOSMANN, G et al. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, s.1, p. 88-99, abr. 2011.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, 2000.

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

HISTER, C.A.L.; TEDESCO, S.B. Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) através de distintos métodos de coloração. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 135-141, 2016.

HOFFMANN, L. V.; BARROSO, P. A. V. **Marcadores Moleculares como Ferramentas para Estudos de Genética de Plantas.** Campina Grande: Embrapa Algodão. (Documentos, 14). 2006. 35p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2015. Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/maracuja/b1_maracuja.pdf. (Acesso em 25 de setembro 2017).

JOSÉ, A. R. S. Pesquisa em maracujazeiro no Brasil. In: CUNHA, M. A. P. (Ed.). **Reunião Técnica: pesquisa em maracujazeiro no Brasil.** Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF. (Documentos, 77). 1996. p. 54-57

JÚNIOR, V. C. A et al. Produção de maracujazeiro-amarelo sob diferentes densidades de plantio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1381-1386, 2003.

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. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. cap. 4, p. 79 – 108.

LIMA, A. A et al. Maracujá: sistema de produção convencional. In: PIRES, M. M.; JOSÉ, A. R. S.; CONCEIÇÃO, A. O. da (Ed.). **Maracujá: avanços tecnológicos e sustentabilidade.** Ilhéus: Editus, 2011. p. 203 - 237.

LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P. Polinização. In: LIMA, A. A. (Ed.). **O cultivo do Maracujá.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1999. Cap. 9. p. 44-46.

LIMA, A. A et al. **A cultura do maracujá.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura. (Coleção Plantar, 51). 3 ed. 2006. 124p.

- LOPES, S. C. Citogenética de maracujazeiro – *Passiflora* spp. In: JOSÉ, A. R. S. (Ed.). **Maracujá-produção e mercado**. Vitória da conquista- BA. DFZ/UESB, 1994. P. 19-23.
- MANICA, I. Fruticultura Tropical: maracujá. São Paulo, SP: Agronômica Ceres, 1981. 151 p.
- MARTINS, A. B. G et al. 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, 2011.
- MARTINS, K. C et al. Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annum* e *Capsicum baccatum*. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 8, p. 1796-1751, ago, 2010.
- MATSUURA, F. C. A. U. ; FOLEGATTI, M. I. S Processamento. In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P. (Ed.). **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. cap. 15, p.307-321.
- MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, Volume Especial, E. 083-091, 2011.
- MELETTI, L. M. M et al. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 3, 2005. p. 55-78.
- MELO, K. G. P. **Caracterização molecular e citogenética de acessos de *Manihot* Muell. cultivados no semiárido brasileiro**. 2016. 58f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)– UNIVASF, Petrolina, Pernambuco, 2016.
- 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.
- 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.
- OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá em potencial agrônomo. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. cap. 6, p. 141-158
- PAIVA, C. L et al.. Diversidade genética de espécies do gênero *Passiflora* com o uso da estratégia Ward – MLM. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 36, n. 2, p. 381 - 390, Junho 2014.

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N. T. V. e BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. cap. 18, p. 457- 463.

PEÑALOZA, A. D. P. S.; POZZOBON, A. T. CARACTERIZAÇÃO CITOGÉNÉTICA DE GERMOPLASMA VEGETAL. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 858 p.

PIRES, M. M et al. Caracterização do mercado de maracujá. In: PIRES, M. M.; JOSÉ, A. R. S.; CONCEIÇÃO, A. O. (Ed.). **Maracujá: avanços tecnológicos e sustentabilidade**. Ilhéus: Editus, 2011. p. 21-67.

PIRES, M. M.; MATA, H. T. C. Uma Abordagem Econômica e Mercadológica para a Cultura do Maracujá no Brasil. In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P. (Ed.). **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. cap. 16, p.325-343.

POZZOBON, M. T et al. Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta. **Horticultura brasileira**, v. 29, n. 2, p. 212-216. Abr.- jun. 2011

PRAÇA, M. M. **Caracterização dos cromossomos de maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) com giemsa, laranja de acridina e fish**. 2005. 60 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2005.

PRECZENHAK, A. P. **Diversidade genética estimada por meio de marcadores moleculares e morfoagronômicos em acessos de mini-tomate**. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Paraná, 2013.

QUEIROZ, M. A et al. 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-CNPMF, 1993. p. 87-92.

REIS, R. V et al. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro- amarelo detectada por marcadores microssatélites. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 46, n. 1, p.51-57, 2011.

RODRIGUES, T. R. **Estudo de alcaloides harmônicos em sementes de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (Maracujá Azedo) por SBSE/CLAE-Flu dual**. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, 2013.

RUGGIERO, C et al. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: Embrapa-SPI, 1996. 64 p.

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.

SILVA, C. I et al. **Manejo dos polinizadores e polinização de flores do maracujazeiro**. Fortaleza, CE: Editora Fundação Brasil Cidadão, 1. ed. 2014. 59 p.

SILVA, I. C.; **Divergência genética entre matrizes de tucumanzeiros selecionadas para a produção de frutos e teor de óleo na polpa por marcadores ISSR e SSR**. 2015. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia aplicada a agropecuária) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará, 2015.

SILVA, R. M. **Enxertia de cultivares de maracujazeiro azedo sobre *Passiflora foetida* L.: Desempenho agrônomo das cultivares, caracterização morfoagronômica, variabilidade genética do porta enxerto e resistência a fusariose**. 2016. 112f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, MOSSORÓ, Rio Grande do Norte, 2016.

SIMONATO, E. M. R. S. Subproduto do Maracujá. In: SAMPAIO, A. C.; FUMIS, T. de F.; KAVATI, R.; ALMEIDA, A. M. de; GARCIA, M. J. De M. (Ed.). **Maracujazeiro-amarelo: do plantio à comercialização**. Campinas: Instituto Agrônomo. (Documento técnico, 115), 2007. 31-34p.

SOARES-SCOTT, M. D. **Caracterização 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.

SOUSA, F. C. F et al. Plantas Medicinais e Seus Constituintes Bioativos: Uma Revisão da Bioatividade e Potenciais Benefícios nos Distúrbios da Ansiedade em Modelos Animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18(4): p. 642-654. Out./Dez. 2008

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S. Biologia da reprodução em maracujazeiro amarelo e sua importância para a produção comercial de frutos. In: PIRES, M. M.; JOSÉ, A. R. S.; CONCEIÇÃO, A. O. (Ed.). **Maracujá: avanços tecnológicos e sustentabilidade**. Ilhéus: Editus, 2011. p. 175 - 201.

SOUZA, M. M et al. Meiotic irregularities and pollen viability in *Passiflora edmundoi* Sacco (Passifloraceae). **Caryologia**, Vol. 56, n. 2, 161-169, 2003.

VIEIRA, M. L. C.; BARBOSA, L. V.; MAYEDA, L. Y. Citogenética dos maracujazeiros (*Passiflora* spp.). In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P. (Eds). **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa mandioca e Fruticultura, 2004. Cap. 3, p. 45-65.

ZAMBERLAN, P. M. **Filogenia de *Passiflora* L. (Passifloraceae): questões de infra-estrutura**. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE *Passiflora cincinnata* MAST. UTILIZANDO TÉCNICAS CONVENCIONAIS E COLORAÇÃO CROMOSSÔMICA COM FLUOROCROMOS

Artigo a ser submetido à revista Acta Scientiarum. Agronomy

RESUMO

Objetivou-se caracterizar citogeneticamente a diversidade genética entre seis acessos de *Passiflora cincinnata* pela análise da viabilidade polínica, descrição do cariótipo e dupla coloração com CMA₃/DAPI. A viabilidade polínica foi estimada através da porcentagem de grãos de pólen viáveis. De modo geral, observou-se que os grãos de pólen corados com carmim acético 2% e reativo de Alexander apresentaram viabilidade acima de 98%. O tamanho médio dos grãos de pólen viáveis variou entre os dois corantes. Os valores mensurados com carmim acético mostraram diâmetro médio de 75,26 µm, enquanto que aqueles corados com reativo de Alexander apresentaram um menor diâmetro (69,45 µm). Com análise mitótica foi possível observar números cromossômicos diploides 2n=18, pertencentes ao grupo cromossômico com número básico x=9, e núcleos interfásicos semirreticulados. O comprimento cromossômico médio variou de 2,67 a 3,33 µm. Foram observadas quatro bandas CMA⁺ com presença de heteromorfismo de tamanho em um dos pares cromossômicos.

Palavras-Chave: Carmim acético. Reativo de Alexander. Viabilidade polínica. CMA₃/DAPI. Maracujá.

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize the genetic diversity of six accessions of *Passiflora cincinnata* by pollen viability, description of karyotype and double staining with CMA₃/DAPI. Pollen viability was estimated by the percentage of viable pollen grains. In general, it was observed that the pollen grains stained with 2% acetic carmine and Alexander reactive showed viability above 98%. The average size of the viable pollen varied between the two dyes. The values measured with acetic carmine had a mean diameter of 75.26 µm, while the ones stained with Alexander reactive resulted in a smaller diameter (69.45 µm). With mitotic analysis it was possible to observe diploid chromosome numbers $2n = 18$, belonging to the chromosomal group with basic number $x = 9$ and semi-reticulated interphase nuclei. The mean chromosome length ranged from 2,67 a 3,33 µm. Four positive CMA⁺ bands were observed with size heteromorphism in a chromosome pair.

Keywords: Acetic carmine. Reactive of Alexander. Pollen viability. CMA₃/DAPI. Passion fruit.

1. INTRODUÇÃO

Maracujá é o nome dado a várias espécies do gênero *Passiflora* que pertencem à família Passifloraceae (OLIVEIRA et al., 1994), formada por plantas trepadeiras herbáceas, arbustivas ou arbóreas.

Citologicamente as espécies de *Passiflora* podem ser divididas em quatro grupos de acordo com o número cromossômico básico, retratados por $x=6$, $x=9$, $x=10$ e $x=12$, sendo $x=6$ o número básico mais provável para o gênero (MELO et al., 2001). *Passiflora cincinnata* tem $2n=18$, pertencendo ao grupo de espécies com $x=9$.

Do ponto de vista econômico, muitas espécies nativas apresentam potencial de uso como frutíferas, ornamentais ou na indústria de cosméticos e farmacêutica. Além disso, as espécies silvestres de maracujá podem contribuir para o melhoramento das espécies de interesse agrônômico (JUNQUEIRA et al., 2005). No Brasil, *P. cincinnata* é uma das espécies que apresenta maior potencial de mercado, observando-se fenotipicamente uma considerável variabilidade entre acessos, principalmente relacionados ao tamanho e formato de folhas, flores e frutos (ARAÚJO, 2007). Dessa forma, além dos trabalhos de descrição e conservação, são necessários estudos de caracterização inicial de forma a conhecer a variabilidade cariotípica e molecular dos genótipos existentes, buscando identificar genótipos promissores para uso em programas de melhoramento genético.

O uso da coloração diferencial com os fluorocromos CMA₃/DAPI permite identificar a distribuição e quantificar a heterocromatina, possibilitando uma melhor compreensão das alterações cromossômicas que se estabelecem em cada genótipo (SOARES-SCOTT et al., 2005). Melo et al. (2001), ao analisarem oito espécies de *Passiflora* com o uso de fluorocromos CMA₃/DAPI, observaram de um a três pares de blocos de CMA e nenhuma heterocromatina DAPI positiva. A coloração com uso dos fluorocromos em *P. cincinnata* mostrou quatro blocos CMA positivos localizados na região terminal do braço longo dos cromossomos, não sendo observada para essa espécie a formação de bandas DAPI positivo (COELHO, 2009). Entretanto, a análise foi realizada em apenas um indivíduo, não sendo possível detectar possíveis diferenças ou estabelecer um padrão de distribuição de bandas para acessos dessa espécie.

Por ser uma planta alógama, os grãos de pólen do maracujazeiro levam consigo a composição genética consequente da heterozigose, o que faz com que essas plantas transmitam para a próxima geração o próprio gameta (SOUZA et al., 2002).

Coelho (2015), investigando a viabilidade polínica em algumas espécies de *Passiflora*, não só detectou alta viabilidade para *P. cincinnata* (96,9%) e *P. edulis* (89,9%), mas também para o híbrido interespecífico *P. edulis* x *P. cincinnata* (89,8%). Araújo et al. (2008), estudando *P. cincinnata*, observaram que existe uma considerável variabilidade morfológica nos grãos de pólen entre os acessos coletados em diferentes localidades. Outra abordagem foi realizada por Moreno et al. (2015), que realizaram coletas de botões florais de *P. edulis* em horários distintos, e verificaram que, apesar de haver diferenças, a viabilidade dos grãos de pólen permaneceu alta, com valores acima de 70%. A elevada taxa de viabilidade do grão de pólen de maracujá detectada por esses autores indica a grande probabilidade de diferentes combinações entre os alelos (SOUZA et al., 2002).

A caracterização inicial de forma a conhecer a composição gênica dos genótipos existentes e identificar quais os promissores, é fundamental para que as espécies sejam utilizadas em programas de melhoramento genético.

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou caracterizar citogeneticamente a diversidade genética entre acessos de *P. cincinnata*, analisando a viabilidade polínica e o número e a localização de regiões heterocromáticas por meio da dupla coloração com fluorocromos CMA₃/DAPI.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e infraestrutura

O material utilizado foi proveniente do Banco Ativo de Germoplasma – BAG de Maracujá, localizado na Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. Foram analisados seis acessos de *P. cincinnata* (Tabela 1), cada acesso contando com três repetições. Todos os experimentos foram conduzidos no laboratório de biotecnologia e em casa de vegetação, pertencentes a Embrapa Semiárido, localizada em Petrolina - PE.

TABELA 1. Origem e identificação dos acessos de *Passiflora cincinnata* analisados, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Maracujá da Embrapa Semiárido . Petrolina, PE, Brasil, 2017.

Trat/acesso ¹	Longitude W	Latitude S	Altitude M	Município/Origem	UF
1 - A0423	39:39:36.00 W	7:23:24.00 S	930	Crato	CE
16 - C0707	42:08:24.00 W	14:33:36.00 S	728	Jaguarari	BA
25 - F2331	39:40:12.00 W	9:43:48.00 S	494	Curaçá	BA
34 - J0809	40:13:12.00 w	9:48:36:00 s	469	Juazeiro	BA
42 - T0336	38:50:24:00 w	8:01:12:00 s	596	São José do Belmonte	PE
49 - F2646	41:17:24: 00 w	8:03:36:00 s	381	Paulistana	PI

1A04, C07, F23, F26, J08 e T03 correspondem às respectivas Unidades Geoambientais de caracterização do zoneamento agroecológico do Nordeste onde os acessos foram coletados (ARAUJO, 2007).

2.2. Análise Citogenética

2.2.1. Viabilidade Polínica

As análises foram realizadas com base no procedimento descrito por Guerra; Souza (2002). Botões florais foram fixados diretamente em solução de Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial, v/v). As fixações foram mantidas entre 2 e 24 horas a temperatura ambiente, sendo, em seguida, estocadas a -20 °C até sua análise. Posteriormente, com auxílio de um estereomicroscópio, as anteras foram retiradas, obtendo-se os grãos de pólen, os quais foram distribuídos em lâmina de vidro para realização da coloração.

A viabilidade polínica foi comparada utilizando os seguintes corantes: Carmim acético (RADFORD et al., 1974) e reativo de Alexander (ALEXANDER, 1980). O carmim confere uma coloração rosa/avermelhado ao pólen quando esse é viável, não corando os inviáveis, enquanto que o Alexander promove uma coloração púrpura aos grãos viáveis e a cor verde para os inviáveis.

Para cada um dos seis acessos foram confeccionadas seis lâminas, três para cada um dos corantes, avaliando-se 300 grãos de pólen por lâmina. Foram considerados viáveis os grãos bem corados e inviáveis os que apresentaram coloração fraca ou esverdeada e/ou morfologia diferente. As imagens foram capturadas e analisadas pelo software Dinocapture 2.0, utilizando a objetiva de 10x, calculando-se os valores médios de diâmetro com seus respectivos desvios padrão.

2.2.2. Análise mitótica

Para as análises mitóticas foram coletadas pontas de raízes, mergulhando-as em tubos de eppendorf de 2 ml, contendo 8-hidroxiquinoleína 2mM, deixados em temperatura ambiente por 1 hora. Finalizado essa etapa foram transferidos para uma temperatura a 8 °C por 24 horas, fixadas em Carnoy 3:1(metanol: ácido acético) e estocadas a -20 °C até sua utilização.

A execução da análise convencional permitiu a identificação do número e morfologia cromossômica, onde pelo menos dez metáfases foram examinadas por indivíduo, utilizando as melhores células para as medições cromossômicas e confecção dos idiogramas. Todas as medições foram realizadas com o auxílio do programa Image Tool.

Foram medidos cromossomos de metáfases bem espalhadas, estimando os seguintes parâmetros cariológicos: comprimento absoluto (CA), somatório dos comprimentos cromossômico total (TCL), comprimento cromossômico médio (mCL) e comprimento relativo (CA/TCL).

Para o preparo das lâminas, as pontas de raízes que estavam estocadas no fixador foram lavadas duas vezes em água destilada por 5 minutos cada, hidrolisadas em HCl 5N por 20 minutos (análise convencional) ou digeridas em solução enzimática (2% celulase – 20% pectinase) à 37 °C em câmara úmida por 2 ou 3 horas (coloração com fluorocromos). Em ambas as análises as amostras foram maceradas em lâmina com uma gota de ácido acético, sendo em seguida esmagadas entre lâmina e lamínula e levadas ao nitrogênio líquido. Após a retirada da lamínula, as lâminas foram postas para secar em temperatura ambiente, coradas com Giemsa 2% e montadas em Entellan para a análise convencional ou coradas com DAPI/glicerol (1:1, v/v) para selecionar as melhores lâminas. As selecionadas foram descoradas com fixador de Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) durante 30 minutos e imersas em álcool etílico absoluto por 1 hora em temperatura ambiente, secas ao ar e deixadas para envelhecer por três dias. Após esses três dias as lâminas foram coradas ou estocadas a -20°C até posterior uso na coloração com os fluorocromos CMA₃ (Cromomicina A₃)/DAPI.

A coloração com fluorocromos CMA₃ e DAPI seguiu o protocolo descrito por Schweizer; Ambros (1994), com algumas modificações, adicionando-se o CMA (0,5 mg/ml) por 1 hora, seguido do DAPI (2µg/ml) por 30 minutos.

Em seguida foi realizada a montagem das lâminas em tampão glicerol/McIlvaine (contendo $MgCl_2$), sendo as mesmas guardadas em caixa escura durante três dias até posterior análise no microscópio de fluorescência.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os grãos de pólen corados com carmim acético 2% apresentaram alta viabilidade polínica para todos os acessos analisados. Os maiores percentuais foram observados para os acessos 34 e 42 com valores 100% e 99,89%, respectivamente (Tabela 1). Um estudo realizado em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener) por Souza et al. (2002), mostrou que os grãos de pólen coletados nas primeiras 12 horas após a abertura da flor, corados com carmim acético mostraram os maiores valores médios de percentagem, porém, mesmo apesar da diminuição encontrada após as 12 horas, o valor médio de viabilidade foi superior a 80%. Souza et al. (2003), utilizando carmim acético em *Passiflora edmundoi* Sacco, observaram um valor médio de viabilidade de 97,9%. O uso do mesmo corante testado em diferentes espécies de maracujazeiro constatou alta viabilidade, com valores acima de 70% (LEMOS et al., 2006; VALERIANO et al., 2011).

A alta viabilidade encontrada nesse gênero pode ser também potencializada pelo fato do grão de pólen do maracujazeiro ser recoberto por uma substância chamada *pollenkit*, que atua como protetora do grão de pólen, minimizando a desidratação e, conseqüentemente, a perda da viabilidade (PACINI; HESSE, 2005).

A viabilidade estimada com o uso do reativo de Alexander também apresentou altos valores de viabilidade para os diferentes acessos. O maior valor encontrado foi para o acesso coletado em Curaçá-BA com 99,00% e o menor valor para o acesso coletado no estado de Pernambuco com 97,78% de viabilidade (Tabela 3). A comparação feita entre os dois corantes testados mostra que o reativo de Alexander apresentou valores ligeiramente inferiores ao carmim acético, porém ambos se mostraram eficientes para discriminar os grãos de pólen inviáveis (Tabelas 2 e 3).

O Reativo de Alexander contém verde malaquita que tem afinidade com a celulose presente na parede celular, corando-a de verde, e a fucsina ácida que cora o protoplasma na coloração púrpura. Os grãos de pólen inviáveis por não

apresentarem protoplasma coram-se de verde (BIONDO; BATTISTIN, 2001; NETO et al., 2006) (Figura 1). O carmim acético confere uma coloração vermelha intensa para os grãos de pólen viáveis, resultado esse obtido a partir da reação que ocorre com o material genético presente no citoplasma, enquanto que os grãos de pólen inviáveis não coram e/ou apresentam formação irregular (SANTOS et al., 2015) (Figura 2).

TABELA 2 – Estimativa da viabilidade polínica em acessos de *Passiflora cincinnata* utilizando carmim acético a 2%, com respectivas procedências e valores médios dos GPV (Grãos de pólen viáveis), GPI (Grãos de pólen inviáveis), DMGPV (Diâmetro médio de grão de pólen viável), DMGPI (Diâmetro médio de grão de pólen inviável) e NTA (Número total avaliado), Petrolina, PE, 2017.

Trat/Acesso	Procedência	GPV (%)	GPI (%)	DMGPV (µm)	DMGPI (µm)	NTA
1-A0423*	Crato – CE	99,56	0,44	84,55	60,88	900
16-C0707*	Jaguarari – BA	99,67	0,33	74,37	57,80	900
25-F2331*	Curaçá - BA	99,67	0,33	72,43	62,89	900
34-J08092*	Juazeiro – BA	100	-	72,31	-	900
42-T03362*	São José do Belmonte – PE	99,89	0,11	72,26	58,48	900
49-F26462*	Paulistana - PI	99,33	0,67	75,62	59,90	900

*1A04, C07, F23, J08, T03 e F26 correspondem às respectivas Unidades Geoambientais de caracterização do zoneamento agroecológico do nordeste onde os acessos foram coletados.

TABELA 3 – Estimativa da viabilidade polínica em acessos de *Passiflora cincinnata* utilizando Reativo de Alexander, com respectivas procedências e valores médios dos GPV (Grãos de pólen viáveis), GPI (Grãos de pólen inviáveis), DMGPV (Diâmetro médio de grão de pólen viável), DMGPI (Diâmetro médio de grão de pólen inviável) e NTA (Número total avaliado), Petrolina, PE, 2017.

Trat/Acesso	Procedência	GPV (%)	GPI (%)	DMGPV (µm)	DMGPI (µm)	NTA
1-A0423*	Crato – CE	98,11	1,89	76,71	60,37	900
16-C0707*	Jaguarari – BA	98,78	1,22	70,28	62,10	900
25-F2331*	Curaçá - BA	99,00	1,00	68,24	63,32	900
34-J08092*	Juazeiro – BA	98,67	1,33	66,58	62,17	900
42-T03362*	São José do Belmonte – PE	97,78	2,22	66,13	62,57	900
49-F26462*	Paulistana - PI	98,89	1,11	68,74	58,98	900

*1A04, C07, F23, J08, T03 e F26 correspondem às respectivas Unidades Geoambientais de caracterização do zoneamento agroecológico do nordeste onde os acessos foram coletados.

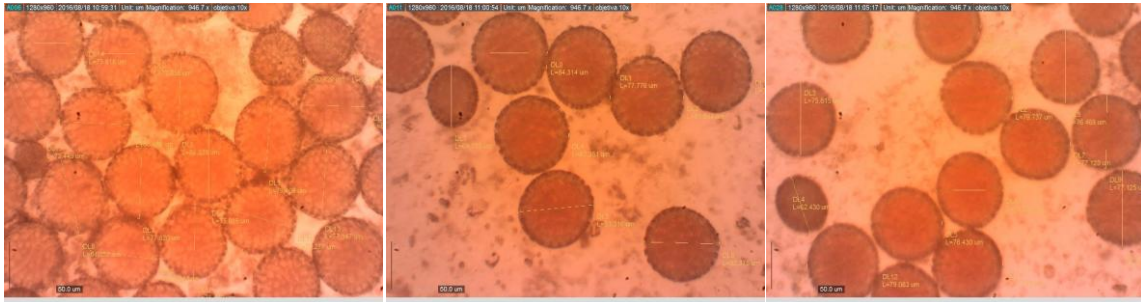


FIGURA 1 – Estimativa da viabilidade polínica e diâmetros de grãos de pólen mensurados em diferentes acessos (01, 16, 25, 34, 42, 49) de *Passiflora cincinnata* corados com carmim acético 2%.

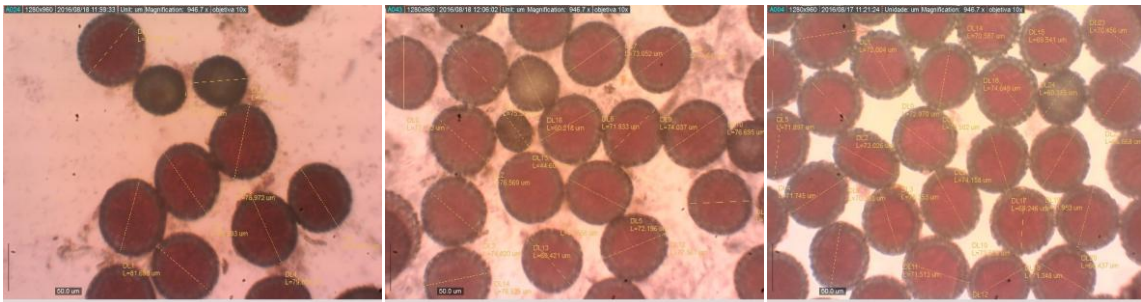


FIGURA 2 – Estimativa da viabilidade polínica e diâmetros de grãos de pólen mensurados em diferentes acessos (01, 16, 25, 34, 42, 49) de *Passiflora cincinnata* corados com reativo de Alexander.

Hister e Tedesco (2016) ao realizarem um trabalho de comparação entre os corantes orceína acética 2% e reativo de Alexander com a finalidade de estimar a viabilidade polínica de *Psidium cattleianum*, chegaram à conclusão que o melhor corante foi o reativo de Alexander, que permitiu uma melhor distinção entre grãos de pólen viáveis e inviáveis. Nesse estudo foi relatado que houve diferença entre os valores da viabilidade encontrada com os dois corantes, ocorrendo uma superestimação com o uso da orceína acética, fazendo do reativo de Alexander o corante mais eficiente para estimar a viabilidade dos grãos de pólen.

Tiago et al. (2014), ao determinarem a viabilidade polínica em variedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com o uso de diferentes corantes, observaram que o reativo de Alexander diferiu estatisticamente dos outros corantes por revelar menor média de pólen viável para a espécie.

Techio et al. (2006), avaliando híbridos interespecíficos entre *Pennisetum purpureum* x *Pennisetum glaucum* (capim-elefante x milho), observaram que os corantes orceína acética e carmim propiônico mostraram alta taxa de grãos de pólen viáveis, com valores acima de 90%. Entretanto essa elevada viabilidade não era esperada, uma vez que as irregularidades meióticas presente nesses híbridos os

tornam inférteis. O reativo de Alexander foi o mais fidedigno, mostrando resultados com 0% de viabilidade para três dos quatro híbridos testados, revelando a completa esterilidade dos mesmos.

Diferentemente dos resultados encontrados por esses autores, Silva et al. (2015) constataram que os corantes carmim acético e reativo de Alexander não diferiram estatisticamente para três populações de cajá, tendo o reativo de Alexander indicado a maior media de viabilidade dos grãos de pólen.

Santos et al. (2015), ao analisarem diferentes corantes com a finalidade de definir o melhor para a avaliação colorimétrica de grãos de pólen de *Bertholletia excelsa*, concluíram que o reativo de Alexander seria o mais indicado devido a fácil distinção entre viáveis e inviáveis.

No presente estudo em *P. cincinnata*, a viabilidade estimada a partir dos valores médios dos diferentes percentuais observados para cada corante mostra que tanto o carmim acético com o Reativo de Alexander apresentaram elevada viabilidade, com valores acima de 98% (Tabela 4). As altas taxas de viabilidade encontradas com o uso de ambos os corantes indicam uma boa responsividade dos diferentes acessos à essas metodologias de avaliação, indicando também que esses genótipos podem ser utilizados em programas de melhoramento, através de cruzamentos para obtenção de híbridos (SOARES-SCOTT et al., 2005).

TABELA 4 Valores médios de viabilidade dos diferentes acessos de *Passiflora cincinnata* corados com carmim acético e reativo de Alexander.

Corantes	Grãos de pólen viáveis (%)	Grãos de pólen inviáveis (%)
Carmim Acético	99,33	0,31
Reativo de Alexander	98,54	1,46

Com relação aos diâmetros dos grãos de pólen, há indicações que a diminuição da viabilidade polínica pode estar relacionada às diferenças no tamanho dos grãos de pólen (Soares-Scott et al., 2005). No presente trabalho, os grãos de pólen viáveis corados com carmim acético mostraram valores entre 72,26 μm (acesso 42) e 84,55 μm (acesso 01). Já os valores mensurados para aqueles considerados inviáveis variaram de 57,80 μm (acesso 16) a 62,89 μm (acesso 25) (Tabela 2). As mensurações realizadas utilizando o reativo de Alexander resultaram em diâmetros entre 66,13 μm (acesso 42) e 76,71 μm (acesso 01) para os grãos de pólen viáveis, e de 58,98 μm (acesso 29) a 63,32 μm (acesso 25) nos grãos de pólen inviáveis (Tabela 3). Nesse caso, parece que o uso do carmim acético

ocasiona alguma mudança de permeabilidade nas membranas e/ou paredes celulares dos grãos de pólen viáveis, levando ao aumento de tamanho. Observa-se ainda na Figura 2 que a espessura da exina dos grãos de pólen corados com carmin acético é mais fina que aqueles corados com o reativo de Alexander. Essa diferença de resposta é importante para efeitos comparativos de morfometria entre genótipos, devendo-se levar em consideração o tipo de corante utilizado. Vale ressaltar que valores similares de diâmetro de grãos de pólen de *P. cincinnata* foram relatados por Coelho (2015) utilizando o corante carmin acético.

3.1. Análise mitótica

No presente estudo, na análise mitótica dos acessos de *P. cincinnata* foram encontrados números cromossômicos diploides $2n=18$ (Figura 3). Outros trabalhos realizados com *P. cincinnata* observaram o mesmo número cromossômico (MELO et al., 2001, COELHO, 2009, AZEVEDO et al., 2011), confirmando a espécie como pertencente ao grupo cromossômico representado pelo número básico secundário $x=9$. Espécies com $2n=18$ podem ser resultantes do processo evolutivo resultante da poliploidia de $2n=12$ seguida de aneuploidia por perdas de pares cromossômicos de espécies ancestrais com $2n=24$. Espécies com números cromossômicos intermediários como por ex: $2n=20$, $2n=22$ sustentam essa hipótese (SOARES-SCOTT et al., 2005)

O comprimento absoluto dos cromossomos variou de 4,02 a 2,52 μm , 3,52 a 2,20 μm , 3,83 a 2,61 μm , 3,66 a 2,23 μm , 3,87 a 2,43 μm , 4,49 a 1,86 μm para os acessos 01, 16, 25, 34, 42 e 49 respectivamente (Figura 3). Com relação aos comprimentos cromossômicos médio e total, o acesso 01 apresentou os maiores valores (3,33 e 29,96 μm), seguidos dos acessos 25 (3,20 e 28,78 μm), 42 (3,06 e 27,57 μm), 34 (3,86 e 25,75 μm), 16 (2,82 e 25,37 μm), e 49 (2,67 e 24,03 μm).

Azevedo et al. (2011), ao realizarem a caracterização citogenética de parentais e híbridos interespecíficos de *Passiflora edulis* Sims x *Passiflora cincinnata* Mast. observaram que o maior valor para o comprimento cromossômico médio foi de 2,39 μm e o menor de 1,75 μm . Coelho (2016) chegou a valores semelhantes em *P. cincinnata* com o maior valor apresentado de 4,12 μm e o menor 2,73 μm . Esses resultados encontrados por esses autores assemelham-se aos registrados nesse trabalho. Finalmente foi observado entre os acessos cariótipos simétricos com uma

distribuição uniforme de tamanhos cromossômicos, com exceção do par 1 do acesso 49, o qual apresentou o maior comprimento cromossômico relativo, com valor cerca de 30% maior que o dos demais acessos (Figura 3).

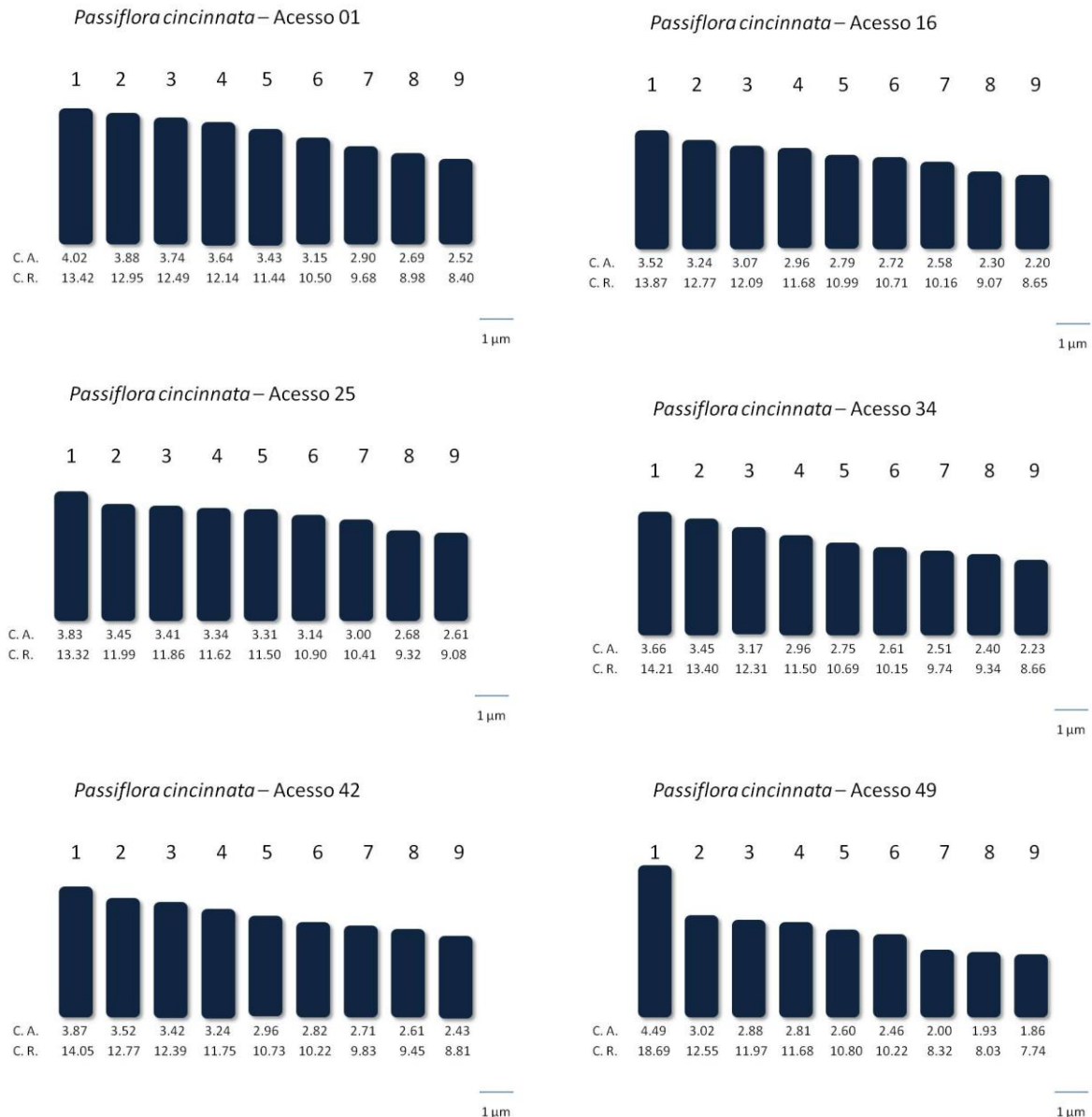


FIGURA 3 - Idiogramas de diferentes acessos de *Passiflora cincinnata* representando os comprimentos cromossômicos absoluto (C.A.) e relativo (C.R.). Os cromossomos foram alinhados de acordo com o comprimento, em ordem decrescente de tamanho.

A dupla coloração CMA₃/DAPI permitiu observar a presença de quatro bandas CMA⁺, revelando regiões heterocromáticas ricas em bases CG (Citosina e Guanina) (Figura 4) em todos os acessos analisados. A heterocromatina constitutiva é composta por sequências de DNA altamente repetitivas, com alto grau de

condensação, localizadas preferencialmente ao redor da constrição secundária e em posições proximais e terminais (SOARES-SCOTT et al., 2005). No presente trabalho foi possível observar quatro blocos de CMA⁺, apresentaram heteromorfismo de tamanho em um dos dois pares cromossômicos de todos os acessos, localizando-se na região terminal dos mesmos (Figura 4).

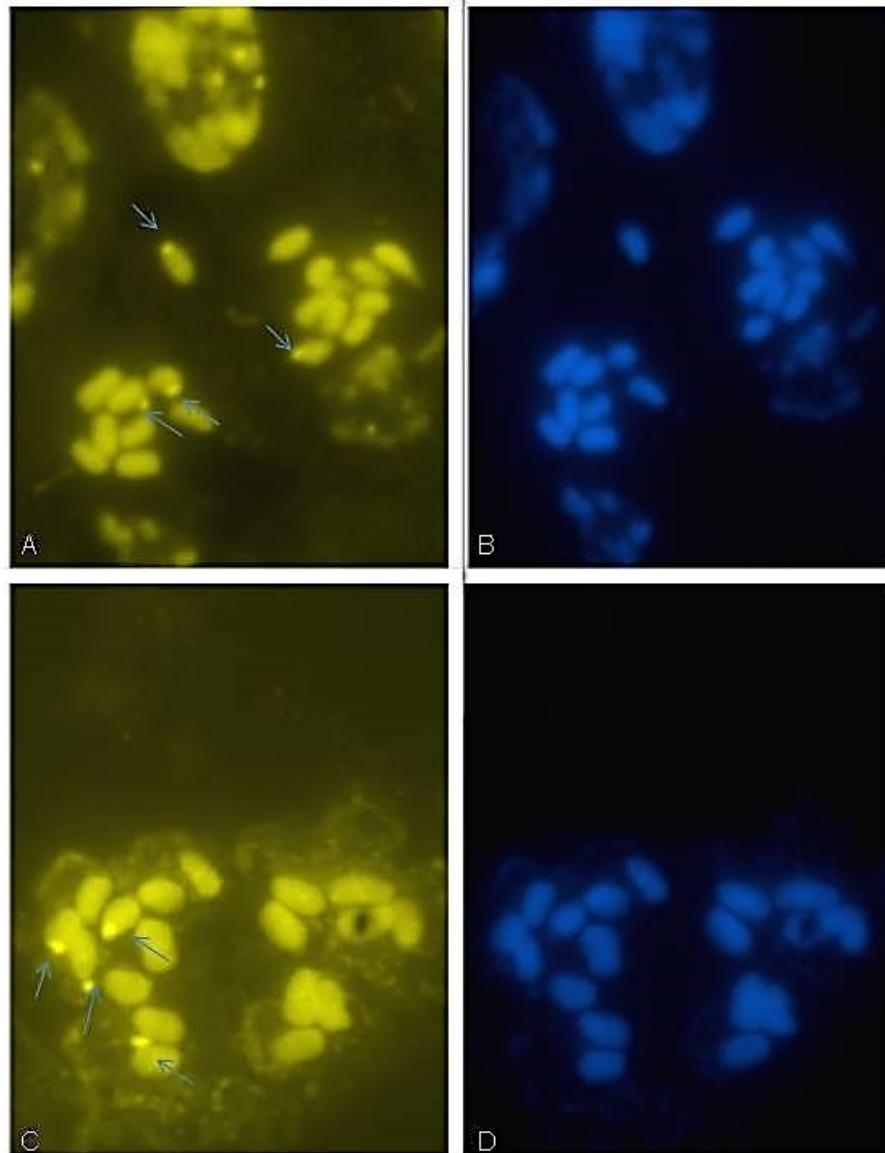


FIGURA 4 - Metáfases mitóticas em *P. cincinnata* com $2n=18$, coradas com CMA (A, C) e DAPI (B, D). Setas indicam presença de bandas CMA⁺.

Os núcleos interfásicos do tipo semirreticulados apresentaram pequenos blocos mais brilhantes identificados através da coloração CMA, indicando que uma pequena porção de cromatina rica em pares de base CG permanece condensada durante a intérfase (Figura 5). O heteromorfismo de tamanho dos blocos CMA⁺ indicam a ocorrência de variação entre os acessos de *P. cincinnata* que

possivelmente podem ser decorrentes de alterações estruturais entre diferentes acessos (SOARES-SCOTT et al., 2005).

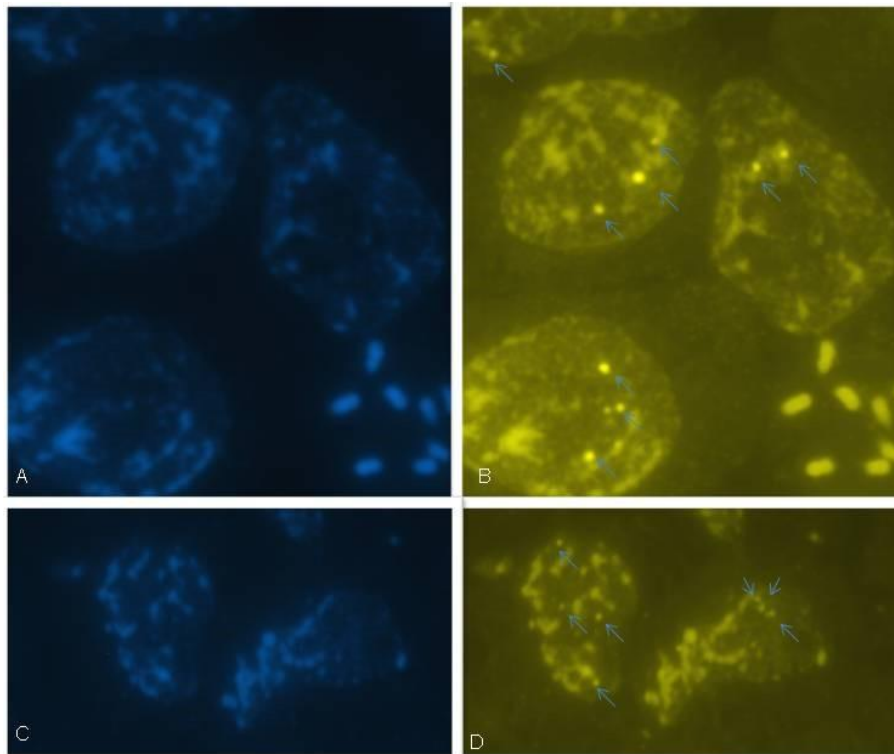


FIGURA 5 – Núcleos interfásicos em *Passiflora cincinnata* corados com CMA (B, D), DAPI (A, C). Setas indicam presença de cromatina mais brilhante nos núcleos interfásicos com coloração CMA.

4. CONCLUSÕES

Não há diferença quanto aos valores de estimativa de viabilidade polínica em diferentes acessos de *Passiflora cincinnata* utilizando como corante tanto carmin acético como o Reativo de Alexander;

Entretanto, verificaram-se diferenças nas medições do diâmetro dos grãos de pólen viáveis dentro do mesmo acesso, sendo os maiores valores observados quando se utiliza carmin acético quando comparados com a coloração realizada utilizando o reativo de Alexander;

A dupla coloração diferencial CMA/DAPI permitiu confirmar a existência de quatro blocos CMA⁺, havendo heteromorfismo de tamanho entre um dos pares.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, v.1, n.5, p.13-8, 1980.

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 Agrônoma, 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.

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.

BIONDO, E.; BATTISTIN, A. Comparação de eficiência de diferentes corantes na estimativa da viabilidade de grãos de pólen em espécies dos gêneros *Eriosema* (DC.) G. Don e *Rhynchosia* Lour (Leguminosae – Faboideae), nativas na região sul do Brasil. **Bioikos**, PUC-Campinas, 15 (1), p. 39-44, 2001.

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.

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 - Ecologia Vegetal e Meio Ambiente). Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, 2009.

COELHO, M. S. E. **Citogenética e cultivo *in vitro* de espécies e híbridos de *Passiflora* L.** 2015. 104 f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2015.

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.

HISTER, C. A. L.; TEDESCO, S. B. Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) através de distintos métodos de coloração. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 135-141, 2016.

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. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. cap. 4, p. 79 – 108.

LEMO, I. B.; MONTEIRO, S. P.; FEITOZA, E. DE A.; MELO, N. F. de; KIILL, L. H. P. **Viabilidade polínica em espécies de maracujazeiro (*Passiflora alata* Curtis, *P. cincinnata* Mast, *P. edulis* F. *flavicarpa* DEG), na região do submédio do Vale do São Francisco**. In: REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 29., 2006, Mossoró. Diversidade, conservação e uso sustentável da flora nordestina: resumos. Mossoró: UERN, 2006.

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.

MORENO, E. C.; TIAGO, A. V.; ROSSI, F. S.; ROSSI, A. A. B. Biologia floral, morfometria e viabilidade polínica do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 11 n. 21, p. 2094, 2015.

NETO, O. D. S.; KARSBURG, I. V.; YOSHITOME, M. Y. Viabilidade e germinabilidade polínica de populações de Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.). **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.4, n.1, p.67-74, 2006.

OLIVEIRA, J. C.; NAKAMURA, K.; MAURO, A. O.; CENTURION, M. A. P. C. Aspectos gerais do maracujazeiro. In: São José, A.R. (Ed.). **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista: Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, 1994, p.27-37.

PACINI, E.; HESSE, M. Pollenkitt – its composition, forms and functions. **Revista Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, V. 200, Issue 5, p. 399–415, 2005.

RADFORD, A. E.; DICKISON, W. C.; MASSEY, J. R.; BELL, C. R. (1974) **Vascular plant systematics**. Harper and Row, New York

SANTOS, T. A.; TIAGO, P. V.; SCHMITT, K. F. M.; MARTINS, K. C.; ROSSI, A. A. B. Viabilidade polínica em *Bertholletia excelsa* Bonpl. (Lecythidaceae) baseada em diferentes testes colorimétricos. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n. 22, p. 3136, 2015.

SCHWEIZER, D.; AMBROS, P. F. Chromosome Banding. In: GOSDEN, J. R. (Ed.). **Methods in Molecular Biology**, 29, Humana Press. 1994. P 97-112.

SILVA, B. M.; MORENO, E. C.; LIMA, J. S.; ROSSI, A. A. B.; SOUZA, S. A. M. Potencial de testes colorimétricos na estimativa da viabilidade polínica em populações nativas de cajazeira. **Cáceres**, v. 2, n. 1, p. 539-544. 2015.

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. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. cap. 9, p. 211-240.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. V.26, n.6, p.1209-1217, nov./dez., 2002.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S. VIANA, A. P.; PEREIRA, M. G.; BERNACCI, L. C.; SUDRÉ, C. P.; SILVA, L. D. C. Meiotic irregularities and pollen viability in *Passiflora edmundoi* Sacco (Passifloraceae). **Caryologia**, v.56, n.2, p.161-169. 2003.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2º Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 704. 2008.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEDROZO, C. Â.; PEREIRA, A. V. Viabilidade dos grãos de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milheto). **Revista Acta Scientia Biologica**, v.28, n.1, p.7-12, jan./mar. 2006.

TIAGO, A. V.; ROCHA, V. D.; TIAGO, P. V.; LIMA, J. S.; ROSSI, A. A. B. Viabilidade polínica e receptividade estigmática em variedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19, p. 1957, 2014.

VALERIANO, J. C.; COELHO, M. S. E.; MELO, N. F.; ARAUJO, F. P. Avaliação da viabilidade polínica e da hibridização de seis espécies de *Passiflora* L. do banco ativo de germoplasma da Embrapa Semiárido. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 6., 2011, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semiárido, p. 111-117, 2011.

CAPITULO 2 – ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE DIFERENTES ACESSOS DE *Passiflora cincinnata* MAST. COM A UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ISSR.

Artigo a ser submetido à revista Brazilian Journal of Botany

RESUMO

O estudo teve como objetivo estimar a diversidade genética em diferentes acessos de *P. cincinnata* com o uso de marcadores moleculares ISSR. Os 15 iniciadores pré-selecionados formaram um total 1200 bandas entre 100-1000 pb, sendo 678 polimórficas, com valor médio de 62,41% de polimorfismo. A dissimilaridade genética (dg) foi estimada com base no coeficiente de Jaccard variando de 0,25 a 0,67, com valor médio de 0,46. O método de agrupamento UPGMA permitiu visualizar a formação de quatro grupos distintos, não sendo os acessos agrupados de acordo com a origem, indicando a existência de variabilidade genética entre acessos de mesma procedência. Os diferentes marcadores moleculares ISSR mostraram eficiência na detecção de polimorfismo, revelando variabilidade intraespecífica nos acessos avaliados.

Palavras-Chave: Maracujá. Espécies nativas. PCR.

ABSTRACT

The objective of this study was to estimate the genetic diversity in different accessions of *P. cincinnata* with the use of molecular markers ISSR. The pre-selected 15 primers formed a total of 1200 bands between 100-1000 bp, 678 polymorphic, with a mean value of 62.41% polymorphism. Genetic dissimilarity (dg) was estimated based on the Jaccard coefficient ranging from 0.25 to 0.67, with an average value of 0.46. The UPGMA grouping method allowed the visualization of the formation of four distinct groups, and the accessions were not grouped according to the origin, indicating the existence of genetic variability between accesses of the same origin. The different molecular markers ISSR showed efficiency in the detection of polymorphism, revealing intraspecific variability between the accessions.

Keywords: Passion fruit. Wild species. PCR.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* possui ampla variabilidade genética, sendo composto por espécies nativas e cultivadas. Algumas espécies nativas apresentam tolerância a doenças e pragas e conseqüentemente potencial de uso em programas de melhoramento. No entanto, pouco se sabe quanto a diversidade genética existente nessas espécies, sendo necessário realizar a caracterização desses germoplasma.

Os marcadores moleculares revelam polimorfismo de sequência de ácido desoxirribonucleico, método esse que tem sido de grande importância para a análise de diversidade genética e caracterização de germoplasma vegetal (FERREIRA; RANGEL, 2005), por detectarem polimorfismo ao nível de DNA, sem influência do meio ambiente (SILVA, et al. 2011).

Os diferentes marcadores moleculares existentes se mostram bastantes eficientes em diversos estudos de identificação de variabilidade genética. Martins et al. (2011), utilizando marcadores do tipo microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeat*), obtiveram resultados positivos na análise em diferentes variedades de abacate, identificando diversidade genética e materiais promissores para uso futuro em programas de melhoramento. Mendonça (2011) conseguiu resultados satisfatórios com uso do marcador AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), relatando 92,94% de bandas polimórficas em populações naturais de Barbatimão-verdadeiro, identificando maior variabilidade genética dentro da população (70,93%) do que entre as populações (29,06%).

Em *Passiflora*, os marcadores moleculares também têm sido utilizados para estimar a variabilidade genética existente. Ao realizar um estudo em genótipos comerciais de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas utilizando RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), Viana et al. (2003), obtiveram elevadas taxas de polimorfismo para a diversidade interespecífica. No entanto, os indivíduos das populações de maracujá amarelo mostraram baixo polimorfismo, indicativo de um possível estreitamento da base genética das espécies comerciais. Bellon et al. (2007), por sua vez, encontraram alta variabilidade genética intra-específica para diferentes acessos *Passiflora edulis* Sims. analisados com uso de RAPD.

De modo geral, marcadores moleculares são eficientes, transmitindo confiabilidade de dados no estudo da variabilidade genética existente entre os

genótipos (FARIAS, 2016). Entretanto, alguns desses marcadores apresentam custo elevado, problemas de repetibilidade ou dificuldade para aquisição de primers (PRECZENHAK, 2013).

Os ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), quando comparados a outros marcadores, destacam-se por combinar facilidade, confiabilidade e baixo custo para as análises (PRECZENHAK, 2013). É uma das muitas técnicas moleculares baseada em PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando primers de sequência simples repetitiva amplificando regiões entre sequências alvo (COELHO, 2015). Promovem rápida distinção entre indivíduos aparentados, devido ao elevado grau de reprodutibilidade e polimorfismo (BORBA et al., 2005), permitindo a identificação de variabilidade intra e interespecífica (DANTAS et al. 2012).

Dentro do gênero de *Passiflora* esse marcador tem se mostrado eficiente na detecção de polimorfismo em germoplasma melhorado e não melhorado (COSTA et al. 2012). Alguns autores, estudando a diversidade genética do maracujazeiro, relataram ter encontrado variabilidade genética intrapopulacional, indicando o seu uso para detecção de polimorfismo (COSTA et al., 2010; REIS et al., 2011; COSTA et al., 2012; COELHO, 2015).

O presente estudo objetivou determinar a diversidade genética em acessos de *P. cincinnata* Mast. com a utilização de marcadores moleculares ISSR.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O material estudado pertence ao Banco Ativo de Germoplasma – BAG de Maracujá, localizado na Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. Foram analisados seis acessos de *P. cincinnata* (Tabela 1), cada acesso contando com três indivíduos. Todos os experimentos foram conduzidos no laboratório de biotecnologia e em casa de vegetação, pertencentes a Embrapa Semiárido, localizada em Petrolina - PE.

A extração de DNA foi feita a partir de folhas jovens coletadas de plantas mantidas em casa de vegetação. Todo o material coletado foi devidamente identificado e armazenado em freezer com temperatura de -80 °C até posterior uso na etapa de extração de DNA.

TABELA 1 Origem e identificação dos acessos de *Passiflora cincinnata* analisados, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Petrolina, PE, Brasil, 2017.

Trat/acesso ¹	Longitude W	Latitude S	Altitude M	Município/Origem	UF
1 - A0423	39:39:36.00 W	7:23:24.00 S	930	Crato	CE
16 - C0707	42:08:24.00 W	14:33:36.00 S	728	Jaguarari	BA
25 - F2331	39:40:12.00 W	9:43:48.00 S	494	Curaçá	BA
34 - J0809	40:13:12.00 w	9:48:36:00 s	469	Juazeiro	BA
42 - T0336	38:50:24:00 w	8:01:12:00 s	596	São José do Belmonte	PE
49 - F2646	41:17:24: 00 w	8:03:36:00 s	381	Paulistana	PI

1A04, C07, F23, F26, J08 e T03 correspondem às respectivas Unidades Geoambientais de caracterização do zoneamento agroecológico do nordeste onde os acessos foram coletados (ARAUJO, 2007).

2.1. Extração de DNA

O protocolo utilizado para a Extração de DNA foi o descrito por Doyle e Doyle (1990). Folhas jovens foram maceradas em cadinhos com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. O material obtido com a maceração foi transferido para um microtubo de 2 ml contendo 950 µl de tampão de CTAB 2% e, em seguida, colocados em banho-maria a 60°C por 45 minutos, invertendo-se os tubos a cada 15 minutos. Após esfriar em temperatura ambiente por pelo menos 5 minutos, o material foi levado à capela de exaustão onde foram adicionados 700 µl de clorofórmio/álcool isoamílico, levemente homogeneizados por inversão e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. Ainda em capela de exaustão, transferiu-se a fase aquosa para microtubos de 1,5 ml.

Em seguida adicionou-se 700 µl de álcool isopropílico gelado, realizando-se suaves inversões, mantendo o material no gelo por 30 minutos. Finalizado esse período, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm sendo, posteriormente, descartado o sobrenadante e adicionado 500 µl de álcool etílico a 70%, realizando-se uma centrifugação por um período de 5 minutos. Essa lavagem com álcool 70% foi repetida mais uma vez, deixando-se em seguida o precipitado secar de um dia para o outro em temperatura ambiente.

O pellet formado foi ressuspenso em 15 µl de TE deixando em temperatura ambiente por 1 hora. Ao final dessa etapa acrescentou-se 5 µl de RNase, levando a banho-maria a 37°C por 1 hora.

2.2. Quantificação

Após a extração foram quantificadas presença e qualidade do DNA em gel de agarose 1%, observando e comparando a intensidade de bandas do DNA extraído em relação à intensidade das concentrações padrão de lambda (Invitrogen). Para os ensaios com PCR as amostras de DNA foram diluídas para alíquotas de 20 ng/μl em água deionizada e posteriormente armazenadas a -20°C.

2.3. Amplificação de DNA por PCR/ISSR

O processo de amplificação foi realizado em um termociclador Gene Amp 9600 (Applied Biosystems), avaliando 15 primers pré-selecionados do tipo ISSR (Tabela 2) com um volume final de 25 μl por amostra, contendo: 20 ng de DNA, 1x de tampão, 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 0,5 mM de primer, 0,7 U de Taq, ajustando o volume final com água Milli-Q. 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 a 72°C por 7 min.

TABELA 2 Iniciadores ISSR utilizados na amplificação de fragmentos de DNA dos diferentes acessos de *Passiflora cincinnata* Mast. mantidos no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Petrolina, 2017.

Primer	Sequência*
1- DiGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAGAC
2- DiGT5'CR	CRGTGTGTGTGTGTGTGT
3- DiGT5'CY	CYGTGTGTGTGTGTGTGT
4- TriCAC3'YC	CACCACCACCACCACYC
5- TriCAC5'CR	CRCACCACCACCACCAC
7- TriCAG	CAGCAGCAGCAGCAG
9- TriCAG3'YC	CAGCAGCAGCAGCAGYC
10- TriGTG3'RC	GTGGTGGTGGTGGTGRC
11- TriTGT	TGTTGTTGTTGTTGT
12- TriAAC 3'RC	AACAACAACAACAACRC
13- TriACA 3'RC	ACAACAACAACAACARC
15- TriACG 3'RC	ACGACGACGACGACGRC
17- DiGA5'CR	CRGAGAGAGAGAGAGAGA
19- TriGTA 3'RC	GTAGTAGTAGTAGTARC
20- TriGCA 3'RC	GCAGCAGCAGCAGCARC

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

2.4. Resolução e análise das amplificações

As amplificações foram realizadas por eletroforese em gel de agarose 1,6 % corados com brometo de etídio, utilizando o tampão de corrida TBE 1x, submetido a uma voltagem de 100 V por 3 horas. O marcador de peso molecular de 100pb DNA Ladder foi utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos. Ao final da eletroforese as amplificações foram observadas sob luz UV e documentadas em um fotodocumentador LPix-STi (Loccus Biotecnologia).

2.5. Análise estatística dos dados

Para a análise dos dados foi atribuídos o valor (1) para presença e (0) para ausência de bandas, sendo os marcadores polimórficos submetidos a análise de diversidade genética. A dissimilaridade genética foi estimada com base no complemento do coeficiente de similaridade Jaccard (1908). A matriz de distâncias e o dendrograma foram ajustados através da correlação cofenética (cc) por meio do programa Genes (CRUZ, 2006). Obteve-se o dendrograma por intermédio do método de agrupamento baseado na média aritmética não ponderada entre grupos (UPGMA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 15 iniciadores de ISSR utilizados, quatro dinucleotídeos (DiGA3'C, DiGT5'CR, DiGT5'CY, DiGA5'CR) e onze trinucleotídeos (TriCAC3'YC, TriCAC5'CR, TriCAG, TriCAG3'YC, TriGTG3'RC, TriTGT, TriAAC 3'RC, TriACA 3'RC, TriACG 3'RC, TriGTA 3'RC, TriGCA 3'RC) geraram um total de 1200 bandas (média de 80 bandas), com tamanhos variando entre 100-1000 pb.

Todos os primers selecionados detectaram polimorfismo entre os acessos, amplificando 678 fragmentos polimórficos (média de 45,2 bandas por iniciador), representado por um valor médio de 62,41% de polimorfismo (Tabela 3). A alta média de marcadores por iniciador evidencia a alta variabilidade genética intraespecífica dos acessos analisados (BELLON et al., 2007).

O número de fragmentos variou entre o valor mínimo de 3 bandas para os primers TriGTG3'RC e TriGTA 3'RC (ambos também apresentaram o menor percentual de polimorfismo), amplificando apenas 5,26% de fragmentos polimórficos. O iniciador TriCAC5'CR amplificou o número máximo de 124 fragmentos. Os

primers com maior percentual de bandas polimórficas foram os DiGA3'C, DiGT5'CY, TriTGT, TriACA 3'RC e TriACG 3'RC, com valor de 100% de polimorfismo (Tabela 3).

Um estudo realizado por Costa (2010), utilizando marcadores ISSR em *P. edulis*, relatou que os primers DiGA3'C e o TriACG 3'RC geraram valores semelhantes ao encontrado no presente trabalho, com 100% de polimorfismo. Estes resultados comprovam o alto conteúdo informativo deste marcador. Vale salientar que os iniciadores ISSR geram polimorfismo sempre que um genoma perde a repetição da sequência ou tem uma exclusão ou inserção ou translocação que modifica a distância entre as repetições (VIJAYAN, 2005).

Os marcadores ISSR selecionados expressaram a existência de variabilidade genética entre os diferentes acessos de *P. cincinnata*, com percentuais de bandas por genótipo de 17,8%, 16,5%, 17%, 15%, 15% e 18% para os acessos 01, 16, 25, 34, 42 e 49, respectivamente, não havendo valores discrepantes no número de bandas geradas (Tabela 2).

Observou-se que os primers com repetições de trinucleotídeos foram os que apresentaram maior polimorfismo em relação àqueles com dinucleotídeos, com média de 51,09 e 28,75 bandas por primer, respectivamente. Santos et al. (2009), realizando estudo semelhante com espécies do gênero *Passiflora*, relataram que os trinucleotídeos foram mais polimórficos que os dinucleotídeos com média de 15,5 e 10,5 alelos por iniciador, respectivamente.

Costa et al. (2012) caracterizaram 63 genótipos de maracujá amarelo, por meio de 23 iniciadores ISSR, onde 22 se mostraram polimórficos, com média de 11,56 bandas por iniciador. Esse valor coloca o ISSR como uma das melhores ferramentas para detectar variabilidade genética intraespecífica de acessos, sendo eficiente para avaliações de polimorfismo e estudo de diversidade genética dentro de *P. edulis*.

A variabilidade genética intraespecífica pode ser explicada, principalmente em acessos provenientes de diferentes localizações geográficas, e pela eficiência da técnica de ISSR na quantificação da variabilidade em *Passiflora*. Em *P. foetida* L., por exemplo, Silva (2016), realizou um trabalho com 11 acessos coletados em duas regiões distintas por meio do uso dos *primers* ISSR e RAPD (5 ISSR e 8 RAPD), o que permitiu a geração de um total de 146 e 271 marcadores, com média de 29,20 e 33,88 marcadores por *primer* ISSR e RAPD, respectivamente. Os elevados valores

de porcentagem de marcadores polimórficos e média de marcadores por iniciador indicam elevada variabilidade genética entre os acessos.

Valores semelhantes ao percentual de polimorfismo aqui relatado também foram encontrados por Carmo et al. (2017) em *P. cincinnata*. Os primers selecionados amplificaram 81 fragmentos de DNA, dos quais 53 foram polimórficos gerando um percentual de 65,43%. Entretanto, a média dos fragmentos polimórficos amplificados por iniciador foi de 4,81.

Os valores elevados de polimorfismo podem ser explicados pelo sistema de autoincompatibilidade, que induz a polinização cruzada, aumentando assim o índice de polinização cruzada das populações das espécies aumentando a variabilidade genética.

Os valores de dissimilaridade Genética (dg) entre os acessos variaram de 0,25 (acessos 1A e 1B) a 0,66 (acessos 1A e 16B), com valor médio de 0,46. Nesse caso, a análise de agrupamento permitiu observar a formação de quatro grupos distintos (Figura 1).

O grupo I foi constituído por 10 indivíduos, o grupo II por 3 indivíduos, o grupo III por 3 indivíduos, e o grupo IV por 2 indivíduos. O número de grupos formados evidencia a variabilidade genética existente entre os indivíduos avaliados, uma vez que a formação de poucos grupos demonstra uma similaridade alta (MARTINS et al., 2011). Os agrupamentos não tiveram necessariamente uma relação direta com a origem dos materiais. No grupo I foram alocados os acessos dos estados da Bahia, Ceará, e Piauí. Os acessos provenientes do estado de Pernambuco se mantiveram no grupo II. O grupo III e IV constituídos por acessos procedentes do estado da Bahia.

Bellon et al. (2006), estudando a variabilidade intraespecífica de acessos de *P. alata*, observou a existência de variabilidade genética entre os acessos de regiões geográficas distintas. O mesmo foi observado por Junqueira et al. (2006), trabalhando com acessos de *P. nitida* de procedências distintas, verificando alta variabilidade nesses acessos.

Com a análise de agrupamento foi possível observar que existe variabilidade não somente entre os acessos, mas também dentro do próprio acesso. Observa-se no dendrograma que um dos três indivíduos do acesso 16 agrupou junto ao grupo I, não seguindo o padrão formado, onde os indivíduos de mesmo acesso permanecem no mesmo grupo.

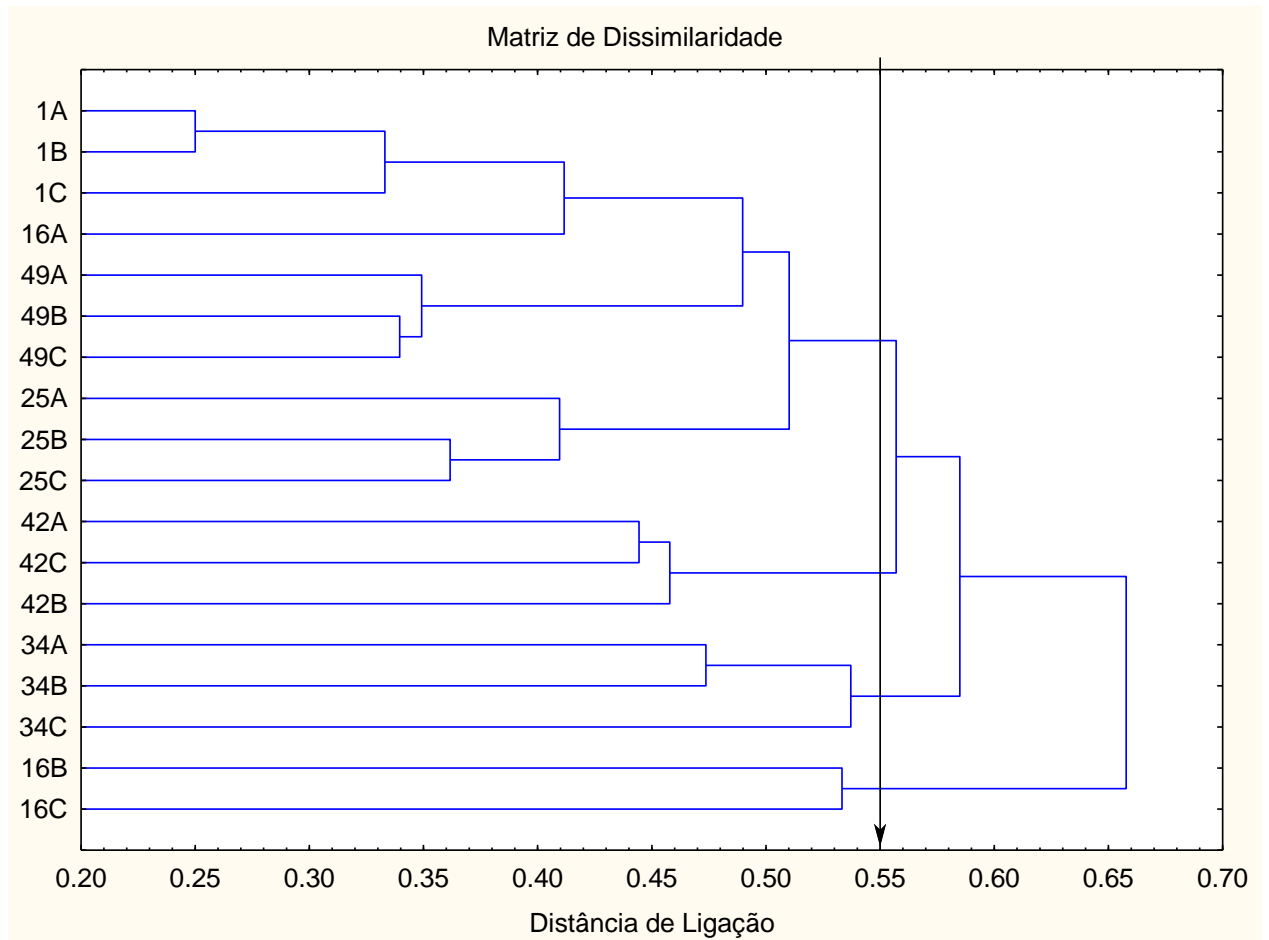


FIGURA 1 Dendrograma de dissimilaridade obtido pelo método UPGMA e coeficiente de Jaccard em 18 acessos de *Passiflora cincinnata* Mast. pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido.

O gênero *Passiflora* possui ampla variação morfológica. Em *P. cincinnata* podemos observar que as folhas da mesma espécie coletada em diferentes regiões apresentam diferenças na sua morfologia (Figura 2). Ocorreu variação morfológica não só entre os acessos, mas também dentro dos acessos (Figura 3). Essas diferenças indicam a existência de variabilidade intraespecífica nessa espécie.

A variabilidade genética encontrada nos acessos possivelmente é resultado de ações conjuntas de fatores como mutação, migração, seleção e deriva gênica, que operam dentro do contexto histórico e biológico de cada espécie de planta. O conhecimento dessa variabilidade intraespecífica mostra que não se deve fazer generalização sobre a espécie. Nesse caso, devem-se considerar as diferentes expressões genéticas entre acessos, principalmente de diferentes procedências (FALEIRO et al., 2012).

Os marcadores moleculares ISSR apresentaram boa reprodutibilidade e polimorfismo, sendo capazes de discriminar os acessos quanto a sua diversidade, indicando a existência de variabilidade intraespecífica entre os acessos de *P. cincinnata*. O fato de os indivíduos não se agruparem com outros acessos de mesma origem revela que pode ocorrer variabilidade genética entre acessos de mesma procedência.

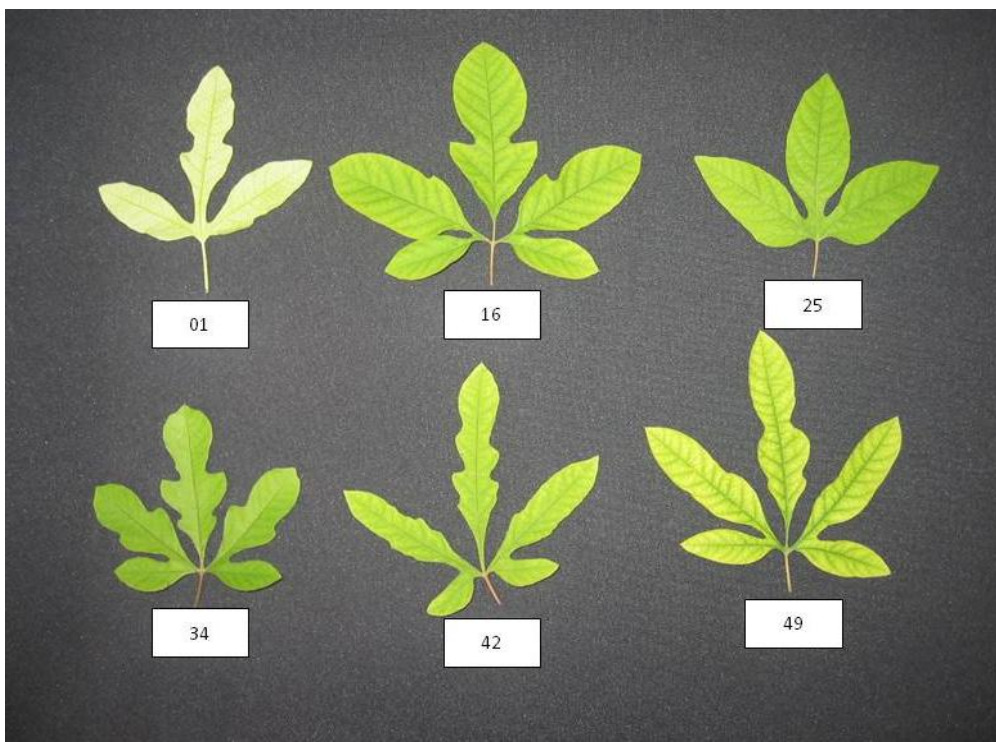


Figura 2 - Diferença morfológica em folhas de diferentes acessos de *Passiflora cincinnata* coletados em regiões distintas.

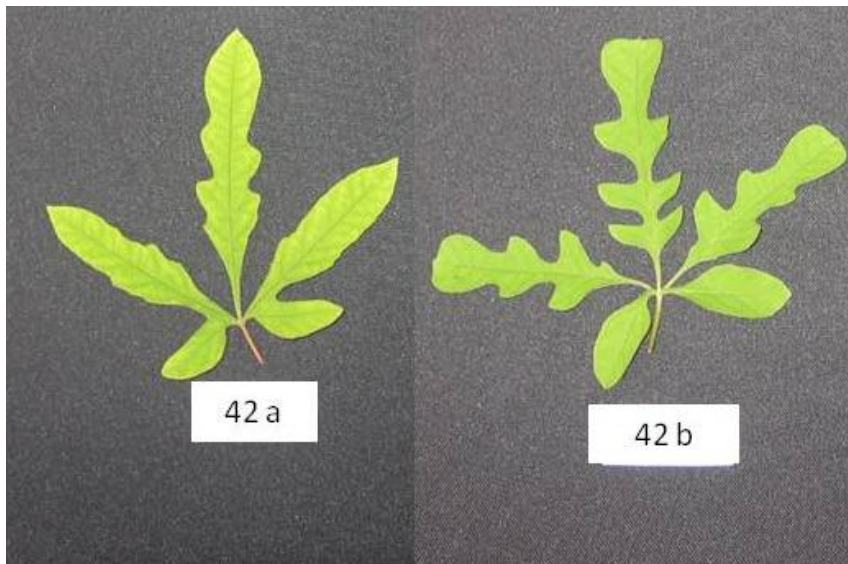


Figura 3 - Diferença morfológica em folhas entre as repetições de um mesmo acesso de *Passiflora cincinnata*.

TABELA 3 Iniciadores ISSR utilizados na amplificação de acessos de *Passiflora cincinnata* Mast., 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)
					01	16	25	34	42	49	
1- DiGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	22	22	100	3	5	3	5	3	3	200-700
2- DiGT5'CR	CRGTGTGTGTGTGTGTGT	77	41	53,25	14	15	13	13	9	13	400-100
3- DiGT5'CY	CYGTGTGTGTGTGTGTGT	35	35	100	6	7	9	2	2	9	350-1000
4- TriCAC3'YC	CACCACCACCACCACYC	136	46	33,82	21	22	25	23	22	23	100-1000
5- TriCAC5'CR	CRCACCACCACCACCAC	196	124	63,27	39	40	30	15	33	39	350-1000
7- TriCAG	CAGCAGCAGCAGCAG	117	81	69,23	22	18	15	21	20	21	500-1000
9- TriCAG3'YC	CAGCAGCAGCAGCAGYC	99	63	63,64	18	10	19	16	17	19	350-650
10- TriGTG3'RC	GTGGTGGTGGTGGTGRC	57	3	5,26	9	9	9	9	9	12	350-1000
11- TriTGT	TGTTGTTGTTGTTGT	43	43	100	5	6	8	8	8	8	300-1000
12- TriAAC 3'RC	AACAACAACAACAACRC	91	73	80,22	17	18	22	13	8	13	250-700
13- TriACA 3'RC	ACAACAACAACAACARC	62	62	100	11	6	12	12	11	10	350-900
15- TriACG 3'RC	ACGACGACGACGACGRC	34	34	100	6	4	6	6	6	6	500-600
17- DiGA5'CR	CRGAGAGAGAGAGAGAGA	107	17	15,89	21	20	17	17	17	15	250-900
19- TriGTA 3'RC	GTAGTAGTAGTAGTARC	57	3	5,26	9	9	9	9	9	12	350-1000
20- TriGCA 3'RC	GCAGCAGCAGCAGCARC	67	31	46,27	13	9	8	12	12	13	350-1000
Total		1200	678	56,5%	214	198	205	181	186	216	
NBG (%)					17,83	16,50	17,08	15,08	15,50	18,00	
Média		80	45,2	62,41%	14,27	13,2	13,67	12,07	12,4	14,4	

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

4. CONCLUSÕES

A caracterização molecular com ISSR foi eficiente para estimar a diversidade genética dentro dos acessos de *P. cincinnata*, podendo ser usados com sucesso na caracterização molecular do germoplasma dessa espécie;

O elevado percentual de polimorfismo encontrado com o uso dos marcadores ISSR, sugere o que as populações em estudo têm ampla base genética;

A análise de agrupamento mostrou a importância de se estudar os diversos acessos dessa espécie, devido à variabilidade encontrada nos acessos procedentes não só de estados diferentes, mais também do mesmo estado, considerando as expressivas diferenças genéticas entre acessos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 Agrônômica, Botucatu, São Paulo, 2007.

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 silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 1, p. 124-127, Abril 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.

BORBA, R. S.; GARCIA, M. S.; KOVALESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; BRANCO, J. S.C.; MALONE, G. Systematics, morphology and physiology: Dissimilaridade Genética de Linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Através de Marcadores Moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 4, p. 565-569, 2005.

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

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

COSTA, J. L. **Marcadores issr: diversidade genética e correlação com heterose em genótipos de *Passiflora edulis* Sims.** 2010. 49 f. TCC (Graduação em Biologia) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2010.

COSTA, J. L.; OLIVEIRA, E. J.; JESUS, O. N.; ALVARENGA, G.; OLIVEIRA, F.; NEVES, C. G.; CASTRO, J. A. Estudo de diversidade genética em *Passiflora edulis* Sims com o uso de marcadores ISSR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 21., 2010, Natal. Frutas: saúde, inovação e responsabilidade: **Anais...** Natal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2010.

COELHO, M. S. E. **Citogenética e cultivo *in vitro* de espécies e híbridos de *Passiflora* L.** 2015. 104 f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2015.

CRUZ, C. D. **Programa GENES-versão Windows 2009.7.** Editora UFV, Viçosa, p. 642, 2006.

DANTAS, A. C. A.; NUNES, G. H. S.; ARAÚJO, S. I.; ALBUQUERQUE, L. B. Caracterização molecular de acessos de melão coletados no nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, p.183-189, 2012.

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

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; COSTA, A. M. **Conservação e caracterização de espécies silvestres de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) e utilização potencial no melhoramento genético, como porta-enxertos, alimentos funcionais, plantas ornamentais e medicinais – resultados de pesquisa.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. (Documento, 312), 2012. 34 p.

FARIAS, D. H. **Caracterização da diversidade genética e resposta ao Cowpea aphid-borne mosaic virus em acessos e híbridos RC1 de maracujazeiro.** 2016. 155 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2016.

FERREIRA, M. E.; RANGEL, P. H. N. Emprego de espécies silvestres no melhoramento genético vegetal: experiência em outras espécies com análise de retrocruzamento avançado de QTLs (AB-QTL). In: FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N. T. V. e BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 5, 2005. p. 111-140

JACCARD, P. Nouvelles Recherches Sur la Distribution Florale. **Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles.** V.44, p.223-70. 1908.

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-

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.

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

MENDONÇA, P. C. **Caracterização da diversidade genética de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville por marcador molecular AFLP e transferência de microssatélites**. 2011. 74 f. Tese (Doutorado em Ciências Agronômicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo. 2011.

PRECZENHAK, A. P. **Diversidade genética estimada por meio de marcadores moleculares e morfoagronômicos em acessos de mini-tomate**. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Paraná, 2013.

REIS, R. V.; OLIVEIRA, E. J.; VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SILVA, M. G. M. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro- amarelo detectada por marcadores microssatélites. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 46, n. 1, p.51-57, 2011.

SILVA, A. F.; SANTOS, A. P. G.; OLIVEIRA, A. P. D.; MORAES, S. A.; SANTANA, SILVA, K. V. P.; ALVES, A. A. C.; MARTINS, M. I. G.; MELO, C. A. F.; CARVALHO, R. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 46, n. 9, p. 1082-1088, 2011.

SILVA, R. M. **Enxertia de cultivares de maracujazeiro azedo sobre *Passiflora foetida* L.: Desempenho agrônomo das cultivares, caracterização morfoagronômica, variabilidade genética do portaenxerto e resistência a fusariose**. 2016. 114f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte.

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

VIJAYAN, K. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism and Its Application in Mulberry Genome Analysis. **Int. J. Indust. Entomol.** Vol. 10, No. 2, p. 79-86, 2005.

CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho aumenta o conhecimento da variabilidade genética de *Passiflora cincinnata*, com base no uso de ferramentas citogenéticas e moleculares. Nesse caso, foi possível concluir que:

O uso dos corantes reativo de Alexander e carmim acético são eficientes para estimar a viabilidade polínica nos diferentes acessos de *P. cincinnata*; porém, as medições de diâmetro realizadas em grãos de pólen corados com carmim acético resultam em valores maiores que aquelas realizadas com o reativo de Alexander;

Foram observados números cromossômicos diploides $2n=18$ em todos os acessos, incluindo a espécie como pertencente ao grupo cromossômico representado pelo número básico secundário $x=9$;

A dupla coloração diferencial CMA/DAPI permitiu observar regiões heterocromáticas ricas em bases CG em todos os acessos analisados, confirmando a existência de quatro blocos CMA⁺ e DAPI⁺;

Os marcadores do tipo ISSR foram eficientes para estimar a diversidade genética dentro dos acessos de *P. cincinnata* permitindo detectar elevado polimorfismo entre os diferentes acessos.

Os iniciadores com os maiores percentuais de polimorfismo foram os DiGA3'C, DiGT5'CY, TriTGT, TriACA 3'RC e TriACG 3'RC, apresentando 100% de bandas polimórficas.

A análise de agrupamento mostrou a importância de não se fazer generalizações quando se trata de uma mesma espécie. Os diferentes acessos analisados de *P. cincinnata*, mostram a existência de variabilidade intraespecífica encontrada nos acessos procedentes tanto do mesmo quanto entre diferentes estados de origem.

As expressivas diferenças genéticas entre os acessos de *P. cincinnata* indicam o seu uso potencial em programas de melhoramento.