

Citogenética comparativa em nove cultivares de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims)

Comparative cytogenetics in nine cultivars of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims)

Jonathan Andre Morales MARROQUÍN¹; Margarete Magalhães SOUZA²; Gonçalo Santos SILVA³; Cláudio Antônio Ferreira de MELO⁴; Viviane de Oliveira SOUZA⁵; Rita de Cássia Vital SANTOS-SANCHÊS⁶

¹ Mestre; Universidade Estadual de Santa Cruz; jmorales1089@gmail.com

² Autora para correspondência. Doutora; Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Biológicas, Rod. Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA, CEP 45662-900; souzamagg@yahoo.com.br

³ Doutor; Universidade Estadual de Santa Cruz; goncaloss21@yahoo.com.br

⁴ Doutor; Universidade Estadual de Santa Cruz; clausiomelo@gmail.com

⁵ Doutora; Universidade Estadual de Santa Cruz; vivi_agr@hotmail.com

⁶ Doutora; Universidade Estadual de Santa Cruz; ritabiologa@yahoo.com.br

Recebido em: 14-04-2021; Aceito em: 21-03-2022

Abstract

Nine commercial cultivars of *Passiflora edulis* were analyzed for karyotypes. Karyotype analyzes in accessions and cultivars of the genus *Passiflora* have helped to understand the interespecific variability both for the genetic improvement and for the production by hybridization to obtain promising plants within the genus. The aim of this study was to understand the intraespecific karyotype variability and its diversification through classic and molecular cytogenetic techniques. Conventional staining with 4% Giemsa was used for conventional karyotype analysis and *fluorescent in situ hybridization* (FISH) was used to locate 45S and 5S rDNA sites. All cultivars were diploid, with chromosome number $2n = 18$. Significant difference ($P < 0.001$) was observed between the mean values of chromosome length between cultivars. The chromosomal mapping with FISH demonstrated a pair with rDNA 5S sites and two pairs of rDNA 45S in long arms of the chromosomes. The rDNA 5S site was observed on chromosomes 5 in all cultivars, while the rDNA 45S sites were observed in two chromosomal pairs that varied their positions in different cultivars (6L and 8L, 7L and 9L, 7L and 8L). Heteromorphism was observed in the length of the 45S site in some cultivars as well as in the length of the long arm and in some chromosomal satellites. The data presented in this article can help to understand the variation of the intraspecific karyotype in *P. edulis*, in view of the varied breeding processes that these species have undergone throughout the domestication process, being observed variation between cultivars. rDNA 5S and 45S clusters proved to be excellent markers cytogenetics to understand the process of variation, and consequently evolution, intraspecific in *Passiflora*.

Additional keywords: Chromosomal heteromorphism; FISH; Intraspecific variation; Karyotype; Passifloraceae.

Resumo

Nove cultivares comerciais de *Passiflora edulis* foram analisadas quanto aos cariótipos. Análises cariotípicas em acessos e cultivares do gênero *Passiflora* têm auxiliado a compreender a variabilidade intraespecífica tanto para o melhoramento genético quanto para a produção de híbridos, gerando plantas promissoras dentro do gênero. O objetivo deste estudo foi compreender a diversidade cariotípica intraespecífica através de técnicas citogenéticas clássica e molecular. A coloração convencional com Giemsa 4% foi utilizada para análise cariotípica convencional e *fluorescent in situ hybridization* (FISH) foi realizada para localizar sítios de DNAr 45S e 5S. Todas as cultivares apresentaram cariótipos diploides, com número cromossômico $2n = 18$. Diferença significativa ($P < 0,001$) foi observada nos valores médios de comprimento cromossômico entre as cultivares. O mapeamento cromossômico com FISH demonstrou dois pares com sítios de DNAr 45S e um par de DNAr 5S nos braços longos dos cromossomos. Os sítios de DNAr 45S foram observados em dois pares cromossômicos que variaram suas posições nas diferentes cultivares (6L e 8L, 7L e 9L, 7L e 8L) enquanto os sítios de DNAr 5S foram observados no par cromossômico 5 em todas as cultivares. Foi observado heteromorfismo no comprimento do sítio de DNAr 45S em algumas cultivares tanto quanto no comprimento do braço longo e em alguns satélites cromossômicos. De acordo com os resultados, houve variação entre cultivares, o que contribuiu para a compreensão da diversificação do cariótipo intraespecífico em *P. edulis*, tendo em vista os variados processos de melhoramento que essas espécies têm passado ao longo do processo de domesticação. Sítios de DNAr 45S e 5S se mostraram marcadores cromossômicos eficientes para compreender o processo de variação e, conseqüentemente, de evolução intraespecífica em *Passiflora*.

Palavras-chave adicionais: Cariótipo; FISH; Heteromorfismo cromossômico; Passifloraceae; Variação intraespecífica.

Introdução

Maracujazeiros são lianas trepadeiras, pertencentes ao gênero *Passiflora* L., família Passifloraceae A. L. de Jussieu ex Kunth, e ocorrem nos trópicos e subtropicais (Bernacci et al., 2003). Muitas espécies de maracujazeiro produzem frutos comestíveis, que podem ser consumidos também in natura, além do seu uso para fins medicinais e ornamentais. O maracujazeiro, *P. edulis* Sims, destaca-se devido ao grande interesse econômico para o mercado de frutas, sendo produzidas 690.364 t no ano de 2020 (IBGE, 2020). Devido ao interesse econômico, foram lançadas no mercado diversas cultivares, entre elas BRS Gigante Amarelo (EMBRAPA, 2008) e BRS Rubi do Cerrado (EMBRAPA, 2012).

Passiflora edulis é diploide, $2n = 18$ cromossomos (Janaki Ammal, 1945), apresentando cromossomos basicamente metacêntricos, com o registro de um acesso apresentando um par submetacêntrico (Viana & Souza, 2012). A análise citogenética comparativa no gênero *Passiflora* tem contribuído com a observação de variações cariomorfológicas intra e interespecíficas quanto ao número e comprimento dos cromossomos, posição do centrômero e quanto ao número e localização das constrições secundárias/satélites (Souza et al., 2003; Viana & Souza, 2012).

Dentre as características cariotípicas, os satélites têm importância em análises comparativas intra e interespecíficas (Melo et al., 2001; Viana & Souza, 2012). A localização dos satélites pode ser obtida utilizando coloração convencional com Giemsa (Viana & Souza, 2012; Amorim et al., 2014) e técnica de bandamentos com fluorocromos base-específicos CMA3 e DAPI (Viana & Souza, 2012; Oliveira et al., 2019), pois as bandas CMA3+ têm sido restritas às constrições secundárias em *Passiflora*. A localização de satélites também são observadas utilizando técnicas de citogenética molecular, com o mapeamento de sítios de DNAr 45S (Oliveira et al., 2019) observados por *fluorescent in situ hybridization* (FISH)/hibridação in situ fluorescente, que evidenciam variações em relação a localização das constrições secundárias/DNAr 45S/satélites, auxiliando análises comparativas/taxonômicas e delimitação entre espécies (Viana & Souza, 2012). Em *P. edulis*, diferentes estudos relatam variação quanto a localização dos satélites. Foram observadas duas constrições secundárias nos braços longos 7 e 9 (Melo & Guerra, 2003), nos braços longos dos cromossomos do par 8 e nos braços curtos do par 9 (Cuco et al., 2005), nos braços curtos dos pares cromossômicos 1 e 4 (Viana & Souza, 2012), e nos braços longos dos pares 6 e 8, com heteromorfismo no tamanho do sítio no último par (Coelho et al., 2016).

O objetivo deste estudo foi verificar a variação cariotípica intraespecífica em nove cultivares comerciais de *P. edulis* utilizando citogenética

convencional e molecular, visando compreender a diversidade intraespecífica nessa espécie.

Material e métodos

Material vegetal

Nove cultivares de *P. edulis* foram mantidas na Coleção de Trabalho de *Passiflora* (CTP/UDESC) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brasil (longitude 39° 10' W, latitude 14° 39' S, altitude 78 m) (Tabela 1).

Sementes de cada cultivar foram colocadas para germinar, mas para as cultivares coletadas em Livramento de Nossa Senhora - BA e São Francisco de Itabapoana - RJ, a propagação foi realizada por estaquia. As plantas foram mantidas em casa de vegetação específica para manutenção de mudas, com cobertura de filme polietileno de baixa densidade aditivado contra raios UV e sombrite 50%.

Preparo de lâminas

Para a obtenção de pontas de raízes, estacas de cada cultivar foram seccionadas embisel, suas extremidades basais foram imersas em talco (pó inerte) contendo auxina sintética (ácido indol-3 butírico - AIB) na concentração de 2 g/kg, e colocadas para enraizar em sacos contendo areia lavada. Raízes com aproximadamente 1,0 cm de comprimento foram coletadas e pré-tratadas com 8-hidroxiquinolina a 0,002 M por uma hora em temperatura ambiente (TA) e mais 21 h a $\pm 8-10$ °C, lavadas duas vezes em água destilada e fixadas em Carnoy (etanol:ácido acético glacial [3:1], v/v; Johansen, 1940) por 3 h em TA. Depois, foram mantidas a -20 °C no próprio fixador até sua utilização. Para o preparo das lâminas, foi seguido o protocolo proposto por Guerra & Sousa (2002). Foram feitas duas lavagens em água destilada nas pontas de raízes e, após a retirada do ápice, os mesmos foram digeridos com o uso da solução enzimática de celulase 2% e pectinase 20% (v/v), incubadas em estufa a 37°C por 80 min. Após a incubação, as raízes foram lavadas novamente com água destilada para retirada da enzima e em seguida maceradas em 6 µl de ácido acético 45% com auxílio de agulhas sob microscópio estereoscópico. Foi adicionada lamínula 18 x 18 mm sobre o material macerado. Com auxílio de agulha de ponta grossa e papel de filtro foi feito o espalhamento do material biológico (células), e com o auxílio de papel de filtro, a lamínula foi pressionada gentilmente com os dedos para o espalhamento dos cromossomos.

Posteriormente, as lâminas foram mantidas em nitrogênio líquido por no mínimo 5 minutos, sendo então retiradas as lamínulas com auxílio de um bisturi e a seguir as lâminas foram secas ao ar. Após triagem em microscópio de luz, as lâminas analisadas e as que apresentaram metáfases de qualidade foram mantidas a -20°C em caixas para lâminas de plástico, adequadas para baixas temperaturas, até a aplicação das técnicas.

Tabela 1. Cultivares comerciais de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims). Classificação de acordo com o Registro Nacional de Cultivares (RNC), com comercialização de sementes e mudas legalizada pelo MAPA.

Table 1. Commercial cultivars of passion fruit (Passiflora edulis Sims). Classification according to the National Cultivar Registry (NCR), with the sale of seeds and seedlings legalized by MAPA

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

ID: identificação. *Oriunda de produtores locais de Livramento de Nossa Senhora, Sudoeste Baiano – BA. ** Oriunda de produtores locais de São Francisco de Itabapoana, Norte Fluminense – RJ.

ID: identification. *From local producers in Livramento de Nossa Senhora, south-west of Bahia - BA, Brazil. ** From local producers in São Francisco de Itabapoana, North of Rio de Janeiro - RJ, Brazil.

Citogenética convencional

As lâminas previamente obtidas foram coradas de acordo com o protocolo proposto por Guerra & Sousa (2002), com modificações, sendo utilizado Giemsa 4% (Merck®) por cerca de 20 min. Após a coloração, as lâminas foram lavadas, secas ao ar e montadas com meio Neomount (Merck®). A fotodocumentação das metáfases foi feita com microscópio Olympus BX41, equipado com câmera digital de 5MP Olympus DP25 utilizando o *software* DP2-BSW. A análise foi realizada a partir da medição cromossômica de cinco metáfases de boa qualidade para cada cultivar. Foram mensurados o comprimento do braço curto (BC), braço longo (BL) e satélites (SAT) com a utilização do *software* ImageTool®. Foram calculadas as seguintes características cariotípicas: i) relação entre braços (BL/BC = braço longo/braço curto); ii) comprimento total do cromossomo (CT = BL + BC, não sendo levado em consideração o comprimento isolado dos satélites); iii) comprimento do lote haploide (CLH = somatório dos comprimentos absolutos dos cromossomos metafásicos, incluindo os satélites); iv) comprimento relativo dos cromossomos (CR), sendo considerado 100% o valor CLH, e a contribuição de cada cromossomos calculado em %; v) índice de assimetria (TF% = somatório dos braços curtos do lote haploide ÷ CLH (Huziwara, 1962); vi) comprimento médio dos cromossomos ($\chi = \chi \text{ CT}/\text{Número de cromossomos}$); vii) heterogeneidade cariotípica (HC) (Paszko, 2006).

O χ das cultivares foi submetido à análise de variância a 5% de probabilidade, seguindo do agrupamento de Scott-Knott com o uso do *software* SISVAR (Ferreira, 2011). Os cariótipos foram confeccionados de acordo com o comprimento dos cromossomos, em ordem decrescente, e com a posição do centrômero, de acordo com a nomenclatura

proposta por Guerra (1986), levando-se em conta a razão entre braços: metacêntrico (1,00 - 1,49) e submetacêntrico (1,50 - 2,99). Os cariógramas foram montados no *software* Adobe Photoshop® SC5. Os ideogramas foram elaborados utilizando como base as médias das mensurações cromossômicas com o *software* Corel Draw® X7 (Corel Corporation, Canadá).

Citogenética molecular

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

O tratamento das lâminas para a FISH seguiu o protocolo proposto por Schwarzacher & Heslop-Harrison (2000) e Souza et al. (2010). Lâminas contendo as preparações citológicas foram secas em estufa a 37 °C pelo tempo mínimo de 1 h. Após aplicação de 50 µl de RNase (Sigma®) a 1 µg/mL em 2xSSC (cloreto de sódio [Sigma®] a 0,3 M; citrato de sódio [Sigma®] a 0,03 M), as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 1 h a 37 °C. A seguir, foram imersas em 2xSSC em TA, duas vezes, por 5 min cada. Foi adicionado 50 µl de ácido clorídrico (HCl; Vetec®)

a 10 mM sobre as metáfases, por 5 min. Após a retirada do HCl, foi adicionado 50 µL de pepsina (Sigma®) (pepsina a 10 mg/mL; HCl a 10 mM (1:100 v/v)) e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 20 min a 37 °C. Todas as etapas de lavagens citadas a seguir foram realizadas em plataforma agitadora (Biomixer®, Mos-1) a 120 rpm. As lâminas foram lavadas em 2xSSC em TA, duas vezes, por 5 min cada, imersas em formaldeído (Sigma) 4% em TA, por 10 min, e novamente lavadas em 2xSSC, duas vezes, por 5 min cada.

As preparações citológicas foram desidratadas em etanol 70% e etanol 96%, por 5 min cada. Após a secagem das lâminas em TA por 30 min, foi adicionada a mistura de hibridação com o volume final de 15 µl, sendo formamida (Sigma®) 50%, dextran sulfato (Sigma®) 10%, 2xSSC, dodecil sulfato de sódio (SDS; Bioagency®) 0,13% e 50 ng de cada sonda. A mistura de hibridação foi aquecida a 75 °C por 10 min em termociclador (Eppendorf®, Mastercycler) e transferida imediatamente para gelo pelo tempo mínimo de 5 min. As lâminas contendo a mistura de hibridação foram desnaturadas em termociclador (Techne®, TC-412) contendo um adaptador para lâminas, a 75 °C por 10 min e incubadas overnight a 37 °C em câmara úmida.

Após a hibridação, as lâminas foram imersas em 2xSSC em TA, por 5 min, para a remoção das lamínulas. Os banhos pós-hibridação a seguir foram realizados em banho-maria com agitação (Marconi, MA093/1/E), a 42 °C, com duas imersões em 2xSSC, por 5 min cada, duas em 0,1xSSC por 5 min cada, e mais duas imersões em 2xSSC por 5 min cada. As lâminas foram imersas em solução com 4xSSC/Tween 20 (Sigma®) a 0,2% em TA por 5 min e tratadas com 50 µl de albumina de soro bovino, fração 5 (BSA; Sigma®) 5%. A sonda marcada com biotina-16-dUTP foi detectada com 0,7 µl de Avidina-isotiocianato de fluoresceína (FITC; Vector®) e a sonda marcada com digoxigenina-11-dUTP foi detectada com 0,7 µl de anti-digoxigenina-rodamina (Roche™) mais 18,6 µl de BSA 5% por lâmina.

As lâminas contendo os anticorpos para a detecção foram incubadas em câmara úmida por 1 h a 37 °C. Para a remoção do excesso de anticorpos, foram realizados três banhos por 5 min cada com 4xSSC/Tween 20 a 0,2% em TA. As lâminas foram brevemente imersas em 2xSSC e as preparações citológicas foram simultaneamente montadas e contracoradas com Vectashield® Antifade Mounting Medium com DAPI (H-1200) utilizando lamínula 20 x 20 mm. As lâminas foram estocadas a 4 °C até análise. A

análise e fotodocumentação foram realizadas com a utilização do microscópio de epifluorescência Olympus BX41, equipado com câmera digital de 5MP Olympus DP25 e com o *software* DP2-BSW. As hibridações detectadas com avidina-FITC foram visualizadas com o filtro U-MWB (*excitation* 450-480 nm/*dichroic cut-off* 500 nm/*emission* > 515nm) e as hibridações detectadas com anti-digoxigenina-rodamina foram visualizadas com o filtro U-MWG (*excitation* 510-550 nm/*dichroic cut-off* 570 nm/*emission* > 590 nm). A contracoloração com DAPI foi visualizada com o filtro U-MWU (*excitation* 330-385 nm/*dichroic cut-off* 400 nm/*emission* > 420 nm). As sobreposições FITC/Rodamina/DAPI e a montagem dos cariogramas foram realizadas utilizando o *software* Photoshop SC5 (Oliveira et al., 2019).

Resultados

Citogenética convencional

Todas as cultivares de *P. edulis* apresentaram núcleo interfásico semireticulado, cromossomos metacêntricos, sendo diploide $2n = 18$ (Tabelas 2 e 3). O comprimento relativo (CR), do primeiro par até o último, variou nas nove cultivares, sendo de 68,9% (A), 61,33% (B), 67,23% (C), 60,62% (D), 60,67% (E), 67,38% (F), 66,46% (G), 64,34% (H) até 64,65% (I) (Tabela 2). O χ variou de 3,74 µm (Livramento de Nossa Senhora - BA) a 2,87 µm (Amarelo redondo -Isla Sementes) (Tabela 3).

Foi observada diferença significativa entre χ das cultivares analisadas. Foram formados dois grupos principais segundo o χ de todas as cultivares. O primeiro grupo foi formado pelas cultivares A, B, C, F e I, enquanto que o segundo grupo foi composto pelas cultivares D, E, G e H. Não houve diferença significativa entre as cultivares pertencentes ao mesmo grupo (Tabela 3).

O comprimento do lote haploide (CLH) variou 9% entre as cultivares, sendo que as cultivares E e F apresentaram a maior e a menor variação, respectivamente (Tabela 3). Todas as cultivares apresentaram cromossomos metacêntricos seguindo a classificação proposta por Guerra e Sousa (2002), porém BL/BC dos dois primeiros pares apresentaram valores próximos ao limite para A (Tabela 2). Embora TF% mostrou que todos os cariótipos analisados foram simétricos, foi possível observar diferenças entre as cultivares, sendo a cultivar B a mais simétrica (44,56%), e A a menos simétrica (41,66%) (Tabela 3).

Tabela 2. Dados cariomorfológicos dos cromossomos metafásicos de nove cultivares comerciais de *Passiflora edulis* Sims.Table 2. Karyomorphological data of metaphasic chromosomes from nine commercial cultivars of *Passiflora edulis* Sims.

ID Cultivar	Par cromossômico	BC (µm)	BL (µm)	SAT (µm)	CT* (µm)	DP	BL/BC	CR* (%)
A	1	1,74	2,57		4,31	± 0,93	1,48	13,14
	2	1,76	2,51		4,27	± 0,29	1,42	13,01
	3	1,62	2,02		3,64	± 0,33	1,19	11,09
	4	1,65	1,98		3,63	± 0,49	1,43	11,06
	5	1,59	1,72		3,32	± 0,30	1,24	10,12
	6	1,44	1,70	0,72	3,14*	± 0,20	1,20	9,57
	7	1,28	1,77		3,05	± 0,24	1,08	9,30
	8	1,30	1,72	0,74	3,02*	± 0,33	1,38	9,20
	9	1,34	1,62		2,97	± 0,35	1,21	9,05
B	1	1,88	2,28		4,16	± 0,27	1,21	13,24
	2	1,84	2,06		3,89	± 0,18	1,12	12,38
	3	1,76	2,05		3,81	± 0,61	1,17	12,13
	4	1,60	1,82		3,41	± 0,18	1,16	10,85
	5	1,61	1,73		3,35	± 0,17	1,20	10,66
	6	1,47	1,70	0,63	3,17*	± 0,16	1,14	10,09
	7	1,36	1,63	0,54	2,99*	± 0,33	1,08	9,52
	8	1,28	1,65		2,92	± 0,19	1,29	9,29
	9	1,22	1,33		2,55	± 0,20	1,10	8,12
C	1	1,77	2,38		4,15	± 0,35	1,34	13,09
	2	1,70	2,15		3,86	± 0,26	1,26	12,17
	3	1,73	1,90		3,63	± 0,37	1,12	11,45
	4	1,66	1,89		3,55	± 0,34	1,10	11,20
	5	1,55	1,87		3,41	± 0,28	1,13	10,75
	6	1,49	1,66	0,58	3,15*	± 0,17	1,15	9,93
	7	1,37	1,68		3,05	± 0,32	1,21	9,62
	8	1,37	1,50	0,67	2,87*	± 0,16	1,23	9,05
	9	1,34	1,45		2,79	± 0,50	1,08	8,80
D	1	1,63	2,15		3,78	± 0,35	1,32	13,13
	2	1,58	2,01		3,59	± 0,50	1,27	12,47
	3	1,59	1,80		3,39	± 0,13	1,13	11,78
	4	1,46	1,68		3,14	± 0,12	1,13	10,91
	5	1,43	1,60		3,03	± 0,14	1,15	10,53
	6	1,18	1,61		2,79	± 0,13	1,24	9,69
	7	1,27	1,43	0,73	2,69*	± 0,33	1,11	9,35
	8	1,23	1,34		2,57	± 0,15	1,36	8,93
	9	1,02	1,27	0,78	2,29*	± 0,29	1,09	7,96
E	1	1,51	1,95		3,46	± 0,54	1,29	13,40
	2	1,39	1,80		3,19	± 0,59	1,30	12,35
	3	1,40	1,60		2,99	± 0,39	1,14	11,58
	4	1,34	1,54		2,88	± 0,37	1,14	11,15
	5	1,28	1,59		2,87	± 0,37	1,24	11,11
	6	1,20	1,36		2,56	± 0,26	1,04	9,91
	7	1,21	1,26	0,60	2,47*	± 0,42	1,11	9,56
	8	1,07	1,24		2,31	± 0,21	1,13	8,94
	9	1,00	1,11	0,40	2,10*	± 0,19	1,16	8,13
F	1	1,92	2,50		4,42	± 0,74	1,30	13,00
	2	1,85	2,39		4,24	± 0,59	1,29	12,47
	3	1,78	2,12		3,90	± 0,48	1,19	11,46
	4	1,63	2,10		3,73	± 0,43	1,26	10,97
	5	1,67	1,96		3,63	± 0,42	1,29	10,67
	6	1,53	1,85	0,63	3,38*	± 0,47	1,17	9,94
	7	1,51	1,78		3,29	± 0,49	1,24	9,67
	8	1,35	1,76	0,70	3,11*	± 0,15	1,18	9,14
	9	1,29	1,70		2,98	± 0,42	1,32	8,76

ID Cultivar	Par cromossômico	BC (µm)	BL (µm)	SAT (µm)	CT* (µm)	DP	BL/BC	CR* (%)
G	1	1,54	2,01		3,55	± 0,46	1,30	13,03
	2	1,54	1,72		3,26	± 0,43	1,12	11,97
	3	1,45	1,75		3,20	± 0,29	1,20	11,75
	4	1,49	1,53		3,02	± 0,29	1,28	11,09
	5	1,36	1,50		2,86	± 0,30	1,21	10,50
	6	1,21	1,55	0,40	2,75*	± 0,37	1,03	10,10
	7	1,25	1,49		2,74	± 0,37	1,11	10,06
	8	1,22	1,48	0,40	2,70*	± 0,33	1,20	9,91
	9	1,11	1,25		2,36	± 0,14	1,12	8,66
H	1	1,74	2,23		3,98	± 0,32	1,28	13,49
	2	1,54	1,96		3,51	± 0,38	1,27	11,89
	3	1,60	1,75		3,35	± 0,21	1,19	11,35
	4	1,52	1,73		3,25	± 0,17	1,10	11,01
	5	1,46	1,70		3,16	± 0,17	1,12	10,71
	6	1,36	1,62	0,50	2,97*	± 0,23	1,14	10,06
	7	1,29	1,62		2,91	± 0,19	1,16	9,86
	8	1,23	1,38	0,71	2,61*	± 0,37	1,26	8,84
	9	1,21	1,35		2,56	± 0,13	1,12	8,68
I	1	2,01	2,62		4,64	± 0,38	1,30	13,72
	2	1,79	2,25		4,04	± 0,61	1,26	11,95
	3	1,80	2,08		3,89	± 0,41	1,16	11,50
	4	1,71	2,03		3,74	± 0,32	1,18	11,06
	5	1,67	1,92		3,59	± 0,30	1,15	10,62
	6	1,49	1,84	0,61	3,33*	± 0,27	1,33	9,85
	7	1,51	1,77		3,28	± 0,30	1,08	9,70
	8	1,40	1,65	0,65	3,05*	± 0,20	1,17	9,02
	9	1,43	1,57		3,00	± 0,28	1,10	8,87

ID: identificação; BC: Braço curto; BL: Braço longo; SAT: Satélite; CT: Comprimento total do cromossomo, *Sem levar em conta o comprimento do satélite; DP: Desvio padrão; BL/BC: Razão entre braço longo e o braço curto; CR: Comprimento relativo dos cromossomos.

ID: identification; BC: Short arm; BL: Long arm; SAT: Satellite; CT: Total length of the chromosome, * Without taking into account the length of the satellite; DP: Standard deviation; BL/BC: Ratio between long arm and short arm; CR: Relative chromosome length.

A análise de heterogeneidade cariotípica (HC), que utiliza parâmetros de dispersão e avalia as variações intercromossômicas contra o comprimento cromossômico (CVcl) e o posicionamento do centrômero (CVci), permitiu distribuir as cultivares em um grupo evidente, formado pelas cultivares C, F, G e H (Figura 1). O agrupamento principal foi composto das cultivares oriundas de produções locais, F e G, da cultivar composta C e da cultivar híbrida F1 de maracujazeiro azedo de frutos amarelos e avermelhados, H. Os pontos mais próximos ao agrupamento principal pertencem às cultivares E e I. Os pontos mais distantes foram das cultivares melhoradas A e B, ambas da companhia Viveiros Flora Brasil e da Cultivar D, produzida pelo Instituto Agrônomo de Campinas (Figura 1).

Foi possível visualizar satélites em quase todas as metáfases das cultivares utilizando a coloração convencional (Giemsa 4%), sendo, às vezes, observado satélite em apenas um homólogo do par. Todas as cultivares de *P. edulis* apresentaram dois pares de cromossomos com satélites nos braços longos. As cultivares A e I apresentaram os satélites distendidos (Figuras 2 e 3). Foi observado polimorfismo dentro da espécie em relação ao comprimento do segundo par de cromossomos satelitados, evidente no par 8 das cultivares B e I (Figura 3).

Tabela 3. Comparação entre as características cariotípicas com base em FISH (DNAr 45S e 5S: número de sítios marcados por par, e entre parênteses a localização no par cromossômico e no braço) e em dados cariomorfológicos de nove cultivares comerciais de *Passiflora edulis* Sims.

Table 3. Comparison between karyotype characteristics based on FISH (rDNA 45S and 5S: number of marked sites by pair, and in parenthesis, the location in the chromosome pair and the arm) and karyomorphological data of the nine *Passiflora edulis* Sims cultivars.

ID Cultivar	DNAr 45S (Satélite)	DNAr 5S	χ (μm) [*]	CLH ^{**}	TF%	FC
A	2 (6L) 2 (8L)	2 (5L)	3,63a	32,81	41,66	18m
B	2 (6L) 2 (7L)	2 (5L)	3,49a	31,42	44,56	18m
C	2 (6L) 2 (8L)	2 (5L)	3,51a	31,71	43,97	18m
D	2 (7L) 2 (9L)	2 (5L)	3,20b	28,78	43,06	18m
E	2 (7L) 2 (9L)	2 (5L)	2,87b	25,83	44,14	18m
F	2 (6L) 2 (8L)	2 (5L)	3,74a	34,01	42,71	18m
G	2 (6L) 2 (8L)	2 (5L)	3,03b	27,24	44,68	18m
H	2 (6L) 2 (8L)	2 (5L)	3,27b	29,51	43,87	18m
I	2 (6L) 2 (8L)	2 (5L)	3,67a	33,82	43,79	18m

ID: identificação; L: braço longo; χ : comprimento cromossômico médio; CLH: complemento do lote haploide (levando em consideração o comprimento do satélite); TF%: índice de assimetria; m: cromossomo metacêntrico; FC: fórmula cariotípica. *Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 0,01% de probabilidade. **Incluindo o comprimento do satélite.

ID: identification; L: long arm; χ : average chromosome length; CLH: complement of the haploid batch (taking into account the length of the satellite); TF%: asymmetry index; m: metacentric chromosome; FC: karyotype formula. *Means followed by the same letter do not differ statistically by the Scott-Knott test at 0.01% probability. **Including the length of the satellite.

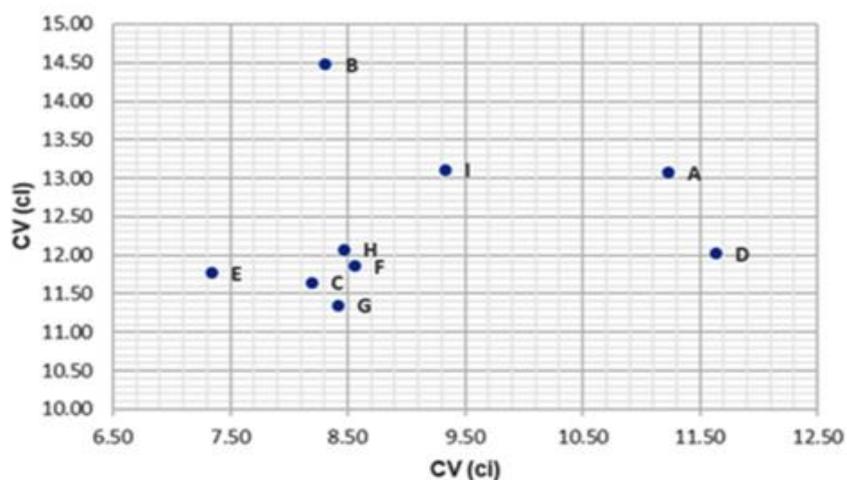


Figura 1. Análise da Heterogeneidade Cariotípica (HC) usando variações intercromossômicas quanto ao comprimento cromossômico (CVcl) e à posição do centrômero (CVci) em nove cultivares comerciais de *Passiflora edulis* Sims obtidas no Brasil: A - FB 200; B - FB 300; C - IAC 273/277; D - IAC 275; E - Isla

Sementes; F - Livramento de Nossa Senhora - BA; G - São Francisco de Itabapoana - RJ; H - BRS RC; I - Top Seed Sementes.

Figure 1. Analysis of Karyotype Heterogeneity (HC) using interchromosomal variations in terms of chromosomal length (CVcl) and position of the centromere (CVci) in nine cultivars of *Passiflora edulis* Sims obtained in Brazil: A - FB 200; B - FB 300; C - IAC 273/277; D - IAC 275; E - Isla Sementes; F - Livramento de Nossa Senhora - BA; G - São Francisco de Itabapoana - RJ; H - BRS RC; I - Top Seed Sementes.

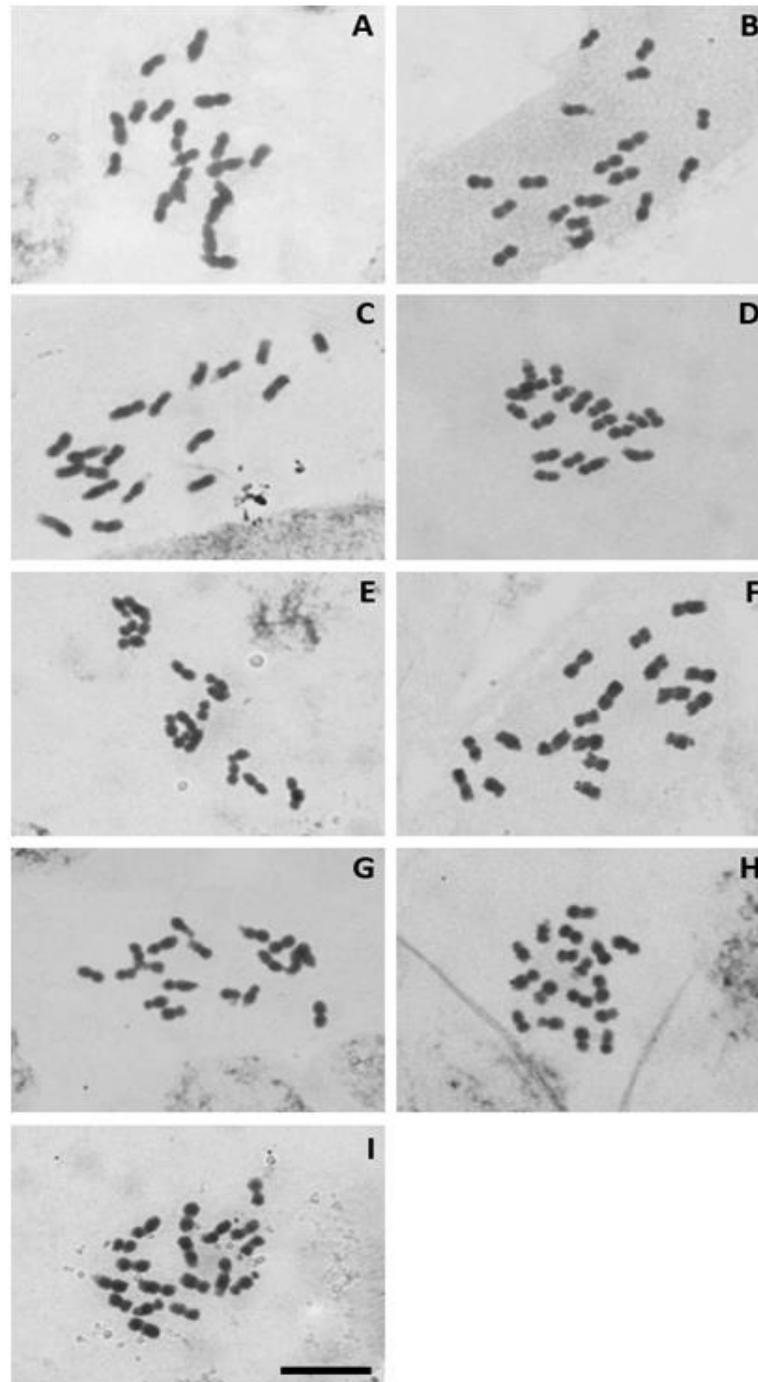


Figura 2. Metáfases mitóticas em nove cultivares comerciais de *Passiflora edulis* Sims ($2n = 18$) obtidas no Brasil: A - FB 200; B - FB 300; C - IAC 273/277; D - IAC 275; E - Isla Sementes; F - Livramento de Nossa Senhora - BA; G - São Francisco de Itabapoana - RJ; H - BRS RC; I - Top Seed Sementes. Barra = 10 μm .

Figure 2. Mitotic metaphases in nine cultivars of *Passiflora edulis* Sims ($2n = 18$) obtained in Brazil: A - FB 200; B - FB 300; C - IAC 273/277; D - IAC 275; E - Isla Sementes; F - Livramento de Nossa Senhora - BA; G - São Francisco de Itabapoana - RJ; H - BRS RC; I - Top Seed Sementes. Bar = 10 μm .



Figura 3. Cariogramas em nove cultivares comerciais de *Passiflora edulis* Sims ($2n = 18$) obtidas no Brasil: A - FB 200; B - FB 300; C - IAC 273/277; D - IAC 275; E - Isla Sementes; F - Livramento de Nossa Senhora - BA; G - São Francisco de Itabapoana - RJ; H - BRS RC; I - Top Seed Sementes. Barra = 10 μ m.

Figure 3. Karyograms in nine cultivars of Passiflora edulis Sims (2n = 18) obtained in Brazil: A - FB 200; B - FB 300; C - IAC 273/277; D - IAC 275; E - Isla Sementes; F - Livramento de Nossa Senhora - BA; G - São Francisco de Itabapoana - RJ; H - BRS RC; I - Top Seed Sementes. Bar = 10 μ m.

Citogenética molecular

Foram mapeados os sítios de DNAr 45S e 5S (Figura 4) em nove cultivares de *P. edulis*. Os cariogramas com os sítios obtidos por FISH (Figura 5) foram elaborados levando em consideração o

tamanho cromossômico, seguindo uma ordem descendente. O pareamento dos cromossomos homólogos foi feito levando em consideração a marcação dos sítios de DNAr e a cariomorfologia.

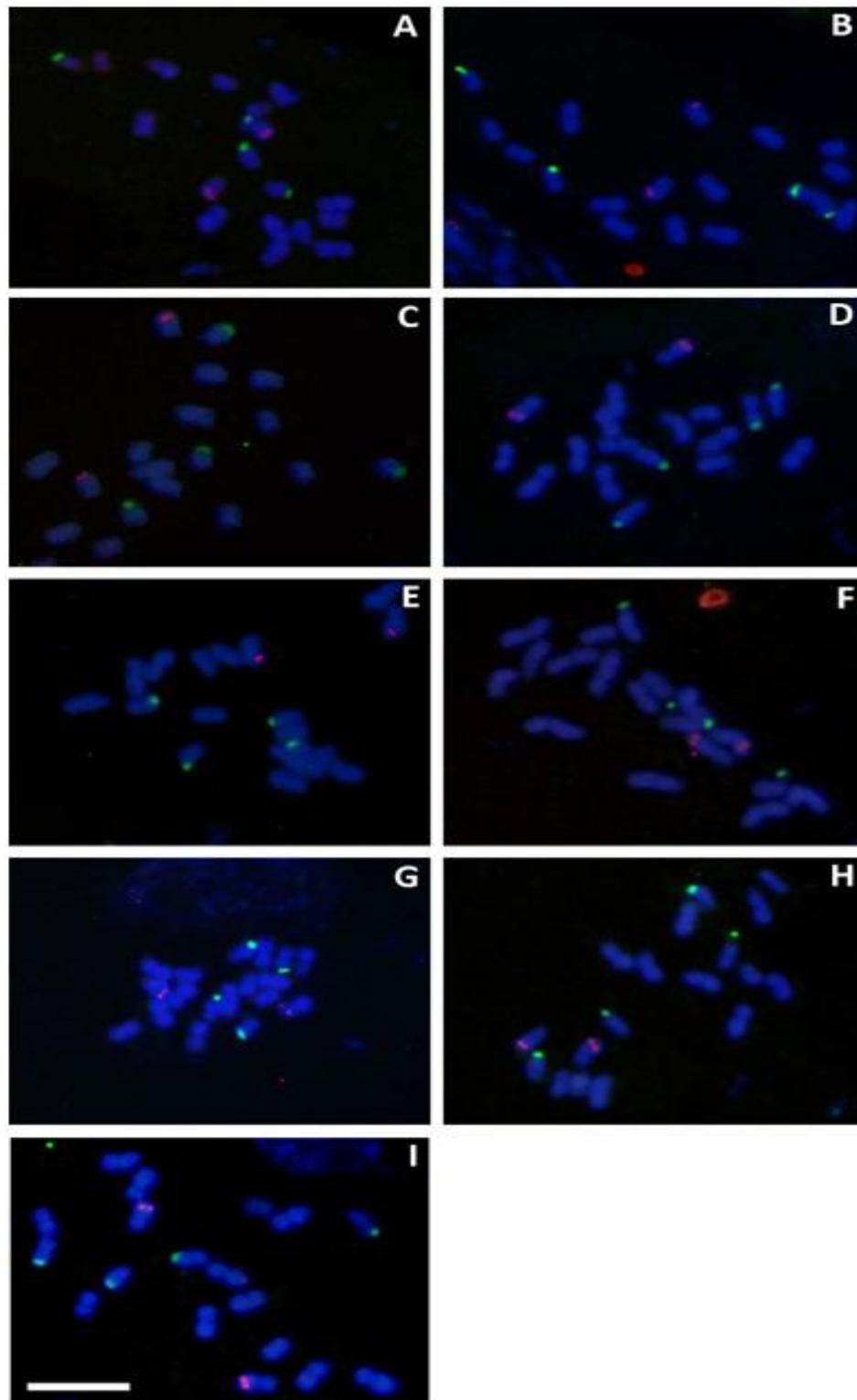


Figura 4. Metáfases mitóticas marcadas com FISH utilizando sondas para sítios de DNAr 5S (vermelho/rodamina) e DNAr 45S (sonda Pe26S-rDNA) (verde/FITC) colocalizado com os satélites em nove cultivares comerciais de *Passiflora edulis* Sims ($2n = 18$) obtidas no Brasil: A - FB 200; B - FB 300; C - IAC 273/277; D - IAC 275; E - Isla Sementes; F - Livramento de Nossa Senhora - BA; G - São Francisco de Itabapoana - RJ; H - BRS RC; I - Top Seed Sementes. Barra = 10 μ m.

Figure 4. Mitotic metaphases labeled with FISH using probes for sites of rDNA 5S (red/rhodamine) and rDNA 45S (probe Pe26S-rDNA) (green/FITC) co localized with satellites in nine cultivars of *Passiflora edulis* Sims ($2n = 18$) obtained in Brazil: A - FB 200; B - FB 300; C - IAC 273/277; D - IAC 275; E - Isla Sementes; F - Livramento de Nossa Senhora - BA; G - São Francisco de Itabapoana - RJ; H - BRS RC; I - Top Seed Sementes. Bar = 10 μ m.

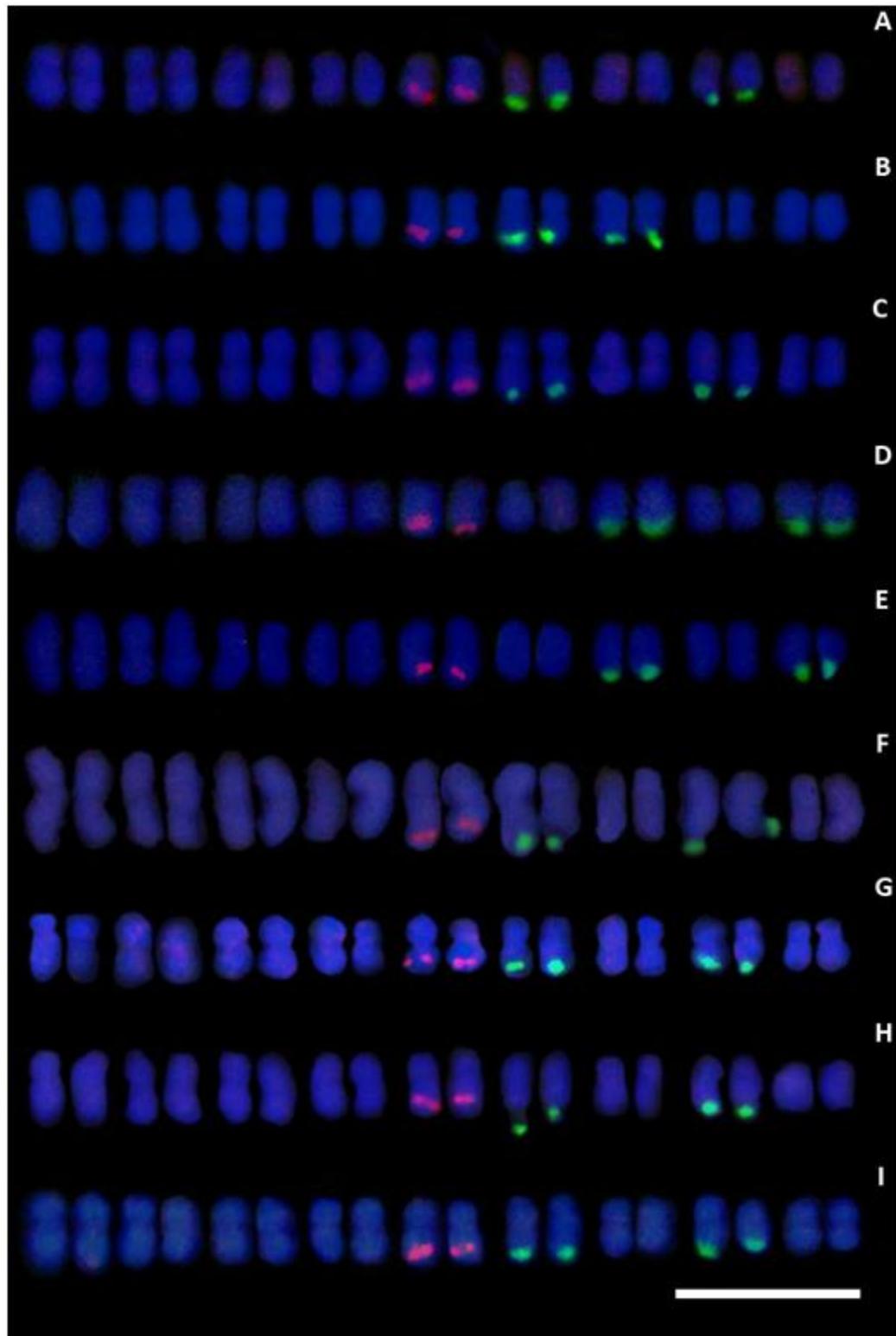


Figura 5. Cariogramas mostrando sítios de DNAr 5S (vermelho/rodamina) e DNAr 45S (verde/FITC) em nove cultivares comerciais de *Passiflora edulis* Sims ($2n = 18$) obtidas no Brasil: A - FB 200; B - FB 300; C - IAC 273/277; D - IAC 275; E - Isla Sementes; F - Livramento de Nossa Senhora - BA; G - São Francisco de Itabapoana - RJ; H - BRS RC; I - Top Seed Sementes. Barra = 10 μ m.

Figure 5. Cariograms showing rDNA 5S (red/rhodamine) and rDNA 45S (green/FITC) sites in nine cultivars of *Passiflora edulis* Sims ($2n = 18$) obtained in Brazil: A - FB 200; B - FB 300; C - IAC 273/277; D - IAC 275; E - Isla Sementes; F - Livramento de Nossa Senhora - BA; G - São Francisco de Itabapoana - RJ; H - BRS RC; I - Top Seed Sementes. Bar = 10 μ m.

O mapeamento cromossômico com FISH demonstrou um par de cromossomos com sítios de DNAr 5S e dois pares com sítios de DNAr45S. O sítio

de DNAr 5S foi observado no braço longo do cromossomo cinco e os sítios de DNAr 45S variaram nas diferentes cultivares (Tabela 3, Figuras 4 a 6).

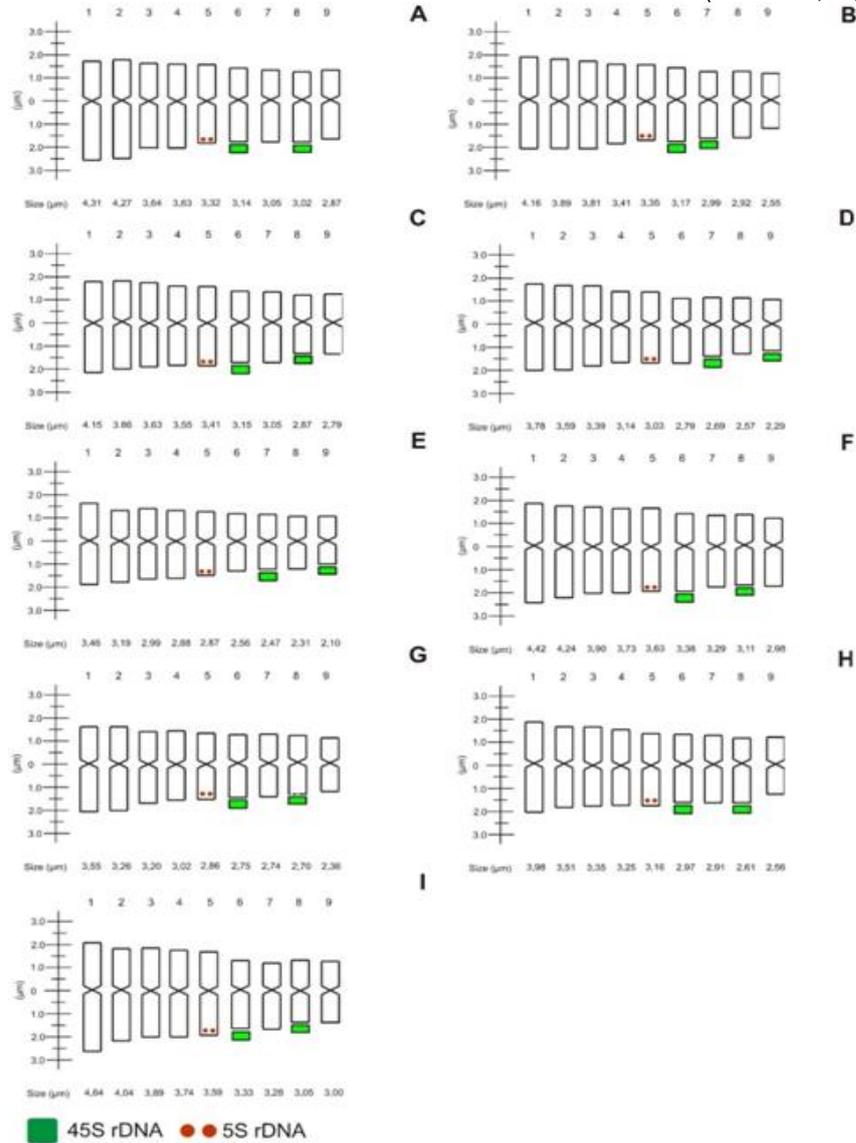


Figura 6. Ideogramas baseados na kariomorfologia evidenciando os sítios de DNAr 5S e 45S em nove cultivares comerciais de *Passiflora edulis* Sims ($2n = 18$) obtidas no Brasil: A - FB 200; B - FB 300; C - IAC 273/277; D - IAC 275; E - Isla Sementes; F - Livramento de Nossa Senhora - BA; G - São Francisco de Itabapoana - RJ; H - BRS RC; I - Top Seed Sementes.

Figure 6. Idiograms based on karyomorphology showing the sites of DNAr 5S and 45S in nine cultivars of Passiflora edulis Sims ($2n = 18$) obtained in Brazil: A - FB 200; B - FB 300; C - IAC 273/277; D - IAC 275; E - Isla Sementes; F - Livramento de Nossa Senhora - BA; G - São Francisco de Itabapoana - RJ; H - BRS RC; I - Top Seed Sementes.

Foi observado heteromorfismo no tamanho do sítio de DNAr 45S nas cultivares A (8L), C (6L; 8L), D (9L), E (7L), F (6L), G (6L), H (8L), sendo mais comum encontrar heteromorfismo no segundo par de cromossomos homólogos satelitados (Figura 5). Também foi evidente observar heteromorfismo no comprimento do braço longo de alguns cromossomos

nos sítios de DNAr 45S nas cultivares A (8L), B (7L), E (9L), F (6L; 8L), I (8L), sendo mais comum encontrar heteromorfismo no segundo par de cromossomos satelitados (Figura 5), tanto utilizando citogenética convencional quanto molecular (Figura 3).

Discussão

A hibridação intraespecífica tem um papel fundamental no melhoramento genético de plantas alógamas (que geralmente apresentam incompatibilidade), já que permite a introgressão de características de interesse agrônomo, e, em última análise, possibilita a combinação da variabilidade intraespecífica gerando plantas com características promissoras ao sistema agrícola. O número cromossômico determinado em estudos citológicos prévios para *P. edulis* foi corroborado nas nove cultivares, $2n=2x=18$, com dois pares com sítios de DNAr 45S um par de cromossomos com sítios DNAr 5S (Melo et al., 2001; Melo e Guerra, 2003; Souza et al., 2010; Viana & Souza, 2012; Melo et al., 2015; Coelho et al., 2016), sugerindo estabilidade no número de sítios de DNAr nessa espécie. Contudo, variações no número de sítios de DNAr 45S e ou 5S têm sido observadas em híbridos retrocruzados, incluindo variações não apenas no número de sítios de DNA, mas também a sobreposição por translocação após o processo de hibridação (Melo et al., 2017).

Os sítios de DNAr 45S variaram entre as cultivares. Seis, das nove cultivares, apresentaram os sítios nos pares 6L e 8L, coincidindo com o relatado por Coelho et al. (2016). Duas cultivares apresentaram os sítios de DNAr 45S nos pares 7L e 9L, coincidindo com o relatado por Melo e Guerra (2003). Somente a cultivar B apresentou sítios de DNAr 45S nos pares 7L e 8L, sendo um novo relato no estudo da variação cariotípica de *P. edulis*. A variação na localização de sítios de DNAr 45S encontrada nas cultivares de *P. edulis* indicam que alterações cromossômicas vêm ocorrendo, provavelmente, devido às técnicas de melhoramento que vêm sendo aplicadas nas empresas de sementes e até na seleção massal aplicada, muitas vezes de forma empírica, pelos pequenos produtores. Em espécies com elevada heteroziguidade, como é o caso de *P. edulis*, por ser alógama e autoincompatível, é notória a observação de translocações (Levin, 2002). Em espécies de *Passiflora* já foi observada formação de quadrivalentes na meiose (Souza et al., 2011), indicando alterações cromossômicas.

A variação observada nas cultivares de *P. edulis* quanto ao CLH mostra um grau significativo de variabilidade intraespecífica, o que leva a inferir sobre variação também no conteúdo de DNA (C-value). Esta variação pode ser observada no diagrama de dispersão da análise de HC. O conjunto principal é composto por plantas oriundas de produtores locais, cultivares provenientes de híbridos intraespecíficos F1 de populações contrastantes, cultivares provenientes de populações sintéticas ou compostos. As cultivares F e G mostram similaridade cariotípica, porém ambas diferem bastante em relação ao comprimento total cromossômico (CT) das

cultivares A e B, provenientes do viveiro Flora Brasil (Viveiro Flora Brasil, 2022a,b), que desenvolve melhoramento genético em *P. edulis* desde 1985. Os cariogramas das cultivares D e E, provenientes da empresa de pesquisa IAC se assemelham quanto ao CT às cultivares F e G. As cultivares H e I, produzidas pela EMBRAPA e pela Top Seed, assemelham-se mais às cultivares A e B. Os cromossomos das cultivares oriundas de empresas que empregam métodos de melhoramento mais categoricamente tendem a ter maior CT e, conseqüentemente, maiores valores de CLH.

Segundo o paradoxo de C, maior quantidade de DNA não significa maior complexidade genética (Levin, 2002), mesmo assim, houve alteração no DNA em algumas cultivares de *P. edulis*, de modo a aumentar o conteúdo de DNA, que pode ter ocorrido por duplicações. Pequenas duplicações raramente apresentam efeito fenotípico reconhecível, mas quando envolvem um gene com um pronunciado efeito de dose, o efeito fenotípico será de uma mutação dominante (Pagliarini, 2001), que pode ser benéfica à população e desejada pelo melhorista.

Todos os métodos de melhoramento utilizados nas cultivares do conjunto principal têm como objetivo aumentar a heteroziguidade, por isso, é provável que os indivíduos estudados possuam essa característica. No Brasil existe uma grande variabilidade tanto em populações cultivadas quanto em populações silvestres, dessa forma, muitos genótipos podem ser utilizados como fonte de germoplasma para o melhoramento genético em produções locais e programas de melhoramento (Meletti et al., 2000; Meletti, 2011). Os pontos mais dispersos foram das cultivares A e B, oriundas de programas de melhoramento com mais ciclos de seleção. Provavelmente estas cultivares contêm mais loci em homozigose, fazendo com que possuam genótipos específicos e diferenciados, corroborando a utilidade da análise de HC em nível intraespecífico.

Os polimorfismos encontrados, tanto no tamanho do sítio de DNAr 45S como no comprimento do braço longo, ambos eventos sendo mais comuns no menor par satelitado, indicam que existe variabilidade cariotípica intraespecífica refletida especificamente nesse cromossomo. Este resultado corrobora o relatado por Coelho et al. (2016) e Silva (2017). Esta heteroziguidade cromossômica pode ser resultado de deleções e/ou ampliações, o que altera o número de repetições do DNA ribossomal por causa dos mecanismos de reparo de DNA. Este processo pode indicar diversificação (evolução), crossing-over desigual, erros na replicação e/ou eventos de translocação (Eickbush & Eickbush, 2007; Bhargava & Fuentes, 2009; Mehrotra & Goyal, 2014; Coelho et al., 2016; Silva, 2017). Alterações cromossômicas levaram a processos de diversificação na história evolutiva e biogeográfica da família Passifloraceae (Melo et al., 2001; Hansen et al., 2006). Por isso, os polimorfismos observados

podem ratificar a teoria que o grupo $x = 9$ em *Passiflora* se derivou de processos de poliploidização seguido por disploidia descendente (Melo e Guerra, 2003; Melo et al, 2011; Melo et al., 2015). A variabilidade cariotípica intraespecífica/heteromorfismos observados nesse estudo podem ser um reflexo dos processos de diversificação do subgênero *Passiflora L.* Além de *P. edulis*, *P. cincinnata* Mast. também apresenta heteromorfismo, especificamente no último par satelitado (Coelho et al., 2016).

Conclusões

Os sítios de DNAr 45S e 5S são marcadores citogenéticos eficientes para entender os processos evolutivos, em conjunto com a citogenética convencional, podem complementar estudos filogenéticos e taxonômicos no gênero *Passiflora*, incrementando os programas de melhoramento do maracujazeiro azedo.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo suporte financeiro. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos do primeiro autor.

Referências

Amorim JS, Souza MM, Viana AJC, Corrêa RX, Araújo IS, Ahnert D (2014) Cytogenetic, molecular and morphological characterization of *Passiflora capsularis L.* and *Passiflora rubra L.* Plant, Systematics and Evolution 300:1147-1162. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0952-1>

Bhargava A, Fuentes FF (2009) Mutational dynamics of microsatellites. Molecular Biotechnology 44:250-266. <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9230-4>

Bernacci LC, Vitta FA, Bakker YV (2003) Passifloraceae. In: Wanderley MGL, Shepperd GJ, Melhem TS, Giulietti AM, Kirizawa M (eds) Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo (v3), RiMa/FAPESP. p.247- 274.

Janaki Ammal EK (1945) Chromosome atlas of cultivated plants. In: Darlington CD, Janaki Ammal EK (eds) George Allen and Unwin Ltd. p.114.

Coelho MSE, Bortoleti KC, Araujo FP, Melo NF (2016) Cytogenetic characterization of the *Passiflora edulis* Sims x *Passiflora cincinnata* Mast. interspecific hybrids and its parents. Euphytica 210:93-104. <https://doi.org/10.1007/s10681-016-1704-4>

Cuco S, Vieira MLC, Mondin M, Aguiar-Perecin MLR (2005) Comparative karyotype analysis of three *Passiflora L.* species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. Caryologia 58:220-228. <https://doi.org/10.1080/00087114.2005.10589454>

Eickbush TH, Eickbush DG (2007) Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. Genetics 175:477-485. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.071399>

EMBRAPA (2008). Maracujá azedo BRS Gigante Amarelo (BRS GA1). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/1035/maracuja-azedo-brs-gigante-amarelo-brs-ga1>> (Acesso em 20 de mar de 2022).

EMBRAPA (2012). Maracujá azedo BRS Rubi do Cerrado (BRS RC). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/1040/maracuja-azedo-brs-rubi-do-cerrado-brs-rc>> (Acesso em 20 de mar de 2022).

Ferreira, DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia, 35:1039-1042. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>

Guerra M (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. Brazilian Journal of Genetics 9:741-743.

Guerra M, Sousa MJ (2002) Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. Funpec. 131p.

Hansen AK, Gilbert LE, Simpson BB, Downie SR, Cervi AC, Jansen RK (2006) Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. Systematic Botany 31:138-150. <https://doi.org/10.1600/036364406775971769>

Huziwara Y (1962) Karyotype analysis in some genera of Compositae. VIII. Further studies on the chromosome of *Aster*. American Journal of Botany 49:116-119. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1962.tb14916.x>

IBGE (2020) Produção Brasileira de Maracujá em 2020. Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/maracuja/b1_ma_racuja.pdf. (Acesso em 19 de mar de 2022).

Johansen DA (1940) Plant microtechnique. Mc Graw Hill. 523p.

- Levin DA (2002) The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford University Press. 230p.
- Mehrotra S, Goyal V (2014) Repetitive sequences in plant nuclear DNA: types, distribution, evolution and function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 12:164-171. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2014.07.003>
- Meletti LMM (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura* 33:83-91. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000500012>
- Meletti LMM, Dos Santos R, Minami K (2000). Melhoramento do Maracujazeiro-Amarelo: Obtenção do Cultivar "Composto IAC-27". *Scientia Agricola* 57:491-498. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162000000300019>
- Melo NF, Cervi AC, Guerra M (2001) Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Plant Systematics and Evolution* 226:69-84. <https://doi.org/10.1007/s006060170074>
- Melo NF, Guerra M (2003) Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Annals of Botany* 92:309-316. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg138>
- Melo CAF, Martins MIG, Oliveira MBM, Benko-Iseppon AM, Carvalho R. (2011) Karyotype analysis for diploid and polyploid species of the *Solanum* L. *Plant Systematic and Evolution* 293:227-235. <https://doi.org/10.1007/s00606-011-0434-2>
- Melo CAF, Silva GS, Souza MM (2015) Establishment of genomic in situ hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora*. *Genetics and Molecular Research* 14:2176-2188. <https://doi.org/10.4238/2015.March.27.4>
- Melo CAF, Souza MM, Silva GS (2017) Karyotype analysis by FISH and GISH techniques on artificial backcrossed interspecific hybrids involving *Passiflora sublancoolata* (Killip) MacDougal (Passifloraceae). *Euphytica* 213:160. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1909-1>
- Oliveira OLS, Souza MM, Melo AF (2019) Cytogenetics and morphological delimitation between three species of *Passiflora* L. (subgenus *Distephana* Cervi). *Plant Biology* 21:662-669. <https://doi.org/10.1111/plb.12967>
- Pagliarini MS (2001) Citogenética aplicada ao melhoramento. In: Nass LL, Valois ACC, Melo IS, Valadares-Inglis MC (eds) Recursos genéticos e melhoramento - Plantas, Fundação MT. p.871-910.
- Paszko BA (2006) Critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Plant Systematic and Evolution* 258:39-48. <https://doi.org/10.1007/s00606-005-0389-2>
- Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS (2000) Practical in situ hybridization. Springer-Verlag New York, Inc. 203p.
- SILVA GS (2017) Análises genômicas (GISH) e citogenômicas comparativas em espécies do gênero *Passiflora* L. Universidade Estadual de Santa Cruz. 118p.
- Souza MM, Pereira TNS (2011) Meiotic behavior in wild and domesticated species of *Passiflora*. *Revista Brasileira de Botânica* 34:63-72. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042011000100007>
- Souza MM, Pereira TNS, Silva LC, Reis DSS, Sudré CP (2003) Karyotype of six *Passiflora* species collected in the State of Rio de Janeiro. *Cytologia* 68:165-171. <https://doi.org/10.1508/cytologia.68.165>
- Souza MM, Urdampilleta JD, Forni-Martins ER (2010) Improvements in cytological preparations for fluorescent in situ hybridization in *Passiflora*. *Genetic and Molecular Research* 9:2148-2155. <https://doi.org/10.4238/vol9-4gmr951>
- Viana AJC, Souza MM (2012) Comparative cytogenetic between the species *Passiflora edulis* and *Passiflora cacaoensis*. *Plant Biology* 14:820-827. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00557.x>
- Viveiro Flora Brasil (2022a) Sementes de Maracujá FB300 Araguari. Disponível em: <<https://viveiroflorabrasil.com.br/produto/sementes-de-maracuja-fb300-araguari/>> (Acesso em 19 de mar de 2022):
- Viveiro Flora Brasil (2022b) Sementes de Maracujá FB200 Yellow Master. Disponível em: <<https://viveiroflorabrasil.com.br/produto/sementes-de-maracuja-fb-200-yellow-master/>> (Acesso em 19 de mar de 2022):