

CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES SILVESTRES DE PASSIFLORA  
VIA ANÁLISE MEIÓTICA E CONTEÚDO 2C DNA

**INGRID GASPAR DA COSTA GERONIMO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2014

CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES SILVESTRES DE PASSIFLORA  
VIA ANÁLISE MEIÓTICA E CONTEÚDO 2C DE DNA

**INGRID GASPAR DA COSTA GERONIMO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Telma Nair Santana Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2014

CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES SILVESTRES DE PASSIFLORA  
VIA ANÁLISE MEIÓTICA E CONTEÚDO 2C DE DNA

**INGRID GASPAR DA COSTA GERONIMO**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 25 de fevereiro de 2014.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Messias Gonzaga Pereira (Ph.D., Plant Breeding) - UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Helaine Christine Cancela Ramos (D.Sc. , Melhoramento Vegetal) – UENF

---

Prof. Pedro Corrêa Damasceno Júnior (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) - UFRRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Telma Nair Santana Pereira (Ph.D., Plant Breeding) – UENF  
(Orientadora)

Dedico esta vitória, com todo o meu amor, aos meus pais, Nilton e Márcia, pelo apoio e pelo incentivo em minhas escolhas.

*"Quem tem esperança sabe que nenhuma tristeza é eterna. Sabe que, após a chuva, virá o Sol. Que amanhã será um outro dia, cheio de surpresas e de boas novidades."*

*(Hugo Schlesinger)*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiro a Deus, por me guiar em meu caminho, todas as vezes que coloquei minha vida em suas mãos.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, pela concessão de bolsa e pela oportunidade de cursar o Mestrado.

À orientadora, Telma Nair Santana Pereira, que me acolheu e que me deu a oportunidade de seguir e trilhar mais uma etapa rumo ao meu objetivo.

À banca, Prof<sup>a</sup>. Helaine Christine Cancela Ramos, Prof. Messias Gonzaga Pereira e Prof. Pedro Corrêa Damasceno Júnior, por aceitarem fazer parte da minha defesa e pelos conselhos valiosos que me concederam.

À professora Ana Rossi, pelo auxílio na obtenção do material vegetal.

Aos meus pais, Nilton e Márcia, e a todos os familiares, pelo imenso apoio e pelo incentivo a cada conquista. As motivações foram o que me impulsionaram a este momento e, sem vocês, tenho certeza de que meus desejos não seriam atendidos.

Ao Renan, pelo carinho e pelo apoio durante esse tempo.

Ao amigo Carlos Misael, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Pollyane, que, durante o Mestrado, tornou-se, além de uma companheira de república, uma grande amiga.

Aos colegas de laboratório, Hellen, Kellen, Milene, Nádia, Elba, Fernanda, Raimundo e Monique, por tornarem o ambiente de trabalho um bom lugar.

A todos que conheci em Campos dos Goytacazes.

Aos meus amigos da UFES, que, mesmo longe, também me ouviram e me aturaram muitas vezes.

## SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| RESUMO .....                                      | viii |
| ABSTRATC .....                                    | xi   |
| 1. INTRODUÇÃO .....                               | 1    |
| 2. OBJETIVOS .....                                | 4    |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA .....                    | 5    |
| 3.1. O Gênero <i>Passiflora</i> .....             | 5    |
| 3.2. Uso e Importância das Passifloras.....       | 7    |
| 3.3. Melhoramento do Maracujazeiro .....          | 8    |
| 3.3.1. Espécies Silvestres e sua Utilização ..... | 11   |
| 3.4. Citogenética .....                           | 12   |
| 3.4.1. Comportamento Meiótico .....               | 14   |
| 3.4.2. Tamanho de Genoma .....                    | 17   |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....                       | 21   |
| 4.1. Caracterização Meiótica .....                | 21   |
| 4.1.1. Material Vegetal .....                     | 21   |
| 4.1.2. Metodologia .....                          | 22   |
| 4.1.2.1. Análise Meiótica .....                   | 22   |
| 4.1.2.2. Índice Meiótico .....                    | 23   |
| 4.1.2.3. Viabilidade Polínica .....               | 23   |
| 4.2. Determinação do Conteúdo de DNA .....        | 24   |
| 4.2.1. Material Vegetal .....                     | 24   |



|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 4.2.2. Metodologia .....          | 25 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 26 |
| 5.1. Comportamento Meiótico ..... | 26 |
| 5.2. Tamanho de Genoma .....      | 33 |
| 6. CONCLUSÕES .....               | 38 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 39 |

## RESUMO

GERONIMO, Ingrid Gaspar da Costa; M.Sc.; Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, fevereiro, 2014; Caracterização de espécies silvestres de passiflora via análise meiótica e conteúdo 2C de DNA. Orientadora: Telma Nair Santana Pereira; Conselheiros: Alexandre Pio Viana e Messias Gonzaga Pereira.

O presente trabalho teve como objetivo gerar conhecimentos básicos sobre espécies da família *Passifloraceae*, via análise meiótica e determinação do conteúdo de DNA. A dissertação está composta por dois estudos. O primeiro estudo descreve a meiose de duas novas espécies, *P. miniata* e *P. cristalina*, ambas nativas da região da Amazônia Meridional; o segundo estudo determinou o tamanho do genoma, via citometria de fluxo, das espécies *P. coccinea*, *P. miniata*, *P. morifolia*, *P. pentagona* e *P. setacea*. Para o primeiro estudo, o material genético foi coletado em mata nativa, no município de Alta Floresta – MT e, para o segundo, foram utilizadas espécies conservadas na coleção de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Para a avaliação meiótica das duas novas espécies, botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento foram coletados em *bulk*, fixados em solução 3:1(etanol:ácido acético), por 24 horas, a 4°C e conservados em etanol 70%, em freezer. As lâminas para a análise da meiose e para determinação do índice meiótico foram preparadas, utilizando-se duas anteras/lâmina, e as anteras foram maceradas em uma gota de carmim acético 2%. Os debris foram retirados e as lâminas, seladas, foram observadas em microscópio óptico. Foi observado o maior número de fases

da meiose e possíveis anormalidades, bem como estimados os índices de recombinação e os índices meióticos para cada espécie. No estudo da viabilidade polínica, foi utilizada uma antera/lâmina, sendo as anteras maceradas em solução tripla de Alexander. Foram preparadas cinco lâminas por espécie e contabilizados 200 grãos de pólen/lâmina. As espécies *P. cristalina* e *P. miniata* apresentaram número básico de cromossomos igual a nove ( $x=9$ ), indicando que as mesmas são diploides ( $2n=2x=18$  cromossomos). Algumas irregularidades meióticas foram observadas, como cromossomos retardatários e anormalidades na fibra do fuso. A frequência das anormalidades variou entre espécies, sendo que *P. miniata* teve 44,5% de anormalidades, enquanto *P. cristalina* teve 49,64%, entretanto essas anormalidades não afetaram a formação dos produtos pós-meióticos, sendo que o índice meiótico foi de 90,6% para *P. cristalina* e 91,6% para *P. miniata*. A viabilidade polínica foi de 98,9% para *P. miniata* e de 82,2% para *P. cristalina*, o que pode ser considerado bons índices de fertilidade. O índice de recombinação foi de 21,6 para *P. cristalina* e 18,76 para *P. miniata*. Os valores obtidos para índice de recombinação, índice meiótico e viabilidade polínica foram analisados através do Teste F ( $\alpha=0,05$ ), demonstrando haver diferenças significativas a 5% para o índice de recombinação e viabilidade polínica. No estudo do conteúdo 2C de DNA, via citometria de fluxo nuclear, foram utilizadas cinco espécies (*P. coccinea*, *P. miniata*, *P. morifolia*, *P. pentagona* e *P. setacea*) e analisada a variação do tamanho do genoma nuclear. Para isso, foram utilizados, aproximadamente,  $0,5\text{cm}^2$  de tecido foliar de cada espécie de passiflora, que foram macerados em placas de Petri e  $500\mu\text{L}$  de solução de extração (Partec), concomitantemente ao padrão interno, a espécie *Zea mays*. Para cada espécie, foram analisadas cinco amostras. A solução foi filtrada em filtro de  $50\mu\text{m}$ , e os núcleos extraídos foram corados com iodeto de propídeo, por 30 minutos, a  $4^\circ\text{C}$ . As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Partec PAII, os quais geraram histogramas para cada espécie. As médias dos tamanhos de genoma nuclear obtidos foram submetidas à análise de variância e, posteriormente, foi aplicado o teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) para a comparação das médias. O conteúdo 2C de DNA variou de 2,69 pg (*P. setacea*) a 3,87pg (*P. pentagona*), o que gerou uma diferença no tamanho do genoma de 43,88%. Pelo teste de Tukey, *P. pentagona* (3,87pg) teve a maior média do conteúdo 2C de DNA, seguida pelas espécies, *P. coccinea* (3,32pg), *P. miniata* (3,16pg), *P. morifolia* (2,77pg), e *P.*

*setacea* (2,69pg). Baseando-se nos resultados, pode-se concluir que essas duas novas espécies de *Passiflora* apresentam 18 cromossomos e que há variação no tamanho do genoma entre as espécies estudadas.

## ABSTRACT

GERONIMO, Ingrid Gaspar da Costa; M.Sc.; Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, February, 2014; Characterization of wild species of *Passiflora* via meiotic analysis and 2C DNA content. Advisor: Telma Nair Santana Pereira; Committee members: Alexandre Pio Viana and Messias Gonzaga Pereira.

The present work aimed to generate basic knowledge about species of *Passifloraceae* family by meiotic analysis and determination of 2C DNA content. The dissertation is composed by two studies. The first one describes the meiosis of two new species *P. miniata* e *P. cristalina*, both are native of Southern Amazon. The second one has determined the genome size of *P. coccinea*, *P. miniata*, *P. morifolia*, *P. pentagona* and *P. setacea* via flow cytometry. For the first study, the genetic material was collected at a native forest of Alta Floresta – MT; for the second study, species were conserved at the germplasm collection of Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. In order to proceed the meiotic evaluation of the two new species, buds in different developmental stages were collected in bulk, fixed by a 3:1 solution (ethanol:acetic acid) for 24 hours at 4°C and conserved in ethanol 70% in freezer. The slides used during the analysis of meiosis and determination of meiotic index were prepared using two anthers/slide and the anthers were macerated under a drop of 2% acetic carmine. The debris was removed and the slides were sealed and observed in optical microscope. A greater number of meiotic phases and possible abnormalities were observed for each species as well as the recombination indices and the meiotic

indices were estimated. The anthers were macerated under triple solution of Alexander and one anther/slide was used during the study of pollen viability. Five slides were prepared for each species and 200 grains of pollen/slide were accounted. The species *P. cristalina* and *P. miniata* presented a basic number of chromosomes equivalent to nine ( $x = 9$ ) indicating that they are diploid ( $2n=2x=18$  chromosomes). Some meiotic irregularities were observed, such as laggard chromosomes and abnormalities in fuse fiber. The frequency of abnormalities varied between species, *P. miniata* presented 44.5% of abnormalities while *P. cristalina* presented 49.64%. However, such abnormalities did not affect the formation of post-meiotic products. The meiotic index was equivalent to 90.6% for *P. cristalina* and 91.6% for *P. miniata*. The pollen viability was equivalent to 98.9% for *P. miniata* and 82.2% for *P. cristalina*, which may be considered as good indices of fertility. The index of recombination was equivalent to 21.6 for *P. cristalina* and 18.76 for *P. miniata*. The values obtained for the recombination index, the meiotic index and the pollen viability were analyzed by F Test ( $\alpha=0.05$ ), showing significance for recombination index and pollen viability. In the study of 2C DNA content by flow cytometry, five species were used in order to study the genome size via 2C nuclear DNA content (*P. coccinea*, *P. miniata*, *P. morifolia*, *P. pentagona* and *P. setacea*) and the variation of genome size was analyzed. Thus, it was used about 0.5cm<sup>2</sup> of leaf tissue of each species of *Passifloran* that were macerated in Petri dishes under 500  $\mu$ L of extraction solution (Partec) and the internal standard, the species *Zea mays* L. Each species was analyzed in five samples. The solution was filtered over a 50  $\mu$ m filter and the extracted nuclei were stained with propidium iodide during 30 minutes at 4°C. The samples were analyzed in flow cytometry Partec PAII, which generated histograms for each species. The mean values of nuclear genome size were undergone to analysis of variance and after that, the Tukey test ( $\alpha=0.05$ ) was applied in order to compare such mean values. The 2C DNA content varied from 2.69 pg (*P. setacea*) to 3.87pg (*P. pentagona*), which generated a difference in genome size of 43.88%. According to Tukey Test, *P. pentagona* (3.87pg) presented the highest average 2C DNA content and was followed by *P. coccinea* (3.32pg), *P. miniata* (3.16pg), *P. morifolia* (2.77pg) and *P. setacea* (2.69pg). Based on the results, it is possible to conclude that this two new species of *Passiflora* showed 18 cromossomes and there is variation in genome size among the species under study.

## 1. INTRODUÇÃO

A família *Passifloraceae* contém 18 gêneros, sendo o gênero *Passiflora* o mais rico dentro da família, compreendendo entre 521 a 537 espécies (Feuillet e MacDougal, 2003; Vanderplank, 2007). As espécies desse gênero estão distribuídas em quatro subgêneros: *Astrophea*, *Deidamioides*, *Decaloba* e *Passiflora* (Feuillet e MacDougal, 2003). Novas espécies pertencentes a esse gênero, ainda, vêm sendo descritas (MacDougal, 2001), e cerca de 90% delas são nativas das Américas (Lopes, 1991). Ferreira (1994) relata a existência de mais de 200 espécies nativas brasileiras, o que deixa o país em uma posição privilegiada em relação aos recursos genéticos de maracujazeiros.

Espécies silvestres têm atraído a atenção dos melhoristas devido ao potencial genético, por apresentarem genes de resistência a doenças ou pragas e características agronômicas de interesse (Meletti *et al.*, 2005). Apesar disso, nem sempre, a hibridação com as espécies cultivadas é possível, por isso algumas delas são subutilizadas (Hajjar e Hodgkin, 2007).

Segundo Nass *et al.* (2001), apesar do potencial como repositório de genes, as espécies silvestres relacionadas às espécies cultivadas são utilizadas como último recurso devido à falta de informações básicas úteis ao melhoramento. De acordo com McCouch *et al.* (2013), espécies silvestres e raças locais de diferentes espécies vegetais estão conservadas em mais de 1.700 bancos de germoplasma, porém há pouca informação genética para esse tipo de

germoplasma, o que faz com que os melhoristas ou não utilizem, ou utilizem pouco esse tipo de germoplasma nos programas de melhoramento.

Estudos básicos de uma espécie, como número de cromossomos, nível de ploidia, normalidade da meiose, tamanho do genoma, dentre outros, são importantes para as mais diferentes áreas de conhecimento (Singh, 2002). O conhecimento do curso da meiose de um organismo vai informar se essa espécie produz gametas viáveis, capazes de gerar uma progênie.

A meiose é que reduz à metade o número cromossômico de um indivíduo ou organismo. O curso normal da meiose garante a viabilidade do gameta, porém esse evento é controlado por vários genes e, assim, podem ocorrer mutações devido à presença de genes mutantes (Pagliarini, 2000). Desse modo, o resultado são produtos pós-meióticos anormais e, como consequência, a infertilidade da planta (Pagliarini, 2000). Além disso, estudos meióticos são importantes, pois explicam fenômenos reprodutivos, mecanismos de hereditariedade e de variabilidade genética nas espécies, afinal, a meiose é uma das fontes de variabilidade genética utilizada pelos organismos para a adaptação ao meio ambiente e, em consequência, para a perpetuação através da descendência (Caetano *et al.*, 2003).

Outro estudo importante para uma espécie é a determinação do tamanho do seu genoma. Essa informação pode ser utilizada tanto no melhoramento, quanto em estudos evolutivos, biologia celular e sistemática e taxonomia. Também fornece informações que podem ser utilizadas em associação a trabalhos de sequenciamento e marcadores moleculares (Doležel e Bartoš, 2005). De acordo com Schifino-Wittmann (2001), a determinação do tamanho do genoma pode, até, substituir a contagem dos cromossomos quando se trabalha com um número muito grande de indivíduos, como, por exemplo, caracterização citológica de bancos de germoplasma. O conhecimento do nível de ploidia é importante para trabalhos onde são utilizados cruzamentos entre as espécies (Schifino-Wittmann, 2001).

Há várias metodologias de determinação do tamanho do genoma, e uma delas é a determinação via citometria de fluxo, que pode ser utilizada na pesquisa em plantas, para a determinação do conteúdo de DNA nuclear, nível de ploidia, para a análise de ciclo celular, identificação de cromossomos específicos, organização do genoma no núcleo, e para a determinação do sexo em plantas



(Doležel e Göhde, 1995). No melhoramento, é uma importante ferramenta para a determinação do tamanho do genoma correlacionado com as características de interesse (Doležel, 1997).

Assim, tanto o conhecimento da estabilidade da meiose como o do tamanho do genoma são importantes, pois poderão ser utilizados pelos melhoristas, considerando que as espécies, aqui estudadas, são silvestres e, portanto, repositórios de genes que poderão ser úteis para melhorar a forma cultivada.

## 2. OBJETIVOS

2.1. Avaliar o comportamento meiótico das espécies, dando ênfase às possíveis irregularidades meióticas, e estimar o índice de recombinação, índice meiótico e a viabilidade polínica de *Passiflora miniata* e *Passiflora cristalina*;

2.2. Estimar o conteúdo de DNA das espécies *Passiflora coccínea*, *Passiflora morifolia*, *Passiflora setacea*, *Passiflora miniata* e *Passiflora pentagona*.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. O gênero *Passiflora*

O gênero *Passiflora* é o mais rico e o mais importante da família *Passifloraceae*. O número de espécies que o compõe varia entre 521 (Feuillet e MacDougal, 2003) a 537 espécies (Vanderplank, 2007).

O gênero é formado por trepadeiras herbáceas ou arbustivas e, em alguns casos, eretas. Possuem caule cilíndrico ou quadrangular, ramificado, anguloso, suberificado, glabro ou piloso (Vanderplank, 2000). Possuem folhas de tamanho e formas variadas, alternadas, simples ou compostas, inteiras ou lobadas, frequentemente, com nectários no pecíolo, na lâmina da folha ou nas estípulas (Feuillet e MacDougal, 2007). As gavinhas são, geralmente, solitárias e se desenvolvem nas axilas das folhas, porém são ausentes em espécies lenhosas (Cunha *et al.*, 2002).

As flores são hermafroditas e possuem grande variação de formas e cores, variando de branco a vermelho intenso. Possuem simetria radial com o cálice tubuloso herbáceo ou subcarnoso, com cinco sépalas. A corola possui cinco pétalas membranáceas, alternadas as sépalas. A coroa, geralmente, é colorida, fator que atrai polinizadores, e esta, junto com o androginóforo, são soldados e elevados, o que caracteriza a família *Passifloraceae* (Vanderplank, 2000; Ulmer e MacDougal, 2004).

Os frutos podem ser bagas indeiscentes ou cápsulas deiscentes de forma globosa ou ovoide. Geralmente possuem coloração amarela, porém existem frutos com coloração vermelha ou roxa (Vanderplank, 2000; Ulmer e MacDougal, 2004). A casca é de texturas coriácea, quebradiça e lisa, as quais protegem as sementes, que são envolvidas em arilo mucilaginoso (Bernacci *et al.*, 2008; Nunes e Queiroz, 2006).

As espécies que compõem o gênero *Passiflora* estão distribuídas em quatro subgêneros: *Astrophea*, *Deidamioides*, *Decaloba* e *Passiflora* (Feuillet e MacDougal, 2003).

O subgênero *Astrophea* é dividido em seis seções (Killip, 1938). Esse subgênero é composto por lianas ou arbustos com pequenas estípulas decíduas (Feuillet, 2002). É encontrado, principalmente, nas áreas tropicais da América do Sul (Escobar, 1994). Apresenta dois nectários peciolares. Os pedúnculos apresentam de 1 a 5 flores coloridas, variando de rosa, vermelho até alaranjado (MacDougal e Feuillet, 2004). São espécies pertencentes a esse subgênero *P. pittieri* e *P. tical*.

O subgênero *Deidamioides* é subdividido em cinco seções (Ulmer e MacDougal, 2004). Possui distribuição na América do Sul e Central, sendo as regiões o centro de diversidade do gênero, incluindo as espécies com características ancestrais de *Deidamioides* (Ulmer e MacDougal, 2004); entre elas, as flores se originarem, diretamente, de gavinhas.

O subgênero *Decaloba* agrupa espécies que estão divididas em oito seções. Vinte e uma espécies desse subgênero são nativas do Brasil (MacDougal e Feuillet, 2004). São representantes desse subgênero as espécies *P. misera* e *P. capsularis*. A maioria das espécies possui pequeno porte e hábito escandente, com flores pequenas e, geralmente, brancas ou esverdeadas. Algumas espécies desse subgênero são autocompatíveis (Ulmer e MacDougal, 2004).

O subgênero *Passiflora* é o mais representativo, com distribuição pantropical, sendo o Brasil e a Colômbia os países com maior número de espécies (Cervi, 1997). É caracterizado por trepadeiras herbáceas, com flores grandes e coloridas, filamentos da corona com duas a várias séries. Possui gavinhas axilares, nectários extraflorais no pecíolo (Ulmer e MacDougal, 2004; Nunes e Queiroz, 2007). Nesse subgênero, estão reunidas as espécies conhecidas como maracujás, e é o mais importante da família por conter espécies

com alto valor econômico e por ser o gênero com maior número de espécies, como a *P. setácea* e a forma comercial *P. edulis* (Milward-de-Azevedo e Baumgratz, 2004).

Quanto à origem e dispersão das espécies, Muschner *et al.* (2012), em um trabalho sobre filogenia, biogeografia e tempo de divergência na família *Passifloraceae*, concluíram que a família parece ter seguido o mesmo cenário biogeográfico proposto para várias espécies vegetais, originando-se na África. Através de pontes de terra, dispersou da África para a Europa e Ásia até chegar ao Novo Mundo, o Continente Americano. Os autores também concluíram que os ancestrais do subgênero *Passiflora* chegaram à América Central e, então, diversificaram-se rapidamente, via muitos eventos de dispersão à longa distância.

### 3.2. Uso e Importância das Passifloras

As passifloras têm uso diversificado na agricultura e na horticultura, sendo que, dessas espécies, muitas são utilizadas para fins alimentares, medicinais e ornamentais (Souza e Meletti, 1997).

No uso medicinal, são utilizadas as folhas, flores, raízes e frutos para o combate a verminoses, a tumores gástricos e a estresse (Costa e Tupinambá, 2005). A maioria dos fármacos modernos é de origem na utilização popular (Gilani e Rahman, 2005). Sakalem *et al.* (2012) apontam as espécies *P. coccinea*, *P. vitifolia*, *P. incarnata*, *P. bahiense* e *P. sidifolia* como medicinais.

O potencial ornamental das passifloras não é muito explorado no Brasil, porém, em outros países do Hemisfério Norte, foram registrados mais de 400 híbridos com fins ornamentais (Peixoto, 2005). As flores de passiflora são fascinantes devido à sua coloração forte e brilhante ou suave e marcante. Isso faz com que sejam consideradas exóticas e complexas. Outra característica importante à ornamentação é a ampla variedade de formatos de folhas (Cruz *et al.*, 2008). Muitas espécies possuem seu valor comercial baseado nas folhagens (Souza *et al.*, 2003a).

Como potencial agrônômico, as passifloras são muito importantes, pois, nesse gênero, está a forma cultivada, maracujazeiro azedo (*P. edulis*), que tem grande aceitação no mercado e possui utilização diversificada (d'Eeckenbrugge, 2003).

O Brasil é o líder na produção da fruta do maracujazeiro azedo, com uma área plantada de 62.019 ha, sendo a região do Nordeste a que mais produz, com 72,59% da produção do país, seguida pelas regiões Sudeste, Norte, Centro-Oeste e Sul (IBGE, 2012). O país se destaca devido às condições ideais de cultivo, uma vez que o maracujazeiro necessita de condições tropicais e subtropicais para se desenvolver, como a alta umidade relativa do ar e a alta luminosidade (Costa, 2008).

O cultivo do maracujá é, também, destinado a fins alimentícios, podendo ser utilizado como fruta fresca ou industrializada (Meletti, 2011). As espécies que são mais cultivadas são *P. edulis* (maracujá-azedo), ocupando 90% da área plantada, e *P. alata* (maracujá-doce) (Meletti *et al.*, 2005). Espécies como *P. quadrangularis* L., *P. nítida* HBK, *P. caerulea*, *P. laurifolia*, *P. cincinnata* e *P. setacea* também são cultivadas, porém em, apenas, algumas regiões do país (Meletti *et al.*, 2005).

A cultivar BRS Pérola do Cerrado é uma cultivar de maracujazeiro silvestre, obtida pela Embrapa Cerrado através do processo de seleção massal de uma população de acessos de *P. setacea* de diferentes origens. Com essa seleção, visou-se ao aumento de produtividade e ao aumento do fruto, além de resistência às principais doenças. É um produto com quádrupla aptidão: para o consumo *in natura*; para o processamento industrial; suas flores brancas e sua densa ramificação demonstram um potencial para ornamentação de grandes áreas e por ser vigoroso e resistente a doenças e a pragas. Também é um material produtivo e com qualidade físico-química e funcional da polpa (EMBRAPA, 2013).

### **3.3. Melhoramento do Maracujazeiro**

O cultivo comercial do maracujazeiro é recente, e o campo de pesquisa, ainda, é amplo e promissor. Apesar disso, é possível utilizar vários métodos de melhoramento em maracujazeiro. A seleção massal vem sendo amplamente utilizada devido à técnica ser simples e eficiente para caracteres qualitativos. Testes com seleção entre e dentro de famílias, índice de seleção e seleção combinada indicam que esses métodos também podem ser utilizados em programas de melhoramento de maracujazeiros com notáveis ganhos genéticos (Nunes, 2008). Também são possíveis de se utilizar, no melhoramento de

maracujazeiro, a introdução de plantas e a seleção com teste de progênie (Bruckner *et al.*, 2005).

Outro método que pode ser utilizado é a seleção recorrente. Ela pode ser utilizada com o objetivo de aumentar os alelos favoráveis na população, mantendo a variabilidade genética (Hallauer, 1971). Reis *et al.* (2011) utilizaram dois ciclos de seleção recorrente em maracujazeiro amarelo, com o objetivo de estimar a variabilidade genética e avaliar o impacto dessas seleções nas progênies, através da alteração nas frequências alélicas, o que pode ser detectado através da utilização de marcadores moleculares.

O melhoramento de passifloras também está relacionado à parte da planta a ser melhorada, como o fruto, a flor, ou a folha e com a região em que é cultivada (Meletti *et al.*, 2003). As folhas e frutos possuem importância medicinal, onde o enfoque do melhoramento é voltado para a produção de folhas maiores e com maiores concentrações de passiflorina para o uso na indústria farmacêutica (Meletti, 2011). Já com as flores, devido à beleza e às cores (Abreu *et al.*, 2009), são realizados cruzamentos interespecíficos com a finalidade de se obterem flores com formatos e cores peculiares para a sua utilização no mercado ornamental (Santos *et al.*, 2011).

No Brasil, o melhoramento do maracujazeiro é voltado para o fruto, visando ao seu consumo; assim, as características a serem melhoradas são o aumento na produtividade, a qualidade do fruto e a resistência a doenças (Viana e Gonçalves, 2005). O melhoramento para a qualidade do fruto deve ser direcionado para o mercado *in natura* ou para a industrialização (Bruckner *et al.*, 2002). Para o mercado *in natura*, visando à sua comercialização, o fruto deve ser grande, resistente ao transporte e ao armazenamento. Para a industrialização, é importante que haja maior rendimento do suco, com maior teor de acidez e alto teor de sólidos solúveis (Bruckner *et al.*, 2002; Meletti *et al.*, 2003).

Viana *et al.* (2003) avaliaram a diversidade genética de 21 genótipos, utilizando marcadores RAPD. Neste trabalho, foi estimada a diversidade genética entre as espécies cultivadas, o maracujazeiro amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa*), e espécies silvestres onde, com base na variabilidade entre os genótipos, os autores recomendaram o seu uso em programas de hibridação, visando à resistência a doenças. Observou-se, também, que as espécies cultivadas, o maracujá amarelo e o roxo, foram agrupadas separadamente, o que sugere a

existência de diversidade genética entre elas, contrariando a hipótese de que o maracujá amarelo seria uma mutação do maracujá roxo ou um híbrido interespecífico natural.

Objetivando o melhoramento populacional do maracujazeiro amarelo, Moraes (2009) utilizou a seleção recorrente e, após a análise de variância de 140 progênies de irmãos completos, observou que havia variabilidade genética a ser explorada nos próximos ciclos, indicando sucesso com a seleção. Foi possível selecionar 40 progênies superiores para serem, então, recombinadas com a consequente formação de uma nova população melhorada.

Silva *et al.* (2012) estimaram parâmetros genéticos associados a onze características agrônômicas de uma população de maracujazeiro amarelo sob seleção recorrente. As características avaliadas foram o número de dias para o florescimento, o peso médio dos frutos, o comprimento médio dos frutos, a largura média dos frutos, a espessura média de casca, o teor de sólidos solúveis totais, a coloração da polpa, a média percentual de polpa, o número total de frutos, a produção total e o peso médio de frutos. Com esses parâmetros, os autores encontraram a existência de variabilidade genética disponível na população. Dessa, há possibilidade de seleção de progênies superiores de maracujazeiro amarelo.

Santos (2013), com o objetivo de obter híbridos resistentes à doença do endurecimento dos frutos, *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), e que apresentem características agrônômicas desejáveis, realizou hibridação interespecífica entre *P. edulis* e *P. setacea*, sendo sete genótipos de *P. edulis* e dois genótipos de *P. setacea*. A hibridação foi bem sucedida nas duas direções dos cruzamentos, comprovando que há compatibilidade genética entre as espécies. Dos cruzamentos, foram obtidas nove progênies com alto percentual de plantas híbridas normais e produtivas, sendo, assim, possível a continuação de trabalhos visando à resistência ao CABMV. Vinte e seis híbridos interespecíficos foram considerados resistentes ao CABMV através de PTA-ELISA.

Ferreira (2013), dando continuidade ao programa de melhoramento de maracujazeiro amarelo, conduziu o terceiro ciclo de seleção recorrente intrapopulacional, visando a recomendar uma variedade adaptada às condições da região Norte do Estado do Rio de Janeiro. No estudo das progênies de irmãos completos, observou-se variabilidade genética entre as 81 progênies de



maracujazeiro amarelo, sendo a característica largura média de frutos a que mais contribuiu para a diversidade genética.

### 3.3.1. Espécies Silvestres e sua Utilização

O Brasil é centro de diversidade das passifloras, possuindo ampla variabilidade genética (Ganga *et al.*, 2004), e, entre as espécies silvestres encontradas no país, algumas possuem características de interesse que podem ser introduzidas nas espécies comerciais, via melhoramento (Junqueira *et al.*, 2007). As doenças e pragas que acometem a cultura do maracujazeiro são os fatores que mais ameaçam a produção (Junqueira *et al.*, 2005), e, devido à grande importância dessa cultura para o País, algumas instituições, como a Embrapa Mandioca e Fruticultura, o Instituto Agrônomo do Paraná (Iapar), a Universidade Estadual Paulista (Unesp) – *Campus* de Jaboticabal e a Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), mantêm coleções do germoplasma, que podem ser mantidas em campo, em casas de vegetação, ou coleções armazenadas via sementes, mantidas em câmara fria (Ferreira, 2005).

Características como longevidade, adaptação a condições adversas do clima, maiores períodos de florescimento, maiores concentrações de componentes químicos de interesse para a indústria farmacêutica e cosmética e a resistência a doenças são de interesse para o melhoramento da variedade cultivada (Junqueira *et al.*, 2006). Genótipos resistentes a doenças podem ser identificados com a utilização de marcadores moleculares e com a utilização de sequências conservadas presentes na maioria dos genes de resistência (Leister *et al.*, 1996). As espécies *P. caerulea*, *P. nitida*, *P. laurifolia*, *P. suberosa*, *P. alata*, *P. coccinea*, *P. giberti* e *P. setacea* são conhecidas por sua resistência à doença (Fischer, 2003; Meletti e Bruckner, 2001). Paula *et al.* (2010), utilizando marcadores moleculares análogos a genes de resistência (RGA – Disease Resistance Gene Analogs), avaliaram espécies de passifloras silvestres, e foi encontrada uma ampla variedade de marcadores RGA. Essa variabilidade possibilita estabelecer níveis de similaridade genética entre os acessos e, além disso, identificar sequências relacionadas a genes de resistência a doenças em plantas, que podem ser utilizadas em futuros cruzamentos.

Assim, uma das linhas de melhoramento do maracujazeiro amarelo é o que visa à obtenção de híbridos interespecíficos, utilizando-se, como um dos genitores, uma espécie silvestre. É um processo que proporciona ganhos agronômicos, além de possibilitar a obtenção de novos materiais genéticos com potencial para o uso, como porta-enxertos, e, também, com potencial para o mercado ornamental (Junqueira *et al.*, 2007). Essa diversidade oferece um potencial a ser explorado, o que torna o campo de pesquisa promissor em relação ao melhoramento de plantas. Entretanto, para tal uso, é necessário que se tenham conhecimentos básicos sobre as espécies em questão, como o número de cromossomos, ploidia e curso da meiose.

### 3.4. Citogenética

Os estudos citogenéticos podem trazer informações valiosas acerca das relações filogenéticas e evolutivas entre grupos de plantas (Raven, 1975). Estes últimos utilizam, como base, a contagem do número de cromossomos, a morfologia dos cromossomos mitóticos e meióticos, o comportamento dos cromossomos meióticos (Bertão, 1993; Shi *et al.*, 1996). Essas contribuições são indispensáveis, uma vez que aumentam a eficiência de estratégias de conservação e auxiliam no melhoramento da espécie (Coelho, 2009).

Em passiflora, há poucos estudos citogenéticos, considerando o tamanho do gênero, e esses estudos se limitam à determinação do número cromossômico (Souza *et al.*, 2008). A análise do comportamento meiótico, a viabilidade polínica, o estabelecimento de cariótipos e o conteúdo de DNA nuclear são ferramentas importantes para o melhoramento, uma vez que o conhecimento desses dados favorece o planejamento de hibridações interespecíficas (Souza *et al.*, 2008).

MacDougal e Feuillet (2004) definiram os subgêneros com os seguintes números básicos de cromossomos: *Decaloba*  $x=n=6$ , *Deidamioides*  $x=n=12$ , *Astropheia*  $x=n=12$  e *Passiflora*  $x=n=9$ . O menor número básico cromossômico é  $x=6$ , o que sugere uma possível poliploidização durante a evolução do gênero, dando origem a espécies com números cromossômicos diferentes, como, por exemplo, *P. suberosa*  $2n=36$  e *P. lutea*  $2n=84$  (Amorim, 2009).

Devido a diferentes relatos a respeito do cariótipo de *P. edulis* f. *flavicarpa*, Praça-Fontes *et al.* (2011) realizaram a montagem do cariograma, onde

observaram 18 cromossomos com  $2n = 6\text{II M} + 3\text{II SM}$ . A coloração com o fluorocromo laranja de acridina revelou quatro regiões de fluorescência, sendo associadas aos cromossomos 7 e 8.

Melo e Guerra (2003) dividiram as espécies, citologicamente, em quatro grupos, com base em seu número cromossômico associado aos sítios 5S e 45S encontrados em 20 espécies desses quatro grupos estudados. O trabalho objetivou entender como foi a evolução cariotípica de *Passiflora* com a utilização da técnica de FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization). De forma geral, os autores puderam concluir que, de acordo com o número de sítios 5S e 45S e a sua localização, os ancestrais de *Passiflora* continham o número cromossômico básico de  $n=x=6$ .

O estudo do cariótipo tem sido importante para pesquisas de caracterização citogenética ou para detecção de híbridos em programas de melhoramento. Outra importância dos estudos cariotípicos é para o entendimento da evolução dos cariótipos de espécies cujos cromossomos sofreram alterações estruturais, como inversões ou translocações (Guerra *et al.*, 1997).

Meletti *et al.* (2003) analisaram diferentes populações de *P. alata* Curtis e as caracterizaram citogeneticamente. Foram observados  $2n=18$  cromossomos, e a fórmula cariotípica foi  $2n = 7\text{II M} + 2\text{II SM}$ , sendo considerado um cariótipo simétrico. Também não foram encontradas diferenças entre as populações de *P. alata* estudadas.

Os cariótipos das espécies *P. alata* Dryand., *P. edimundoi* Sacco, *P. malacophylla* Mast., *P. mucronata* Lam., *P. galbana* Mast. e *P. quadrangulares* L. foram feitos por Souza *et al.* (2003b), todas com  $2n=18$ , obtendo variação entre os cariótipos obtidos para as seis espécies, sendo eles considerados assimétricos. Viana *et al.* (2008) realizaram a comparação entre os cariótipos das espécies *P. edulis* Sims e *Passiflora* spp., uma espécie muito similar à forma cultivada, e ambas apresentam  $2n=18$ . Os autores observaram variação entre a posição dos satélites e no comprimento individual de cada par cromossômico dentro e entre espécies, sendo considerados cariótipos assimétricos, com variação média de 60% entre o maior e o menor par cromossômico dentro de cada espécie.

### 3.4.1. Comportamento Meiótico

A meiose é um evento de elevada estabilidade durante o processo evolutivo, que resulta na redução do número de cromossomos (Pagliarini, 2000). O processo de divisão meiótica caracteriza-se por uma série de eventos sequenciais de elevada complexidade, tanto mecânica quanto bioquímica (Pagliarini e Pozzobon, 2004). Os estudos meióticos são de grande relevância, pois explicam fenômenos reprodutivos, mecanismos de hereditariedade e de variabilidade genética nas espécies. Afinal, a meiose é a principal fonte de variabilidade genética através do mecanismo de recombinação genética e que pode ser utilizada pelos organismos na adaptação e na perpetuação da espécie (Caetano *et al.*, 2003).

A realização de estudos meióticos fornece importantes informações associadas ao genoma individual de uma espécie, assim como sobre o pareamento na produção de híbridos (Gupta e Priyadarshan, 1987), gerando, também, informações sobre a recombinação cromossômica, as irregularidades meióticas e a viabilidade polínica (Jong *et al.*, 1993).

A permuta ou recombinação genética é um evento que ocorre durante a meiose e é muito importante para o melhoramento, pois é durante o processo de permuta que há troca de genes, o que pode gerar variabilidade. Ocorre na meiose I, durante a prófase I, e tem sido observado que altas taxas de recombinação são encontradas em regiões densas em genes e próximas aos telômeros, e há uma perda de recombinação em regiões próximas aos centrômeros (Mezard, 2006).

Um bom estimador da recombinação em uma população é a frequência e a posição do quiasma. Correlações têm sido encontradas entre a taxa de recombinação e a estrutura do cromossomo, como tamanho total, tamanho dos braços, distância do centrômero ou do telômeros, ou, ainda, características das sequências dos cromossomos, como conteúdo das bases nitrogenadas guanina e citosina, sequências simples ou repetitivas e elementos de transposição (Martinez-Perez e Moore, 2008).

Darlington (1958), citado por Colombo (1992), propôs um índice de recombinação baseado na soma do número médio de quiasma por célula ou população e do número haplóide de cromossomos da espécie; entretanto, esse índice não leva em conta a posição do quiasma se intersticial ou terminal, já que o

primeiro produz um máximo e o último um mínimo de recombinação (Colombo, 1992). Outro método, para ser estimar a taxa de recombinação, é via o excesso no número de quiasmas, que é estimado subtraindo-se o número básico de cromossomos do número de quiasmas na célula (Koella, 1993). A taxa ou frequência de quiasmas é controlada geneticamente, embora possa sofrer alterações em função de condições ambientais, como temperatura, idade da planta, quantidade de água e exposição a agentes mutagênicos, como a radiação ionizante e produtos químicos (Sybenga, 1972).

O curso normal e harmonioso da meiose garante a viabilidade do gameta (Pagliarini, 2000); entretanto, os eventos da meiose são controlados por fatores genéticos, sendo, assim, mutáveis e responsáveis por algumas das irregularidades meióticas (Kaul e Murthy, 1985), como os cromossomos retardatários (Consolaro *et al.*, 1996) e o processo de orientação diferenciada das fibras do fuso acromático (Shamina, 2005). Segundo Defani-Scoarize *et al.* (1996), as irregularidades meióticas são indesejáveis, pois alteram os genótipos, ocasionando a instabilidade meiótica, característica indesejada por dificultar trabalhos de hibridação interespecífica em programas de melhoramento. A ocorrência dessas anomalias pode dificultar a produção de híbridos, por ter como consequência a variação cromossômica em função da perda ou ganho de cromossomos nas novas gerações, além da redução ou perda da capacidade reprodutiva.

Love (1951) estabeleceu o Índice Meiótico (IM) como forma de avaliação da estabilidade meiótica dos genótipos. Esse índice analisa os produtos pós-meióticos, como as tétrades, tríades, díades, monades e políades. Com o curso normal da meiose, esperam-se maiores números de tétrades normais. Dessa forma, genótipos que apresentam os índices meióticos abaixo de 90% descrevem uma espécie com baixa estabilidade meiótica. Isso sugere uma tendência para a ocorrência de anormalidades durante o processo de gametogênese; já espécies portadoras de um índice superior a 90% são consideradas de alta estabilidade meiótica, sendo indicadas em programas de hibridação. A normalidade da meiose gera gametas viáveis, e, normalmente, uma alta porcentagem de grãos de pólen viáveis é esperada como resultado de um alto percentual de tétrades normais, as quais refletem um processo meiótico regular (Techio *et al.*, 2005).

A viabilidade polínica pode ser determinada através de métodos diretos, como a indução da germinação do pólen *in vivo* ou *in vitro* e por métodos indiretos, baseados em parâmetros citológicos, como a coloração (Dafni, 1992). Estes últimos utilizam corantes químicos específicos que vêm a reagir com componentes celulares presentes no grão de pólen desenvolvido. Dentre esses testes, destaca-se o teste do Lugol, teste do Carmim acético e a solução tripla de Alexander e o diacetato de fluoresceína (Pagliarini e Pozzobon, 2004).

A solução tripla de Alexander (1969) utiliza uma mistura de corantes, laranja G, fucsina básica e verde malaquita. O núcleo do grão de pólen viável reage com a fucsina, corando o pólen viável de vermelho/púrpuro, enquanto os grãos inviáveis coram-se de verde. É um teste simples, barato, fácil e eficaz na distinção dos grãos de pólen viáveis dos inviáveis.

O comportamento meiótico de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. amethystina* foi analisado por Barbosa *et al.* (1997), bem como seus híbridos, os quais foram produzidos através de fusão de protoplastos. Foi observado que o pareamento cromossômico dos parentais foi regular, e as anormalidades (cromossomos retardatários e pontes anafásicas) foram observadas em menos de 1% das células observadas. Porém, nos híbridos somáticos, a meiose foi irregular, com altas frequências de pontes anafásicas e cromossomos retardatários durante todo o processo da meiose. Apesar das anormalidades, em média, todos os materiais apresentaram alta viabilidade polínica, onde o menor valor encontrado foi de 72,9%.

Souza *et al.* (2003c), analisando a meiose de *P. edmundoi* Sacco ( $x=n=9$ ), observaram seu pareamento, encontrando as seguintes configurações 7II + 1IV; 5II + 2IV e 18 I. O IR encontrado para a espécie foi de 9.3 quiasmas por célula, e, apesar das irregularidades encontradas, como anomalias na fibra do fuso e cromossomos retardatários, o comportamento meiótico de *P. edmundoi* foi considerado regular, uma vez que o índice meiótico e a viabilidade polínica estimados foram altos.

A espécie pertencente ao gênero *Passiflora*, *P. serrato-digitada*, teve seu comportamento meiótico analisado, e foram observadas anormalidades, como a migração precoce para os polos, os cromossomos não orientados, os cromossomos retardatários, a formação de micronúcleos e a anormalidade observada, pela primeira vez, em uma espécie do gênero passiflora, a aderência

cromossômica. Essas anormalidades geraram um índice meiótico considerado baixo, de 71,83% (Kiihl *et al.*, 2011).

Souza e Pereira (2011), estudando 14 taxas de passifloras, observaram anormalidades durante o pareamento na meiose, onde foram encontrados, além de cromossomos bivalentes, univalentes e tetravalentes. Azevedo *et al.* (2011), trabalhando com *P. organesis*, observaram um alto índice meiótico (IM), isso se deu por não terem encontrado anormalidades meióticas. Foram observados seis bivalentes, o que é esperado para a espécie.

A viabilidade polínica é um fator importante para o melhoramento de plantas, uma vez que os grãos de pólen são os gametas. De acordo com Souza (2002), os grãos de pólen devem estar completamente viáveis durante a abertura da flor, e a sua viabilidade depende da regularidade meiótica. O referido autor também observou que a viabilidade polínica diminui após a abertura da flor, onde os valores médios de viabilidade polínica, em maracujazeiro-amarelo, foi de 88 e 84,1%.

### **3.4.2. Tamanho de Genoma**

A determinação do conteúdo de DNA é uma das formas de se conhecer o tamanho do genoma de um organismo. Existem duas maneiras de determinar o conteúdo de DNA de determinado organismo: através da análise do DNA extraído de diversas células e a partir da medição de núcleos individuais (Doležel e Bartoš, 2005).

Apesar do desenvolvimento da técnica ter ocorrido no fim dos anos 50 (Côrte-Real *et al.*, 2002), a citometria de fluxo começou a ser utilizada em células vegetais no início dos anos 80 (Doležel, 1991). Favorecida pelo aparecimento de novos corantes fluorescentes, a técnica pôde ser aplicada a outras áreas, além da hematologia e imunologia (Doležel, 1997).

A análise do DNA nuclear é baseada no uso de corantes fluorescentes específicos para DNA, onde a análise é realizada a partir da intensidade de coloração da molécula (Doležel, 1991). A avaliação do conteúdo de DNA de células vegetais pode ser feita através de estratégias que possibilitam a utilização de núcleos sem células intactas, pois a presença de parede celular rígida com autofluorescência pode conferir resultados irregulares (Doležel e Bartoš, 2005).

Assim, a amostra deve ser preparada em forma de suspensão de núcleos e/ou células permeáveis. Os núcleos são liberados em uma solução de isolamento através de homogeneização mecânica de uma pequena amostra de tecido vegetal fresco e corados com fluorocromos DNA-específicos e, por fim, a luz emitida quantificada (Doležel e Bartoš, 2005).

Os fluorocromos mais utilizados para estimar o conteúdo de DNA nuclear de plantas, via citometria de fluxo, são iodeto de propídeo, brometo de etídeo, acridine orange, DAPI, Hoeschst, cromamicina A3, mitramicina e olivomicina (Loureiro, 2007). O fluorocromo deve se ligar, especificamente e estequiometricamente, ao DNA, proporcionando melhores resultados. Os corantes podem ser divididos de acordo com a maneira que se ligam ao DNA: os que se intercalam, quantitativamente, na dupla fita da molécula de DNA e os que se ligam a bases específicas (Loureiro, 2007). Yanpaisan *et al.* (1999) indicam o iodeto de propídeo para a determinação da quantidade de DNA nuclear devido à sua capacidade intercalante e pelos coeficientes de variação obtidos com a sua utilização. Além disso, Price e Johnston (1996), também, destacam o iodeto de propídeo devido à sua acurácia na determinação do conteúdo de DNA quando utilizado com RNase, uma vez que o corante também possui a capacidade de corar a dupla fita de RNA. Não é recomendada a utilização de DAPI, uma vez que esse corante é preferencial para sequências ricas em bases nitrogenadas AT, sendo, dessa forma, menos rigoroso que o iodeto de propídeo nas quantificações de DNA genômico (Price e Johnston, 1996).

A fonte de luz é outro fator relevante nas análises de citometria de fluxo, influenciando, diretamente, os resultados obtidos. São utilizados dois tipos de luz: o *laser* e a luz HBO (luz de arco de mercúrio) (Doležel, 1991). Os *lasers* têm um alto poder de radiação, estabilidade e monocromaticidade, e esses fatores eliminam a necessidade de excitação de filtros de luz (Doležel, 1991; Nunez, 2001). Alguns citômetros de fluxo ainda possuem luzes HBO, e, devido a isso, os pesquisadores necessitam utilizar o corante DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), pois é mais fácil de excitar e mensurar a quantidade de DNA (Doležel e Bartoš, 2005).

A citometria de fluxo é uma metodologia bastante precisa e de fácil aplicação, reprodutível, que requer poucas amostras de material vegetal, e a obtenção de resultados é rápida (Souza *et al.*, 2008). As espécies de passifloras



apresentam grande variação fenotípica, o que pode indicar diferenças no tamanho do genoma entre as espécies (Souza *et al.*, 2008). Essas diferenças no conteúdo de DNA podem envolver sequências repetitivas, que não traduzem proteínas funcionais (Flavell, 1986), variações cromossômicas causadas por deleções, duplicações, aneuploidias espontâneas e poliploides, cromossomos B e, em alguns casos, cromossomos sexuais (Greilhuber, 1998). Sabe-se que existe, quase sempre, algum grau de variação do cromossomo dentro da população, tais como deleções, duplicações e aneuploidias espontâneas e poliploides, cromossomos B e, em alguns casos, cromossomos sexuais, e tais variações cromossômicas irão, naturalmente, provocar algumas variações no conteúdo de DNA entre os indivíduos (Greilhuber, 1998).

O conhecimento do tamanho do genoma é empregado em estudos filogenéticos, em análises de correlação entre tamanhos do genoma, entre espécies afins e em características fisiológicas ou agronômicas e para estimar efeitos ambientais no genoma. Apesar da importância dessas informações, o tamanho do genoma não é conhecido para, aproximadamente, 99% das angiospermas (Bennett e Leitch, 1995). Arumuganathan e Earle (1991) analisaram o conteúdo 2C de DNA nuclear de 100 espécies, incluindo *P. menspermiifolia* e encontraram, para essa espécie, o valor de 4,54pg.

Souza *et al.* (2004a) encontraram o valor 2C do conteúdo de DNA nuclear, variando de 3,16 a 5,36pg para as espécies diplóides (*P. edulis* Sims. *F. edulis*, *P. edulis f. flavicarpa*, *P. edmundoi* Sacco, *P. giberti* N.E. Brown, *P. lauria fólia* L., *P. mucronata* Lam., *P. quadrangularis* L.) e 1,83pg para a espécie tetraplóide (*P. suberosa*). Os autores observaram variação no tamanho do genoma de 69,6% entre as espécies estudadas.

Bugalho *et al.* (2011) aplicaram a técnica de citometria de fluxo nas espécies *P. alata*, *P. caerulea*, *P. cincinnata* e *P. amethystina* e nos seus híbridos, e foi observado que os picos que corresponderam ao conteúdo de DNA nuclear dos híbridos, gerados nos histogramas, encontraram-se entre os picos de conteúdo de DNA nuclear dos parentais. Com essa conclusão, pode-se fazer uma detecção precoce do conteúdo de DNA nuclear da progênie de *P. alata* x *P. caerulea*, *P. alata* x *P. cincinnata* e *P. alata* x *P. amethystina*.

Yotocko *et al.* (2011) analisaram espécies de *Passifloras* e observaram a correlação do tamanho do genoma com características físicas, como o diâmetro da

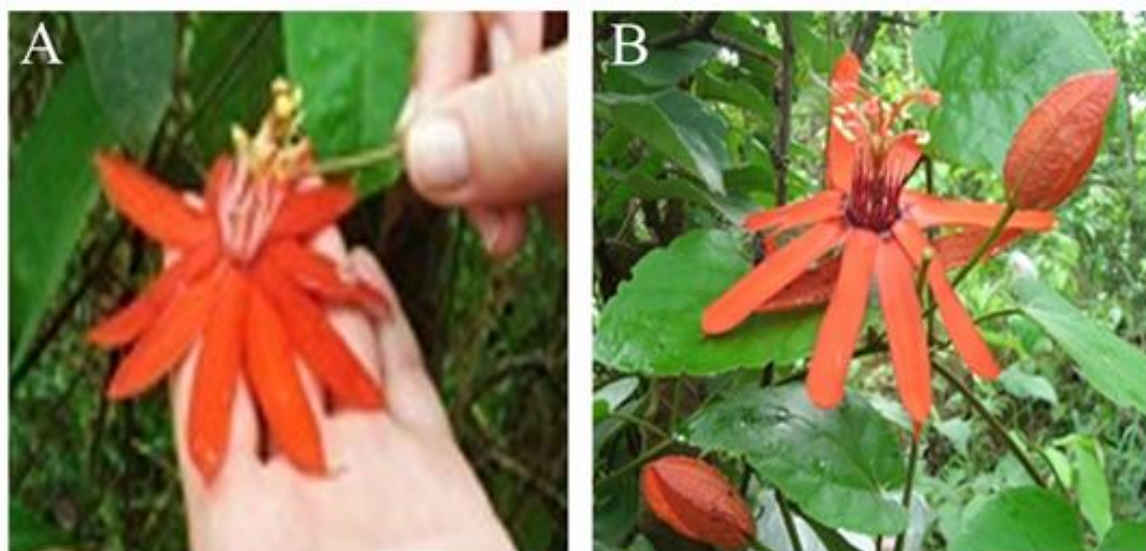
flor. O tamanho do genoma variou de 0,212 a 2,208pg. Dessa forma, foi possível encontrar evidências de que a variação do tamanho do genoma pode ser considerada um processo evolutivo

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Caracterização Meiótica

#### 4.1.1. Material Vegetal

Para a análise meiótica, foram utilizadas duas espécies silvestres do gênero *Passiflora*, *P. miniata* e *P. cristalina* (Fig. 1).



**Figura 1 – A) *Passiflora cristalina* e B) *Passiflora miniata*.** Fonte: Silveira, 2012.

*Passiflora cristalina* pertence à Supersecção Diasthephana do subgênero *Passiflora* e foi encontrada no Parque Estadual Cristalino, no nordeste do Estado

de Mato Grosso, daí ter recebido essa denominação; apresenta flores de coloração vermelha, com 10 a 11 mm de comprimento e 7 a 8 mm de diâmetro, que se mantêm eretas antes e durante a antese, tornando-se peduncular à medida que o ovário se desenvolve (Vanderplank e Zappi, 2011).

*Passiflora miniata* foi descrita por Vanderplank (2006) e pertence ao subgênero *Passiflora*, supersecção *Coccinea*, tem sua origem e distribuição na região Amazônica, no Peru, no Brasil, na Colômbia e nas Guianas (Lim, 2012). Apresenta flor de coloração vermelha e, segundo Vanderplank (2006), possui 3 séries de filamentos da coroa com uma coloração púrpura e seus frutos são pequenos e variegados com coloração verde e creme.

Os botões florais, de ambas as espécies, em diferentes estádios de desenvolvimento, foram coletados em plantas individuais encontradas em uma propriedade particular, localizada no município de Alta Floresta, extremo norte do Estado de Mato Grosso (9° 53'02" latitude S e 56° 14'38" longitude W), com altitude média de 320m e clima tropical chuvoso, com temperaturas variando entre 20°C a 38°C, com média de 26°C. As análises citológicas foram realizadas no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

#### **4.1.2. Metodologia**

##### **4.1.2.1. Análise Meiótica**

Para a meiose, botões florais, em diferentes estádios de desenvolvimento, foram fixados em solução de etanol: ácido acético na proporção de 3:1 e mantidos em temperatura de 4° C (geladeira). Após 24h, a solução fixadora foi substituída por uma solução de etanol 70%, e os botões foram mantidos em freezer até o momento de preparo das lâminas.

Para o preparo da lâmina, anteras foram maceradas em gota de carmim acético 2% e, após a retirada dos debris e a cobertura com lamínula, as lâminas foram observadas em microscópio óptico (Olympus BX 60). As diferentes fases da meiose foram analisadas, e as irregularidades foram contabilizadas.

Estimou-se, também, o índice de recombinação (IR), baseado em Darlington (1958), tendo sido contados o número de quiasmas observados em células na diacinese. Para a estimativa, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$IR = [\sum n^{\circ} \text{ total de quiasmas} \div n^{\circ} \text{ de células analisadas}] + n$$

onde n corresponde ao número haploide da espécie.

Para cada espécie, foram observadas 50 células em diacinese. O número médio de quiasmas, por espécie, foi comparado pela análise de variância.

#### **4.1.2.2. Índice Meiótico**

O índice meiótico (IM) foi estimado com base em cinco lâminas/botões, sendo cada lâmina preparada com quatro anteras e estas maceradas e coradas com carmim acético 2% para a visualização e contagem de produtos pós-meióticos. Considerou-se produto pós-meiótico normal tétrades e como anormal as mônades, díades, tríades e políades. Com base nesses dados, foi calculado o índice meiótico conforme Love (1951):

$$IM = [(\text{número de tétrades normais}) \div (\text{número total de produtos pós-meióticos})] \times 100$$

#### **4.1.2.3. Viabilidade Polínica**

Para a estimativa da viabilidade polínica, as lâminas foram preparadas com a maceração de duas anteras em solução tripa de Alexander, composta por Orange G, fucsina ácida e verde de malachita (Alexander, 1969). Dessa forma, foi possível avaliar os grãos de pólen como viáveis ou inviáveis, de acordo com a cor detectada. Grãos de pólen corados de vermelho/púrpura foram considerados viáveis e os corados de verdes foram considerados inviáveis.






Foram preparadas cinco lâminas com diferentes botões florais, contabilizando-se 200 grãos de pólen/lâmina, perfazendo um total de 1000 grãos de pólen por espécie. Foi calculada a porcentagem de grãos de pólen viáveis.

## 4.2. Determinação do Conteúdo de DNA

### 4.2.1. Material Vegetal

Para a determinação do conteúdo de DNA, foram utilizadas folhas jovens de *P. coccinea* (A), *P. miniata* (B), *P. morifolia* (C), *P. pentagona* (D) e *P. setacea* (E) (Tabela 1). Essas espécies, com exceção da *P. miniata*, estão conservadas na coleção de *Passifloraceae* da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. As análises citológicas foram realizadas no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da UENF.

**Tabela 1** – Características das espécies: nome das espécies, subgênero, número haploide e número cromossômico.

| Imagem  | Espécie             | Subgênero         | n  | 2n |
|---|---------------------|-------------------|----|----|
|   | <i>P. coccinea</i>  | <i>Passiflora</i> | 9  | 18 |
|  | <i>P. miniata</i>   | <i>Passiflora</i> | 9  | 18 |
|  | <i>P. morifolia</i> | <i>Decaloba</i>   | 6  | 12 |
|  | <i>P. pentagona</i> | <i>Astropheia</i> | 12 | 24 |
|  | <i>P. setacea</i>   | <i>Passiflora</i> | 9  | 18 |

#### 4.2.2. Metodologia

Cada espécie foi representada por cinco plantas, exceto *P. pentagona* (duas plantas) e *P. coccinea* (três plantas). Amostras foliares das espécies e do padrão interno, medindo, aproximadamente, 0,5cm<sup>2</sup>, foram utilizadas para a extração dos núcleos intactos. Foi utilizada, como padrão interno, a espécie *Zea mays* CE-777, cujo conteúdo 2C de DNA é definido como 5.43 pg (Lysák e Doležel, 1998). Para tal, as amostras foliares foram maceradas, concomitantemente, com auxílio de uma lâmina de barbear, em placa de petri, em 500µL de solução tampão de extração (Partec), durante 90 segundos, à temperatura ambiente. O macerado foi, então, filtrado em filtros de 50µm (Partec), e os núcleos intactos foram corados a 4°C, por 30 minutos, em 2mL de solução de coloração (Partec), contendo iodeto de propídeo e RNase.

Cinco amostras por espécies (repetições) foram analisadas no citômetro de fluxo (Partec PII), onde foram contabilizados 10.000 núcleos em cada análise. Os parâmetros, como ganho, velocidade de análise da amostra, foram definidos previamente, e os histogramas, médias, áreas, e coeficiente de variação foram analisados, utilizando-se *Flow Max Software* (Partec). Dessa forma, o conteúdo 2C de DNA foi determinado de acordo com Doležel e Bartoš (2005), onde:

$$\text{Conteúdo de DNA} = \frac{\text{Média do Pico } G_0/G_1 \text{ da espécie alvo}}{\text{Média do Pico } G_0/G_1 \text{ do padrão interno}} \times \text{conteúdo de DNA 2C do padrão interno (pg)}$$

Os valores em picogramas foram submetidos ao Teste F em um delineamento inteiramente casualizado, onde cada amostra foi considerada uma repetição, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ), utilizando-se o programa GENES.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Comportamento Meiótico

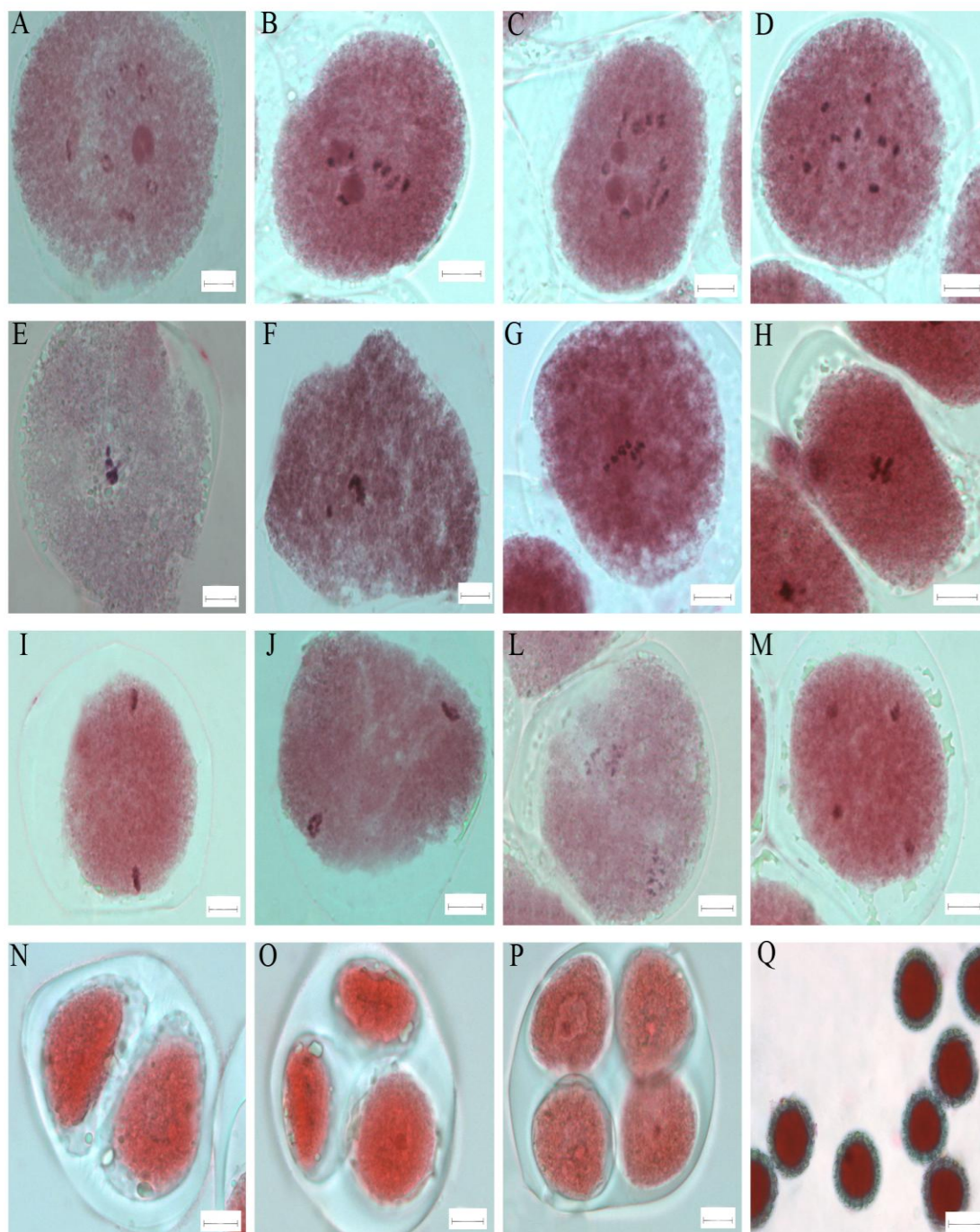
Os resultados aqui apresentados são inéditos para as duas espécies, tendo sido observados nove pares de bivalentes em células em diacinese (Fig. 2 A-D e 3 A-D). Assim, pode-se confirmar que as espécies são diplóides e apresentam  $2n=2x=18$  cromossomos. Esses dados são corroborados por Hansen *et al.* (2006), que relatam que as espécies do subgênero *Passiflora* possuem, como número cromossômico básico mais representativo,  $n=x=9$ ; além disso, a maioria das espécies desse subgênero apresentam  $2n=2x=18$  cromossomos (Souza *et al.*, 2012).

As espécies do gênero *Passiflora* podem ser classificadas em quatro grupos cariológicos representados por  $x=6$ ,  $x=9$ ,  $x=10$  e  $x=12$  (Melo e Guerra, 2003). A maioria das espécies apresenta  $2n=2x=18$  ou  $2n=2x=12$  cromossomos, porém é possível observar número cromossômico de  $2n=14$ , 20, 22, 24, 36, 72, e 84 cromossomos; entretanto, a maioria é diploide, sendo que há registros de poliplóides e aneuplóides na família (Souza *et al.*, 2008).

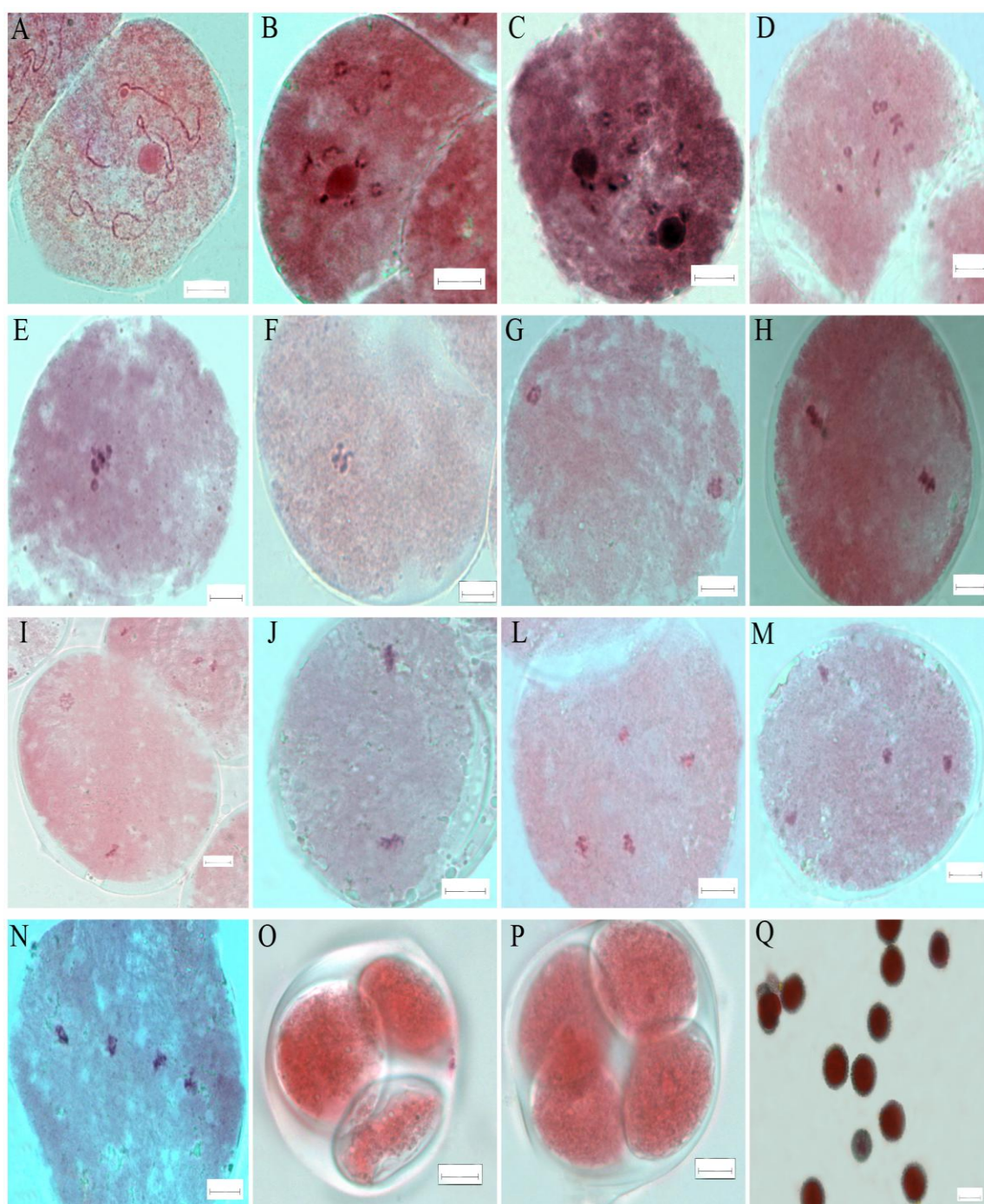
Nas duas espécies, foi observado mais de um par de cromossomos associados ao nucléolo, indicando a presença de, pelo menos, dois pares de cromossomos, contendo as regiões organizadoras do nucléolo (RONs), e foram, também, observadas células com mais de um nucléolo dois pares de cromossomos estavam associados ao nucléolo em 33% das células. Barbosa e



Vieira (1997), em seu estudo com maracujá azedo, observaram que dois pares de cromossomos estavam associados ao nucléolo em 33% das células.



**Figura 2** - Meiose em *P. cristalina*. **A)** Diacinese com um nucléolo; **B)** Diacinese com dois nucléolos; **C)** Diacinese com três nucléolos; **D)** Prometáfase; **E)** Metáfase I; **F)** Metáfase I com cromossomo retardatário; **G)** Metáfase I com anormalidade na formação da fibra do fuso; **H)** Início da anáfase I; **I)** Metáfase II; **J – L)** Anormalidade na formação das fibras do fuso; **M)** Telófase II; **N)** Díade; **O)** Tríade; **P)** Tétrade; **Q)** Grãos de pólen. Barra de A – P = 10µm; Barra em Q = 30 µm.



**Figura 3 -** Meiose em *P. miniata*. **A)** Paquíteno; **B)** Diacinese com um nucléolo; **C)** Diacinese com dois nucléolos; **D)** Diacinese; **E)** Metáfase I; **F)** Metáfase I **G)** Telófase I; **H)** Metáfase II; **I)** Célula assincrônica; **J - N)** Anormalidade na formação da fibra do fuso; **O)** Tríade; **P)** Tétrade; **Q)** Grãos de pólen. Barra de A – P = 10µm; Barra em Q = 30 µm.

De acordo com os autores, a espécie cultivada possui duas regiões RON, localizadas nas constrições secundárias dos cromossomos 8 e 9. As RONS são seqüências de DNA repetidas, que codificam o RNA ribossômico - rRNA 18S, 5.8S e 26S (18S-26S) e estão localizadas nas contrições secundárias. Durante a



telófase e a interfase, as regiões RON são responsáveis pela formação dos nucléolos (Besendorfer *et al.*, 2002). As RONS, normalmente, estão associadas às constrições secundárias, porém nem todas as constrições secundárias são sítios de RON (Battistin *et al.*, 1999).

A meiose das duas espécies foi considerada normal, porém apresentaram algumas irregularidades, sendo que cromossomos retardatários em metáfase I (Fig. 3 F), segregação irregular dos cromossomos (Fig 3 J – L), e anomalias no fuso foram as mais frequentes (Fig. 3 J – N) (Tabela 2). De acordo com Souza e Pereira (2011), as espécies pertencentes ao gênero *Passiflora* tendem a apresentar maiores porcentagens de irregularidades meióticas quando comparadas aos resultados obtidos neste trabalho.

Cromossomos retardatários podem levar à formação de gametas não balanceados, a aborto de óvulos e à consequente formação de gametas inviáveis (Battistin *et al.*, 2006). Uma possível causa é o fim precoce de quiasmas ou a presença dos genes *asynaptic* ou *desynaptic* durante a prófase I (Pagliarini, 2000).

Segundo Pagliarini (2000), cromossomo retardatário é a irregularidade mais frequente durante a metáfase I, assim como durante a anáfase I. Cromossomos retardatários, geralmente, também estão relacionados com micronúcleos (Risso-Pascotto *et al.*, 2003), entretanto essa anormalidade não foi observada na espécie. Isso sugere a ação do mecanismo de *check-point*, que atua, entre outros casos, quando há um atraso na divisão celular, onde, pelo menos, um cromossomo não apresenta o cinetócoro ligado à fibra do fuso. Nessa situação, as proteínas especializadas desse complexo emitem um sinal para a ativação do *check-point* até que a situação esteja normalizada. Assim, a eliminação dos cromossomos retardatários e posterior formação de micronúcleos podem ter sido impedidas, assim como descrito, também, por Dasmasceno Júnior *et al.* (2010).

Os cromossomos retardatários se caracterizaram por um cromossomo ou um grupo de cromossomos que não se encontram alinhados na placa equatorial, durante a metáfase I. Cromossomos retardatários não foram observados durante a meiose II, isso também sugere a ocorrência de *check-point* ou restituição nuclear (Souza *et al.*, 2003c). Para células meióticas, os *check-points* conhecidos são: G<sub>1</sub>/S, G<sub>2</sub>/M e um ponto adicional que impede a segregação dos cromossomos na meiose I, até que a recombinação esteja completa (Weinert,

1998). Kiihl *et al.* (2010) também observaram essa irregularidade em *P. alata*, *P. foetida*, *P. cincinnata* e *P. amethystina*, durante a meiose I e meiose II.

**Tabela 2** – Características avaliadas durante a meiose e a pós-meiose em *P. miniata* e *P. cristalina*.

| Característica                 | <i>P. miniata</i> | <i>P. cristalina</i> |
|--------------------------------|-------------------|----------------------|
| Cromossomo retardatário        | -                 | 16,73%               |
| Anormalidades na Fibra do Fuso | 35,89%            | 17,82%               |
| - Metáfase II                  | 9,69%             | 17,82%               |
| - Telófase II                  | 26,20%            | -                    |
| Assincronia na Divisão Celular | 8,61%             | 15,09%               |
| Total                          | 44,5%             | 49,64%               |
| Índice de Recombinação         | 21,6              | 18,76                |
| Índice Meiótico                | 91,6%             | 90,6%                |
| -tétrade                       | 916               | 906                  |
| -triade                        | 84                | 93                   |
| -díade                         | -                 | 1                    |
| Viabilidade Polínica           | 82,2%             | 98,9%                |

Os *check-points* que contribuem para manter as fibras do fuso são mecanismos evolucionários conservados em células mitóticas entre os organismos eucarióticos (Risso-Pascotto *et al.*, 2003). Os *check-point* mitóticos são mecanismos bem conhecidos e que, também, foram observados em células meióticas de *Zea mays* (Yu *et al.*, 1999).

Observou-se, no presente trabalho, a falta de sincronismo durante a meiose II nas duas espécies estudadas, apresentando um dos grupos cromossômicos em prófase, enquanto o outro grupo encontrava-se em metáfase (Fig. 3I). Assincronia é caracterizada quando a mesma célula apresenta duas fases distintas da divisão celular (Souza *et al.*, 2003c)

A irregularidade mais frequentemente observada, para ambas as espécies, foi a falta de orientação do fuso durante a meiose II (Fig. 2 J-L e 3 J-N), com as

células apresentando os grupos cromossômicos da mesma célula alinhados na placa equatorial de forma diferenciada, em forma de “T” (Fig. 2J e 3J). Isso caracteriza o chamado fuso transverso (Shamina, 2005; Souza e Pereira, 2011). Uma consequência dessa anormalidade é que, em células na telófase II, apresentam os grupos cromossômicos posição assimétrica (Fig. 3 M-N).

Alguns genes afetam a formação do fuso durante a meiose I (Shamina 2005; Shamina *et al.*, 1999) e na meiose II (Gloubovskaya, 1979). Essa anormalidade pode causar problemas na cariocinese e citocinese, gerando produtos pós-meióticos anormais, como díades, tríades e políades.

Apesar de sua importância, os estudos da frequência de quiasmas são raros em Passifloras (Souza *et al.*, 2008). O número de quiasmas é uma característica importante para a estabilidade meiótica, uma vez que são eles que previnem a separação precoce dos cromossomos, gerando univalentes e asseguram que os bivalentes são orientados para polos opostos. Os quiasmas são originários dos *crossing-over*, e são as regiões que mantêm os cromossomos homólogos unidos durante a prófase I (Sumner, 2003). Pode-se observar a ocorrência de bivalentes em bastão (“rod”) e em anel (“ring”). A observação dessas configurações proporcionou a obtenção do índice de recombinação (IR) das espécies, onde a ocorrência de pareamento tipo bastão caracteriza a formação de um quiasma, e o pareamento do tipo anel caracteriza a formação de dois quiasmas (Senda *et al.*, 2005). Sendo assim, o IR estimado para as espécies foi de 18,76, sendo calculado 9,76 quiasmas por célula para *P. cristalina*, e o índice de recombinação calculado para *P. miniata* foi de 21,6, apresentando 12,6 quiasmas por célula. Através do Teste F, foi constatado que esses valores são, estatisticamente, diferentes, com *P. miniata* apresentando um IR maior que *P. cristalina* (Tabela 3). Souza e Pereira (2011), ao analisar 14 espécies silvestres de passiflora, encontraram, para o grupo n=9, um IR que variou de 17,6 (*P. alata*) a 23,9 (*P. malaccolhyla*).

Um alto grau de pareamento cromossômico e a formação de quiasmas indicam homologia dos cromossomos ou de algumas regiões cromossômicas (Nikolova e Niemirowicz-szczytt, 1995), e a homologia cromossômica é um evento necessário para a formação dos quiasmas. Os quiasmas e *crossing-over*, geralmente, estão localizados em segmentos específicos do cromossomo, o que torna o padrão controlado geneticamente (Sybenga, 1999).

**Tabela 3** - Análise de variância para o índice de recombinação (IR), índice meiótico (IM) e viabilidade polínica (VP), considerando o efeito dos genótipos.

| FV          | IR |        |           | IM |       |                      | VP |         |          |
|-------------|----|--------|-----------|----|-------|----------------------|----|---------|----------|
|             | GL | QM     | F         | GL | QM    | F                    | GL | QM      | F        |
| Genótipos   | 1  | 201,64 | 165,889** | 1  | 2,5   | 0,8197 <sup>ns</sup> | 1  | 695,556 | 48,024** |
| Resíduos    | 98 | 1,215  |           | 8  | 3,05  |                      | 8  | 141,835 |          |
| Média Geral |    | 11,18  |           |    | 91,1  |                      |    | 90,56   |          |
| CV (%)      |    | 9,861  |           |    | 1,917 |                      |    | 4,202   |          |

FV – Fonte de variação; CV – Coeficiente de Variação; \*\* - Teste F significativo a 1% de significância ( $\alpha=99\%$ ).

Na espécie *P. miniata*, onde foi observado maior IR, não foram observados cromossomos retardatários (Tabela 2). Esse fato também foi observado por Souza e Pereira (2011), onde, em *P. alata*, apresentou-se IR de 17,7 e, conseqüentemente, menor frequência média de quiasmas (8,7), e se obteve alto percentual de cromossomos retardatários. *P. malacophylla* apresentou IR de 23,9 e frequência média de quiasmas por células (14,72). Os mesmos autores obtiveram menor porcentagem de cromossomos retardatários. No trabalho de Souza e Pereira (2011), *P. cincinnata* foi a única que não apresentou correlação entre alto IR e baixa porcentagem de cromossomos retardatários.

Entretanto, essas anormalidades não prejudicaram os resultados pós-meióticos das espécies, já que o índice meiótico de *P. miniata* e *P. cristalina* foi de 91,6% e 90,6%, respectivamente, considerados valores estatisticamente semelhantes (Tabela 3). As plantas que apresentam o índice meiótico entre 90 e 100% são consideradas citologicamente estáveis, não apresentando problemas em gerar progênie fértil. Na figura 3N, observa-se a única díade encontrada em 1000 células analisadas de *P. cristalina*. Foram observadas tríades em 8,4% das células de *P. miniata* (Fig. 3 O) e em 9.3% de *P. cristalina* (Fig. 2 O). A determinação do índice meiótico auxilia na verificação da regularidade meiótica; dessa forma, quanto maior é o valor do índice meiótico, mais regular é o comportamento meiótico da espécie (Love, 1951).

A viabilidade polínica de *P. miniata* foi de 82,2% e de *P. cristalina* foi de 98,9%. Esses valores são similares aos relatados por Souza *et al.* (2004b), que observaram viabilidades polínicas superiores a 90% para as espécies estudadas, exceto para *P. pentagona*, onde a viabilidade polínica foi de 78,22%. A fertilidade das plantas depende da regularidade meiótica, que pode ocorrer durante a

formação dos grãos de pólen, microsporogênese e microgametogênese (Souza *et al.*, 2004b).

Os resultados obtidos neste trabalho podem sugerir a correlação entre as anormalidades na fibra do fuso e a viabilidade polínica em *P. miniata*. Os produtos pós-meióticos irregulares e os consequentes grãos de pólen inviáveis podem estar sendo gerados a partir de células que apresentam essa anormalidade, uma vez que essas anomalias foram mais frequentes em *P. miniata* que em *P. cristalina*. A viabilidade polínica em *P. miniata* também foi, estatisticamente, menor que em *P. cristalina*, de acordo com a análise de variância (Tabela 3).

## 5.2. Tamanho de Genoma

A análise do conteúdo 2C de DNA nuclear por citometria de fluxo resultou em histogramas, contendo dois picos predominantes, correspondendo aos picos G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> das espécies estudadas e do padrão interno (Fig. 4) com coeficientes de variação (CV%), variando de 2,42% a 4,93%. De acordo com Marie e Brown (1993), o CV é um critério importante na validação da metodologia e definem valores entre 1 e 2 % para análises de alta qualidade e 3 % como um valor de rotina. No entanto, a literatura reporta que CVs menores que 5% são considerados valores satisfatórios (Galbraith *et al.*, 2002). Assim, pode-se considerar que os núcleos foram preparados adequadamente, não sofrendo danos significativos durante o procedimento metodológico.

Os valores obtidos do conteúdo de DNA nuclear e o tamanho do genoma estão apresentados na tabela 4.

Houve variação no conteúdo 2C de DNA nuclear de 2,69pg (*P. setacea*) a 3,87pg (*P. pentagona*). A variação do conteúdo 2C de DNA nuclear pode ocorrer tanto dentro da espécie como entre espécies. Considerando que as espécies aqui estudadas são todas diplóides, conforme a literatura reporta, essa variação não se deve ao nível de ploidia das espécies, nem às condições de cultivo, uma vez que foram germinadas em casa de vegetação, mas sim devido à variação que pode ser encontrada entre as espécies do mesmo gênero e, até, dentro da mesma espécie. Dentro do mesmo gênero, a variação pode estar associada à heterocromatina ou, até mesmo, a cromossomos extranumerários (Schifino-

Wittmann, 2001). Price (1988) mostrou que podem ocorrer diferenças de duas a três vezes entre espécies do mesmo gênero.

**Tabela 4** - Valores do conteúdo 2C de DNA em picogramas (pg), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV) e tamanho do genoma em Mega pares de base (Mpb) de cinco espécies silvestres de *Passifloras*.

| Espécies              | Subgênero  | Conteúdo 2C de DNA |        |       | Tamanho do genoma (Mpb <sup>2</sup> ) |
|-----------------------|------------|--------------------|--------|-------|---------------------------------------|
|                       |            | pg                 | (±) DP | CV(%) |                                       |
| <i>P. pentagona</i>   | Astrophea  | 3,87A <sup>1</sup> | 0,079  | 4,38  | 3.784,86                              |
| <i>P. coccinea</i>    | Passiflora | 3,32B              | 0,037  | 4,33  | 3.246,96                              |
| <i>P. miniata</i>     | Passiflora | 3,16C              | 0,053  | 4,88  | 3.090,48                              |
| <i>P. morifolia</i>   | Decaloba   | 2,77D              | 0,007  | 2,42  | 2.709,06                              |
| <i>P. setacea</i>     | Passiflora | 2,69D              | 0,008  | 4,93  | 2.630,82                              |
| <b>Valores médios</b> |            | 3,16               | -      | -     | 3.092,44                              |
| <i>P. edulis</i>      | Passiflora | 3,19 <sup>3</sup>  | -      | -     | 3126                                  |

<sup>1</sup>/Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ )

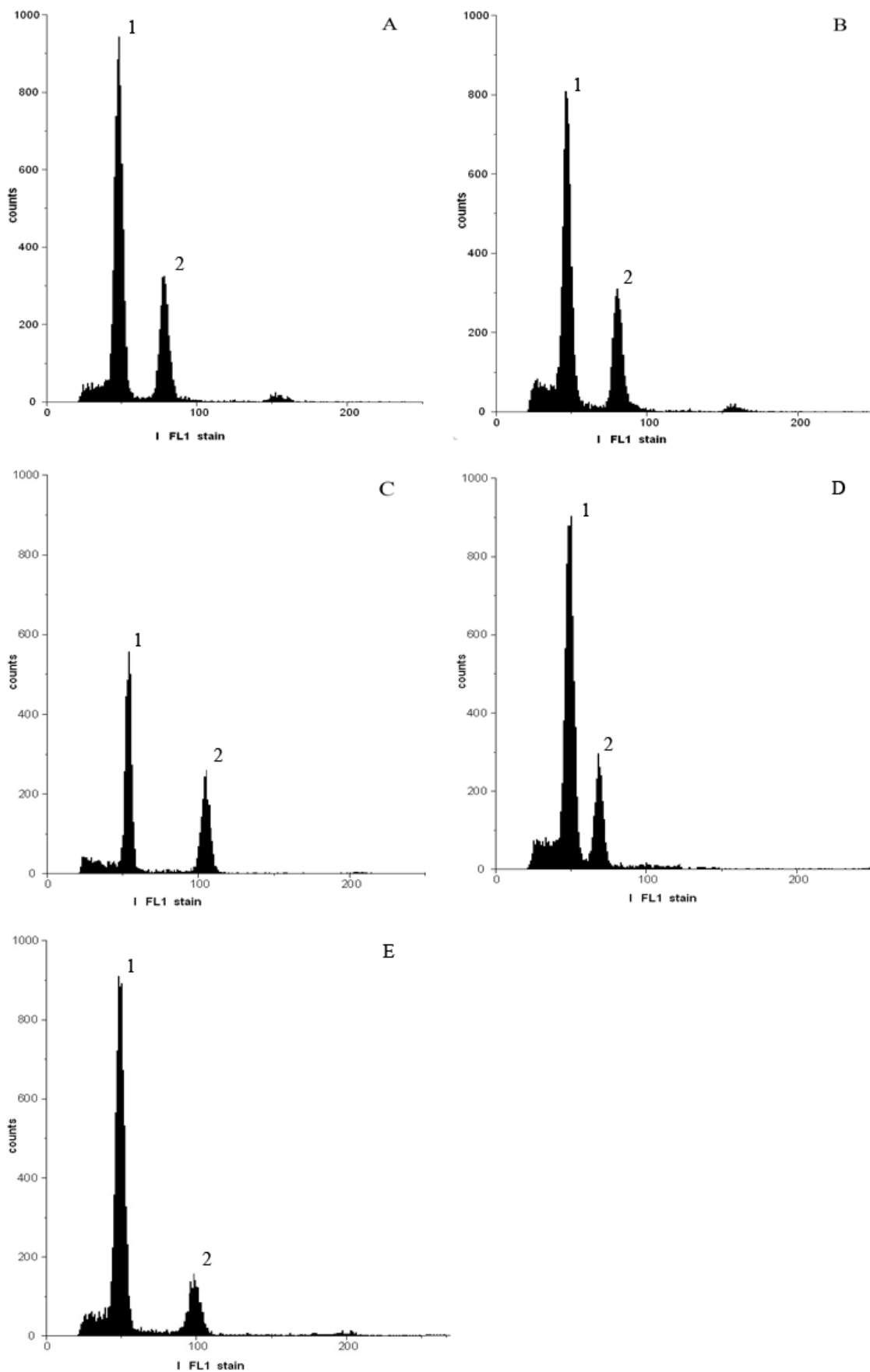
<sup>2</sup> 1pg=978Mpb (Doležel *et al.*, 2003).

<sup>3</sup> Valor obtido por Souza *et al.* (2004a)

Pelo resultado da análise de variância, há diferenças, quanto ao conteúdo de DNA nuclear, entre as espécies estudadas. Sendo assim, as médias (em pg) foram comparadas pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ), permitindo a diferenciação em quatro grupos: *P. pentagona* (3,87pg); *P. coccinea* (3,32pg); *P. miniata* (3,16pg); e *P. morifolia* (2,77pg) e *P. setacea* (2,69pg). Em termos médios, as espécies apresentaram conteúdo 2C de DNA igual a 3,16pg.

O maracujazeiro amarelo apresenta um conteúdo de DNA de 3,19pg, o que corresponde a 3.126 Mpb (mega pares de base) (Souza *et al.*, 2004a). Assim, a média do conteúdo 2C de DNA das espécies silvestres, aqui analisadas, possui valores similares à forma cultivada, indicando similaridade entre os tamanhos do genoma.





**Figura 4** – Histogramas das espécies de *Passiflora* (pico 1) e *Zea mays* (pico 2)  
**A)** *P. coccinea*; **B)** *P. miniata*; **C)** *P. morifolia*; **D)** *P. pentagona*; **E)** *P. setacea*.

Yotoko *et al.* (2011), analisando 36 espécies do subgênero *Passiflora*, observaram que a variação do tamanho do genoma (1C) está correlacionada, positivamente, com o diâmetro da flor, sendo *P. alata* a espécie com maior conteúdo de DNA (1C=2,208pg) e maior diâmetro floral (12,52 cm), enquanto *P. palmeri* teve o menor conteúdo médio (1C= 0,263pg) e o menor diâmetro floral (3,81cm). *P. morifolia*, que pertence ao subgênero *Decaloba*, no presente trabalho, apresentou média de conteúdo 2C de DNA igual a 2,77pg, bem diferente da média encontrada por Yotoko *et al.* (2011), que observaram, para 14 espécies desse subgênero, um conteúdo médio 1C de DNA igual a 0,413pg (2C=0,826pg) com uma variação dentro do subgênero de 0,212pg (*P. organensis*; 2C=0,424pg) a 0,993pg (*P. auriculata*; 2C=1,989pg). Souza *et al.* (2013), trabalhando com *P. trintae*, uma passiflora de fores vermelhas, nativa da Bahia, encontraram um valor 2C igual a 2,23pg.

O tamanho do genoma 2C estimado variou de 2.630,82 a 3.784,86 Mpb, isso gera 43,88% de variação entre os genótipos estudados (Tabela 4). Neste trabalho, foram observados valores de tamanho do genoma em espécies de *Passiflora*, em picogramas e em Mpb, semelhantes aos valores encontrados por Souza *et al.* (2004a). Esses valores foram de 846 – 3842 Mpb, com variação de 69.6% entre as espécies diplóides estudadas, e, com isso, pôde-se concluir haver variação significativa entre esses genótipos.

Espécies de angiospermas com valor 1C de DNA nuclear menor ou igual a 3,5 pg (2C = 7pg) são tidas como espécies de genoma pequeno (Leitch *et al.*, 1998). Dessa forma, as espécies estudadas possuem um genoma considerado pequeno, uma vez que o valor médio foi de 3,16pg (2C). O tamanho do genoma em plantas varia de menos de 1pg a muitas centenas de picogramas, como exemplo *Arabidopsis thaliana*, que possui o valor 2C de 0,2pg e *Fritilaria assyriaca* com 127,4pg (Bennet e Leitch, 1997), tendo como tendência ser uma característica do táxon (Bennet *et al.*, 2000).

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

1. As duas novas espécies *P. miniata* e *P. cristalina*, ambas pertencentes ao gênero *Passiflora*, apresentam  $x=9$ , sendo, portanto, duas novas espécies diplóides do gênero com  $2n=2x=18$  cromossomos;
2. A meiose de ambas as espécies foi, de um modo geral, normal, apesar das irregularidades observadas, porém as duas espécies são silvestres e estão, ainda, no processo de domesticação.
3. Apesar das duas espécies apresentarem um percentual alto de irregularidades meióticas (44,5% e 49%), as mesmas apresentaram um bom índice meiótico e de viabilidade polínica, indicando que algum evento de *check point* deve ter ocorrido durante a divisão celular;
4. Houve variação no tamanho do genoma das cinco espécies estudadas, sendo *P. pentagona* a de maior conteúdo 2C de DNA e a *P. setaceae* a de menor conteúdo 2C de DNA.
5. Em termos médios, o genoma das espécies foi de 3.092,44 Mpb, o que pode-se considerar como um genoma de tamanho pequeno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, P. P., Souza, M. M., Santos, E. A., Pires, M. V., Pires, M. M., Almeida, A. A. F. (2009) Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant Market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brasil. *Euphytica*. 166: 307-315.
- Alexander, M. P. (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technology*. 44: 117–122.
- Amorim, J. S. (2009) *Caracterização citogenética, molecular, morfológica e reprodutiva de Passiflora capsularis LINN e Passiflora rubra LINN*. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Ilhéus – BH, Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC. 100p.
- Arumuganathan, K; Earle, E. D. (1991) Nuclear DNA content of Some Important Plant Species. *Plant Molecular Biology Reporter*. 9(3): 208 – 218.
- Azevedo, A. S. de, Pereira, T. N. S., SOUZA, S. A. M. (2011) Análise do comportamento meiótico em *Passiflora organensis* GARDN. V CONFICT Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica. Acessado em 21/08/2013  
<http://www.essentiaeditora.iff.edu.br/index.php/confict/article/view/3070>

- Barbosa, L. V., Vieira, M. L. C. (1997) Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener + *P. amethystine* Mikan. *Euphytica*. 98: 121 – 127.
- Battistin, A., Biondo, E., Coelho, L. G. M. (1999) Chromosomal characterization of three native and one cultivated species of *Lathyrus* L. in southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 22(4): 557 – 563.
- Battistin, A., Conterato, I. F., Pereira, G.M., Pereira, B. L., Da Silva, M. F. (2006) Biologia floral, microsporogênese e número cromossômico em cinco espécies de plantas utilizadas na medicina popular no Rio Grande do Sul. *Ver. Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Botucatu. 8(3): 56 – 62.
- Bennett, M. D., Leitch, I. J. (1995) Nuclear DNA amount in angiosperms. *Annals of Botany*. 76: 113 – 176.
- Bennet, M. D., Leitch, I. J. (1997) Nuclear DNA amounts in angiosperms: 583 new estimates. *Annals of Botany*. 80:2,169 – 196.
- Bennet, M. D., Bhandol, P., Leitch, I. J. (2000) Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses – 807 new estimates. *Annals of Botany*. 86: 859 – 909.
- Bernacci, L. C., Soares-Scott, M. D., Junqueira, N. T. V., Passos, I. R. S.; Meletti, L. M. M. (2008) *Passiflora edulis* SIMS: The correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal. 30(2): 566 – 576.
- Bertão, M. R. (1993) *Evolução cariotípica no gênero Capsicum (Solanaceae)*. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Piracicaba – SP, Universidade de São Paulo – USP. 79p.
- Besendorfer, V., Samardzija, M., Zoldos, V., Solic, M.E., Papes, D. (2002) Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss. (Alliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 139: 99 – 108.

- Bruckner, C. H., Meletti, L. M. M., Otoni, W. C., Zerbini Junior, F. M. (2002) Maracujazeiro. In: BRUCKNER, C. H. Melhoramento de fruteiras tropicais. Viçosa: UFV, 373 – 409p.
- Bruckner, C. H., SUASSUNA, TMF; REGO, MM; NUNES, ES. (2005) Auto-incompatibilidade do maracujá: implicações no melhoramento genético. In: FALEIRO, FG; JUNQUEIRA, NTV; BRAGA, MF. *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Embrapa Cerrados, Planaltina, 315 – 338p.
- Bugalho, V., Cardone, S., Pannunzio, M. J., Facciuto, G. (2011) Breeding Advances in *Passiflora* spp. (Passionflower) Native to Argentina. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*. 5(1): 23 – 34.
- Caetano, C. M., d'Eeckenbrugge, G. C., Olaya, C. A., Jimenez, D. R., Veja, J. (2003) Spindle absence in *Vasconcellea cundinamarcensis* (Caricaceae). *The Nucleus*, 46(3): 86 – 89.
- Cervi, A. C. (1997) Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. *FontQuerria*. 45: 1 – 92.
- Coelho, M. S. E. (2009) Caracterização citogenética e *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* DEG., *P. cincinnata* MAST. e seu híbrido interespecífico. Tese (Mestrado em Agronomia) – Areia – PB, Universidade Federal da Paraíba. Areia. 80p.
- Colombo, P. C. (1992) A new index for estimating genetic recombination from chiasma distribution data. *Heredity*. 69:412 – 415.
- Consolaro, M. E., Pagliarini, M. S., Chaves, L. J. (1996) Meiotic behavior, pollen fertility and seed production in Brazilian populations of *Centella asiatica* (L.) Urban (Umbelliferae). *Cytologia*, Tokyo, 61:375 – 381.
- Côrte-Real, M., Sansonetty, F., Ludovico, P., Prudêncio, C., Rodrigues, F., Fortuna, M., Sousa, M., Silva, M., Leão, C.(2002) Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. *Boletim de Biotecnologia* 71: 19 – 33.

- Costa, A. F. S. (2008) *Recomendações técnicas para o cultivo do maracujazeiro*. Vitória: Incaper, 56p. (Documentos, 162).
- Costa, A. M., Tupinambá, D. D. (2005) O maracujá e suas propriedades medicinais – estado da arte. In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. (eds.) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 475 – 508p.
- Cruz, T. V., Souza, M. M., Roza, F. A., Viana, A. J. C., Belo, G. O., Fonseca, J. W. S. (2008) Germinação in vitro de grãos de pólen em *Passiflora suberosa* L. para sua utilização em hibridação interespecífica. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal – SP. 30 (4): 875 – 879.
- Cunha, M. A. P., Barbosa, L. V., Junqueira, N. T. V. (2002) Espécies de maracujazeiro. In: Lima, A. A. (ed.) *Maracujá Produção: aspectos técnicos*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. 104 p. (Embrapa Informação Tecnológica. Frutas do Brasil; 15).
- Dafni A. (1992) *Pollination Ecology: A Practical Approach (practical approach series)*. Oxford University Press. USA.
- Damasceno Júnior, P. C., Pereira, T. N. S., Freitas Neto, M., Pereira, M. G (2010) Meiotic behavior of *Carica papaya* and *Vasconcellea monoica*. *Caryologia*. 63 (3): 229 – 236.
- Darlington, C. D. (1958) *Evolution of genetic systems*. London: Oliver and Boyd.
- d'Eeckenbrugge, G. C. (2003) Exploração da diversidade genética de Passifloras (CD) – In: *Simpósio Brasileiro sobre a Cultura do Maracujazeiro, 6.*, Campos dos Goytacazes: UENF.
- Defani-Scoarize, M. A., Pagliarini, M. S., Aguiar, C. G. (1996) Meiotic behavior of inbred lines of maize (*Zea mays* L.). *Nucleus*. 39: 10 – 18.
- Doležel, J. (1991) Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis* . 2: 143 – 154.

- Doležel, J., Göhde, W. (1995) Sex Determination in Dioecious Plants *Melandrium album* and *M. rubrum* Using High-Resolution Flow Cytometry. *Cytometry*. 19: 103 – 106.
- Doležel, J. (1997) Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics*. 38(3): 285 – 302.
- Doležel, J., Bartoš, J., Voglmayr, H., Greilhuber, J.(2003) Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry*. 51: 127–128.
- Doležel, J., Bartoš, J. (2005) Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany*. 95: 99 – 110.
- Escobar, L. K. (1994) Two New species and a Key to *Passiflora* subg. *Astrophea*. *Systematic Botany*. 19(2): 203 – 210.
- Embrapa. 2013. BRS Pérola do Cerrado. Cultivar de maracujazeiro silvestre com quádrupla aptidão: consumo in natura, processamento industrial, ornamental e funcional. Acessado em 14/04/2014:  
<http://www.cpac.embrapa.br/publico/usuarios/uploads/lancamentoperola/foldertecnico.pdf>
- Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F., Peixoto, J. R. (2005) Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – Desafios da pesquisa. In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. (eds.). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Embrapa Cerrados, p.187 – 209.
- Ferreira, A. G. (2005) Recursos genéticos de Passiflora. In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V; Braga, M. F. (eds.). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Embrapa Cerrados, p.41 – 50.
- Ferreira, F. R. (1994) Germoplasma de Passiflora no Brasil. In: São José, A.R. (ed.) *Maracujá: produção e mercado*. UESB, Vitória da Conquista, BA. pp. 24 - 26.
- Ferreira, R. T. (2013) Melhoramento Intrapopulacional do Maracujazeiro Amarelo (*Passiflora edulis* Sims) Via Seleção Recorrente e Modelos Mistos. Tese



(Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 119p.

Feuillet, C. (2002) A new series and three new species of *Passiflora* subgenus *Astrophea* from the Guianas. *Brittonia*. 54(1): 18 – 29.

Feuillet, C., MacDougal, J. M. (2003) A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Passiflora* 13: 34 – 38.

Feuillet, C., MacDougal, J. M. (2007) Passifloraceae. In: Kubitzki, K. (ed.) The families and genera of vascular plants. *Springer*, Berlin

Fischer, I. H. (2003) Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da “morte prematura” do maracujazeiro, causada por *Nectria hematococca* e *Phytophthora pasitica*. Tese (Mestrado em Agronomia) – Piracicaba – SP, Universidade de São Paulo (USP). 48p.

Flavell, R. B. (1986) Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B*. 312: 227 – 242.

Galbraith, D., Lambert, G., Macas, J., Doležel, J. (2002). Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. . In: Robinson, J., Azmi, A., Tutois, S. (eds) Current Protocols in cytometry. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Ganga, R. M. D., Ruggiero, C., Lemos, E. G. M., Grili, G. V. G., Gonçalves, M. M., Chagas, E. A., Wickert, E. (2004) Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares AFLP. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 26: 494 – 498.

Gilani, A. H., Rahman, A. U. (2005) Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethno-Pharmacology*. 100: 43 – 49.

Gloubovskaya, I. N. (1979) Genetic control of meiosis. *International Review of Cytology*. 58: 247 – 290.

Greilhuber, J. (1998) Intraspecific variation in genome size: a critical reassessment. *Annals of Botany*. 82 (Suppl. A): 27 – 35.

- Guerra, M., Pedrosa, A., Silva, A. E. B., Cornélio, M. T. M., Santos, K., Soares-Filho, W.S. (1997) Chromosome number and secondary constriction variation in 51 acessions of a Citrus germoplasm bank. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, Brasil, 20: 489 – 496.
- Gupta, P.K., Priyadarshan, P. M. (1987) Analysis of meiosis in triticales (Triticosecale X Wittmack) X rye (*Secale cereale* L.) F1 hybrids at three ploidy levels. *Theoretical and Applied Genetics*. 73: 893 – 898.
- Hajjar, R., Hodgkin, T. (2007) The use of wild relative in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*. 156 (1-2): 1 – 13.
- Hallauer, A. R. (1971) Changes in genetic variance for seven plant and traits after four cycles of reciprocal recurrent selection for yield in maize. *Iowa State Journal Science*. 45: 575 – 593.
- Hansen, A. K., Lawrence, G., Simpson, B. B., Downie, S. R., Stephen, R., Cervi, A. C., Jansen, R. K. (2006) Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. *Systematic Botany*. 31: 138 – 150.
- IBGE. (2012) *Produção brasileira de maracujá em 2010*. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Acessado em 17/01/2014 - [http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Maracuja\\_Brasil\\_2012.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Maracuja_Brasil_2012.pdf)
- Jong, J. H., Wolters, A. M. A., Kok, J. M., Verhaar, H., Van Eden, J. (1993) Chromosome pairing and potential for intergeneric recombination in some Hypotetraploid somatic hybrids of *Lycopersicon esculentum*, *Solanum tuberosum*. *Genome*, 36: 1032 – 1041.
- Junqueira, N. T. V., Braga, M. F., Faleiro, F. G., Peixoto, J. R., Bernacci, L. C. (2005) Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, FG; JUNQUEIRA, TNV; BRAGA, MF. (eds) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. 1ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 81-108p.
- Junqueira, N. T. V., Lage, D. A. C., Braga, M. D., Peixoto, J. R., Borges, T. A., Andrade, S. R. M. (2006) Reação a doenças e produtividade de um clone de maracujazeiro-azedo propagado por estaquia e enxertia em estacas herbáceas

de passiflora silvestre. *Revista Brasileira Fruticultura*, Jaboticabal. 28(1): 97-100.

- Junqueira, K. P., Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Bellon, G., Ramos, J. D., Souza, L. S., Santos, E. C. (2007) Obtenção de híbridos interespecíficos de *Passiflora laurifolia* L. e *Passiflora nítida* Kunth. In: 4º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, São Lourenço. *Anais do 4º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas*. São Lourenço: UFLA. CD-ROM.
- Kaul, M. L. H., Murthy, T. G. K. (1985) Mutant genes affecting higher plants meiosis. *Theoretical and Applied Genetics*. 70: 449 – 466.
- Kiihl, P. R. P., Barragan, M. F., Santos, S. P., Godoy, S. M., Alonso-Pereira, A. R., Stenzl, N. M. C., Riso-Pascotto, C. (2010). Abnormal behavior of spindle during microsporogenesis of *Passiflora* (Passifloraceae). *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*. Umuarama. 14: 237 – 243.
- Kiihl, P. R. P., Pereira, A. R. A., Godoy, S. M., Stenzel, N. M. C., Riso-Pascotto, C. (2011). Chromosome stickiness during behavior analysis of *Passiflora serrato-digitada* L. (PASSIFLORACEAE). *Ciência Rural*, Santa Maria. 41(6): 1018 – 1023.
- Killip, E. P. (1938) *The American species of Passifloraceae*. Field Museum of Natural History Publications, Botanical Series 19: 1 – 613.
- Koella J. C. (1993) Ecological correlates of chiasma frequency and recombination index of plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, 48: 227-238.
- Leitch, I. J., Chase, M. W., Bennett, M. D. (1998) Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Annals of Botany*. 82: 85 – 94.
- Leister, D., Ballvora, A., Salamini, F., Gebhardt, C. (1996) A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genetics*. 14: 421 – 429.
- Lim, T. K. (2012) *Passiflora miniata*. *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants: Volume 4, Fruits*. 178 – 180p.

- Lysak, M. A., Doležel, J. (1998) Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). *Caryologia*. 52: 123 – 132.
- Lopes, S. C. (1991) Citogenética do maracujá. In: São José, A. R. (ed.) *A cultura do maracujá no Brasil*. Funep, Jaboticabal. 201-209p.
- Loureiro, J. C. M. (2007) Flow Cytometric Approaches to Study Plant Genomes. Tese. (Doutorado em Biologia) – Universidade de Aveiro.
- Love, R. M. (1951) Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. *Agronomy Journal*, 43: 72 – 76.
- MacDougal, J. M. (2001) Two new species of Passionflower (*Passiflora*, Passifloraceae) from southwestern Mexico. *Novon*. 11: 69 – 75.
- MacDougal, J. M., Feuillet, C. (2004) Systematics. In: Ulmer, T., MacDougal, J. M. (eds) *Passiflora: Passionflowers of the World*. Portland, Timber Press. 430p.
- Marie, D., Brown, S. C. (1993). A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*. 78: 41–51.
- Martinez-Perez, E., Moore, G. (2008). To check or not to check? The application of meiotic studies to plant breeding. *Current Opinion in Plant Biology*. 11: 222 – 227.
- McCouch, S., Baute, G. J., Bradeen, J., Bramel, P., Bretting, P. K., Buckler, E., Burke, J. M., Charest, D., Cloutier, S., Cole, G., Dempewolf, H., Dingkuhn, M., Feuillet, C., Gepts, P., Grattapaglia, D., Guarino, L., Jackson, S., Knapp, S., Langridge, P., Lawton-Rauh, A., Lijua, Q., Lusty, C., Michael, T., Myles, S., Naito, K., Nelson, R. L., Pontarollo, R., Richards, C. M., Riesiberg, L., Ross-Ibarra, J., Rounsley, S., Hamilton, R. S., Schurr, U., Stein, N., Tomooka, N., Van Der Knaap, E., Van-Tassel, D., Toll, J., Valls, J., Varshney, R. K., Ward, J., Waugh, R., Wenzl, P., Zamir, D. (2013) Agriculture: Feeding the future. *Nature*. 499 (7456): 23 – 24.
- Meletti, L. M. M., Bruckner, C. H. (2001) Melhoramento genético. In: Bruckner, C. H., Picanço, M. C. (eds). *Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, Mercado*. Porto Alegre: Cinco continentes, p. 345 – 385.

- Meletti, L. M. M., Bernacci, L. C., Soares-Scott, M. D., Filho, J. A. A., Martins, A. L. M. (2003) Variabilidade Genética em Caracteres Morfológicos, Agronômicos e Citogenéticos de Populações de Maracujazeiro-Doce (*Passiflora alata* Curtis). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal – SP. 25(2): 275 – 278.
- Meletti, L. M. M., Soares-Scott, M. D., Bernacci, L. C., Passos, I. R. S. (2005) Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. (eds.) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 55 – 78p.
- Meletti, L. M. M. (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira Fruticultura*. Jaboticabal. 33: 83 – 91.
- Melo, N. F., Guerra, M. (2003) Variability of the 5S and 45S rDNA Sites in Passifloraceae L. Species with Distinct Base Chromosome numbers. *Annals of Botanical*. London. 92: 309 – 316.
- Mezard, C. (2006) Meiotic recombination hotspots in plants. *Biochemical Society Transactions*. 34(part 4).
- Milward-De-Azevedo, M. A., Baumgratz, J. F. A. (2004) *Passiflora* L. subgênero decaloba (DC.) Rchb. (Passifloraceae) na Região Sudeste do Brasil. *Rodriguésia*. 55(85): 17 – 54.
- Muschner, V. C., Zamberlan, P. M., Bonatto, S. L., Freitas, L. B. (2012) Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology*. 35: 1036 – 1043.
- Nass, L. L., Valois, A. C. C., Melo, I. S. De., Valadares-Ingliš, M. C. (2001) Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 1183p.
- Nikolova, V., K. Niemirowicz-Szczytt, (1995) Evaluation of meiosis in cucumber (*Cucumis sativus* L.) monohaploids. *Caryologia* 48: 3 – 4.
- Nunes, E. S. (2008) Pesquisas atuais em genética, Citogenética, Evolução e Melhoramento de Espécies Cultivadas de *Passiflora*. Seminários em Genética e Melhoramento de Plantas. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Acessado em 19/08/2013:

<http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/ESNunes-200801-Resumo.pdf>

Nunes, T. S., Queiroz, L. P. (2006) Flora da Bahia: Passifloraceae. *Sitientibus. Série Ciências Biológicas*. 6(3): 194 – 226.

Nunes, T. S., Queiroz, L. P. (2007) Uma nova espécie de *Passiflora* L. (Passifloraceae) para o Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 21(2): 499 – 502.

Nunez, R. (2001) Flow Cytometry: Principles and Instrumentation. *Current Issues in Molecular Biology*. 3: 39 – 45.

Pagliarini, M. S. (2000) Meiotic behavior of economically important plant species: The relationship between fertility and male sterility. *Genetics and Molecular Biology*. 23(4): 997 – 1002.

Pagliarini, M. S., Pozzobon, M. T. (2004) *II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais*. EMBRAPA CENARGEN – DF.

Paula, M. S., Fonseca, M. E. N., Boiteux, L. S., Peixoto, J. R. (2010) Caracterização genética de espécies de *Passiflora* por marcadores moleculares análogos a genes de resistência. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 32(1): 222 – 229.

Peixoto, M. (2005) Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. (eds) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina: Embrapa Cerrados. 457-463p.

Praça-Fontes, M. M., Mendonça, M. A. C., Carvalho, C. R. (2011) Estudo dos cromossomos do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) com palicação de ferramentas citogenéticas. In: XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, XV INIC, VINIC Jr. As contribuições para a Sustentabilidade do Planeta, São José dos Campos – SP.

Price, H. J. (1988) DNA content variation among higher plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 75: 1248 – 1257.

- Price, H. J., Johnston, J. S. (1996) Methods of genome analysis in plants. In: *Analysis of plants DNA content by Feulgen microspectrophotometry and flow cytometry*. 1<sup>st</sup> ed. CRC Press LLC. Florida, USA.
- Raven, P. H. (1975) The bases of Angiosperm Phylogeny: Cytology. *Annals of the Missouri Botanic Garden*. 62: 724 – 764.
- Reis, R. V., Oliveira, E. J., Viana, A. P., Pereira, T. N. S. (2011) Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro-amarelo detectada por marcadores microssatélites. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 46: 51 – 57.
- Risso-Pascotto, C., Pagliarini, M. S., Valle, C. B. (2003). Mutation in the spindle checkpoint arresting meiosis II in *Brachiaria ruziziensis*. *Genome*. 46: 724 – 728.
- Sakalem, M., Negri, G., Tabach, R. (2012) Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(6): 1219 – 1232.
- Santos, E. A., Souza, M. M., Abreu, P. P., Da Conceição, L. D. H. C. S., Araújo, I. S., Viana, A. P., Almeida, A-A. F. (2011) Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. *Euphytica*, 184(3): 389 – 399.
- Santos, E. A. (2013) Melhoramento do Maracujazeiro-Azedo (*Passiflora edulis* Sims) Visando À Resistencia ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 178p.
- Schifino-Wittmann, M. T. (2001) Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. *Ciência Rural*. 31(5): 897 – 902.
- Senda, T., Hiraoka, Y., Tominagaa, T. (2005) Cytological affinities and infertilities between *Lolium temulentum* and *L. persicum* (Poaceae) accessions. *Hereditas*. 142: 45 – 50.

- Shamina, N. V., Dorogava, N., Goncharov, N., Orlova, A., Trunova, S. (1999) Abnormalities of spindle and cytokine behavior leading to the formation of meiotic restitution nuclei in intergeneric cereal hybrids. *Cell Biology International*. 23: 863 – 870.
- Shamina, N. V. (2005) A catalogue of abnormalities in the division spindles of higher plants. *Cell Biology International*. 29: 384 - 391.
- Shi, L., Zhu, T., Keim, P. (1996) Ribosomal RNA genes in soybean and common bean: chromosomal organization, expression and evolution. *Theoretical and Applied Genetics*. 93: 136-141.
- Silva, M. G. M. (2009) Seleção Secorrente Intrapopulacional no Maracujazeiro Amarelo (*Passiflora edulis* Sims). Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 157p.
- Silva, M. G. M., Viana, A. P., Amaral Júnior, A. T., Gonçalves, L. S. A., Reis, R. V. (2012) Biometria aplicada ao melhoramento intrapopulacional do maracujazeiro amarelo. *Revista Ciência Agronômica*. 43(3): 493 – 499.
- Silveira, G. F. da (2012) Sistema reprodutivo de duas espécies de *Passiflora* nativas da Amazônia Meridional. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Alta Floresta – MT, Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT, 40p.
- Singh, R. J. (2002) *Plant cytogenetics*. 2ª ed. CRC Press.
- Souza, J. S. I., Meletti, L. M. M. (1997) Maracujá: espécies, variedades, cultivo. Piracicaba: FEALQ. 179p.
- Souza, M. M. (2002) Estudos genômico e reprodutivo em espécies de *Passiflora*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 162p.
- Souza, M. M., Pereira, T. N. S., Martins, E. R. (2003a) *Passifloras* como plantas ornamentais. In: *Anais do Congresso Brasileira de Floricultura e Plantas*



*ornamentais, 14., congresso brasileiro de cultura de tecidos de plantas*. Lavras, UFLA/FAEPE. p.24.

- Souza, M. M., Pereira, T. N. S., Silva, L. C., Reis, D. S. S., Sudré, C. P. (2003b) Karyotype of Six *Passiflora* Species Collected in the State of Rio de Janeiro. *Cytologia*. 68(2): 165 – 171.
- Souza, M. M., Pereira, T. N. S., Viana, A. P., Pereira, M. G., Bernacci, L. C., Sudré, C. P., Silva, L. C. (2003c). Meiotic irregularities and pollen viability in *Passiflora edmundoi* Sacco (Passifloraceae). *Caryologia*. 56(2): 161 – 169.
- Souza, M. M., Palomino, G., Pereira, T. N. S., Pereira, M. G., Viana, A. P. (2004a) Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species. *Hereditas*. 141: 31 – 38.
- Souza, M. M., Pereira, T. N. S., Viana, A. P., Silva, L. C. (2004b) Pollen viability and fertility in wild and cultivated *Passiflora* species (Passifloraceae). *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*. 73: 359 – 376.
- Souza, M. M., Pereira, T. N. S., Vieira, M. L. C. (2008) Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasizing Brazilian species. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 51(2): 247 – 258.
- Souza, M. M., Pereira, T. N. S. (2011) Meiotic behavior in wild and domesticated species of *Passiflora*. *Revista Brasileira de Botânica*. 34(1): 63 – 72.
- Souza, A. M., Pereira, M. R., Viccini, L. F., Oliveira, A. C. (2013) 2C DNA content of 'red passionflower' (*Passiflora trintae* Sacco; Passifloraceae). In: Resumos do 59º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia, SP.
- Sumner, A. T. (2003) Chromosomes - organization and function. Blackwell Publishing, North Berwick, UK.
- Sybenga, J. (1999) What makes homologous chromosomes find each other in meiosis? A review and a hypothesis. *Chromosoma*. 108: 209 – 219.
- Techio, V. H., Davide, L. C., Pereira, A. V. (2005) Genomic analysis in *Pennisetum purpurum* X *P. glaucum* hybrids. *Caryologia*. 58: 28 – 33.

- Ulmer, T., MacDougal, J. M. (2004) *Passiflora: Passionflowers of the World*. Portland-Cambridge: Timber Press. 430p.
- Vanderplank, R. J. R. (2000) *Passion flowers*. 3<sup>a</sup>ed. Cambridge: The MIT Press. 224p.
- Vanderplank, R. J. R. (2006) 562. PASSIFLORA MINIATA *Passifloraceae*. *The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew*.
- Vanderplank, R. J. R. (2007) There are... lies, damned lies and statistics. A statistical look at the genus *Passiflora*. *Passiflora* 17: 14 – 15.
- Vanderplank, R. J. R., Zappi, D. 2011. *Passiflora cristalina*, a striking new species of *Passiflora* (Passifloraceae) from Mato Grosso, Brazil. *Curtis's Botanical Magazine*. 66: 149 – 153.
- Viana, A. J. C., Corrêa, R. X., Araújo, I. S., Souza, M. M. (2008) Cariótipo comparado entre duas espécies de *Passiflora* L. *Resumo do 54º Congresso Brasileiro de genética*. Acessado em 20/01/2014: <http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/pdfs2008/23229.pdf>
- Viana, A. P., Pereira, T. N. S., Pereira, M. G., Souza, M. M., Maldonado, J. F. M., Amaral Júnior, A. T. (2003) 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. 25(3): 489 – 493.
- Viana, A. P., Gonçalves, G. M. (2005) Genética quantitativa aplicada ao melhoramento genético do maracujazeiro. In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F.(eds). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. 1 ed. Brasília: EMBRAPA. 1: 277 – 294.
- Weinert, T. (1998). DNA damage checkpoints update: getting molecular. 1998. *Current Opinion in Genetics & Development*. 8: 185 – 193.
- Yanpaisan, W., King, N. J. C., Doran, P. M. (1999) Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. *Biotechnology Advances*. 17: 3 – 27.

- Yockteng, R., D'Eeckenbrugge, G. C., Souza-Chies, T. T. (2011) Passiflora. In: Kole, C. (ed). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources - Tropical and Subtropical Fruits*.129 – 171p.
- Yotocko, K. S. C., Dornelas, M. C., Togni, P. D., Fonseca, T. C., Salzano, F. M., Bonatto, S. L., Freitas, L. B. (2011) Does Variation in Genome Sizes Reflect Adaptive or Neutral Processes? New Clues from Passiflora. *PLoS ONE*. 6(3): e18212.