

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DO MARACUJÁ-AZEDO
(Passiflora edulis Sims, Passifloraceae)

Mariela Analía Sader

RECIFE
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DO MARACUJÁ-AZEDO
(Passiflora edulis Sims, Passifloraceae)

Dissertação de mestrado apresentada por Mariela Analía Sader ao programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal, área de concentração Sistemática e Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Pedrosa Harand
(Depto. de Botânica, UFPE)

RECIFE
2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Sader, Mariela Analía
Mapeamento cromossômico do maracujá-azedo (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae)/
Mariela Analía Sader. – Recife: O Autor, 2016.
63 f.: il.

Orientadora: Andrea Pedrosa Harand
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, 2016.
Inclui referências e anexos

1. Genética vegetal 2. Mapeamento genômico vegetal 3. Citogenética 4.
Passiflora I. Harand, Andrea Pedrosa (orient.) II. Título.

581.35

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-196

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DO MARACUJÁ-AZEDO
(*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae)

Aprovada em 29/02/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Andrea Pedrosa Harand (orientadora), Depto. de Botânica, CCB, UFPE

Prof. Dr. Reginaldo Carvalho, Depto. de Biologia/Genética, UFRPE

Profa. Dra. Ana Christina Brasileiro-Vidal, Depto. de Genética, CCB, UFPE

Membros suplentes:

Prof. Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza, Depto. de Botânica, CCB, UFPE

Profa. Dra. Ana Emília Barros e Silva, Depto. de Biologia, UFPB

*Dedico a Pablo y Emilio, a mis padres, Nancy y Anibal, y mis
hermanos Dianela y Hernán, por el amor y apoyo incondicional a
mi dedicación a la vida científica.*

Agradecimentos

A meu marido Pablo, e meu filho Emilio pelo apoio, amor e ajuda.

Aos meus pais e meus irmãos pelo amor e carinho, e por respeitar minhas decisões de vida.

A Andrea pela confiança, apoio, sabedoria e paciência. Todos os dias me ensinou com pequenos detalhes a lutar pelos meus objetivos e aperfeiçoar o meu profissional.

Obrigada por me mostrar o caminho da ciência.

A Marcelo Guerra, pelas suas conversas de ciência e das passifloras.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética Vegetal da UFPE: Mariana, Gustavo, André, Tiago R., Tiago E., Lili, Sandra, Marcus, Dani, Brena, Jéssica, Alex, Duda, Thallitha, Bruno, Elivania, Gessica, Karol, Isabelle, Aline pelos bons momentos compartilhados.

À minha terceira família no Recife, as “Mãezinhas da praça” pelo apoio e companhia.

À família “Curumim”, por cuidar muito bem meu filho e por ser um grande apoio no nosso passo por Recife.

A todos os familiares e amigos que estão longe mas mesmo assim eles sempre estão presentes.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida. À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pela oportunidade e orgulho de fazer parte.

E por todos aqueles que de alguma forma me ajudaram na elaboração deste trabalho.

Obrigada a todos!

Resumo

O gênero *Passiflora* é o maior da família Passifloraceae, sendo formado por aproximadamente 500 espécies. Tem origem na América tropical, apresentando mais de 135 espécies nativas do Brasil. Dentre as principais espécies do gênero, destaca-se o maracujá-azedo, *Passiflora edulis* Sims, em virtude de seu interesse comercial principalmente como planta frutífera. Apesar de avanços no conhecimento genético e genômico, não é possível o reconhecimento de cada um de seus nove pares cromossômicos. Uma estratégia que auxilia na definição do cariótipo é o desenvolvimento de marcadores específicos para cada par cromossômico, que podem ser obtidos a partir da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) de sequências genômicas clonadas em cromossomos artificiais de bactérias (BACs). No presente trabalho, 27 BACs contendo genes ou regiões gênicas de *Passiflora* foram utilizados como sondas para a construção de um mapa físico do maracujá-azedo por BAC-FISH integrando a localização de sequências únicas e repetidas. Destes, 12 clones puderam ser mapeados, permitindo a identificação com marcas únicas de oito dos pares cromossômicos, sendo o par cinco identificado com o DNA r 5S. Além disso, foi demonstrada a distribuição dispersa de retroelementos Ty1-*copia*, Ty3-*gypsy* e LINE. Os resultados do presente trabalho corroboram a importância da FISH na caracterização e identificação cromossômicas, tanto com sequências repetitivas quanto com clones com grandes insertos como sonda (BAC-FISH), propiciando o desenvolvimento de marcadores cromossomo-específicos e um mapa citogenético para o maracujá-azedo.

Palavras-chave: BAC-FISH, mapa físico, mapa gênico, DNA repetitivo, retrotransposons.

Abstract

Passiflora is the largest genus of the Passifloraceae family, and includes about 500 species. It originates in tropical America and more than 135 species are native to Brazil. Among the main species of the genus, the sour passion-fruit *Passiflora edulis* Sims is of great importance because of their commercial interest, primarily as a fruitful plant. Despite the advances in genetic and genomic knowledge, it has not been possible to distinguish each one of its nine chromosome pairs. One strategy that helps karyotype definition is the development of markers specific for each chromosome pair, which can be obtained from fluorescent *in situ* hybridization (FISH) of cloned genomic sequences in bacterial artificial chromosomes (BACs). In this study, 27 BACs containing genes or gene regions of *Passiflora* were used as probes to construct a physical map of the sour passion-fruit using BAC-FISH. Subsequently, 12 clones have been mapped allowing the identification of eight chromosome pairs with unique signal, the fifth pair being identified by the 5S rDNA. Furthermore, a dispersed distribution of retrotransposons Ty1-copia, Ty3-gypsy and LINE was demonstrated. The results of this study confirm the importance of FISH in chromosome characterization and identification, using both repetitive sequences and clones with large inserts as probe (BAC-FISH), promoting the development of chromosome-specific markers and a cytogenetic map for the sour passion-fruit.

Key words: BAC-FISH, physical map, genic map, repetitive DNA, retrotransposons.

Sumário

Agradecimentos

Resumo

Abstract

1. Apresentação	1
2. Revisão de Literatura	4
2.1. Citogenética clássica e molecular	5
2.1.1. Citogenética convencional e bandeamento cromossômico	5
2.1.2. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente - FISH	6
2.2. Bibliotecas genômicas e mapeamento físico	8
2.3. O gênero <i>Passiflora</i>	9
2.3.1. Importância econômica do gênero <i>Passiflora</i>	10
2.3.2. Citogenética do gênero <i>Passiflora</i>	11
3. Referências bibliográficas	13
4. Artigo a ser submetido à revista “Theoretical and Applied Genetics”	18
Anexo I	34
Anexo II	37
5. Conclusões	41
Anexo III	43

1. Apresentação

1. Apresentação

O gênero *Passiflora* da família Passifloraceae, ordem Malpighiales, possui distribuição nas regiões tropicais e subtropicais da América, África e Ásia, sendo o gênero com maior número de espécies da família (Ulmer e MacDougal 2004). Abrange 135 espécies descritas para o Brasil, sendo 83 delas endêmicas (Cervi et al. 2012). Dentre as principais espécies do gênero, destaca-se o maracujá-azedo, *P. edulis* Sims, em virtude de seu interesse comercial, como planta frutífera.

As espécies do gênero *Passiflora* possuem uma ampla variação no tamanho e número cromossômico, podendo ser agrupadas em quatro grupos: $x = 6$, $x = 9$, $x = 10$ e $x = 12$. A maioria das espécies é diplóide, com $2n = 12$, $2n = 18$, $2n = 20$ ou $2n = 24$, com algumas tetraplóides ($2n=24$), hexaplóides ($2n=36$) e octoplóides ($2n=72$) (Melo e Guerra, 2003). O maracujá-azedo possui cariótipo com $2n=18$, sendo sete pares metacêntricos (2 a 7 e 9) e dois pares submetacêntricos (1 e 8). Apresenta um comprimento total do complemento haplóide de 25,58 μm e dois pares de DNA ribossomal (DNAr) 45S no braço curto do cromossomo 7 e no braço longo do cromossomo 8, e um par de sítios de DNAr 5S no braço longo do par cromossômico 5 (Penha, 2012). A identificação dos cromossomos portadores de DNAr, no entanto, é controversa entre diferentes autores e os demais cromossomos do cariótipo não podem ser reconhecidos devido à semelhança de tamanho e morfologia.

Para auxiliar no melhoramento genético desta espécie foram desenvolvidos mapas de ligação (Carneiro et al. 2002; Lopes et al. 2006; Oliveira et al. 2008), mas estes não estão integrados a dados cromossômicos nem genômicos. Recentemente, foi construída para *Passiflora edulis* uma biblioteca genômica com 82.944 clones BAC (cromossomos artificiais de bactérias). Os sequenciamento dos terminais de 5,974 BACs foi utilizada para obter uma visão geral do conteúdo gênico e sequências repetitivas do genoma da espécie. Além disso, quatro BACs foram selecionados com sequências gênicas e mapeados nos cromossomos 1 (gene ERS), 3 (gene ACCO) e 4 (genes G3PD e CYCD1). Outras quatro sondas BACs (genes EMB, LOX, NDID e MIPS) apresentaram sinais de hibridização subteloméricos, pericentroméricos ou dispersos, indicando a presença de DNA repetitivo nos clones. Com base em análises de FISH, definiu-se um novo cariótipo para o maracujá-azedo, com marcadores específicos para os cromossomos 1, 3 e 4, e localizando também sítios de DNAr 45S nos cromossomos 7 e 8, e um sítio de DNAr 5S no cromossomo 5 (Penha, 2012). Um conjunto maior de marcadores, entretanto, é necessário para reconhecer todos os cromossomos da espécie, permitir integração com mapas genéticos e sequências genômicas e realizar estudos de evolução cariotípica no gênero. Por tanto o objetivo deste trabalho foi

construir um mapa citogenético para o maracujá-azedo, *Passiflora edulis* Sims, integrando a localização de sequências únicas e repetidas.

1. Revisão de Literatura

2. Revisão de Literatura

2.1. Citogenética clássica e molecular

2.1.1. Citogenética convencional e bandeamento cromossômico.

As técnicas convencionais de coloração cromossômica são geralmente a primeira abordagem utilizada para a caracterização cariotípica de germoplasma, pois permitem a obtenção de informações básicas sobre diversas características citogenéticas. Nas últimas décadas, o uso de técnicas citogenéticas tem possibilitado a descrição de importantes características cariotípicas, como, por exemplo, o número e o comprimento cromossômico médio, a razão entre os braços cromossômicos e o padrão de condensação. Características físicas adicionais, como a presença e a posição de constrições secundárias e cromossomos satelitados também são essenciais à análise cariotípica. Esses dados cariotípicos permitem a comparação entre táxons e a identificação de variações cromossômicas inter- e intraespecíficas (Yokota, 1990; Guerra et al., 1997; Melo et al., 2011). As técnicas de coloração convencional se caracterizam por evidenciar uniformemente os cromossomos, sem nenhuma preferência por tipos de cromatina, composição do DNA ou proteínas (Guerra e Souza 2002). Em muitos casos, a simples coloração citogenética convencional é insuficiente para uma análise detalhada do cariótipo, especialmente em cariótipos com cromossomos pequenos e sem diferenças morfológicas contrastantes. Por outro lado, o refinamento do cariótipo pode ser realizado com a aplicação de técnicas de coloração cromossômica diferencial, aumentando o poder de resolução da heterocromatina. Muitas das técnicas citogenéticas possuem como objetivo o estudo da heterocromatina constitutiva, como o bandamento C, o qual possibilita a caracterização da cromatina fortemente condensada durante todo o ciclo celular, geralmente sendo constituída de DNA altamente repetitivo (Sumner 2003; Guerra 2002).

O refinamento qualitativo da heterocromatina quanto à riqueza de bases AT e GC pode ser realizado com a utilização de corantes fluorescentes base-específicos. Os fluorocromos são corantes que apresentam especificidade a determinadas sequências de bases no DNA alvo, como a adenina e timina (AT), detectadas pelo uso de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Hoechst 33258 e a quinacrina. Contudo, a cromomicina A3 (CMA3) e a mitramicina apresentam afinidade por regiões ricas em guanina e citosina (GC). Outras moléculas, como a distamicina A (DA) e a actinomicina D (AMD) podem ser empregadas como contra-corantes, aumentando o contraste das colorações (Sumner 2003; Kim et al. 2002). O uso da cromomicina A3 pode ser realizado para a detecção das regiões organizadoras de nucléolos (RONS), visto que estas regiões são normalmente flanqueadas por heterocromatina constitutiva ricas em pares de bases GC. Em *Allium communtatum* Guss.

(Aliaceae) a aplicação sequencial das técnicas CMA3/DAPI e nitrato de prata (AgN03) revelaram que as marcações com CMA3 encontravam-se colocalizadas às RONS (Besendorfer et al. 2002). No gênero *Solanum* a identificação de regiões ricas em GC demonstraram relação com constrições secundárias e satélites, sendo um importante marcador citológico para o grupo (Melo et al. 2011).

2.1.2. Hibridização *in situ* fluorescente - FISH

A técnica de FISH (hibridização *in situ* fluorescente) pode ser utilizada, entre diversas aplicações, em conjunto com outras ferramentas, para caracterizar mais detalhadamente o complemento cromossômico de várias espécies vegetais. O princípio dessa técnica consiste na ligação não covalente de determinada sequência de DNA de fita simples ou RNA, denominada sonda, com uma sequência de nucleotídeos complementar situada na célula. O objetivo nesse caso é verificar se a célula possui essa sequência e qual a sua exata localização nos cromossomos. A técnica se baseia no fato que o DNA é formado por duas fitas complementares, as quais podem ser separadas em fitas simples, ou desnaturadas, e posteriormente renaturadas, voltando ao estado de fita dupla. Durante a renaturação do DNA cromossômico, caso haja sonda disponível no meio de hibridização, as cópias da sonda competirão com as fitas do DNA cromossômico e poderão ser hibridizadas *in situ*, isto é, no sítio exato onde aquela sequência ocorre naturalmente (Guerra 2004) (Fig. 1).

A FISH tem sido muito empregada para esclarecer a composição e organização dos cromossomos. O DNA nuclear é constituído por sequências codificadoras de cópia única ou pequeno número de cópias, íntrons, promotores e sequências de DNA reguladoras, assim como também por várias classes de sequências de DNA repetitivo. As sequências de DNA repetitivo, constituídas por centenas a milhares de unidades dispostas em tandem ou dispersas no genoma, formam uma grande parte dos genomas de plantas, e estão sujeitas a rápidas mudanças nas sequências ou no número de cópias, podendo ser sequências de DNA satélites, microssatélites, elementos transponíveis, DNA ribossomal entre outros (Heslop-Harrison e Schwarzbacher, 2011). As sequências repetidas em tandem ou DNA satélite consistem em motivos repetidos com várias cópias em uma ou mais localizações genômicas. Embora a maior parte seja não-codificante, um exemplo de sequências repetidas em tandem são os DNA ribossomais (DNAr), que são genes para RNAr e espaçadores intergênicos, organizados em tandem nos locos de DNAr 5S e 45S, e frequentemente utilizados como sondas heterólogas na FISH por apresentarem sequências conservadas que podem ter sua localização comparada em diversas espécies (Ganet al. 2013; Fukushima et al. 2011).

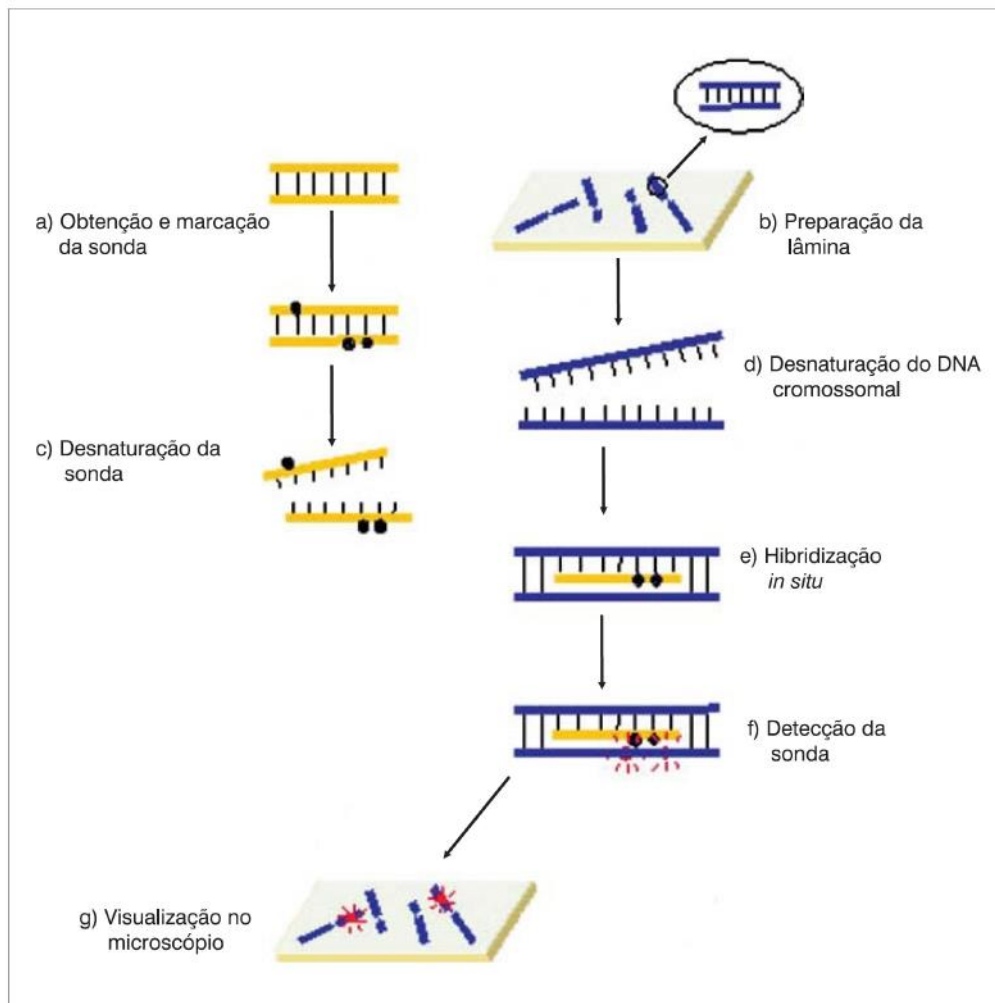


Fig. 1 - Esquema simplificado da técnica de hibridização *in situ*. (a) A sequência de DNA a ser usada como sonda deve ser isolada e marcada. (b) Paralelamente, devem ser preparadas lâminas com cromossomos espalhados. (c, d, e) Posteriormente, os DNAs da sonda e dos cromossomos devem ser desnaturados e colocados em contato para que ocorra a renaturação e a hibridização *in situ*. (f, g) A localização da sonda é feita por uma molécula reconhecidora ligada a um fluorocromo e observada sob microscopia de fluorescência. Fonte: Brasileiro-Vidal e Guerra (2002)

Os elementos transponíveis, que incluem sequências que codificam para enzimas relativas à sua própria replicação e integração no DNA nuclear (Heslop-Harrison e Schwarzacher 2011), estão distribuídos em diferentes regiões dos genomas (por exemplo, pericentroméricas ou subteloméricas), e podem ser utilizadas para identificação cromossômica quando marcadas e localizadas através da FISH (Kato et al. 2004; Fonsêca et al. 2010). Além da caracterização da composição do genoma, a técnica de FISH é ideal para: (i) construir mapas em cromossomos, independentemente do seu grau de condensação; (ii) analisar alterações cromossômicas estruturais, como fusão, fissão e translocação cromossômicas; (iii) inferir a evolução cromossômica e genômica; (iv) determinar a expressão gênica e (v) identificar sequências virais inserida em genomas. A localização de sequências de copia únicas têm sido possível principalmente através da hibridação de cromossomos

artificiais bacterianos (BACs) para a amplificação do sinal de detecção da sonda no DNA alvo (Zhang et al. 1996; Peterson et al. 2000; Chester et al. 2010).

2.2. Bibliotecas genômicas e mapeamento físico

Bibliotecas genômicas constituídas por clones contendo grandes insertos são importantes ferramentas utilizadas na construção de mapas físicos. Os clones obtidos por ligação entre grandes fragmentos de DNA genômico e vetores BACs ou YACs são os mais utilizados por terem a capacidade de armazenar insertos contendo centenas de quilobases de forma estável (Peterson et al. 2000). As bibliotecas de BACs, com insertos de aproximadamente 200kb, são muito mais utilizadas devido ao fato de apresentarem baixos níveis de quimerismo, alta eficiência de clonagem, além de fácil isolamento e manipulação dos insertos de DNA (Song et al. 2001). Devido às suas vantagens, inúmeras bibliotecas foram construídas em plantas a partir da utilização desse tipo de clone, armazenando em média insertos de aproximadamente 100 kb (Men et al. 2001; Yang et al. 2003; Wu et al. 2004) (Fig. 2).

Os mapas físicos consistem na representação em pares de bases ou em micrômetros das distâncias entre duas sequências de DNA, diferente dos mapas de ligação, que refletem distâncias relativas estimadas a partir da frequências de recombinação entre dois marcadores e são medidas em cM (Pedrosa-Harand e Guerra 2004). Existem três formas mais comuns de se construir um mapa físico. A primeira se baseia na correlação entre ausência de determinado marcador e ausência de um fragmento cromossômico em estoques citogenéticos de deleções e translocações. A segunda, na construção de sequências contíguas (*contigs*) de BACs (cromossomos artificiais de bactérias) ou YACs (cromossomos artificiais e levedura) abrangendo parte ou todo o genoma. E a última é através do mapeamento de clones de DNA diretamente nos cromossomos mediante a FISH. Assim, o princípio da técnica de BAC-FISH consiste em isolar BACs que possuam a sequência-alvo de interesse, e marcá-lo para ser utilizado como sonda em ensaios de FISH (Jiang e Gill 2006).

Vários mapas citogenéticos foram construídos para plantas utilizando BAC-FISH, como o mapa de *Oryza sativa*, o arroz (Cheng et al. 2001), o mapa de *Lupinus angustifolius* (Książkiewicz 2013), de girasol *Helianthus annuus* L. (Feng 2013) e o mapa de *Phaseolus vulgaris*, o feijão comum (Fonsêca et al. 2010). Nesse último, 35 BACs mapeados nos onze cromossomos do mapa de *P. vulgaris* ($2n = 22$), mais sondas de DNAr 5S e 45S, e a distribuição da heterocromatina localizada com BACs portadores de sequências repetidas pericentroméricas e subteloméricas, possibilitaram reconhecer todos os pares cromossômicos do complemento (Pedrosa-Harand et al. 2009; Fonsêca et al. 2010).

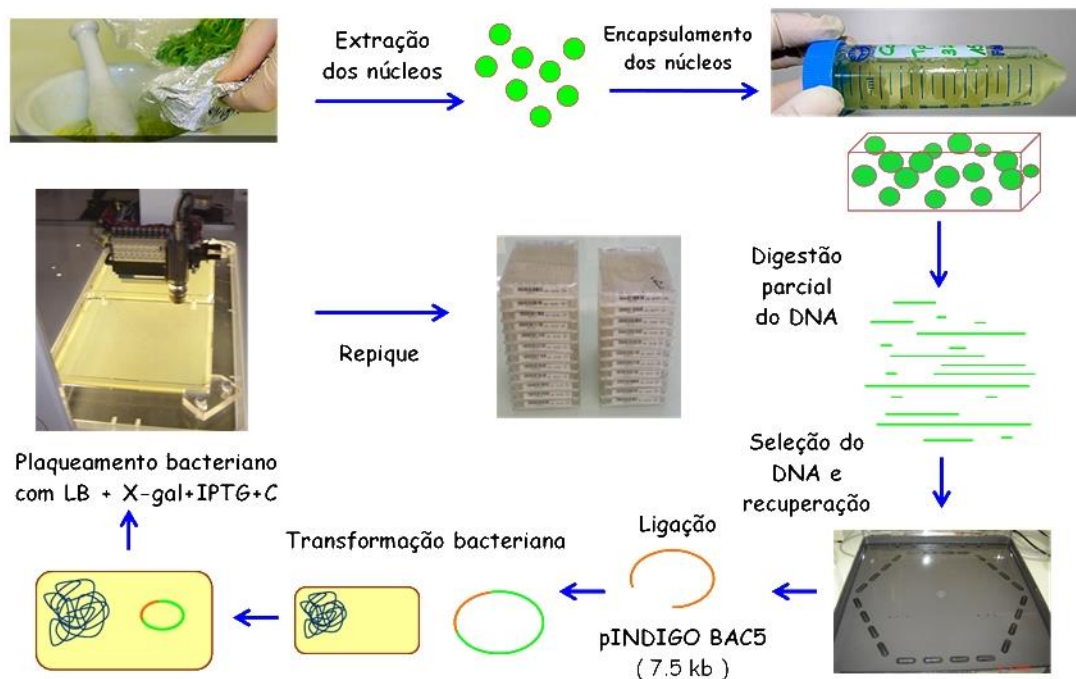


Fig. 2 - Representação esquemática da construção de uma biblioteca genômica inserida em BACs. Reproduzido de Penha, 2012.

A facilidade de sequenciamento dos clones de BAC possibilitou também o desenvolvimento da estratégia de BAC-End Sequencing (Venter et al. 1998), que tem facilitado aos pesquisadores a ter uma primeira visão sobre a composição de um genoma pela análise das sequências das pontas dos insertos da biblioteca e o mapeamento de genes de cópia simples (Peterson et al. 2000). Os *BAC-endssequences* (BES) também são úteis para a busca de marcadores microssatélites e SNPs, os quais vêm sendo utilizados para o desenvolvimento e a saturação de mapas de ligação em diversas espécies (Han et al. 2011; Rabbi et al. 2012).

2.3. O gênero *Passiflora*

O gênero *Passiflora* L. pertence à família Passifloraceae Juss., que está taxonomicamente estruturada em 17 gêneros e duas tribos, Paropsiae e Passiflorieae. No Novo Mundo, a família é representada por cinco gêneros (*Passiflora*, *Mitostemma* Mast., *Dilkea* Mast, *Ancistrothyrsus* Harms e *Tetrastylis* Barb. Rodr.), sendo o primeiro o mais representativo com aproximadamente 500 espécies (Escobar 1988; Muschner et al. 2003). A América do Sul é o centro de origem de mais de 95% das espécies de *Passiflora*, sendo o Brasil um dos principais centros de diversidade com três gêneros relatados, *Passiflora*, *Dilkea* e *Mitostemma*, com em torno de 200 espécies endêmicas (Bernacci 2013). O gênero *Passiflora* foi estabelecido por

Linnaeus em 1735. Através da análise de caracteres florais e vegetativos, Killip (1938) propôs 22 subgêneros: *Apodogyne*, *Astephia*, *Tryphostemmatoïdes*, *Deidamioides*, *Plectostemma*, *Chloropanthus*, *Murucuja*, *Pseudomurucuja*, *Psilanthus*, *Adenosépala*, *Tacsoniopsis*, *Rathea*, *Tacsonia*, *Distephana*, *Calopanthus*, *Tacsonioides*, *Passiflora*, *Dysosmia*, *Dysosmioides*, *Polyanthea*, *Astrophea* e *Manicata*. A subdivisão do gênero *Passiflora* em apenas quatro subgêneros (*Astrophea*, *Deidamioides*, *Decaloba* e *Passiflora*) foi proposta por Ulmer e MacDougal (2004) utilizando principalmente aspectos morfológicos para a análise taxonômica. Estudos filogenéticos e taxonômicos mais recentes (Hansen et al. 2006; Muschner et al. 2012), utilizando dados moleculares de sequências plastidiais e nucleares, também sugeriram redução no número de subgêneros propostos por Killip (1938), corroborando os quatro gêneros sugeridos por Ulmer e MacDougal (2004) e com a proposição de inclusão do novo subgênero *Tryphostemmatoïdes* (Muschner et al. 2012).

Uma característica marcante em espécies do gênero é a morfologia floral com simetria radial e a presença de discos nectaríferos na base do hipanto. A presença de corola filamentosa é uma característica diagnóstica e restrita às espécies de *Passiflora*, fato que sustenta a monofilia do grupo (Judd et al. 1999).

2.3.1 Importância econômica do gênero *Passiflora*.

As passifloras são popularmente conhecidas como maracujazeiros e largamente utilizadas para o consumo *in natura* e na indústria alimentícia, apresentando grande importância econômica na agricultura e na horticultura. As espécies de maior importância econômica no Brasil são *Passiflora edulis* (o maracujá-azedo ou amarelo) e *P. alata* Curtis (o maracujá doce), sendo o país um dos maiores produtores e consumidores mundiais (Agrianual 2011). A utilização cosmética e farmacêutica das passifloras também é bastante representativa, as quais possuem flavonóides com atividade ansiolítica, hipnótica e sedativa (Sakalem et al. 2012). A produção anual brasileira foi estimada em cerca de 923.035 toneladas em 2013, revelando a importância socioeconômica desta cultura para o país (IBGE 2013). O nordeste brasileiro é a região do país de maior produção, liderada pela Bahia (410.078 t/ha), seguido pelos estados da região sudeste: Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro (IBGE 2013). As passifloras também possuem o status de planta ornamental por serem dotadas flores vistosas, de coloração forte, brilhante e de beleza exótica, florescimentos mais de uma vez ao ano e grande capacidade de produção (Abreu et al., 2009).

2.3.2. Citogenética do gênero *Passiflora*

As espécies de *Passiflora* estudadas possuem certa amplitude para tamanho e número de cromossomos, com espécies diplóides com $2n = 12$, $2n = 18$, $2n = 20$ e $2n = 22$ (Melo et al. 2001; Souza et al. 2008) e algumas espécies tetraplóides ($2n = 24$), hexaplóides ($2n = 36$) ou octaplóides ($2n = 72$), considerando $x = 6$ como número básico (Snow e MacDougal 1993; Melo et al. 2001). O gênero possui número básico primário ($x = 6$), no entanto, números básicos secundários foram propostos ($x = 9, 10, 12$) (Storey 1950; Melo et al. 2001; Hansen et al. 2006). Estudos recentes baseados em sequências indicam $x = 12$ como o número básico mais provável considerando a filogenia proposta para o gênero (Hansen et al. 2006). A evolução citogenética do grupo teve como base os eventos de disploidia e poliploidia (Melo et al. 2001; Souza et al. 2008).

As espécies do gênero *Passiflora* possuem cromossomos com morfologia variando de meta- a submetacêntrico, com o complemento cromossômico total variando de 32,9 μm a 62,3 μm (Souza et al. 2003; Vieira & Carneiro 2004). A caracterização citogenética realizada através da FISH tem demonstrado variações no número de sítios de DNAr 45S e 5S. Melo e Guerra (2003) investigaram a variabilidade dos sítios de DNAr 5S e 45S em 20 espécies de *Passiflora*, observando que as espécies com $x = 6$ apresentam apenas um par de sítios de DNAr 45S e 5S, enquanto as com $x = 9$ e $x = 10$ frequentemente apresentam mais de um par de sítios de DNAr 45S e apenas um par de DNAr 5S. Em maracujá-azedo, estes autores observaram sítios de DNAr 45S no braço longo dos cromossomos 7 e 9, e um sinal de DNAr 5S localizado no braço longo do cromossomo 5.

Estudos envolvendo bandamento em regiões organizadoras do nucléolo (RONs) usando a prata para fins de detecção das RONs ativas (Schwarzacher et al. 1980), foram feitas em *P. alata*, *P. amethystina*, *P. coccinea*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. incarnata* and *P. maliformis* (Mayeda 1997). Em algumas espécies, foi revelada a existência de mais de um par de cromossomos portadores de RONs, como observado em *P. coccinea*, onde foram visualizados de 1 a 6 nucléolos na intérfase mitótica (Mayeda 1997). Em *P. edulis* a autora identificou estas regiões associadas com a constrição secundária nos cromossomos 8 e 9. Melo et al. (2001) aplicaram a técnica de bandamento CMA₃ (Cromomicina 3) e DAPI (4',6-diamidino-2-phenlindol) em oito espécies de *Passiflora*, quais sejam: *P. amethystina*, *P. caerulea*, *P. capsularis*, *P. edulis*, *P. foetida*, *P. racemosa*, *P. rubra* e *P. tricuspidis*. Os autores observaram de um a três pares de blocos CMA₃ positivos, mas não encontraram heterocromatina DAPI positiva.

Passiflora edulis

Em maracujá-azedo ($2n = 18$), análises do cariótipo revelaram valores médios de comprimento dos cromossomos metafásicos variando de 3,16 μm (par 1) a 1,82 μm (par 9), totalizando um comprimento para o complemento haplóide de 22,66 μm . Ainda, observou-se que os pares 1 e 8 são submetacêntricos e os demais metacêntricos (Cuco et al. 2005). Praça et al. (2008) realizaram um estudo particularmente importante, já que usaram metáfases mais distendidas que os demais autores, permitindo uma melhor caracterização da morfologia cromossômica. A análise revelou seis pares de cromossomos metacêntricos (2-7) e três pares submetacêntricos (1, 8 e 9). Variações no número e na localização de constrições secundárias presentes no cariótipo do maracujá-azedo foram relatadas por diferentes autores. Oliveira (1996) descreveu uma constrição secundária no cromossomo 8 da espécie; Mayeda (1997) e Cuco et al. (2003) relataram a presença de constrições secundárias nos cromossomos 8 e 9, enquanto Soares-Scott (1998) identificou constrições secundárias nos braços longo dos pares cromossômicos 4 e 7. Praça et al. (2008) revelaram a localização destas constrições nos cromossomos 1, 2, 7 e 8. Dessas, apenas as constrições nos cromossomos 7 e 8 estariam associadas sítios de DNA r 45S ativos como regiões organizadoras no nucléolo (RONs).

Estudos sobre o conteúdo de DNA estão disponíveis para algumas espécies do gênero. Souza et al. (2004), através da técnica de citometria de fluxo, demonstraram que o conteúdo 2C de DNA variou entre 1,83 pg para *P. suberosa* e 5,36 pg para *P. quadrangularis*. Para o maracujá-azedo, o valor encontrado foi 3,19 pg. Um recente trabalho, utilizando a mesma técnica, revelou o conteúdo de DNA para 50 espécies de *Passiflora*, sendo 36 do subgênero *Passiflora*, e 13 do subgênero *Decaloba*. As variações entre o maior e menor genoma foram maiores que 10 vezes, sendo de $2C = 0,424$ pg em *P. organensis*, subgênero *Decaloba*; a $2C = 4,416$ pg em *P. alata*, subgênero *Passiflora* (Yotoko et al. 2011). Para o maracujá-azedo o genoma foi estimado em 1.258 pg (Yotoko et al. 2011).

Recentemente, foi construída para *Passiflora edulis* uma biblioteca genômica com 82.944 clones BAC, com tamanho médio dos insertos de 108 kb. Desta biblioteca foram analisadas 5.974 sequências de regiões terminais de BACs (BES), que foram usadas para fornecer informações sobre microssintenia com outros genomas sequenciados, sobre a composição do genoma, densidade gênica e ocorrência e distribuição de sequências repetitivas como elementos transponíveis (TEs) e sequências de microssatélites (SSRs). Oito BACs foram selecionados da biblioteca com genes isolados do maracujá e utilizados no mapeamento cromossômico da espécie. Destes, quatro apresentaram sinal único de hibridização e foram mapeados nos cromossomos 1 (gene ERS), 3 (gene ACCO) e 4 (genes

G3PD e CYCD1). Quatro sondas (genes EMB, LOX, NDID e MIPS) apresentaram sinais de hibridização subteloméricos, pericentroméricos ou dispersos, indicando a presença de DNA repetitivo (Santos et al. 2014).

3. Referências Bibliográficas

- Abreu PP, Souza MM, Santos EA, Pires MV, Pires MM, Almeida AAF (2009) Passionflower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. *Euphytica* 166:307–315
- Agrianual (2011) Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP, Consultoria & Agroinformativos, pp345–350. <http://www.agrianual.com.br/>. <http://www.agrianual.com.br/>
- Bernacci LC, Cervi AC, Milward-de-azevedo MA, Nunes TS, Imig DC, Mezzonato AC (2013) Passifloraceae In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128567>. 2013
- Besendorfer V, Samardžija M, Zoldoš V, Šoljæ ME & Papeš E (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
- Brasileiro-Vidal AN, Guerra M (2002) Citogenética molecular em cereais. In: Brammer SP, Iorczeski EJ (org) Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal. Passo Fundo: Embrapa Trigo. pp 277–298
- Carneiro MS, Camargo LEA, Coelho ASG, Vencovsky R, Leite Júnior RP, Stenzel NMC, Vieira MLC (2002) RAPD-based genetic linkage maps of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg) *Genome Ottawa* 45: 670-678
- Cervi AC, Milward-de-Azevedo MA & Bernacci LC (2012) Passifloraceae. In: Forzza, RC et al (ed) Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB012506>. Acesso em 28 Jul 2012
- Cheng Z, Presting GG, Buell CR, Wing RA Jiang J (2001) High-resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosomes anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. *Genetics* 157:1749–1757
- Chester M, Leitch AR, Soltis PS, Soltis DE (2010) Review of the Application of Modern Cytogenetic Methods (FISH/GISH) to the Study of Reticulation Polyploidy /Hybridisation). *Genes* 1:166–192

- Cuco SM, Mondin M, Vieira MLC, Aguiar-Perecin MLR (2003) Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). *Acta Bot Bras* 17:1–7
- Cuco SM, 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
- Escobar LK (1988) Passifloraceae. In: Pinto P, Lozano G (eds) *Flora de Colombia*. Universidade Nacional da Colombia Bogotá v10 p 1–138
- Feng J, Liu Z, Cai X, Jan CC (2013) Toward a Molecular Cytogenetic Map for Cultivated Sunflower (*Helianthus annuus* L.) by Landed BAC/BIBAC Clones. *G3 Genes| Genomes| Genetics* 3:31–40. doi:10.1534/g3.112.004846
- Fonsêca A, Ferreira J, Dos Santos TRB, Mosiolek M, Bellucci E, Kami J, Gepts P, Geffroy V, Schweizer D, Santos KGB dos, Pedrosa-Harand A (2010) Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Chromosome Res* 18:487–502
- Fukushima K, Imamura K, Nagano K, Hoshi Y (2011) Contrasting patterns of the 5S and 45S rDNA evolutions in the *Byblis liniflora* complex (Byblidaceae). *J Plant Res* 124:231–244
- Gan Y, Liu F, Chen D et al (2013) Chromosomal Locations of 5S and 45S rDNA in *Gossypium* Genus and Its Phylogenetic Implications Revealed by FISH. *PLoS One* 8(6):e68207
- Guerra M (2004) Hibridização in situ: princípios básicos. In: Guerra M (Org) *FISH- Conceitos e aplicações na citogenética*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, pp1–32
- Guerra M, Pedrosa A, Silva AEB, Cornelio MTM, Santos K, Soares WD (1997) Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a *Citrus* germplasm bank. *Revista Brasileira de Genética* 20(3):489–496
- Guerra M, Souza MJ (2002) Como analisar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002, 132 p.
- Han Y, Zheng D, Vimolmangkang S, Khan M, Beever JE, Korban SS (2011) Integration of physical and genetic maps in apple confirms whole-genome and segmental duplications in the apple genome. *J Exp Bot* 62:5117–5130
- Hansen AK, Gilbert LE, Simpson BB, Downie SR, Cervi AC, Jansen RK (2006) Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. *Syst Bot* 31:138–150
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T (2011) Organisation of the plant genome in chromosomes. *Plant J* 66:18–33
- Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. Produção agrícola municipal. Disponível em: <<http://sidra.ibge.gov.br/2010>>. Acesso em: 12 nov. 2010

- Jiang J, Gill BS (2006) Current status and the future of *fluorescence in situ hybridization* (FISH) in plant genome research. *Genome* 49:1057–1068
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF (1999) *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 464 p
- Kato A, Lamb JC, Birchler JA (2004) Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. *PNAS* 101(37):13554–13559
- Killip EP (1938) The American species of *Passifloraceae*. Field Museum of Natural History. Botanical series, 19:1–613
- Kim ES, Punina EO, Rodionov AV (2002) Chromosome CPD (PI/DAPI)- and CMA/DAPI-banding patterns in *Allium cepa* L. *Russ J Genet* 38:392–398
- Książkiewicz M, Wyrwa K, Szczepaniak A, Rychel S, et al (2013) Comparative genomics of *Lupinus angustifolius* gene-rich regions: BAC library exploration, genetic mapping and cytogenetics. *BMC Genomics* 14:79. Doi: 10.1186/1471-2164-14-79
- Lopes R, Lopes MTG, Carneiro MS, Matta FP, Camargo LEA, Vieira MLC (2006) Linkage and mapping of resistance genes to *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae* in yellow passion fruit. *Genome Ottawa* 49: 17-29
- Mayeda LY (1997) Estudo citogenético em dez táxons do gênero *Passiflora* L. (*Passifloraceae*), 89 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo Piracicaba
- Melo CAF, Martins MIG, Oliveira MBM, Benko-Iseppon AM, Carvalho R (2011) Karyotype analysis for diploid and polyploid species of the *Solanum* L. *Plant Systematics and Evolution*, 293: 227-235
- Melo NF, Cervi AC, Guerra M (2001) Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (*Passifloraceae*). *Plant Syst Evol* 226:69–84
- Melo NF, Guerra FMS (2003) Variability of the 5S and 45SrDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Ann Bot-London* 92:309–316
- Men AE, Meksem K, Kassem MA (2001) A bacterial chromosome library of *Lotus japonicus* constructed in an *Agrobacterium tumefaciens*-Transformable vector. *Mol Plant Microbe In* 14:422–425
- Muschner VC, Lorenz AP, Cervi AC, Bonatto SL, Souza-Chies T, Salzano FM, Freitas LB (2003) A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (*Passifloraceae*). *Am J Bot* 90:1229–1238
- Muschner VC, Zamberlan PM, Bonatto SL, Freitas LB (2012) Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (*Passifloraceae*). *Genet Mol Biol* 35:1036–1043

- Oliveira EJ, Vieira MLC, Garcia AAF, Munhoz CF, Margarido GRA, Consoli L, Matta FP, Moraes MC, Zucchi MI, Fungaro MHP (2008) An integrated molecular map of yellow passion fruit based on simultaneous maximum-likelihood estimation of linkage and linkage phases. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria. 133: 35-41
- Pedrosa-Harand A, Guerra M. (2004) Contribuições da FISH para a citogenética de plantas. In: Guerra M (Org) FISH: conceito e aplicações na citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, pp 33–60
- Pedrosa-Harand A, Kami J, Gepts P, Geffroy V, Schweizer D (2009) Cytogenetic mapping of common bean chromosomes reveals a less compartmentalized small-genome plant species. *Chromosome Res* 17:405–417
- Penha HP (2012) Construção de uma biblioteca genômica de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* inserida em BACs (Bacterial Artificial Chromosome) e mapeamento cromossômico usando *hibridação in situ fluorescente*. Tese de doutorado USP, Brazil. [www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-25092012-101518/]
- Peterson DG, Tomkins JP, Frisch DA, Wing RA, Paterson AH (2000) Construction of plant artificial chromosome (BAC) libraries: An illustrated guide. *J Agric Genomics* 5:1–3
- Praça MM, Carvalho RC, Marcelino FC, Mendonça MAC (2008) Morphological aspects of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* chromosomes using acridine orange banding and rDNA-FISH tools. *Caryologia* 61:154–159
- Rabbi IY, Kulembeka HP, Masumba E, Marri PR, Ferguson M (2012) An EST-derived SNP and SSR genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet* 125:329–342
- Sakalem M, Negri G, Tabach R (2012) Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. *Rev Bras Farmacogn* 22:1219–1232
- Santos AA dos, Penha HA, Bellec A, Freitas MC De, Pedrosa-Harand A, Bergès H, Carneiro Vieira ML (2014) Begin at the beginning: A BAC-end view of the passion fruit (*Passiflora*) genome. *BMC Genomics* 15:816
- Schwarzacher HG, Mikelsaar AV, Schnedl W (1980) The nature of Ag- staining of nucleolus organizer regions. *Cytogenet Cell Genet* 20:24–39
- Snow N, MacDougal JM (1993) New chromosome reports in *Passiflora* (Passifloraceae). *Syst Bot* 18:261–273
- Soares-Scott MD (1998) Caracterização citogenética de algumas espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora*. 89p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)- Instituto de Ciências Biológicas Universidade Estadual de Campinas, Campinas

- Song JF, Jiang DJ (2001) Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for potato molecular cytogenetics research. *Genome* 43:199–204
- Souza MM, Palomino G, Pereira MG, Viana AP (2004) Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species. *Hereditas* 141:31–38
- Souza MM, Palomino G, Pereira TNS, Pereira MG, Viana AP, Silva LC, Sudré CP (2003) Variação interespecífica do tamanho do genoma em *Passiflora* spp. (Passifloraceae). In: 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas SBMP Livro eletrônico, 297-302.
- Souza MM, Pereira TNS, Vieira MLC (2008) Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasizing Brazilian species. *Braz Arch Biol Techn* 51:247–258
- Storey WB (1950) Chromosomes numbers of some species of *Passiflora* occurring in Hawaii. *Pac Sci* 4:37–42
- Sumner AT (2003) *Chromosomes: Organization and Function*. Blackwell Publishing Limited, 304p.
- Ulmer T, MacDougal JM (2004) *Passiflora: Passion flowers of the World*. Timber Press, Portland
- Venter JC, Adams MD, Sutton GG, Kerlavage AR, Smith HO, Hunkapiller M (1998) Shotgun sequencing of the human genome. *Science* 280:1540–1542
- Vieira MLC, Carneiro MC (2004) *Passiflora* spp. Passionfruit. In: Litz R (ed) *Biotechnology of fruit and nut crops*. CABI, Oxford, pp 436–453
- Wu C, Sun S, Nimmakayala P, Santos FA, Meksem K, Springman R, Ding K, Lightfoot DA, Zhang HB (2004) A BAC and BIBAC-based physical map of the soybean genome. *Genome Res* 14:319–326
- Yang J, Wang Q, Deng D (2003) Construction and Characterization of a Bacterial Artificial Chromosome Library of Maize Inbred Line 77Ht2. *Plant Mol Biol Repr* 21:159–169
- Yokota M (1990) Karyomorphological studies on *Habenaria*, Orchidaceae and allied genera from Japan. *Journal of Science of the Hiroshima University* 2: 53-161
- Yotoko KSC, Dornelas MC, Togni PD, Fonsêca TC, Salzano FM, Bonatto SL, Freitas LB (2011) Does variation in genome sizes reflect adaptive or neutral processes? New clues from *Passiflora*. *Plos One* 6:127–131
- Zhang HB, Woo SS, Wing R (1996) A BAC, YAC and cosmid library construction. In: Foster G, Twell D (eds) *Plant gene isolation: principles and practice*. John Wiley, England, pp75–99

4. Artigo a ser submetido à revista “Theoretical and Applied Genetics”

Mapeamento citogenético do maracujá-azedo (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae)

Sader, M.A.¹; Munhoz, C.²; Penha, H.³; Bergès, H.⁴; Vieira, M.L.C.²; Pedrosa-Harand, A.¹

1- Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal, Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

2- Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.

3- Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, Brasil.

4- Centre National de Ressources Génomiques Végétales, INRA, Toulouse, France.

Autor para correspondência:

Andrea Pedrosa-Harand

Tel. + 55 81 2126 8846

Fax + 55 81 2126 8348

E-mail: andrea.pedrosaharand@pesquisador.cnpq.br

Resumo

O maracujá-azedo, *Passiflora edulis* Sims, é uma das 500 espécies do gênero *Passiflora*, que apresenta centro de diversidade na América do Sul. Devido ao seu interesse econômico, mapas genéticos e uma biblioteca genômica de BACs (cromossomos artificiais de bactérias) foram construídos. Do ponto de vista citogenético a espécie apresenta $2n = 18$, com cromossomos de tamanho e morfologia similares, o que tem dificultado a identificação dos mesmos e levado a diferentes cariótipos propostos. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi construir um mapa citogenético para o maracujá-azedo utilizando sequências únicas e repetitivas como sondas em hibridizações *in situ* fluorescente (FISH) para permitir a futura integração com dados genéticos e genômicos. Foram selecionados 27 clones da referida biblioteca contendo genes ou regiões gênicas de *Passiflora* e três retroelementos (Ty1-copia, Ty3-gypsy e LINE). Sete BACs evidenciaram padrão disperso, semelhante ao revelado pelos retroelementos, e dois apresentaram padrão subtelomérico. Doze clones evidenciaram sinal único nas regiões terminais ou subterminais dos cromossomos e puderam ser mapeados, permitindo a identificação com marcas únicas de oito dos cromossomos, sendo o par cinco identificado com o DNAr 5S. O mapa citogenético desenvolvido para o maracujá-azedo será uma importante ferramenta para estudos genômicos e evolutivos no gênero.

Palavras-chave: BAC-FISH, mapa físico, mapa gênico, DNA repetitivo, retrotransposons.

Introdução

O gênero *Passiflora* L. pertence à família *Passifloraceae* Juss. ex Kunth, ordem Malpighiales. A família é composta por cerca de 700 espécies herbáceas ou lenhosas, arbustos e árvores, classificadas em cerca de 16 gêneros, com quase todos os seus membros pertencentes ao gênero *Passiflora*.

Este gênero apresenta 525 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da América, África e Ásia (Ulmere MacDougal 2004), com um centro de diversidade na América do Sul (Cervi et al. 2012). Uma característica marcante em espécies do gênero é a morfologia floral com simetria radial e a presença de discos nectaríferos na base do hipanto. A presença de corola filamentosa é uma característica diagnóstica e restrita às espécies do gênero, fato que sustenta sua monofila (Judd et al. 1999). Estudos filogenéticos mais recentes dividem o gênero em quatro subgêneros, *Astropheia* (57 espécies), *Decaloba* (220), *Deidamioides* (13) e *Passiflora* (240) (Feuillet e MacDougal 2003; Hansen et al. 2006), com a proposição de inclusão do novo subgênero *Tryphostemmatooides* (Muschner et al. 2012). Dentre as principais espécies, o

maracujá-azedo, *Passiflora edulis* Sims, se destaca para a produção de suco, cosméticos e fitoterápicos e para o consumo como fruta fresca (Rudnicki et al. 2007).

As espécies do gênero *Passiflora* possuem cromossomos com morfologia variando de meta- a submetacêntrica, com o complemento cromossômico total das espécies estudadas variando de 32,9 μm a 62,3 μm (Souza et al. 2003; Vieira & Carneiro 2004) e o tamanho do genoma de 0,212 pg em *P. organensis* (Decaloba) e 2,208 pg em *P. alata* (*Passiflora*) (Yotoko et al. 2011). As espécies possuem uma ampla variação no tamanho e número cromossômicos, podendo ser agrupadas em quatro grupos de acordo com seus números básicos: $x = 6$, $x = 9$, $x = 10$, $x = 12$. A maioria das espécies são diploides, com $2n = 12$, $2n = 18$, $2n = 20$, $2n = 22$ com algumas tetraploides ($2n = 24$), hexaploides ($2n = 36$) e octoploides ($2n = 72$) (Melo e Guerra 2003; Hansen et al. 2006). *Passiflora edulis* apresenta $2n = 18$. Estudos envolvendo bandejamento em regiões organizadoras do nucléolo (RONs) usando o nitrato de prata para fins de detecção das RONs ativas (Schwarzacher et al. 1980), foram feitas para *P. edulis*, identificando estas regiões associadas com a constrição secundária nos cromossomos 8 e 9 (Mayeda 1997). Melo et al. (2001) aplicaram a técnica de bandamento CMA₃ (Cromomicina 3) e DAPI (4',6-diamidino-2-phenindol) observando de um a três pares de blocos CMA₃ positivos, mas não encontraram heterocromatina DAPI positiva.

Em virtude de seu interesse comercial, mapas de ligação baseados em marcadores moleculares do tipo RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNAs*), AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) e SSRs (*Simple Sequence Repeats*) foram construídos para o maracujá-azedo (Carneiro et al. 2002; Lopes et al. 2006; Oliveira et al. 2008). Recentemente, foi construída uma biblioteca genômica de grandes insertos em cromossomos artificiais de bactérias (BACs). Bibliotecas BACs são importantes ferramentas utilizadas em análises genômicas e na construção de mapas físicos (Peterson et al. 2000). A biblioteca do maracujá-azedo possui 82.944 clones com insertos de tamanho médio de 108 kb, fornecendo uma cobertura de aproximadamente seis vezes o genoma. Desse total de clones, 5.974 tiveram seus terminais sequenciados. Estas sequências, conhecidas como *BAC-ends sequences* (BES), foram usadas para fornecer informações sobre microssintenia com outros genomas sequenciados, sobre a composição do genoma, densidade gênica e ocorrência de sequências repetitivas como elementos transponíveis (TEs) e sequências microssatélites (SSRs) (Santos et al. 2014). Além disso, quatro BACs foram selecionados da biblioteca com genes isolados do maracujá e utilizados no mapeamento cromossômico da espécie, apresentando sinais únicos de hibridização nos cromossomos 1, 3 e 4 (Penha, 2012). Desse modo, foi possível demonstrar a viabilidade de construir um mapa citogenético do maracujá-azedo por BAC-FISH, o que permitiria, como em

outras espécies vegetais, tanto a integração dos dados genéticos, genômicos e citogenéticos (Cheng et al. 2001; Pedrosa 2002; Feng 2013), como o uso desses marcadores cromossômicos para estudos de evolução cariotípica (Książkiewicz 2013). Sendo assim, o objetivo principal deste trabalho foi construir um mapa citogenético para o maracujá-azedo, integrando a localização de sequências únicas e a distribuição de sequências repetidas eventualmente presentes nos BACs ou previamente isoladas (Santos et al. 2014).

Materiais e Métodos

Material vegetal e preparações citogenéticas

Sementes de *P. edulis* (IAPAR 123x06) foram germinadas em placas de Petri e mantidas no Jardim Experimental do Laboratório de Citogenética Vegetal do Departamento de Botânica da UFPE. Pontas de raízes obtidas das sementes germinadas a temperatura ambiente foram pré-tratadas em 2 mM 8-hidroxiquinoleína por 20 h a 10°C e fixadas em etanol/ácido acético 3:1 (v/v), sendo armazenadas a -20°C. Para preparação das lâminas, as raízes foram digeridas em 2% (w/v) celulase Onozuka (Serva) e 20% (v/v) pectinase (Sigma-Aldrich), em tampão ácido cítrico-citrato de sódio a 37°C por 2 hs. O material foi fragmentado em uma gota de ácido acético 45% e esmagado entre lâmina e lamínula. Após remoção da lamínula e secagem ao ar, as lâminas foram coradas em 1 µg /ml 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) em 1:1 tampão (v/v) McIlvaine pH 7,0 e glicerol. As melhores lâminas foram descoradas a temperatura ambiente em etanol/ácido acético 3:1 por 30 min, transferidas para etanol absoluto por 1 h, secas e estocadas a -20°C até o uso.

Screening da biblioteca para o isolamento e a validação de clones

Clones foram selecionados com conjuntos de quatro a cinco genes simultaneamente, segundo metodologia descrita em Santos et al. (2014) e foram submetidos à *screening* por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers* desenhados a partir dos genes correspondentes (Anexo I, Tabela 1). Para tal, o DNA dos clones foi extraído utilizando o kit Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segundo as especificações do fabricante, com adaptações para o uso com BACs. O DNA destes BACs foi usado como molde para a amplificação dos fragmentos especificados por cada par de *primers*. As reações continham aproximadamente 20 ng de DNA de BAC, 1X de tampão de PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de enzima Taq DNA polimerase, 0,2 mM de cada dNTP, 0,3 µM de cada *primer* em um volume final de 16 µl. As amplificações foram realizadas em termociclador utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 40 s, 60 °C por 40 s e 72 °C por 1 min, e extensão final a 72 °C por 8 min. Para verificar as amplificações,

alíquotas de 5 µl de cada reação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) e visualizadas sob luz UV, utilizando-se como marcador de massa molecular o GeneRuler DNA ladder 100 pb (Fermentas).

Análise Dot blot para detecção de BACs contendo DNA repetitivo

Cinquenta colônias de BACs obtidos da biblioteca desenvolvida por Santos et al. (2014) foram inoculados em membranas de nylon carregadas positivamente (Hybond-N+, GE). As membranas de nylon foram transferidas para placas de Petri contendo LB-agar+12,5 µg/ml de cloranfenicol. Os clones bacterianos cresceram por 17 h a 37°C. A sonda foi marcada com digoxigenina utilizando o *Dig High-prime DNA labelling kit* (Roche Diagnostics). As membranas foram mantidas em papel Whatmann 3 MM, saturado com tampão de desnaturação (0,5 M de NaOH; 1,5 M NaCl), tratadas durante 10 min a 100°C com o mesmo tampão, e neutralizadas durante 10 min em papel Whatmann 3MM saturado com tampão de neutralização (1,5 M Tris-HCl; pH 7,4; 1,5 M NaCl). Imediatamente as membranas foram incubadas a 37°C durante 45 min com 250 mg/L de proteinase K em 100 mM de Tris-HCl pH 8,0; EDTA 50 mM; NaCl 0,5 M. Finalmente, as membranas foram secas durante 45 min a 80°C. Após a hibridação, as membranas foram lavadas duas vezes em tampão 2× citrato de sódio (SSC) e 0,1% de dodecilsulfato de sódio (SDS) por 5-15 min, e em 0,5x SSC e 0,1% de tampão de SDS durante 15 min a 68°C. A detecção foi realizada utilizando anti-DIG conjugado com fosfatase alcalina (Roche Diagnostics) e o substrato quimioluminescente CDP-Star (Roche Diagnostics), de acordo com as instruções do fabricante. Os sinais foram capturados em um filme X-ray ECL (GE).

Hibridização in situ fluorescente (FISH)

Tanto sondas de sequências repetitivas como únicas foram utilizadas para a FISH. Para sondas repetitivas, três sequências parciais de retrotransposons de diferentes famílias caracterizadas a partir do sequenciamento de terminais de BACs dessa mesma biblioteca (Santos et al., 2014) foram utilizadas como sondas. Tais sequências foram amplificadas por PCR com o uso de *primers* específicos desenhados no programa Geneious pro v.7.1.8 (Anexo I, Tabela 2) como descrito acima. Além disso, também foram utilizadas sondas para o DNAr 5S e 45S, localizadas, respectivamente, com a sonda D2, um fragmento de 500 pb contendo o DNAr 5S de *Lotus japonicus* (Pedrosa et al. 2002), e a sonda R2, um fragmento de 6,5- kb de uma unidade de repetição do DNAr 18S-5.8S-25S de *Arabidopsis thaliana* (Wanzenböck et al. 1997). A marcação dos produtos amplificados foi feita por Nick Translation (Roche Diagnostics,

Indianapolis, IN, USA) com Cy3-dUTP (GE Healthcare, Bucks, UK), seguindo as recomendações do fabricante.

Para sondas únicas o DNA de 27 BACs selecionados com genes de interesse, assim como BACs selecionados a partir de análise de microssintenia com genomas completos disponíveis (Santos et al. 2014; Anexo I, Tabela 3), foi extraído por meio do kit Qiagen Plasmid Mini Kit. O DNA foi quantificado em gel de agarose 1% (p/v) após uma digestão com *Hind*III e quantificação com *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific).

Para o procedimento de hibridização *in situ* foi utilizado o protocolo de Fonsêca et al. (2010). Resumidamente, as preparações foram pré-tratadas com RNase 100 µg/ml (Invitrogen), pepsina 10 µg/ml (Boehringer Mannheim) e fixadas em formaldeído 3,7 % (Merck). A desnaturação do cromossomo e da sonda foram feitas em conjunto, após pré-desnaturação da sonda na mistura de hibridização que consistiu de formamida 50 % (v/v), sulfato de dextran 10 % (w/v), 2x SSC e 2-5 ng/µl de sonda. O DNA genômico total fragmentado obtido de acordo com Penha, 2012, foi adicionado na mistura de hibridização, em uma concentração de 5-50x a concentração da sonda, para o bloqueio de sequências repetitivas em BACs, quando necessário. A estringência final foi de 76%. As sondas marcadas com digoxigenina foram detectadas com 0,2 µl anti-digoxigenina conjugada com FITC (anticorpo primário, Roche) e 0,4 µl de anti-ovelha ou anti-cabra conjugadas com FITC (anticorpo secundário, Sigma) em 3 % BSA em PBS para um volume final de 20 µl cada. As preparações foram contra-coradas e montadas com 2 µg/ml de DAPI em Vectashield (Vector). As re-hibridizações das lâminas, para a localização de diferentes sequências de DNA em uma mesma célula, foi realizada de acordo com Heslop-Harrison et al. (1992), por até quatro vezes.

Análise de dados

As imagens foram capturadas por microscopia de epifluorescência Leica DMLB utilizando o software Leica Las-AF. Para o processamento final, as imagens foram sobrepostas e coloridas artificialmente através do software Adobe Photoshop versão 10.0 e ajustadas apenas para brilho e contraste. A posição aproximada dos BACs mapeados foi integrada ao idiograma proposto por Penha (2012) a partir dos resultados de rehibridizações e medições do cromossomo marcado em relação aos demais do complemento.

Resultados

Distribuição de sequências repetitivas

Três sequências de retrotransposons, identificados como os mais abundantes de cada grupo pela

análise dos BES, foram utilizados como sondas para investigar sua distribuição cromossômica. Os elementos Gypsy-22, um Ty3-gypsy, e L1-1Cpa, um LINE (Long Interspersed Nuclear Element), apresentaram uma distribuição dispersa e uniforme em todo o genoma (Anexo II, Fig. 1A-B). Já o elemento Copia-13, um Ty1-copia, revelou uma marcação dispersa, mas não inteiramente uniforme, com os 4 cromossomos menores não marcados e alguns deles marcados diferencialmente (Anexo II, Fig. 1C).

Mapeamento de BACs

O *screening* em membrana da biblioteca com conjuntos de sondas gênicas (com 4 ou 5 genes marcados em conjunto em cada sonda) permitiram a identificação de 23 clones positivos (Anexo I, Tabela 1). Todos os clones selecionados foram isolados, submetidos à validação via PCR com pares de *primers* específicos para reconhecer cada gene (Anexo I, Tabela 1) e demonstraram produtos de tamanhos preditos. Foram encontrados clones correspondentes a onze genes, sendo eles BeB (3 clones), Glu-rec (1 clone), C-bind (4 clones), CPI3 (4 clones), Csyn (4 clones), Cyt2 (1 clone), Glu (1 clone), St-acp (1 clone), TyPI-M (2 clones), NAD(P)H (1 clone) e StP13 (1 clone, Anexo I, Tabela 3). Nenhum clone correspondeu aos genes GO, PSP, KP, Lip2 ou Aux2, ainda que o controle positivo tenha sido amplificado. Nenhuma amplificação foi obtida para o gene Glulig, indicando a necessidade de síntese de novos *primers* para seleção de BACs correspondentes a esse gene.

Para seleção de BACs que apresentassem sinais únicos de hibridização *in situ* e pudessem ser mapeados, um dot-blot usando o DNA genômico total como sonda foi realizado para estimar a proporção de DNA repetitivo em cada clone selecionado (Anexo I, Tabela 3). Para cada gene ou região gênica selecionada por apresentar microssintenia com genomas previamente sequenciados, um clone que apresentou sinal mais fraco de hibridização em membrana foi então utilizado como sonda. Além disso, foram utilizados clones previamente selecionados para os genes ACCO (134H15), CYCD1 (125I23), EMB (187G07), ERS (198H23), G3PD (215I08), LOX (79I13 e 209G15), MIPS (29G08) e NDID (152I06). Os clones correspondentes aos genes ERS, ACCO, G3PD e CYCD1 haviam sido previamente mapeados nos cromossomos 1, 3, 4 e 4, respectivamente, e foram utilizados como marcadores para identificação dos mesmos.

Um total de 27 clones foram selecionados para BAC-FISH, sendo desses 19 aparentemente únicos (“+” ou “-”) de acordo com o *dot-blot* (Anexo I, Tabela 3). Seis BACs foram incluídos por falta de BACs únicos para o gene ou região gênica em questão e um BAC foi incluído apesar da presença de DNA repetitivo a fim de investigar os padrões repetitivos apresentados.

Do total de 27 BACs, 15 (55,6%) apresentaram sinal único, quatro apresentaram sinal disperso e dois sinal subtelomérico (22,2%). Estes clones apresentaram-se como contendo DNA altamente repetitivo na análise de dot blot. Os demais (22,2%) não apresentaram sinal na FISH realizada e foram excluídos de análises seguintes. Os BACs 75D12, 108C16, 216I05 e 61D03 apresentaram sinais com padrão repetitivo disperso em todos os cromossomos. Já os BACs 54C16 e 55J16 evidenciaram sinais com padrão repetitivo de tipo subtelomérico, com sinais em um ou ambos os telômeros, a depender do cromossomo (Anexo II, Fig. 1D).

A maioria dos BACs únicos apresentaram sinais em posição terminal ou subterminal nos cromossomos. Após reibridizações com os quatro BACs previamente mapeados nos cromossomos 1, 3 e 4, mais o DNAr 5S foi possível estabelecer marcadores para os nove pares cromossômicos da espécie, sendo assim caracterizados (Anexo II, Fig. 4):

Cromossomo 1. Apresenta o BAC 198H23 (gene ERS, previamente mapeado) na região distal do braço longo (Anexo II, Fig. 2A) eo BAC 93G04 adjacente ao BAC 198H23 (Anexo II, Fig. 2C).

Cromossomo 2. Apresenta o BAC 216B22 na região distal do braço curto e o BAC 79I13 (gene LOX) na região distal do braço longo (Anexo II, Fig. 2A, B).

Cromossomo 3. Apresenta o BAC 134H15 (gene ACCO, previamente mapeado) na região distal do braço curto (Anexo II, Fig. 2D).

Cromossomo 4. Apresenta os BAC 125I23 (gene CYCD1) e BAC 215I08 (gene G3PD) no braço curto (previamente mapeados) e o BAC 214H11 no braço oposto (Anexo II, Fig. 2E-F).

Cromossomo 5. Apresenta o sítio de DNAr 5S na região subterminal do braço longo (previamente mapeado).

Cromossomo 6. Apresenta o BAC 164K17 na região distal do braço curto (Anexo II, Fig. 2F).

Cromossomo 7. Apresenta um sítio de DNAr 45S na região terminal do braço curto e o BAC 173B16 na região distal do braço longo (Anexo II, Fig. 3A).

Cromossomo 8. Apresenta os BACs 164M13, o BAC 152I06e 164A12 no braço curto e o segundo sítio de DNAr 45S na região terminal no braço longo (Anexo II, Fig. 3B-C).

Discussão

No presente trabalho, 27 BACs contendo genes ou regiões gênicas de *Passiflora* foram utilizados como sondas para a construção de um mapa físico do maracujá-azedo por BAC-FISH. Destes, 12 clones evidenciaram sinal único e puderam ser mapeados, permitindo a identificação com marcas únicas de oito dos cromossomos, sendo o par cinco identificado com o DNAr 5S. Os pontos fortes da FISH para construção de mapas físicos, também chamados

nesse caso de mapas citogenéticos, incluem a visualização da localização exata do DNA clonado no cromossomo, a atribuição das sequências mapeadas a regiões de heterocromatina ou eucromatina, e o potencial de se construir um mapa físico em um curto tempo e a um custo relativamente baixo (Jiang e Gill 2006). Além disso, novos clones podem ser sucessivamente incorporados ao mapa, tornando-o cada vez mais denso, e os clones mapeados constituem marcadores cromossomo-específicos úteis na identificação cromossômica, redefinindo cariótipos pré-existentes. A identificação cromossômica usando marcadores cromossomo-específicos vem sendo demonstrada em diversas espécies de interesse agrônomo, como arroz (Cheng et al. 2001), algodão (Wang et al. 2008), sorgo (Kim et al. 2005), tomate (Tang et al. 2009), batata (Dong et al. 2000) e feijão comum (Fonsêca et al. 2010).

Os clones de BACs, especialmente de espécies de grande tamanho, podem conter, no entanto, uma grande quantidade de sequências repetitivas. Desta forma, ao se utilizar estes clones em FISH, a probabilidade de obter sinais em vários ou todos os cromossomos é alta, dificultando, assim, a localização de sequências de cópia única (Jiang e Gill 1996). Portanto, esta metodologia é mais apropriada para o mapeamento físico de espécies com genomas menores (Jiang e Gill 1996; Dong et al. 2000; Islam-Faridi et al. 2002; Pedrosa et al. 2002; Kim et al. 2005). No caso do maracujá, que apresenta um genoma 1C de 1,258 Mpb, uma proporção relativamente alta de BACs cópia única puderam ser selecionados para regiões gênicas se comparado, por exemplo, os BACs selecionados para o feijão comum, que apresentou uma proporção de 38% de BACs repetitivos com um genoma de apenas 600 Mpb (Fonsêca et al. 2010).

Embora o sinal único de hibridização seja mais eficiente na identificação de um dado cromossomo, os BACs mostrando padrões dispersos de hibridização podem ser importantes na identificação cromossômica. Fonsêca et al. (2010), utilizando apenas um BAC de sinal único para o cromossomo 8 e três BACs contendo sequências repetitivas (um com sinais pericentroméricos, outro subteloméricos, e o terceiro que permitia visualizar um bloco repetitivo no cromossomo 7), identificaram cada par cromossômico do feijão comum, devido às diferentes intensidades e à localização dos sinais, além do tamanho cromossômico. Os BACs subteloméricos 54C16 e 55J16, assim como a sonda do retroelemento *Ty1-copia*, pode ser utilizada em conjunto com BACs e DNAr para permitir a identificação de todos os cromossomos da espécie numa única hibridização. Já os BACs 134H15 (gene ACCO), 61D03 (gene CPI3) e 164M13 que apresentaram fraco padrão de hibridização disperso, mostraram sinais únicos após o uso do DNA bloqueador. Isto indica que, usando o DNA bloqueador genômico, foi possível mapear adicionalmente três BACs. Pedrosa-Harand et al. (2009) e

Fonsêca et al. (2010) obtiveram sucesso utilizando o bloqueador Cot-100, e conseguiram eliminar a marcação de sequências repetitivas dispersas, recuperando 18 BACs em estudos citogenéticos com o feijão-comum.

Se uma sequência única estiver presente num BAC utilizado como sonda e, além dela, houver sequências altamente repetitivas, como discutido anteriormente, a visualização de um sinal único é muito difícil ou quase impossível. Mas se o inserto contiver uma sequência moderadamente repetitiva, esta poderá ser bloqueada, utilizando como bloqueador um excesso de DNA genômico ou, de preferência, uma fração enriquecida de sequências repetitivas do genoma. Frequentemente, a fração usada como DNA bloqueador é a Cot-100 que, embora eficiente, deve ser testada clone a clone. Esta fração contém DNA altamente e moderadamente repetitivo, obtida por renaturação incompleta do DNA genômico da espécie após desnaturação.

A hibridização com os BACs 75D12, 108C16, 61D03, 216I05, 54C16 e 55J16 resultaram em fortes sinais de padrões disperso ou subtelomérico na maioria dos cromossomos do complemento. Isto significa que as regiões clonadas nesses BACs contêm uma proporção provavelmente elevada de sequências repetitivas em seus insertos que apresentam essa distribuição. Padrão semelhante foi obtido em *Phaseolus vulgaris*, para a qual foi identificado um DNA satélite subtelomérico, *khipu* (Fonsêca et al. 2010). Nenhum DNA satélite foi descrito até o momento para o maracujá, mas a presença de BACs com padrão subtelomérico sugere a existência de DNA satélite com esse padrão na espécie. No entanto, vários dos BACs hibridizados no feijão-comum apresentaram padrão pericentromérico, não observado entre os BACs agora mapeados, apenas em dois previamente utilizados (Penha 2012). Diferentemente do feijão-comum, bandeamento cromossomo CMA/DAPI em *Passiflora* não detectou blocos pericentroméricos (Melo et al. 2001), sugerindo diferença na distribuição da heterocromatina. Por outro lado, é possível que outros BACs futuramente analisados apresentem padrão pericentromérico, especialmente se não selecionados com genes ou regiões ricas em genes. De fato, todos os BACs únicos apresentaram uma distribuição terminal ou subterminal nos braços cromossômicos, sugerindo que essa região subterminal dos cromossomos seja mais rica em genes na espécie.

O número e a posição das constrições secundárias, que correspondem aos sítios de DNAr 45S, presentes no cariótipo do maracujá-azedo vêm sendo descritos de forma diferente por diversos autores. Oliveira (1996) encontrou apenas uma constrição secundária, localizada no cromossomo 8, enquanto Mayeda (1997) relatou a presença de dois pares de cromossomos com satélites. Soares-Scott (1998) também relatou a presença de duas constrições secundárias, uma no cromossomo 4 e outra no cromossomo 7, ambas no braço longo. Em trabalhos

posteriores (Soares-Scott et al. 2005), a autora relatou a presença de, pelo menos, três constrições secundárias, porém não especificou a posição. Cuco et al. (2005) observaram a presença de constrições secundárias nos cromossomos 8 e 9, os menores da espécie. Já Melo e Guerra (2003) identificaram sítios de DNAr 45S no braço longo dos cromossomos 7 e 9. Essas diferenças podem ocorrer em função do pequeno tamanho dos cromossomos, devido ao grau de compactação das metáfases analisadas ou ainda à qualidade da morfologia dos cromossomos. A identificação dos cromossomos com sequências únicas permite melhor comparar o tamanho de cada par cromossômico, confirmando, por exemplo, que o par cromossômico 8, portador do DNAr 45S é maior que o par cromossômico 9, identificado com um marcador específico. Por outro lado, um sítio de DNAr 5S foi observado no braço longo do cromossomo 5, correspondendo ao observado por Melo e Guerra (2003) e Penha (2012).

A caracterização citogenética realizada através da FISH tem demonstrado variações no número de sítios de DNAr 45S e 5S. Melo e Guerra (2003) investigaram a variabilidade dos sítios de DNAr 5S e 45S em 20 espécies de *Passiflora*, observando que as espécies com $x = 6$ apresentam apenas um par de sítios de DNAr 45S e 5S, enquanto as com $x = 9$ e $x = 10$ frequentemente apresentam mais de um par de sítios de DNAr 45S e apenas um par de DNAr 5S. Foi sugerido para o gênero um número básico primário ($x = 6$), e números básicos secundários derivados ($x = 9, 10, 12$) (Storey 1950; Melo et al. 2001) originados por eventos de dispoloidia e poliploidia (Melo et al. 2001; Souza et al. 2008). No presente trabalho não foram achados marcadores BACs que apresentem mais de um par de sinal, como foi observado no poliploide de algodão (Wang et al, 2007).

Os resultados do presente trabalho corroboram a importância da FISH na caracterização e identificação cromossômicas, tanto com sequências repetitivas quanto com clones com grandes insertos como sonda (BAC-FISH), propiciando o desenvolvimento de marcadores cromossomo-específicos e um mapa citogenético para o maracujá-azedo. Quando os BACs utilizados no mapeamento físico cromossômico são selecionados com base em marcadores geneticamente mapeados, é possível se estabelecer a relação entre os GLs e os cromossomos da espécie. Ainda, o mapa cromossômico gerado pode ser usado para estimar as frequências de recombinação em diferentes regiões do genoma e esclarecer distorções dos mapas de ligação (Pedrosa et al. 2002). Além disso, com a disponibilidade de BACs cromossomo- específicos, é possível o mapeamento comparativo entre espécies próximas do mesmo gênero ou tribo, graças à conservação de sequências nucleotídicas observada entre táxons próximos (Pedrosa et al. 2002; Lysak et al. 2005).

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao PPGBV- UFPE pelo suporte financeiro concedido para o desenvolvimento do projeto.

Referências

- Carneiro MS, Camargo Lea, Coelho ASG, Vencovsky R, Leite Júnior RP, Stenzel NMC, Vieira MLC (2002) RAPD-based genetic linkage maps of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg). *Genome* 45:670–678
- Cervi AC, Milward-De-Azevedo MA, Bernacci LC, Nunes TS *Passifloraceae*. In: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB012506>> Acesso em: 16 jan 2012.
- Cheng Z, Presting GG, Buell CR, Wing RA Jiang J (2001) High-resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosomes anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. *Genetics* 157:1749–1757
- Cuco SM, 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
- Dong F, Song J, Naess SK, Helgeson JP, Gebhardt CL (2000) Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theor Appl Genet* 101:1001–1007
- Feng J, Liu Z, Cai X, Jan CC (2013) Toward a Molecular Cytogenetic Map for Cultivated Sunflower (*Helianthus annuus* L.) by Landed BAC/BIBAC Clones. *G3 Genes| Genomes| Genetics* 3:31–40.doi:10.1534/g3.112.004846.
- Feuillet C, MacDougal JM (2003) Checklist of recognized species names of passion flowers. *Passiflora* 12:41–43
- Fonsêca A, Ferreira J, Dos Santos TRB, Mosiolek M, Bellucci E, Kami J, Gepts P, Geffroy V, Schweizer D, Santos KGB dos, Pedrosa-Harand A (2010) Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Chromosome Res* 18:487–502
- Hansen AK, Gilbert LE, Simpson BB, Downie SR, Cervi AC, Jansen RK (2006) Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. *Syst Bot* 31:138–150.
- Heslop-Harrison JS, Harrison GE, Leitch IJ (1992) Reprobing of DNA: DNA in situ hybridization preparations. *Trends Genet* 8:372–373

- Islam-Faridi MN, Childs KL, Klein PE (2002) A molecular cytogenetic map of *sorghum* chromosome: 1. *Fluorescence in situ hybridization* analysis with mapped bacterial artificial chromosomes. *Genetics* 161:345–353.
- Jiang J, Gill BS (1996) Current status and potential of *fluorescence in situ hybridization* in plant genome mapping. In: Paterson AH (ed). *Genome mapping in plants*. RG Landes Company, Georgetown, pp 127–135
- Jiang J, Gill BS (2006) Current status and the future of *fluorescence in situ hybridization* (FISH) in plant genome research. *Genome* 49:1057–1068
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF (1999) *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 464 p
- Kim JS, Klein PE, Klein RR (2005) Molecular cytogenetic maps of *Sorghum* linkage groups 2 and 8. *Genetics* 169:955–965
- Kim JS, Klein PE, Klein RR, Price HJ, Mullet JE, Stelly DM (2005) Chromosome identification and nomenclature of *Sorghum bicolor*. *Genetics* 169:1169–1173
- Książkiewicz M, Wyrwa K, Szczepaniak A, Rychel S, et al (2013) Comparative genomics of *Lupinus angustifolius* gene-rich regions: BAC library exploration, genetic mapping and cytogenetics. *BMC Genomics* 14:79.doi: 10.1186/1471-2164-14-79
- Lopes R, Lopes MTG, Carneiro MS, Matta FP, Camargo LEA, Vieira MLC (2006) Linkage and mapping of resistance genes to *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae* in yellow passion fruit. *Genome* 49:17–29
- Lysak MA, Koch M, Pecinka A, Schubert I (2005) Chromosome triplication found across the tribe Brassiceae. *Genome Res* 15:516–525
- Mayeda LY (1997) Estudo citogenético em dez táxons do gênero *Passiflora* L. (*Passifloraceae*), 89 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo Piracicaba.
- Melo NF, Cervi AC, Guerra M (2001) Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (*Passifloraceae*). *Plant Syst Evol* 226:69–84
- Melo NF, Guerra FMS (2003) Variability of the 5S and 45SrDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Ann Bot-London* 92:309–316
- Muschner VC, Zamberlan PM, Bonatto SL, Freitas LB (2012) Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (*Passifloraceae*). *Genet Mol Biol* 35:1036–1043
- Oliveira AMA (1996) Reprodução e citogenética de espécies de *Passiflora*. 148 p. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto.

- Oliveira EJ, Vieira MLC, Garcia AAF, Munhoz CF, Margarido GRA, Consoli L, Matta FP, Moraes MC, Zucchi MI, Fungaro MHP (2008). An integrated molecular map of yellow passion fruit based on simultaneous maximum-likelihood estimation of linkage and linkage phases. *Journal of the American Society for Horticultural Science, Alexandria* 133:35–41
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A (2002) Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161:1661–1672
- Pedrosa-Harand A, Kami J, Gepts P, Geffroy V, Schweizer D (2009) Cytogenetic mapping of common bean chromosomes reveals a less compartmentalized small-genome plant species. *Chromosome Res* 17:405–417
- Penha HP (2012) Construção de uma biblioteca genômica de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* inserida em BACs (Bacterial Artificial Chromosome) e mapeamento cromossômico usando *hibridação in situ fluorescente*. Tese de doutorado USP, Brazil. [www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-25092012-101518/]
- Peterson DG, Tomkins JP, Frisch DA, Wing RA, Paterson AH (2000) Construction of plant artificial chromosome (BAC) libraries: An illustrated guide. *J Agric Genomics* 5:1–3
- Rudnicki M, Silveira MM, Pereira TV, Oliveira MR, Reginatto FH, Dal-Pizzol F, Moreira JCF (2007) Protective effects of *Passiflora alata* extract pretreatment on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol* 45:656–661
- Santos AA dos, Penha HA, Bellec A, Freitas MC De, Pedrosa-Harand A, Bergès H, Carneiro Vieira ML (2014) Begin at the beginning: A BAC-end view of the passion fruit (*Passiflora*) genome. *BMC Genomics* 15:816
- Schwarzacher HG, Mikelsaar AV, Schnedl W (1980) The nature of Ag- staining of nucleolus organizer regions. *Cytogenet Cell Genet* 20:24–39
- Soares-Scott MD (1998) Caracterização citogenética de algumas espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora*. 89p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)- Instituto de Ciências Biológicas Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Soares-Scott MD, Meletti LM, Bernacci LC, Passos IRS (2005) Citogenética clássica e molecular em passifloras. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF(eds) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Embrapa Cerrados, Planaltina 1:213–239
- Tang X, De Boer JM, Van Eck HJ, Bachem C, Visser RG, De Jong H (2009) Assignment of genetic linkage maps to diploid *Solanum tuberosum* pachytene chromosomes by BAC-FISH technology. *Chromosome Res* 17:899–915
- Ulmer T, MacDougal JM (2004) *Passiflora: Passion flowers of the World*. Timber Press, Portland

- Vieira MLC, Carneiro MC (2004) *Passiflora* spp. Passionfruit. In: Litz R(ed) Biotechnology of fruit and nut crops. CABI,Oxford, pp 436–453
- Wang K, Guo W, & Zhang T (2007) Detection and mapping of homologous and homoeologous segments in homoeologous groups of allotetraploid cotton by BAC-FISH. BMC genomics, 8(1), 1.
- Wang K, Guan B, Guo W (2008) Completely distinguishing individual A-genome chromosomes and their karyotyping analysis by multiple bacterial artificial chromosome *fluorescence in-situ hybridization*. Genetics 178:1117–1122
- Wanzenböck EM, Schöfer C, Schweizer D & Bachmair A (1997). Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 11(5):1007-1016.
- Yotoko KSC, Dornelas MC, Togni PD, Fonsêca TC, Salzano FM, Bonatto SL, Freitas LB (2011) Does variation in genome sizes reflect adaptive or neutral processes? New clues from *Passiflora*. Plos One 6:127–131.

Anexo I

Tabela 1. Genes putativos de *Passiflora* utilizados em *screening* da biblioteca BAC de *P. edulis*, com seus respectivos códigos, sequências dos *primers* e tamanhos esperados dos *amplicons*. Os BACs selecionados para cada conjunto de sonda no *screening* em membrana estão indicados.

Genes	Código	Primers <i>foward</i> e <i>reverse</i>	Amplicon (pb)
Sonda 2 (BACs 54C16, 55J16, 58C13, 61D03, 70N03, 85L08, 88A19, 88O02, 96N23)			
Cysteine proteinase inhibitor 3	(CPI3)	5'-GCGGAGGGTGAACATCATCAA TGATCTCATGGTTGGTGGG3'	300
NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit J, chloroplastic	(NAD(P)H)	5'-CCGCACTTTTCCAAACCCAG CTGCTTGGCTGGTCAAACAC-3'	306
Putative serine proteinase	(PSP)	5'-TTGATCCAACACACCCAGC GTTTCCCGCAGCAACAGATG-3'	265
Trypsin and protease inhibitors – miraculin	(TyPI-M)	5'-ACCTGGCCCCATACATTTGG AGAAGAACAGCTCTGCCCCAC-3'	286
Sonda 3 (BACs 20N03, 24M06, 27H17, 28E22, 28I20, 64C12, 64P05, 108P03)			
Basic endochitinase B	(BeB)	5'-TCATTCTCTCCCAATCGCGG GGGTTTGCACCACAATCACG-3'	375
Glutamate receptor	(Glu-rec)	5'-TGTTTTTATGCGGCTGTGG CAATTGGGGCCACAATCACG-3'	110
Glycolate oxidase	(GO)	5'-TGATCTCCCTGAGTGAGCGA AATGGCTTTGGAAGAGGTTG-3'	187
Kinesin-like protein	(KP)	5'-TCGATCTTGCCGGAAGTGAG ATCAGCGTCTTGAGTCCCC-3'	205
Lipoxygenase 2	(Lip2)	5'-TCACCACGCTGCTGTAACT AAGATGGCAGTCACTCGCAA-3'	195
Sonda 4 (BACs 05M17, 24G19, 27O13, 63A24, 63J18, 86H07, 95P11, 103L12)			
Auxin response factor 2	(Aux2)	5'-ATCGAACTGCTTCACCTGCA TCCACGTGACAGCTCAACTC-3'	499
Chlorophyll a b binding	(C-bind)	5'-GAACCGTGAGCTGGAAGTCA GCCCAGGTAGTCAAGACCAC-3'	163
Cytochrome c oxidase subunit 2	(Cyt2)	5'-CTTTGTGATGCAGCGGAACC TGGAATGCCATAAAGCGCG-3'	158
Sugar transport protein 13	(StP13)	5'-AACGCCGGCTTCCAATAGAA AGGAATCGACCCAGCTAGF-3'	234
Sonda 7 (BACs 03F10, 21O15, 25C22, 65F07, 68D14, 71E03, 83L02, 108C16)			
Cellulose synthase	(Csyn)	5'-AGCTCTGCAAAGTCCCCATC AGGTGGAGCGGAGTCAGTAF-3'	179
Glutamate-cysteine ligase, chloroplastic	(Glulig)	5'-ATCGGGGAGTTGCTGCATAG AGATTGACCTGAACTGCGCA-3'	377
Glutamine synthetase, chloroplastic/mitochondrial	(Glu)	5'-ATGCTGGCAGTCTCATGCTT TCACGACGTTCTGAACCCAG-3'	170
Stearoyl-acp desaturase	(St-acp)	5'-TGCCAAGGAACATGGAGACC	253

Tabela 2. Primers específicos desenhados no programa Geneious pro v.7.1.8

Nome	Sequência de Consulta	Familia	Primers
Pe141Q1H9F	Gypsy22-ZM_I-int	LTR/Gypsy	5'-TCATTTTGTGACAAACCAGGCA AGATTTGAAAGCTTTGTACTGACGG-3'
Pe164Q3F10R	L1-1_CPa	LINE/L1	5'- ATGATCGTCTTCGTTGGGATTTT TTGCCTAACTTAATTGGCAACCA-3'
Pe101Q2F4R	Copia-13_SB-LTR	LTR/Copia	5'- AGGCCATCAAATCATCATGTTCT TGCACTTTAGCATGTTACTGTGT -3'

Tabela 3. Clones utilizados nos ensaios de *FISH* e padrões de hibridizações observados com e sem o uso de DNA bloqueador. Dot blot: (-) único; (+) pouco repetitivo; (++) medianamente repetitivo (+++ ou +++) altamente repetitivo.

*Clones previamente mapeados (Penha 2012)

Genes / regiões gênicas	Clone de BAC	Padrão de hibridização sem DNA bloqueador	Dot Blot	Cromossomo mapeado
Genes				
ACCO	135H15*	Sinal único (5-50x DNA Bloq)	+	3
CPI3	61D03	Sinal único (5-50x DNA Bloq)	++	-
Csyn	25C22	Sem sinal	++	-
	108C16	Sinal único (5-50x DNA Bloq)	+	-
CYCD1	125I23*	Sinal único	-	4
EMB	187G07	Sem sinal	+	-
ERS	198H23*	Sinal único	+	1
G3PD	215I08*	Sinal único	-	4
LOX	79I13	Sinal único	+	2
	209G15	Sem sinal	+	-
MIPS	29G08	Sem sinal	+++	-
NAD(P)H	85L08	Sem sinal	+	-
NDID	152I06	Sinal único (5-50x DNA Bloq)	+++	9
StP13	24G19	Sem sinal	++	-
TyPI-M	55J16	Bloco subtelomérico	++	-
?	54C16	Bloco subtelomérico	++++	-
Sinténicos				
	69N18	Sem sinal	-	-
	75D12	Repetitivo disperso	++++	-
	93G04	Sinal único	+	2
	141K8	Sem sinal	-	-
	164K17	Sinal único	+	6
	164M13	Sinal único (5-50x DNA Bloq)	-	8
	164A12	Sinal único	-	8
	173B16	Sinal único	-	7
	214H11	Sinal único	-	4
	216I05	Repetitivo disperso	-	-
	216B22	Sinal único	-	2

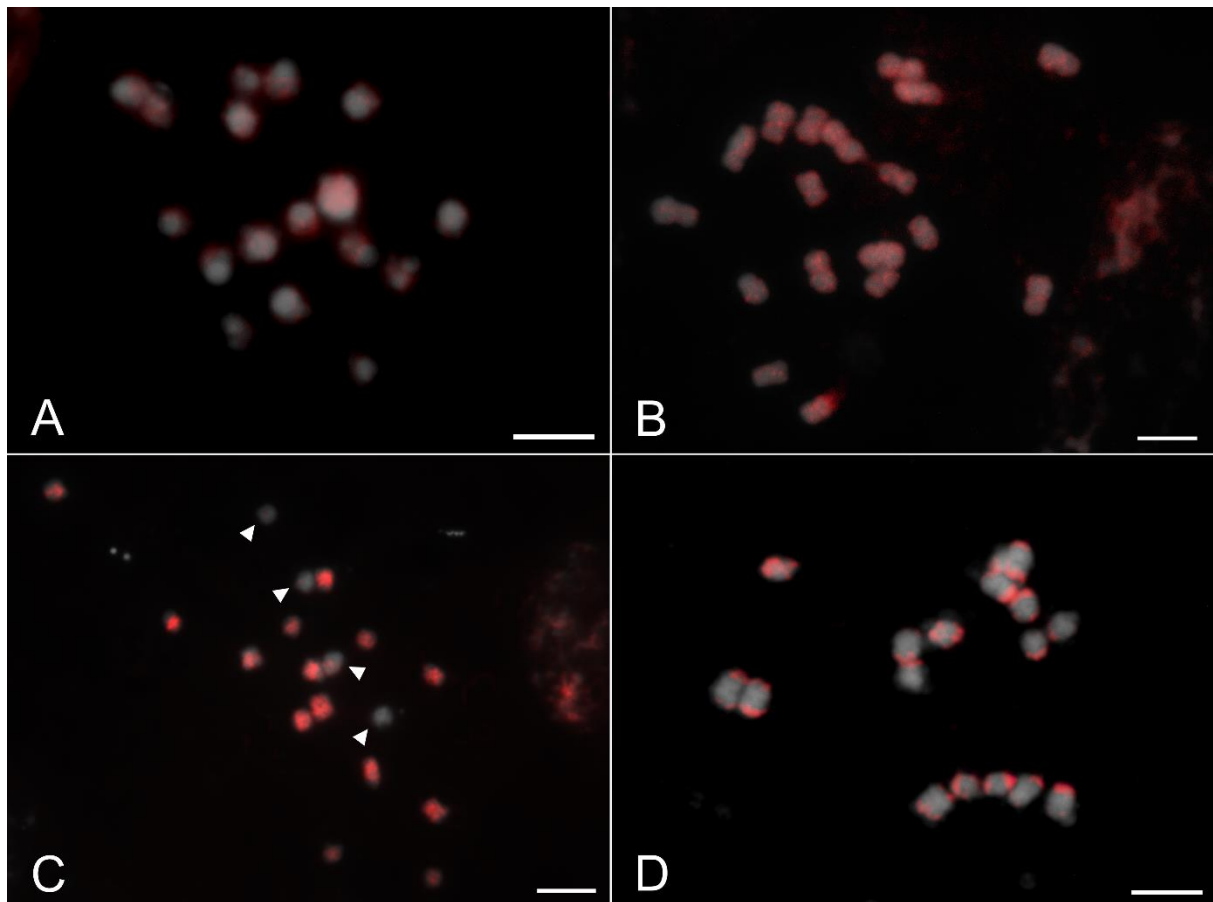
Anexo II

Fig. 1. Metáfases mitóticas de maracujá-azedo hibridizadas com as sondas (em vermelho) (A) Gypsy-22, (B) L1-1Cpa, um LINE, (C) Copia-13 e (D) BAC 54C16. Cabeças-de-setas indicam cromossomos menores não marcados ou com fraca marcação. Barras indicam 5 μ m.

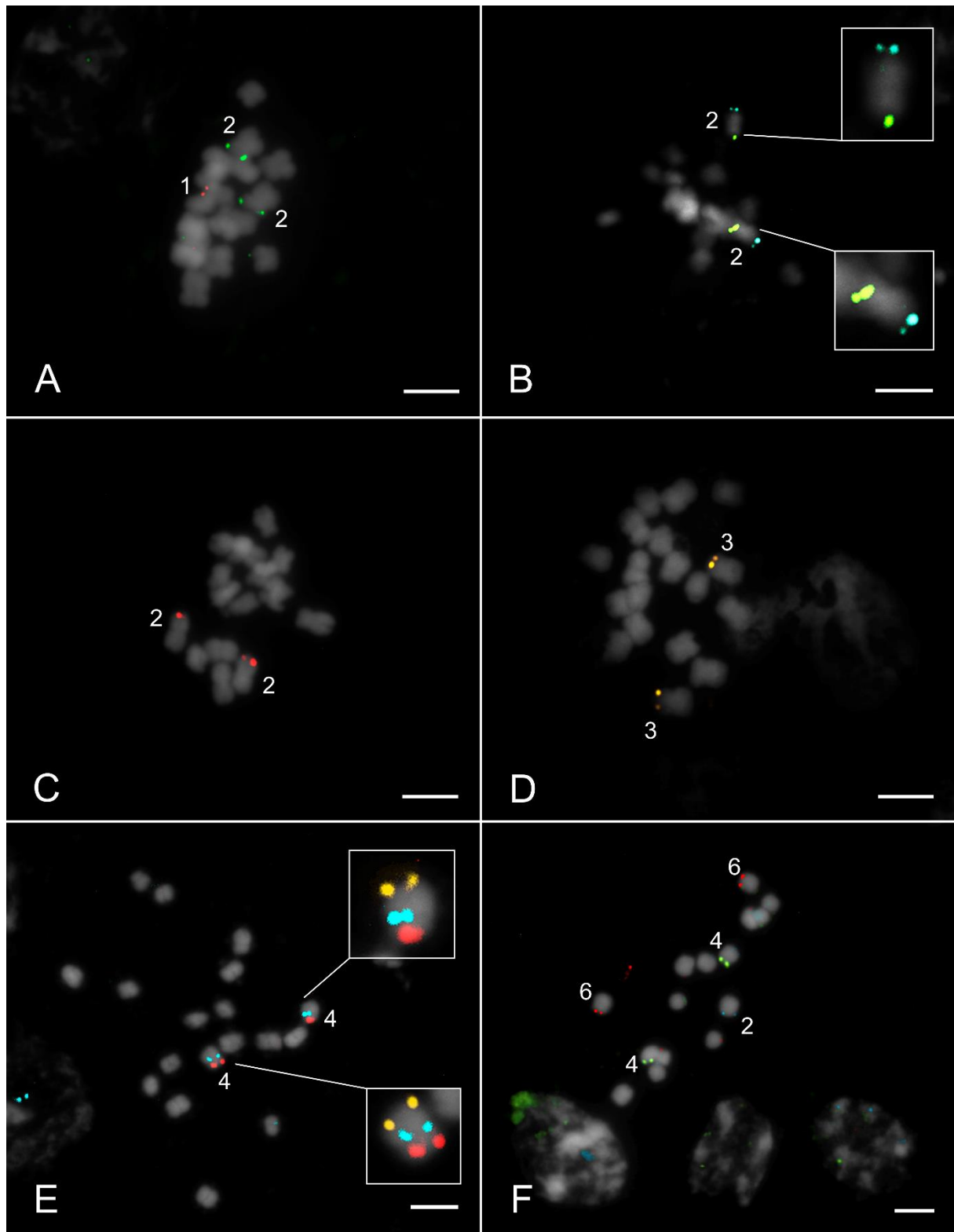


Fig. 2. Metáfases mitóticas de maracujá-azedo hibridizadas com (A) BAC 198H23 (vermelho) e BAC 216B22 (verde). (B) BAC 79I13 (azul) e BAC 216B22 (amarelo). (C) BAC 93G04 (vermelho). (D) BAC 134H15 (amarelo). (E) BAC 125I23 (vermelho), BAC 215I08 (azul) e o BAC 214H11(amarelo). (F) BAC 125I23 (verde), BAC 216B22 (azul) e BAC 164K17 (vermelho). Os cromossomos marcados estão indicados. Barras indicam 5 μ m.

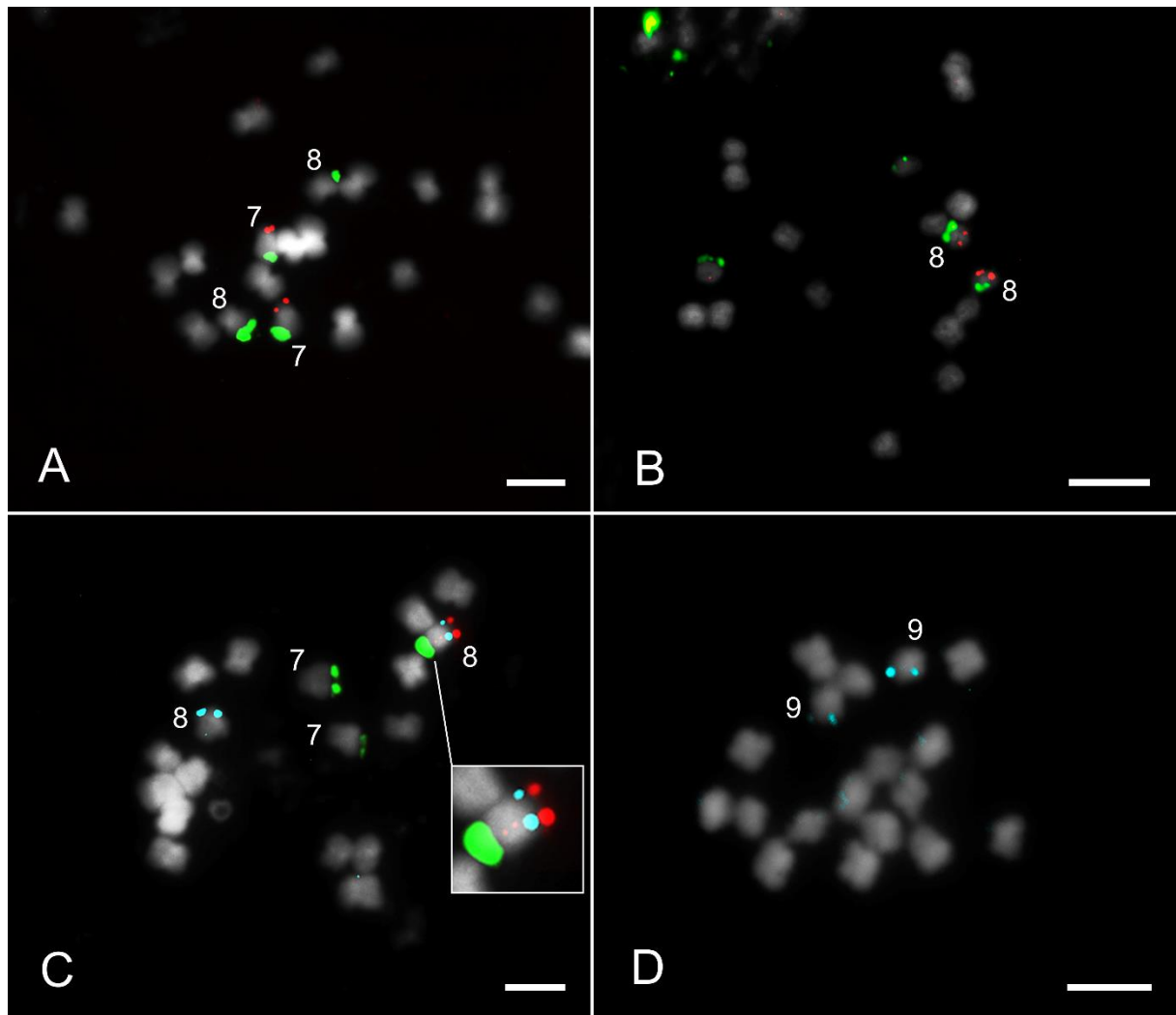


Fig. 3. Metáfases mitóticas de maracujá-azedo hibridizadas com (A) BAC 173B16 (vermelho) e DNAr 45S (verde). (B) BAC 164A12 (vermelho) e DNAr 45S (verde). (C) BAC 164M13 (azul), BAC 164A12 (vermelho) e DNAr 45S (verde). (D) BAC 152I06 (azul). Os cromossomos marcados estão indicados. Barras indicam 5μm.

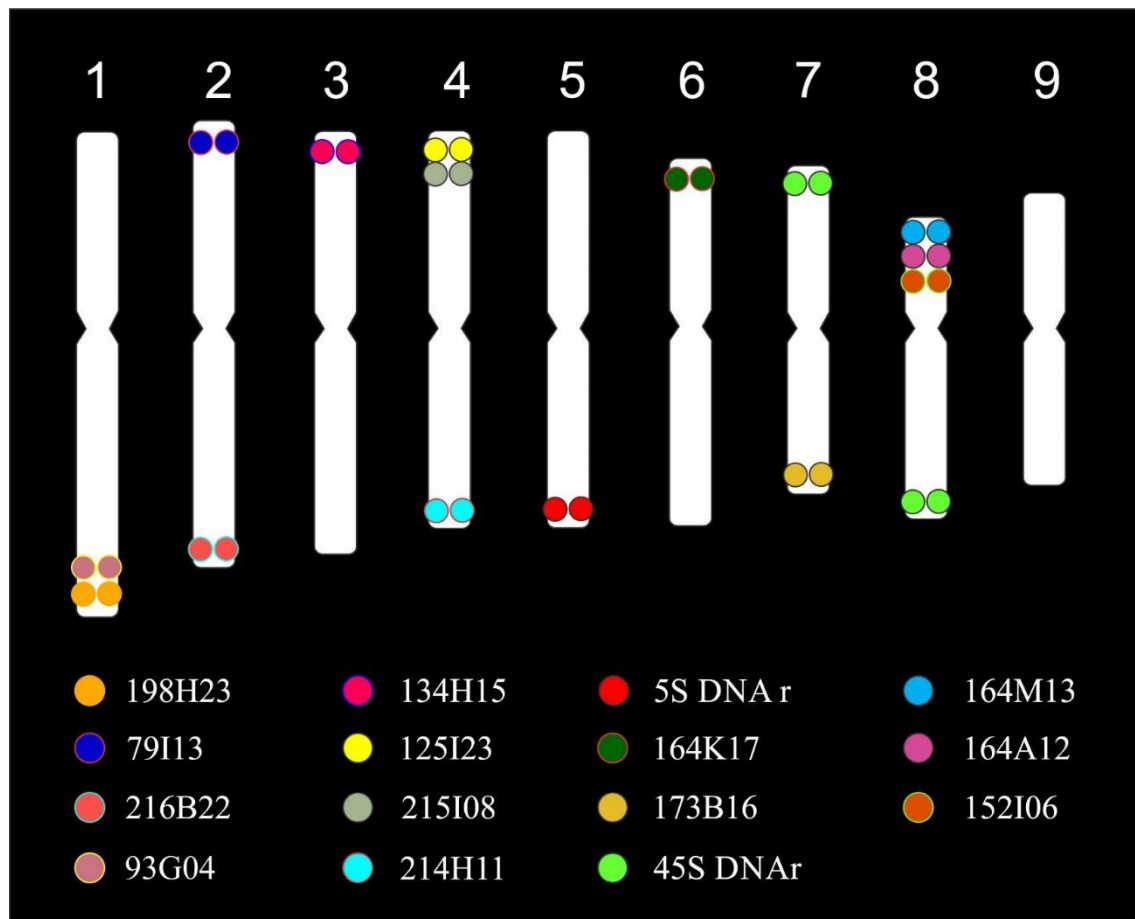


Fig. 4.

Idiograma do maracujá-azedo (n = 9) definido por Penha (2012) com a representação de todos os BACs já mapeados e os sítios de DNA r 5S e 45S (cores de acordo com a legenda).

5. Conclusões

5. Conclusões

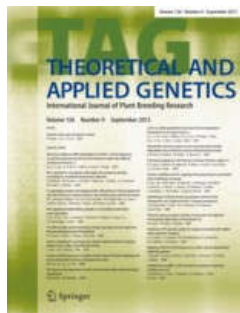
- ~ A BAC-FISH permitiu a definição de mapa citogenético para o maracujá-azedo, que atualmente conta com marcadores específicos para oito dos cromossomos, sendo o par cinco identificado com o DNAr 5S.
- ~ A presença de genes nos BACs marcadores e suas distribuições predominantemente terminais sugerem regiões mais ricas em genes nas regiões distais dos cromossomos da espécie.
- ~ As principais famílias de retrotransposons do genoma do maracujá apresentaram distribuição dispersa, não uniforme no caso do Ty1-copia.
- ~ Outras sequências repetitivas ainda não identificadas apresentam distribuição subtelomérica ou pericentromérica.
- ~ Os marcadores BACs estabelecidos permitirão ancorar o mapa citogenético à sequência genômica a ser obtida, assim como o mapeamento comparativo entre espécies próximas, graças à conservação de sequências nucleotídicas ao longo da evolução deste grupo.

Life Sciences - Plant Sciences | Theoretical and Applied Genetics – incl. option to publish open access


www.springer.com

Plant Sciences Home > Life Sciences > Plant Sciences

SUBDISCIPLINES JOURNALS BOOKS SERIES TEXTBOOKS REFERENCE WORKS



Theoretical and Applied Genetics

International Journal of Plant Breeding Research

Editor-in-Chief: Albrecht E. **Melchinger**

ISSN: 0040-5752 (print version)

ISSN: 1432-2242 (electronic version)

Journal no. 122



\$199.00 Personal Rate e-only for the Americas

Online subscription, valid for one calendar year

Immediate Content Access via SpringerLink

1 Volumes with 12 issues per year

Subscription will auto-renew for another year unless duly terminated

[FAQ & Policy](#)

[ABOUT THIS JOURNAL](#) [EDITORIAL BOARD](#) [REVIEWS](#) [ETHICS & DISCLOSURE](#) [INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#)

Instructions for Authors

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

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

Permissions

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

Online Submission

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