**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Construção de uma biblioteca genômica de *Passiflora edulis* f.
flavicarpa inserida em BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*) e
mapeamento cromossômico usando hibridação *in situ* fluorescente**

Helen Alves Penha

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2012**

Helen Alves Penha
Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas

**Construção de uma biblioteca genômica de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*
inserida em BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*) e mapeamento
cromossômico usando hibridação *in situ* fluorescente**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **MARIA LUCIA CARNEIRO VIEIRA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Penha, Helen Alves

Construção de uma biblioteca genômica de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* inserida em BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*) e mapeamento cromossômico usando hibridação *in situ* fluorescente / Helen Alves Penha. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.

127 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Citogenética vegetal 2. DNA recombinante 3. Genômica 4. Hibridização
5. Mapeamento cromossômico 6. Maracujá I. Título

CDD 634.425
P399c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*Aos meus pais e familiares, por todo amor, apoio,
incentivo, e por sempre acreditarem em mim...*

Dedico.

*Aos meus amigos espalhados pelo mundo, os quais se
tornaram parte de minha família...*

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela qualidade do ensino e estrutura oferecida e oportunidade de realizar o doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsas de estudo e suporte financeiro ao projeto.

Especialmente à Profa. Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira, por toda confiança, apoio, paciência, orientação e oportunidade de realizar este trabalho.

Aos professores dos Programas de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ e em Ciências do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), pelos conhecimentos compartilhados.

À Dra. Hélène Bergès, do “Centre National de Ressources Génomiques Végétales” (CNRGV/INRA/Toulouse), por ter me recebido tão bem em seu grupo de pesquisa, e pela valiosa contribuição na construção da biblioteca genômica em BACs.

À Dra. Andréa Pedrosa-Harand, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pela atenção tão especial a mim concedida, e pelos ensinamentos e contribuição indispensável na etapa do mapeamento por BAC-FISH.

Ao Dr. Marcelo dos Santos Guerra, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pelos ensinamentos sobre o “mundo” da citogenética.

Ao biólogo Anselmo de Azevedo Santos, pelo grande apoio nos trabalhos de laboratório, sobretudo, naqueles envolvendo o isolamento de sequências mapeadas, e pelas discussões sobre bibliotecas em BACs.

Ao técnico de laboratório Carlos Alberto de Oliveira, pela amizade, paciência e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular de Plantas Cultivadas: Alessandra, Anselmo, Augusto, Bruno, Carla, Carmelice, Cássia, Larissa, Guilherme, Luciane, Marcelo, Taislene e Zyrlane, pelo aprendizado mútuo e convívio agradável.

Aos “*amis*” do “Centre National de Ressources Genomiques Vegetales” (CNRGV/INRA): Alice, Arnould, David, Elisa, Genséric, Ingrid, Joelle, Laetitia, Nadine, Nico, Sonia e Sthéphane, pela disponibilidade em compartilhar seus ensinamentos sobre bibliotecas em BACs e pela amizade, confiança e apoio.

Aos amigos do laboratório de Citogenética Vegetal da UFPE: André, Lidiane, Liliane, Lucas, Magdalena, Mariana, Nice, Gustavo, Tiago Exposito, Tiago Ribeiro, Silvokleio e, em especial, à Sandrinha e Artur, pelos ensinamentos sobre BAC-FISH, e pelo excelente convívio e amizade inesquecível.

À minha família, pelo seu amor incondicional, compreensão pela distância, e apoio em todos os momentos de minha vida.

Ao meu namorado Alessandro, que, mesmo tão distante na maior parte do tempo, sempre me transmitiu confiança, paciência, compreensão, apoio, incentivo e amor, especialmente nos momentos mais difíceis.

À minha “mainha pernambucana” Maria José, que me recebeu com tanto amor, como seu eu fosse sua filha.

Aos amigos de Recife, Clarissa, Fabiana, Samma, Tiago, Marianita e Magdá, que fizeram minha permanência na cidade ser inesquecível.

Aos amigos de Toulouse, em especial ao Alessandro, Cidicley, Ingrid e Fer, que me deram forças em momentos difíceis.

Aos amigos de Piracicaba, os quais sempre me proporcionaram momentos de alegria e descontração, em especial ao Carlos, Priscila, e Kátia Prado por todo apoio nos momentos mais críticos.

Aos meus amigos do Pólo de Educação: Cindy (e Bernardo), Emerson, Fernando, Isabella, Katherine, Michel, Rodrigo, Rosebelly, Rosilda, Tomás e Valéria, em especial ao Reinaldo e Taitiâny, pela compreensão e apoio.

Aos amigos de Londrina e Sorocaba que, mesmo distantes, sempre me deram apoio e incentivo.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta tenham contribuído para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	21
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 O gênero <i>Passiflora</i>	27
2.2 Espécies comerciais de <i>Passiflora</i>	29
2.3 Estudos cromossômicos em <i>Passiflora</i>	33
2.4 Fundamentos e uso da técnica de hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	36
2.5 Bibliotecas genômicas inseridas em BACs.....	40
2.6 Mapeamento físico com ênfase em BAC-FISH.....	44
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 Material vegetal.....	49
3.2 Extração e quantificação do DNA genômico do maracujá-azedo.....	49
3.3 Construção da biblioteca de maracujá-azedo em BACs.....	49
3.3.1 Isolamento dos núcleos contendo o DNA de alto peso molecular.....	50
3.3.2 Preparação dos <i>plugs</i>	50
3.3.3 Teste de digestão.....	51
3.3.4 Digestão.....	53
3.3.5 Ligação e transformação.....	54
3.3.6 Seleção dos recombinantes e estimativa do tamanho dos insertos.....	54
3.4 <i>Screening</i> da biblioteca para o isolamento e a validação de clones contendo genes putativos e sequências de cpDNA e mtDNA de maracujá-azedo.....	56
3.4.1 Preparo das membranas.....	56
3.4.2 Obtenção do DNA para o preparo das sondas.....	56
3.4.3 Marcação, purificação e contagem das sondas.....	58
3.4.4 Preparação das membranas, pré-hibridização e hibridização.....	58
3.4.5 Validação dos clones isolados.....	59
3.5 Estudos cromossômicos em maracujá-azedo.....	59
3.5.1 Obtenção de preparações metafásicas.....	59
3.5.1.1 Germinação de sementes.....	59

3.5.1.2 Pré-tratamento das raízes.....	60
3.5.1.3 Preparo das lâminas.....	60
3.5.2 Obtenção das sondas.....	61
3.5.2.1 Extração de DNA de BACs.....	61
3.5.2.2 Seleção de clones a serem utilizados como sondas para FISH.....	62
3.5.2.3 Marcação das sondas.....	63
3.5.2.4 Obtenção do DNA bloqueador <i>C_{ot}</i>	64
3.5.3 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	65
3.5.3.1 Pré-tratamento das raízes.....	65
3.5.3.2 Hibridização <i>in situ</i>	65
3.5.3.3 Banhos pós-hibridização.....	66
3.5.3.4 Rehibridização de lâminas.....	66
3.5.4 Medições cromossômicas.....	67
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1 Construção da biblioteca de maracujá-azedo em BACs.....	69
4.1.1 Isolamento dos núcleos contendo o DNA de alto peso molecular	69
4.1.2 Digestão.....	71
4.1.3 Seleção dos recombinantes e estimativa do tamanho dos insertos.....	74
4.2 <i>Screening</i> da biblioteca para o isolamento e a validação de clones contendo sequências de cpDNA, mtDNA e gênicas de maracujá-azedo.....	78
4.3 Obtenção e marcação das sondas utilizadas nas etapas de FISH.....	84
4.4 Estudo cromossômicos em maracujá-azedo.....	87
4.4.1 Obtenção de raízes e preparações metafásicas.....	87
4.4.2 Estabelecimento do cariótipo	90
4.4.3 Mapeamento cromossômico de genes.....	95
5 CONCLUSÕES.....	109
REFERÊNCIAS.....	111

RESUMO

Construção de uma biblioteca genômica de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* inserida em BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*) e mapeamento cromossômico usando hibridação *in situ* fluorescente

Passiflora (Passifloraceae) é um grande gênero de espécies vegetais encontradas, principalmente, na flora tropical. Algumas passifloras são cultivadas como plantas ornamentais, frutíferas ou exploradas pelas suas propriedades medicinais. A principal espécie comercial brasileira, o maracujá-azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, $2n = 18$), ocupa 95% da área plantada. Os frutos são consumidos *in natura* ou processados pela indústria de suco. Estudos genéticos e cromossômicos têm sido gerados para esta espécie. Entretanto, devido ao pequeno tamanho e a similaridade morfológica dos seus cromossomos, as medições do cariótipo convencional do maracujá-azedo têm levado a resultados inconsistentes, sendo necessário o desenvolvimento de marcadores cromossomos-específicos. Estes marcadores são produzidos a partir da identificação de sequências de cópia-única em clones de bibliotecas de BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*), que são utilizadas como sondas em ensaios de FISH (Hibridização *in situ* Fluorescente). Neste trabalho, foi construída uma biblioteca genômica de maracujá-azedo em BACs contendo 82.944 clones, com tamanho médio dos insertos de 108 kb, e provendo uma cobertura de seis vezes o genoma. A biblioteca apresentou baixa contaminação com cpDNA e mtDNA (~0,04% e 0%, respectivamente), e foi possível o isolamento de oito clones contendo genes putativos de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Estes clones foram marcados e utilizados como sondas em ensaios de FISH. Destas sondas, quatro apresentaram sinal único de hibridização, e foram mapeadas nos cromossomos 1 (gene *ERS*), 3 (gene *ACCO*) e 4 (genes *G3PD* e *CYCD1*). As demais sondas (genes *LOX*, *NDID* e *MIPS*) apresentaram sinais de hibridização subteloméricos ou pericentroméricos, indicando a presença de DNA repetitivo nos clones; a sonda contendo o gene *EMB* não revelou sinal fluorescente. Com base em análises de FISH, definiu-se, no presente trabalho, um novo cariótipo para o maracujá-azedo, com marcadores específicos para os cromossomos 1, 3 e 4, localizando, também, sítios de DNAr 45S nos cromossomos 7 e 8, e um sítio de DNAr 5S no cromossomo 5. A exploração da biblioteca de BAC, bem como o mapa físico aqui estabelecido, representa importantes avanços para guiar pesquisas futuras sobre o gênero *Passiflora*.

Palavras-chave: BAC-FISH, biblioteca em BACs, citogenética, maracujá, *Passiflora*

ABSTRACT

Construction of a BAC (Bacterial Artificial Chromosome) library for *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* and chromosomal mapping using fluorescent *in situ* hybridization

Passiflora (Passifloraceae) is a large genus of plant species essentially found in the tropical flora. Some *passiflora* are grown as ornamentals, cultivated for their edible fruits, or exploited due to their medicinal properties. The main Brazilian commercial species, the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, $2n = 18$) occupies 95% of all planted orchards. The fruits are eaten fresh or used for industrial juice production. Genetic and chromosomal studies have been carried out on the species. However, due to the small size and morphological similarity of their chromosomes, the conventional measures of the karyotype have produced some inconsistent results, being imperative the development of chromosome-specific markers. These markers are produced by identifying BAC (Bacterial Artificial Chromosome) library clones that harbor single copy sequences, which are used as probes in FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) assays. In the present work, a yellow passion fruit genomic BAC library of 82,944 clones was constructed, with average insert sizes of 108 kb, and covering six times the genome equivalent. The library has shown a low level of cpDNA and mtDNA contamination (~0.04% and 0%, respectively), and it was possible the isolation of eight clones harboring putative genes of *P. edulis* f. *flavicarpa*. These clones were labeled and used as probes in FISH assays. Of these probes, four have shown single hybridization signals, and they were mapped on chromosome 1 (*ERS* gene), 3 (*ACCO* gene), and 4 (*G3PD* and *CYCD1* genes). The other probes (*LOX*, *NDID* and *MIPS* gene) revealed subtelomeric or pericentromeric signals, suggesting the presence of repetitive DNA sequences in the clones; the probe harboring the *EMB* gene did not reveal any hybridization signal. Based on FISH analyses, a new karyotype for the passion fruit was established in the present work, with specific markers in chromosomes 1, 3 and 4; we also mapped 45S rDNA sites in chromosomes 7 and 8, and one 5S rDNA site in chromosome 5. The exploitation of the BAC library, as well as the physical map here established, represents novel and essential advances to guide future researches on the *Passiflora* genus.

Keywords: BAC-FISH, BAC-library, cytogenetics, *Passiflora*, passion fruit

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Área colhida (ha) de maracujá-azedo nas mesoregiões brasileiras em 2009.....30
- Figura 2 – 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 reconhecedora ligada a um fluorocromo e observada sob microscopia de fluorescência.....37
- Figura 3 – Representação esquemática da construção de uma biblioteca genômica inserida em BACs.....42
- Figura 4 – Idiograma do feijão-comum comparativamente ao mapa de ligação, estabelecido por Vallejos et al. (1992).....46
- Figura 5 – Representação diagramática da localização cromossômica de 20 BACs de uma biblioteca de sorgo, do sítio de DNAr 18-28S e do clone CEN38, associado ao centrômero, no cromossomo 1 de sorgo (à direita). As posições correspondentes no respectivo grupo de ligação estão mostradas à esquerda.....47
- Figura 6 – Sistema automatizado e robotizado de seleção de clones (Genetix Q-Pix2, Genetix.).....55
- Figura 7 – Cubos de agarose com os núcleos de maracujá-azedo, contendo HMW DNA.....71
- Figura 8 – Resultado do teste de digestão por restrição com *HindIII* do HMW DNA de maracujá-azedo. A primeira e a última canaleta contêm o marcador de peso molecular PFGE/lambda. Da 2^a até a 12^a canaleta estão as amostras digeridas com concentrações crescentes de *HindIII*.....72
- Figura 9 – Gel de agarose parcialmente reconstruído. A porção do gel não visível continha fragmentos de tamanho entre 80 a 200 kb, usados no 2^o ciclo de seleção. Na primeira e última canaletas, visualiza-se o marcador de peso molecular PFGE.....73

- Figura 10 – Gel de agarose parcialmente reconstruído depois do 2º ciclo de seleção. Os blocos 1, 2 e 3 (não visíveis) continham fragmentos de tamanhos entre 80 a 200 kb. Nas canaletas indicadas por “L” visualiza-se o marcador de peso molecular PFGE.....74
- Figura 11 – Estimativa em gel de agarose da concentração do HMW DNA eluído (canaletas 1 a 3), por comparação com DNAs do fago λ (canaletas 4 a 13). Os números correspondem às concentrações em ng.....74
- Figura 12 – Resultado dos testes para avaliar a eficiência de transformação, utilizando 100 μ l de transformantes derivados do bloco 1, 2 e 3, em placas de Petri contendo LB-ágar+X-gal+IPTG.....75
- Figura 13 – BACs derivados do bloco 2 (em cima) e 3 (em baixo) após a digestão com a enzima *NotI*, Na primeira e última canaleta visualiza-se o marcador de peso molecular PFGE (L), e V indica o vetor de 7,5 kb. As setas em vermelho indicam os clones sem inserto.....76
- Figura 14 – Distribuição do tamanho (em kb) dos insertos na biblioteca de BAC de maracujá-azedo.....77
- Figura 15 – Gel mostrando os resultados da amplificação de cpDNA e mtDNA, utilizando como *template* o DNA genômico de maracujá-azedo. As canaletas 1 a 3 mostram o DNA amplificado com os *primers* de genes cloroplastidiais *psbA*, *psbD* e *ndhb*, respectivamente, e as canaletas 4 a 6 mostram o DNA amplificado com os *primers* de genes mitocondriais *ccb256*, *ccb452* e *cox3*, respectivamente. Nas canaletas tc e tm foram usados os *primers* de *psbA* e *ccb256* e o DNA de eucalipto como *template*. Concentrações padrões de 5 a 55 ng de DNA de fago λ são mostradas após o marcador de peso molecular (“L”).....79
- Figura 16 – *Screening* da biblioteca de maracujá-azedo utilizando como sonda os genes cloroplastidiais *psbA*, *psbD* e *ndhb* (a) e os DNAs mitocondriais *ccb256*, *ccb452* e *cox3* (b).....80
- Figura 17 – *Screening* da biblioteca de maracujá-azedo utilizando como sonda os genes *ACCO*, *LOX* e *EMB*.....81
- Figura 18 – Validação dos clones, utilizando *primers* específicos para o gene *ERS*. As setas indicam os amplicons dos clones positivos. Na canaleta “L” visualiza-se o marcador de peso molecular, na “G” o DNA genômico de

maracujá-azedo (controle positivo), e na "C" está o controle negativo.....81

Figura 19 – Validação dos clones, utilizando *primers* específicos para o gene *G3PD*. As setas indicam os amplicons dos clones positivos. Na canaleta "L" visualiza-se o marcador de peso molecular, na "G" o DNA genômico de maracujá-azedo (controle positivo), e na "C" está o controle negativo.....82

Figura 20 – Validação dos clones, utilizando *primers* específicos para o gene *ACCO*. As setas indicam os amplicons dos clones positivos. Na canaleta "L" visualiza-se o marcador de peso molecular, na "G" o DNA genômico de maracujá-azedo (controle positivo), e na "C" está o controle negativo.....82

Figura 21 – Validação dos clones, utilizando *primers* específicos para o gene *MIPS*. As setas indicam os amplicons dos clones positivos. Na canaleta "L" visualiza-se o marcador de peso molecular, na "G" o DNA genômico de maracujá-azedo (controle positivo), e na "C" está o controle negativo.....82

Figura 22 – Validação dos clones, utilizando *primers* específicos para o gene *NDID*. As setas indicam os amplicons dos clones positivos. Na canaleta "L" visualiza-se o marcador de peso molecular, na "G" o DNA genômico de maracujá-azedo (controle positivo), e na "C" está o controle negativo.....82

Figura 23 – Validação dos clones, utilizando *primers* específicos para o gene *CYCD1*. As setas indicam os amplicons dos clones positivos. Na canaleta "L" visualiza-se o marcador de peso molecular, na "G" o DNA genômico de maracujá-azedo (controle positivo), e na "C" está o controle negativo.....83

Figura 24 – Validação dos clones, utilizando *primers* específicos para o gene *EMB*. As setas indicam os amplicons dos clones positivos. Na canaleta "L" visualiza-se o marcador de peso molecular, na "G" o DNA genômico de maracujá-azedo (controle positivo), e na "C" está o controle negativo.....83

Figura 25 – Validação dos clones, utilizando *primers* específicos para o gene *LOX*. As setas indicam os amplicons dos clones positivos. Na canaleta "L"

visualiza-se o marcador de peso molecular, na "G" o DNA genômico de maracujá-azedo (controle positivo), e na "C" está o controle negativo.....83

Figura 26 – Validação dos clones, utilizando *primers* específicos para o gene *ACCS*. As setas indicam os amplicons dos clones positivos. Na canaleta "L" visualiza-se o marcador de peso molecular, na "G" o DNA genômico de maracujá-azedo (controle positivo), e na "C" está o controle negativo.....83

Figura 27 – Rearranjo dos clones contendo oito genes de maracujá-azedo e validados via PCR.....84

Figura 28 – Hibridização dos clones contendo genes putativos de maracujá-azedo com uma sonda de DNA repetitivo (fração *C_{ot}-100* do genoma).....85

Figura 29 – Quantificação de 1µl de DNA resultante da *miniprep* de diversos clones, digerido com a enzima *HindIII*, cuja concentração variou de 50 ng/µl (2^a canaleta) até 400 ng/µl (5^a canaleta). Na última canaleta visualiza-se o marcador de peso molecular, utilizado, também, para a quantificação das amostras.....86

Figura 30 – Digestão do inserto dos BACs 17N01 (à esquerda) e 178K06 (à direita), visando obter fragmentos de tamanho adequado para a marcação por *nick translation*. Na última canaleta visualiza-se o marcador de peso molecular.....86

Figura 31 – Sementes de maracujá-azedo em papel umidecido, após 8 dias de incubação.....88

Figura 32 – Metáfase mitótica de maracujá-azedo mostrando $2n = 18$ cromossomos corados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindole).....90

Figura 33 – Cariograma dos cromossomos de maracujá-azedo, mostrando, em evidência, os satélites nos pares cromossômicos 7 e 8.....92

Figura 34 – Metáfase de maracujá-azedo hibridizada com as sondas de DNAr 5S (marcada em vermelho, setas brancas), e DNAr 45S (marcadas em verde, setas amarelas). Notar, em evidência, os pares cromossômicos com as respectivas marcações.....95

Figura 35 – Metáfase cromossômica de maracujá-azedo hibridizada com a sonda (a) 63N22 (gene *NDID*) e (b) 178K06 (gene *MIPS*) aonde se notam os sinais subteloméricos e pericentroméricos, respectivamente.....98

- Figura 36 – Metáfase cromossômica de maracujá-azedo hibridizada com a sonda 135G05 (gene *EMB*): (a) sem *C_ot*-100 e (b) com 100 vezes a *C_ot*-100.....100
- Figura 37 – Metáfase cromossômica de maracujá-azedo (a) corada com DAPI; visualizada com o fluoróforo CY3 e hibridizada com a sonda 79I13 (gene *LOX*); (b) sem a utilização de *C_ot*-100; (c) com a utilização do *C_ot*-100; (d) imagens a e c sobrepostas, evidenciando o sinal único.....101
- Figura 38 – Metáfase cromossômica de maracujá-azedo (a) corada com DAPI; visualizada com o fluoróforo CY3 e hibridizada com a sonda 134H15 (gene *ACCO*); (b) sem a utilização de *C_ot*-100; (c) com a utilização do *C_ot*-100; (d) imagens a e c sobrepostas, evidenciando o sinal único.....102
- Figura 39 – Metáfase cromossômica de maracujá-azedo (a) corada com DAPI; (b) hibridizada com a sonda 187G07 marcada com o fluoróforo CY3 (gene *EMB*).....102
- Figura 40 – a - Metáfase cromossômica de maracujá-azedo corada com DAPI e hibridizada com as sondas 198H23 (gene *ERS*), em azul, indicada por setas brancas; 134H15 (*ACCO*), em vermelho, indicada por setas vermelhas, e 215I08 (gene *G3PD*), em amarelo, indicada por setas amarelas. Em b, cariograma da mesma metáfase, mostrando os pares de cromossomos que possuem regiões homólogas a cada sonda.....103
- Figura 41 – Metáfase cromossômica de maracujá-azedo corada com DAPI e hibridizada com a sonda (a) 215I08 (gene *G3PD*), cujo sinal aparece em vermelho (CY3), e (b) 125I23 (gene *CYCD1*), cujo sinal aparece em azul (CY5). Notar a co-localização dos genes.....104
- Figura 42 – Cariótipo de maracujá-azedo, determinado com base em análises de FISH no qual aparecem identificados os cromossomos 1, 3, 4, 5, 7 e 8.....106
- Figura 43 - Ideogramas de maracujá-azedo ($n = 9$), desenhados com base nos trabalhos de (a) Mayeda (1997); (b) Melo e Guerra (2003); (c) Cuco et al. (2005); (d) Praça et al. (2008); (e) presente trabalho. Embaixo está a legenda dos marcadores específicos, definidos com base em ensaios de

FISH. O ideograma b foi desenhado seguindo as mensurações do presente trabalho, por não constar no trabalho original.....107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Divisão do subgênero <i>Passiflora</i> em superseções e séries, e número de espécies dentro de cada subgrupo.....	28
Tabela 2 - Comparação dos mapas de ligação de maracujás, publicados por diversos autores.....	32
Tabela 3 - Concentrações de <i>Hind</i> III utilizadas no teste de concentração de enzima de restrição	52
Tabela 4 - Genes putativos de <i>Passiflora</i> , códigos, sequências dos <i>primers</i> e tamanhos esperados dos amplicons.....	57
Tabela 5 - Testes de tempo de incubação e temperatura para a escolha do pré-tratamento com 8HQ 2mM para o maracujá-azedo.....	60
Tabela 6 - Reagentes, concentrações e volume utilizados no preparo da mistura de hibridização.....	65
Tabela 7 - Morfometria dos cromossomos mitóticos e metafásicos do maracujá-azedo.....	92
Tabela 8 - Clones utilizados nos ensaios de FISH e padrões de hibridizações observados com e sem o uso de DNA bloqueador (fração <i>C_ot</i> 100 do genoma).....	97

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* é o maior da família Passifloraceae, sendo formado por aproximadamente 525 espécies (ULMER; MACDOUGAL, 2004). Tem origem na América tropical, apresentando mais de 135 espécies nativas do Brasil (LIMA et al., 1999; CERVI; MILWARD-DE-AZEVEDO; BERNACCI, 2012). Dentre as principais espécies do gênero, destaca-se o maracujá-azedo, *P. edulis* f. *flavicarpa*, em virtude de seu interesse comercial, como planta frutífera. O Brasil é o maior produtor desta espécie, que está presente em 95% dos pomares comerciais do país, com uma produção anual, em 2009, de 731.515 toneladas, numa área cultivada de 50.795 ha.

Foram desenvolvidos mapas de ligação para essa espécie, baseados em marcadores RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNAs*) (CARNEIRO et al., 2002), AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (LOPES et al., 2006) e AFLPs e SSRs (*Simple Sequence Repeats*) (OLIVEIRA et al., 2008). Os mapas revelaram a presença de 9 grupos de ligação (GLs), correspondendo ao complemento haplóide dos cromossomos da espécie.

As análises citogenéticas em maracujá-azedo foram feitas por diversos autores, e revelaram um número cromossômico de $2n = 18$ (veja revisão de SOUZA; PEREIRA; VIEIRA, 2008). Entretanto, a caracterização da morfologia de cada um de seus cromossomos ainda não está bem estabelecida. Os relatos disponíveis na literatura são conflitantes quanto à posição do centrômero e ao número e a localização de constrições secundárias, regiões organizadoras de nucléolo (RONs), e dos sítios de DNAr 5S e 45S (OLIVEIRA, 1996; MAYEDA, 1997; SOARES-SCOTT, 1998; MELO et al., 2001; CUCO; VIEIRA; AGUIAR-PERECIN, 2003; CUCO et al., 2005; MELO; GUERRA, 2003; PRAÇA et al., 2008). Estes conflitos se devem à semelhança morfológica e de tamanho de seus cromossomos, dificultando a definição de um cariótipo-consenso para o maracujá-azedo.

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 de cópia única. Entretanto, a localização física e precisa de genes ou sequências de DNA não repetitivo, através de hibridização *in situ*, é restrita, pois a cromatina condensada impede a localização confiável de sondas menores que 10 kb. Como forma de superar esta limitação, foi desenvolvida a técnica de BAC-FISH. Os BACs (*Bacterial*

Artificial Chromosome) são vetores que carregam insertos de aproximadamente 100 a 150 kb, inseridos em bactérias, constituindo bibliotecas genômicas (SHIZUYA et al., 1992). A partir delas, é possível se fazer o isolamento de um BAC que contenha uma sequência de interesse e marcá-lo para ser utilizado como sonda em ensaios de FISH (JIANG; GILL, 2006).

O DNA de alto peso molecular (*High Molecular Weight* - HMW) recombinante é uma das principais tecnologias que vem sendo desenvolvidas e largamente utilizadas em pesquisas genômicas modernas (ZHANG et al., 2012). O mais notável uso dessa tecnologia é na construção de bibliotecas de grandes insertos, em cromossomos artificiais de bactérias (BACs), como descrito anteriormente. Várias espécies vegetais cultivadas têm se beneficiado destas tecnologias, como soja (WU et al., 2004), tomate (BUDIMAN et al., 2000), arroz (AMMIRAJU et al., 2006), girassol (BOUDIZI et al., 2006), cana-de-açúcar (FIGUEIRA et al., 2012), café (NOIR et al., 2004), ervilha (COYNE et al., 2007), milho (WEI et al., 2009), algodão (HU et al., 2010), entre outras.

As bibliotecas em BACs são essenciais para vários estudos genômicos avançados, como a clonagem posicional de genes de herança simples ou quantitativa (*Quantitative Trait Loci* – QTL, ZHANG et al., 2007), mapeamento físico genômico por *fingerprinting* (TAO et al., 2001; REN et al., 2003; WU et al., 2005; ZHANG et al., 2006, 2011), isolamento de genes (COYNE et al., 2007; PAIVA et al., 2011), estudos de sintenia, análises do genoma funcional em larga escala (CHANG et al., 2011; JOHNSON et al., 2011), sequenciamento genômico (VENTER; SMITH; HOOD, 1996, ZHANG et al., 2001; SATO et al., 2011) e o mapeamento físico cromossômico (PEDROSA et al., 2002; TANG et al., 2009; WAI et al., 2010).

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; LYSACK et al., 2005).

As informações acima mencionadas embasam os objetivos gerais desta tese que são, essencialmente, a construção de uma biblioteca genômica do maracujá-azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) inserida em BACs, e sua exploração para o mapeamento físico de genes putativos nos cromossomos desta espécie.

Mais detalhadamente, o presente trabalho visou atingir aos seguintes objetivos específicos: (i) construir uma biblioteca de maracujá-azedo inserida em clones de BACs; (ii) identificar, via hibridização de *macroarrays*, os clones da biblioteca que contivessem sequências de DNA cloroplastidial (cpDNA), mitocondrial (mtDNA) e genes putativos de *P. edulis flavicarpa*; (iii) isolar BACs contendo esses genes putativos e prepará-los para uso em ensaios de hibridização *in situ*; (iv) mapear citogeneticamente os BACs selecionados com genes de cópia única e (v) disponibilizar a biblioteca de BACs para uso da comunidade científica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Passiflora*

O gênero *Passiflora* pertence à família Passifloraceae, ordem Malpighiales, e suas espécies são encontradas principalmente em regiões tropicais e subtropicais das Américas, África e Ásia.

Não há um consenso entre os autores sobre o número de espécies incluídas na família Passifloraceae: Watson e Dallwitz (1992) citam a ocorrência de 530 espécies distribuídas em 18 gêneros, quais sejam: *Adenia*, *Ancistrothyrus*, *Androsiphonia*, *Barteria*, *Basananthe*, *Crossostemma*, *Deidamia*, *Dilkea*, *Efulensia*, *Hollrungia*, *Mitrostemma*, *Paropsia*, *Paropsiopsis*, *Passiflora*, *Schlechterina*, *Smeathmannia*, *Tetraphathaea*, *Tryphostemma*, *Viridivia*. Vanderplank (1996) e Feuillet (2004) apontam 630 e 700 espécies, respectivamente, classificadas em 18 gêneros. Este número variável se deve à inclusão subsequente de novas espécies, às sinonímias existentes e a discordâncias relativas à taxonomia.

O gênero *Passiflora* é o mais volumoso da família (ULMER; MACDOUGAL 2004), sendo a maioria natural do Neotrópico. O número de espécies de *Passiflora* descritas no Brasil é 135, sendo 83 endêmicas (CERVI et al., 2012).

Através da análise de caracteres florais e vegetativos, Killip (1938), o primeiro naturalista a fazer um estudo aprofundado sobre o gênero, propôs 22 subgêneros para *Passiflora*, quais sejam: *Apodogyne*, *Astephia*, *Tryphostemmatoides*, *Deidamioides*, *Plectostemma*, *Chloropathanthus*, *Murucuja*, *Pseudomurucuja*, *Psilanthus*, *Adenosépala*, *Tacsoniopsis*, *Rathea*, *Tacsonia*, *Distephana*, *Calopathanthus*, *Tacsonioides*, *Passiflora*, *Dysosmia*, *Dysosmioides*, *Polyanthea*, *Astrophea* e *Manicata*. Entretanto, estudos mais recentes, aliando aspectos evolutivos a análises morfológicas, indicaram que a classificação de Killip não reflete adequadamente as relações filogenéticas entre as espécies, e sugeriram uma redução para apenas quatro subgêneros: *Astrophea*, *Decaloba*, *Deidamioides* e *Passiflora* (FEUILLET; MACDOUGAL, 2003).

Por sua vez, o subgênero *Passiflora* é dividido em seis superseções, e estas se encontram subdivididas em 16 seções e 11 séries, como pode ser visualizado na Tabela 1. As espécies do subgênero *Passiflora* apresentam características morfológicas comuns, principalmente: são trepadeiras herbáceas, com brácteas

inteiras, flores grandes e coloridas, filamentos da coroa com duas a várias séries, opérculo encurvado e ovário estreitando-se em direção ao ápice. Seus frutos geralmente são ovóides e com coloração amarela, entretanto, existem frutos de coloração vermelha, verde e roxa, e que produzem um grande número de sementes (VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004).

Tabela 1 – Divisão do subgênero *Passiflora* em superseções e séries, e número de espécies dentro de cada subgrupo

Classificação		Número de espécies	
		236	
Superseção <i>Passiflora</i>			19
	Série <i>Passiflora</i>	13	
	Série <i>Palmatisectae</i>	01	
	Série <i>Pedatae</i>	01	
	Série <i>Setaceae</i>	04	
Superseção <i>Stipulata</i>			95
	Seção <i>Granadillastrum</i>	66	
	Seção <i>Calopathanthus</i>	01	
	Seção <i>Tacsonioides</i>	04	
	Seção <i>Kermesinae</i>	04	
	Seção <i>Dysosmia</i>	20	
Superseção <i>Laurifolia</i>			42
	Série <i>Laurifoliae</i>	21	
	Série <i>Quadrangulares</i>	06	
	Série <i>Tiliifolia</i>	14	
	Serie <i>Marginatae</i>	01	
Superseção <i>Coccinea</i>			14
Superseção <i>Distephana</i>			05
Superseção <i>Tacsonia</i>			61
	Seção <i>Rathea</i>	03	
	Seção <i>Insignes</i>	05	
	Seção <i>Colombiana</i>	19	
	Série <i>Colombianae</i>	09	
	Série <i>Leptomischae</i>	08	
	Série <i>Quindiensae</i>	02	
	Seção <i>Parritana</i>	02	
	Seção <i>Fimbriatispula</i>	02	
	Seção <i>Tacsoniopsis</i>	02	
	Seção <i>Elkea</i>	15	
	Seção <i>Tacsonia</i>	05	
	Seção <i>Boliviana</i>	02	
	Seção <i>Trifoliata</i>	01	
	Seção <i>Manicata</i>	05	

Fonte: Adaptado de Ulmer e MacDougal (2004)

As espécies comerciais deste subgrupo, quais sejam *P. edulis* (o maracujá-roxo), *P. edulis* f. *flavicarpa* (o maracujá-azedo) e *P. alata* (o maracujá-doce) são alógamas, condicionadas pelo fenômeno da autoincompatibilidade, do tipo esporofítica (BRUCKNER et al., 1995; FERREIRA et al., 2010). As mamangavas (*Xylocopa* spp.) são os principais agentes polinizadores, devido ao tamanho, uma vez que podem fazer a coleta de pólen e a polinização ao mesmo tempo (MELETTI et al., 2003). Outros insetos somente coletam o pólen, não conseguindo promover a polinização cruzada e, por conseguinte, a geração de frutos. A polinização realizada pelos ventos é praticamente nula, tendo em vista que o pólen do maracujá é bastante pegajoso e pesado (RUGGIERO; LAM-SANCHEZ; BANZATTO, 1976).

2.2 Espécies comerciais de *Passiflora*

O termo maracujá é utilizado para designar o fruto e a planta das espécies do gênero *Passiflora*. É uma forma generalizada de referir-se a umas das plantas mais atraentes, não só pela beleza das suas flores, que são cultivadas para o uso ornamental, mas também pelos diversos produtos derivados de suas folhas e frutos. As folhas e, em menor concentração, os frutos possuem um composto denominado passiflorina, um calmante natural (veja revisão de LIMA; CUNHA, 2004). Os frutos são cultivados principalmente para a produção de suco industrializado, mas, também, para o consumo *in natura* (LIMA, 1999). Mais recentemente, a indústria de cosméticos tem utilizado os maracujás para a produção de óleos, cremes e perfumes.

Os frutos de maracujás são produzidos em diversas regiões do mundo, com merecido destaque para os países americanos Equador, Colômbia, Peru e Brasil, sendo alguns países europeus os principais importadores da fruta e do suco industrializado.

As principais espécies, encontradas nas Américas, com propriedades sedativas são *P. caerulea* L. (maracujá de flor azul) e *P. incarnata* (maracujá de flor roxa), e as comerciais produtoras de frutos comestíveis são *P. edulis* (maracujá-roxo), *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá-azedo), *P. alata* (maracujá-doce), *P. macrocarpa* (maracujá-melão), *P. quadrangularis* (maracujá-açú), *P. ligularis* (maracujá-urucu), *P. laurifolia* (maracujá-laranja), *P. maliformis* (maracujá-maçã), *P. caerulea* (maracujá-azul) (ULMER; MACDOUGAL, 2004).

A espécie mais cultivada no Brasil é o maracujá-azedo, por ser mais vigorosa e adaptada aos dias quentes e por apresentar frutos de maior tamanho (LIMA, 1999). A segunda mais cultivada é o maracujá-doce que, embora não seja tão difundida quanto à cultura do maracujá azedo, vem ganhando importância dentro do mercado de frutas *in natura* devido aos preços diferenciados e baixa acidez.

O maracujá-azedo está presente em 95% dos pomares comerciais do país, com uma produção anual, em 2009, de 731.515 toneladas, numa área de 50.795 ha (Figura 1), representando um valor de produção de R\$ 669 milhões (IBGE, 2010). Segundo Lima (2001), o agronegócio do maracujá no Brasil emprega 250.000 pessoas entre empregos diretos e indiretos. A cultura é bem aceita pelos pequenos produtores rurais, por ser uma atividade que gera renda em áreas relativamente pequenas, em comparação com outras culturas, além de possibilitar um rápido retorno dos investimentos. A cultura está presente em, praticamente, todas as regiões do país, sendo o Pará, a Bahia, São Paulo, Sergipe, Minas Gerais e Goiás os principais estados produtores (FNP, 2004).

Figura 1 – Área colhida (ha) de maracujá-azedo nas mesoregiões brasileiras em 2009
Fonte: (IBGE, 2010)

As espécies comerciais de *Passiflora* são pouco estudadas do ponto de vista genético e os programas de melhoramento são bastante incipientes. A maioria das variedades foi produzida por seleção fenotípica, ou massal, suas mudas são multiplicadas por viveiristas, sem seguir, entretanto, um programa de seleção

genética em longo prazo. Há alguns estudos relevantes, conduzidos no Brasil, avaliando populações específicas, que resultaram em estimativas de parâmetros genéticos e que sugerem estratégias que podem ser seguidas para o desenvolvimento de variedades geneticamente melhoradas (MORAES et al., 2005; GONÇALVES et al., 2009).

Estudos de natureza teórica vêm sendo igualmente conduzidos, entre eles, aqueles sobre a geração de mapas de ligação. Os mapas de ligação são formados por grupos de ligação (GLs), nos quais está arranjada a ordem e a distância entre os marcadores genéticos, sejam morfológicos ou moleculares. Os grupos de ligação correspondem ao complemento haplóide dos cromossomos de uma espécie.

O primeiro mapa de ligação para o maracujá-azedo foi desenvolvido por Carneiro et al. (2002), baseado em RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNAs*). A população de mapeamento foi composta por 90 plantas F_1 derivadas do cruzamento simples entre os acessos 'IAPAR-123' (genitor feminino) e 'IAPAR-06' (genitor masculino). Outro mapa, utilizando 117 plantas desta mesma população, foi construído baseado em AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) por Lopes et al. (2006). Ambos os mapas foram construídos utilizando uma estratégia conhecida como duplo pseudocruzamento teste, que é baseada em marcadores dominantes. Como consequência, os mapas gerados são relativos a cada genitor (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994).

Anos depois, foi construído um mapa único (integrado) de maracujá-azedo, com base em dados de AFLPs e SSRs (*Simple Sequence Repeats*), por Oliveira et al. (2008). Também, foi desenvolvido, recentemente, um mapa de ligação para o maracujá-doce, baseado inicialmente em marcadores AFLPs e alguns SSRs (NUNES, 2010), e posteriormente adensado com outros locos de SSRs, marcas M-AFLPs, RGAs (*Resistance Genes Analogs*) e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) (PEREIRA, 2010).

Comparando os primeiros mapas desenvolvidos para o maracujá-azedo com os mais recentes, observa-se um considerável aumento do seu tamanho (Tabela 2), o que também ocorreu para os mapas de maracujá-doce.

Tabela 2 - Comparação dos mapas de ligação de maracujás, publicados por diversos autores

Espécie	Nº de indivíduos da F ₁	Genitor	Nº de GLs*	Comprimento do mapa (cM)	Referência
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	90	♀	9	727,7	Carneiro et al. (2002)
		♂	9	783,5	
	117	♀	9	488,9	Lopes et al. (2006)
		♂	9	790,2	
<i>P. alata</i>	160	-	10	1687,0	Oliveira et al. (2008)
	180	-	9	1725,3	Nunes (2010)
	180	-	9	2574,7	Pereira (2010)

*GLs: Grupos de ligação

Sendo assim, verificou-se um aumento da cobertura do genoma e maior comprimento de mapa. Segundo Braga (2011), que se utilizou do mapa construído por Pereira (2010) para mapear locos quantitativos em resposta da população F₁ à infecção por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, contribuíram para esse aumento as novas abordagens estatísticas nas análises de ligação (WU et al., 2002) implementadas no software ONEMAP (MARGARIDO et al., 2007), o maior número e a diversidade de marcadores disponíveis, bem como o considerável aumento no número de indivíduos das populações genotipadas, que variou de 90 a 180 (Tabela 2).

Consequentemente, houve um aumento nos tamanhos dos grupos de ligação. Para o maracujá-azedo o menor GL tem 101,3 cM enquanto o maior tem 307,1 cM (OLIVEIRA et al., 2008); já para o maracujá-doce, o menor GL tem 143,3 cM enquanto o maior tem 407,6 cM (PEREIRA, 2010). Cada grupo de ligação representa um cromossomo da espécie. Devido ao fato de algumas regiões cromossômicas não estarem cobertas por marcadores ou haver uma inibição da fração de recombinação em regiões centroméricas, por exemplo, um grupo de ligação pode se apresentar fragmentado em grupos menores. Isto ocorre devido à informação genética disponível não ser suficiente para que estes fragmentos possam ser ligados aos seus respectivos grupos de ligação (PEREIRA, 2010). Uma estratégia para solucionar este problema é selecionar marcas mapeadas, e utilizá-

las como sonda para hibridização *in situ* nos cromossomos da espécie, estabelecendo, portanto, a relação entre o GL e o respectivo cromossomo, tal como será abordado adiante.

2.3 Estudos cromossômicos em *Passiflora*

Características cariotípicas (número, forma e tamanho dos cromossomos), padrão de bandas, número e localização de sítios específicos de DNA nos cromossomos, além do comportamento dos cromossomos durante os processos meióticos e mitóticos são os principais aspectos estudados pela Citogenética (SINGH, 1993). O gênero *Passiflora*, bem como os demais gêneros das passifloráceas, tem sido muito pouco estudado citologicamente. As mais amplas contagens cromossômicas foram realizadas por Bowden (1945), Beal (1969a, 1969b, 1973), Storey (1950), Guerra (1986) e Snow e MacDougal (1993). Segundo Soares-Scott (1998) há informações citogenéticas, registradas na literatura, para 68 espécies de *Passiflora*, 8 subespécies e 14 híbridos interespecíficos, sendo que os estudos restringem-se em sua maioria à contagem do número cromossômico.

As espécies de *Passiflora* estudadas possuem certa amplitude para tamanho e número de cromossomos, podendo ser agrupadas segundo o número básico de cromossomos (x). De acordo com Melo e Guerra (2003), as espécies podem ser divididas em quatro grupos: $x = 6$ (maior parte pertencente ao subgênero *Decaloba*), $x = 9$ (maior parte pertencente ao subgênero *Passiflora*), $x = 10$ (maior parte pertencente ao subgênero *Astropheia*) e $x = 12$ (maior parte pertencente ao subgênero *Deidamioides*). Segundo estes autores, muitas espécies são diplóides, com $2n = 12$, $2n = 18$ ou $2n = 20$, embora algumas tetraplóides ($2n = 24$), hexaplóides ($2n = 36$) e octaplóides ($2n = 72$) tenham sido encontradas. Melo et al. (2001), revisando a citotaxonomia do grupo, consideraram $x = 6$ o número básico principal e $x = 9$, $x = 10$ e $x = 12$, os números básicos secundários. O menor número haplóide, $x = 6$, sugere a ocorrência de poliploidia durante a evolução do gênero.

Em *P. foetida* foram identificados, $2n = 18$, 20 , 22 e 28 , o que indica, provavelmente, a ocorrência de disploidia na evolução desse grupo cariotípico. Uma possível triploidia do número básico $x = 6$ foi sugerida para a origem das espécies com $2n = 18$, que representam as espécies comerciais importantes, inclusive *P. edulis* f. *flavicarpa* (STOREY, 1950). Melo et al. (2001) sugeriram que o número $x =$

9 é derivado de $x = 6$ por poliploidia (de $x = 6 \rightarrow x = 12$), seguida de dispoloidia reducional ($x = 12 \rightarrow x = 9$), considerando, dessa forma, as espécies com $2n = 18$ diplóides.

Em *Passiflora*, a análise de alguns cariótipos tem possibilitado reconhecer diferenças na morfologia dos cromossomos entre subgêneros e seções, quanto ao número e às posições de satélites e constrições secundárias, ao número e comprimento de cromossomos e à posição do centrômero (VIEIRA et al., 2004). Mayeda (1997) analisou nove espécies de *Passiflora*, quais sejam: *P. alata*, *P. edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. incarnata*, *P. giberti*, *P. amethystina*, *P. maliformis*, *P. coccínea* e *P. capsularis*. A autora concluiu que os cariótipos das espécies são bem similares, com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. O cromossomo 1 apresentou centrômero submediano em todos os *taxa*, à exceção de *P. maliformis*, que é metacêntrico. Os cromossomos 2 e 4 são metacêntricos, à exceção de *P. capsularis* e *P. amethystina*, que se apresentaram submetacêntricos. Ainda, o cromossomo 6 apresentou-se muito variável, sendo metacêntrico em seis *taxa*, e submetacêntrico em *P. alata*, *P. incarnata* e *P. coccínea*.

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 e, conseqüentemente, observaram valores médios dos cromossomos maiores, variando de 3,75 μm (par 1) a 2,2 μm (par 2), com o comprimento total do complemento haplóide de 26,65 μm .

Variações no número e na localização de constrições secundárias presentes no cariótipo do maracujá-azedo foram observadas 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. Recentemente, Praça et al. (2008), que utilizou preparações com cromossomos mais distendidos (tal como citado acima), revelaram a localização destas constrições nos cromossomos 1, 2, 7 e 8.

Estudos envolvendo bandamento em regiões organizadoras do nucléolo (RONs) usando a prata para fins de detecção das RONs ativas (SCWARZACHER 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* f. *flavicarpa*, 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. capsularis*, *P. rubra*, *P. tricuspidis*, *P. foetida*, *P. caerulea*, *P. edulis*, *P. racemosa* e *P. amethystina*. Os autores observaram de um a três pares de blocos CMA₃ positivos, mas não encontraram heterocromatina DAPI positiva.

Com o advento da citogenética molecular, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) tornou possível a detecção da localização específica de genes de DNAr ativos ou inativos, sendo que mais detalhes sobre esta técnica serão abordados no tópico 2.5.

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. Posteriormente, Praça et al. (2008) observaram sinais de 45S positivos no braço curto do cromossomo 7, e no braço longo do cromossomo 8.

Estudos sobre o conteúdo de DNA também 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, em picogramas, variou entre as espécies estudadas. O valor de 1,83 pg foi encontrado para *P. suberosa*, 3,16 pg para *P. edulis* f. *edulis*, 3,40 pg para *P. mucronata*, 3,43 pg para *P. edmundoi*, 3,88 pg para *P. laurifolia*, 3,92 pg para *P. gilberti* 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*. Ainda, analisaram a espécie *P. deidamioides*, derivada de outro grupo. As variações entre o maior e menor genoma foram maiores que 10X, 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).

2.4 Fundamentos e uso da técnica de hibridização *in situ* fluorescente

A técnica de FISH (*Fluorescent In Situ* Hybridization) tem sido amplamente utilizada para localizar sequências de DNA em cromossomos mitóticos ou meióticos, em núcleos interfásicos e em fibras de cromatina estendidas (DONG et al., 2001). A detecção dessas sequências *in situ* tem gerado avanços importantes na citogenética de plantas, destacando-se a construção de mapas físicos (cromossômicos), a investigação detalhada da estrutura cromossômica, o acompanhamento da quantidade de cromatina introduzida em cruzamentos interespecíficos e a análise de pareamentos intergenômicos em plantas híbridas (SOARES-SCOTT, 2005).

Segundo Guerra (2004), 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 no núcleo da célula. O objetivo é verificar se a célula possui essa sequência e qual a sua exata localização. A técnica baseia-se 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. A Figura 2 esquematiza as principais etapas da técnica de FISH.

A FISH foi utilizada, pela primeira vez, por Gall e Pardue (1969), para análises cromossômicas e por Buongiorno-Nardelli e Amaldi (1969), em cortes histológicos. A alta especificidade e o aprimoramento das técnicas utilizadas nos anos posteriores permitiram modificar a técnica inicial em algo mais informativo, sendo aplicada na área da biologia do desenvolvimento, citotaxonomia, citogenética clínica e melhoramento genético (PEDROSA-HARAND; GUERRA, 2004).

Figura 2 - Esquema simplificado da técnica de hibridização *in situ*. (a) A seqüência 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 reconhecedora ligada a um fluorocromo e observada sob microscopia de fluorescência

Fonte: Brasileiro-Vidal e Guerra, (2002)

Para observar as regiões hibridizadas com a sonda, é necessário associar algo que permita a visualização da sonda e do restante dos cromossomos. A detecção da sonda era feita, inicialmente, por autorradiografia, utilizando radioisótopos ou pela associação da sequência de DNA com um sistema enzimático (geralmente a fosfatase alcalina). Atualmente, é realizada mediante o emprego de fluorocromos (moléculas que fluorescem quando excitadas por um comprimento de luz específico). A marcação das sondas envolve a incorporação de análogos de nucleotídeos trifosfatados, diretamente associados a compostos fluorescentes (marcação direta), ou a moléculas repórteres marcadoras que serão detectadas

através de reagentes secundários (detecção indireta). As moléculas marcadoras mais usadas na marcação indireta são a biotina e a digoxigenina, enquanto os fluorocromos mais utilizados para sinalizar a presença das sondas são o FITC (isotiocianato de fluoresceína), de cor verde, e a rodamina ou CY3, de cor vermelha (SOARES-SCOTT et al., 2005).

As primeiras sondas detectadas foram as de sequências de DNA repetitivo, cujas unidades de repetição podem estar distribuídas *em tandem* ou dispersas ao longo do genoma. As sequências *em tandem* ocorrem em blocos de centenas a milhares de cópias, localizadas em um ou mais sítios de um dado genoma. Essa categoria inclui o DNA codificador, como genes de DNAr, e não-codificador, como o DNA telomérico, centromérico e outros, que vêm sendo utilizados em diversos estudos, uma vez que fornecem importantes informações sobre a estrutura, função e evolução dessas sequências e outras regiões dos cromossomos, como a heterocromatina, os centrômeros e os telômeros (LEITCH et al., 1994; JIANG; FRIEBE; GILL, 1994; SCHMIDT; HESLOP- HARRISON, 1998).

Os genes ribossomais 5S e 45S têm sido as sequências mais utilizadas como sondas na hibridização *in situ*. A unidade de repetição do DNAr 45S é uma sequência com cerca de 9,2 kb contendo os genes de DNAr 18S, 5,8S e 26S, sempre nesta ordem. Esses genes foram conservados durante a evolução vegetal, o que permite a hibridização com o uso de uma sonda ou sequência de uma espécie em qualquer outra espécie vegetal. Com sondas 18S, Montijn et al. (1998), por exemplo, identificaram essa região nos cromossomos de *Petunia hybrida*, em diferentes fases do ciclo celular. Com sondas de DNAr 45S e 5S, Brasileiro-Vidal et al. (2003) identificaram essas regiões em cromossomos de *Thinopyrum ponticum* (trigo alto). Esses dados, juntamente com o padrão de hibridização de sequências complementares às sondas pAs1 e pSc1, auxiliaram na identificação de grupos cromossômicos inteiros ou segmentos cromossômicos, em linhagens melhoradas de trigo alto. Sondas de DNAr 45S foram utilizadas, também, por Marcon, Barros e Guerra (2005), juntamente com fluorocromos base-específicos, como a cromomicina A3, a distamicina e DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol), em estudos visando ao acompanhamento de mudanças evolutivas no cariótipo de espécies do gênero *Selaginella*. Em *Passiflora*, como descrito anteriormente, já foi relatado o uso das sondas de DNAr 5S e 45S, em 20 espécies (MELO; CERVI; GUERRA, 2001; CUCO et al., 2005).

Tanto cromossomos mitóticos metafásicos como os meióticos paquitênicos podem ser utilizados no mapeamento por FISH. Os cromossomos metafásicos são mais fáceis de serem obtidos e são particularmente úteis para a estimativa do tamanho cromossômico. Por outro lado, os cromossomos paquitênicos têm como vantagem uma melhor resolução espacial do que os cromossomos mitóticos, por serem menos condensados (PEDROSA-HARAND; GUERRA, 2004). O mapeamento por FISH em cromossomos paquitênicos vem sendo utilizado em estudos de diversas espécies como tomate (ZHONG; JONG; ZABEL, 1996; PETERSON; LAPITAN; STACK, 1999), batata (SONG; JIANG, 2001), *Arabidopsis* (FRANSZ et al., 2000; LYSAK et al., 2001), *Medicago* (KULIKOVA et al., 2001), arroz, (CHENG et al., 2001), sorgo (ISLAM-FARIDI et al., 2002; KIM et al., 2005, KIM; KLEIN; KLEIN, 2005), *Brassica* (HOWELL et al., 2005), soja (WALLING et al., 2006) e milho (AMARILLO; BASS, 2007).

Com o desenvolvimento de microscópios mais potentes, resultando no aumento da sensibilidade e da resolução, foi possível utilizar como sonda sequências de DNA de cópia única e determinar a posição física de um gene ou marcador de DNA. Inicialmente, a maioria dos trabalhos de mapeamento de sequências únicas, ou com pequeno número de cópias, em cromossomos de plantas, através da FISH, foi realizada utilizando famílias de genes em que as várias cópias estão localizadas numa mesma região cromossômica, assegurando um tamanho mínimo para a sequência alvo e gerando um sinal reproduzível nos cromossomos (PEDERSEN; GIESE; LINDE-LAURSEN, 1995; FUCHS; KUHNE; SCHUBERT, 1998). Entretanto, poucas famílias gênicas apresentando tais características estão disponíveis para o mapeamento por FISH.

Como solução desse problema foi desenvolvida a técnica de BAC-FISH. Os BACs são vetores que carregam insertos de aproximadamente 100 a 150 kb, inseridos em bactérias, podendo constituir bibliotecas genômicas. É possível se fazer o isolamento de um BAC que contenha uma sequência de interesse. Assim, o princípio da técnica de BAC-FISH consiste em isolar BACs que possuam a sequência-alvo, e marcá-lo para ser utilizado como sonda em ensaios de FISH (JIANG; GILL, 2006). O desenvolvimento dessas bibliotecas forneceu um meio de superar essa limitação e tem trazido contribuições importantes para inúmeras pesquisas, como será descrito a seguir.

2.5 Bibliotecas genômicas inseridas em BACs

O DNA de alto peso molecular (*High Molecular Weight* - HMW) recombinante é uma das principais tecnologias que vem sendo desenvolvidas e largamente utilizadas em pesquisas genômicas modernas. O mais notável uso dessa tecnologia é na construção de bibliotecas de grandes insertos inseridas em cromossomos artificiais de levedura (*Yeast Artificial Chromosome* - YAC, BURKE; CARLE; OLSON, 1987), cromossomos artificiais de bactérias (BAC, SHIZUYA et al., 1992), cromossomo artificial de bacteriófago P1 (*Bacteriophage P1-Derived Artificial Chromosome* – PAC, IOANNOU et al., 1994), na transformação de plantas competentes em BIBAC (ou BAC binário, HAMILTON et al., 1996), clonagem de grandes insertos baseada em plasmídeos (*Large-Insert Plasmid-Based Clone* – PBC, TAO et al., 1998) e transformação de cromossomos artificiais competentes (*Transformation-Competent Artificial Chromosomes* – TAC, LIU et al., 1999).

Tanto os BACs, PACs, BIBACs, PBCs como os TACs são clonados em vetores baseados em plasmídeos e utilizam bactérias como hospedeiro (ZHANG et al., 2012). As tecnologias de BACs e YACs têm vantagens consideráveis sobre os sistemas pré-existent de clonagem de DNA (WU et al., 2004). Os plasmídeos, cosmídeos e vetores baseados no fago lambda só permitem a clonagem de fragmentos de DNA de até 45 kb, enquanto os BACs permitem a clonagem de fragmento de até 300 kb (ZHANG; WOO; WING, 1996), e os YACs permitem a clonagem de fragmentos de até 1.000 kb (BURKE et al., 1987). Sendo assim, a capacidade de clonagem de BACs e YACs é várias vezes maior que os sistemas convencionais de plasmídeos.

Com a clonagem de grandes insertos em YACs e BACs, houve a redução do número de clones necessários para representar uma biblioteca genômica de um organismo, com a vantagem de possuírem ampla cobertura. Os clones de uma biblioteca de DNA de grandes insertos podem ser individualmente dispostos em placas de 384 poços. Esta mudança transformou as bibliotecas de DNA em “verdadeiras” bibliotecas, onde todos os clones são individualmente dispostos em placas (“livros”) e codificados (“identificados”). Como cada clone possui um nome único ou código, ele pode ser individualmente identificado e compartilhado entre os pesquisadores (ZHANG et al., 2012).

Portanto, é muito mais conveniente o uso de bibliotecas de grandes insertos do que o de bibliotecas convencionais em pesquisas genômicas. As bibliotecas de grandes insertos tornaram possível a realização de experimentos que são difíceis ou até impossíveis de se realizar quando se utilizam bibliotecas convencionais com pequenos insertos (ZHANG et al., 2012).

À primeira vista, os YACs (com capacidade de clonagem de 1.000 kb) parecem ter uma vantagem considerável sobre BACs (com capacidade de clonagem de 300 kb). No entanto, os YACs possuem várias desvantagens, como o elevado número de clones quiméricos, a instabilidade e a dificuldade na purificação do inserto. Estes problemas têm limitado a utilidade das bibliotecas em YACs em pesquisas genômicas. Embora a capacidade de clonagem em BACs seja muito menor, os BACs são estáveis no hospedeiro bacteriano, possuem baixo quimerismo, e o seu DNA é facilmente purificado. Portanto, a tecnologia de clonagem em vetores BACs tornou-se o método de escolha para a construção de bibliotecas de grandes insertos de DNA na investigação genômica moderna (PETERSON et al., 2000).

A construção de uma biblioteca em BACs consiste em, resumidamente, extrair o DNA da espécie em estudo de núcleos previamente inseridos em *plugs* de agarose, fragmentá-lo utilizando enzimas de restrição, fazer a seleção de fragmentos de tamanhos grandes, e colocá-los em vetores que podem então ser manipulados (Figura 3). Esses fragmentos do genoma são inseridos em *Escherichia coli*, e o conjunto desses fragmentos é denominado de “biblioteca genômica”.

Figura 3 – Representação esquemática da construção de uma biblioteca genômica inserida em BACs

Ao contrário do que o seu nome descreve, os BACs não são vetores criados a partir de cromossomos artificiais *per se*, mas são fatores bacterianos do tipo F modificados. Apesar de serem capazes de carregar insertos de até 500 kb, o tamanho típico de um fragmento clonado em BAC é de 80 a 200 kb (PETERSON et al., 2000). A maioria dos vetores BAC contém as características de seleção comuns à maior parte dos vetores, como resistência a antibióticos e um sítio de clonagem múltipla associado a um gene repórter (o que possibilita a inativação do repórter por inserção do fragmento). A estabilidade de clones BAC é, em parte, devida à presença do fator F, que impede que mais de um BAC habite simultaneamente uma mesma célula bacteriana (YUKSEL; PATERSON, 2005). Uma vantagem adicional dos BACs é que estes clones são relativamente fáceis de manipular e de se propagar, quando comparados com vetores virais ou baseados em levedura. Consequentemente, os BACs têm suplantado os YACs como os vetores mais comuns utilizados diversas pesquisas genômicas (KELLEY et al., 1999).

Bibliotecas genômicas de grandes insertos foram construídas em vetores BACs para várias espécies vegetais, como: cana-de-açúcar (FIGUEIRA et al., 2012), soja (MAREK; SHOEMAKER, 1997), tomate (BUDIMAN et al., 2000), café (NOIR et al., 2004), arroz (AMMIRAJU et al., 2006), girassol (BOUZIDI et al., 2006), ervilha

(COYNE et al., 2007), milho (WEI et al., 2009) e algodão (HU et al., 2010), entre outras.

As bibliotecas em BACs são essenciais para vários estudos genômicos avançados, como a clonagem posicional de genes de herança simples ou quantitativa (*Quantitative Trait Loci* – QTL, ZHANG et al., 2007), mapeamento físico genômico por *fingerprinting* (TAO et al., 2001; REN et al., 2003; WU et al., 2005; ZHANG et al., 2006, 2011), mapeamento físico cromossômico (PEDROSA et al., 2002; TANG et al., 2009; WAI et al., 2010), isolamento de genes (COYNE et al., 2007; PAIVA-JORGE et al., 2011), estudos de sintenia (MA et al., 2010), análises do genoma funcional em larga escala (CHANG et al., 2011; JOHNSON et al., 2011) e sequenciamento genômico (VENTER; SMITH; HOOD, 1996; ZHANG et al., 2001; SATO et al., 2011).

A facilidade de sequenciamento dos clones de BAC possibilitou 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 (BERGÈS, 2012, comunicação pessoal) e o mapeamento de genes de cópia simples (PETERSON et al., 2000). Os *BAC-ends* também são úteis para a busca de marcadores microsatélites 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).

Marcas moleculares usadas na construção de mapas de ligação podem ser localizadas em BACs específicos, possibilitando a sobreposição desses mapas diretamente sobre mapas físicos (de sequências) baseados em BAC. Como exemplo, em maçã (*Malus domestica*), foi feita a integração do mapa de *contig* (HAN et al., 2011) com um mapa de ligação, que foi desenvolvido utilizando marcadores SNPs identificados em *BAC-ends* derivados de BACs do mapa físico (HAN et al., 2011).

Esta sobreposição também pode ser realizada em mapas cromossômicos, resultando na integração de ambos os mapas (TANG et al., 2009; FONSECA et al., 2010; FEBRER et al., 2010). Para tal, é importante a disponibilidade de grandes insertos para a construção de sondas para FISH, que podem ser obtidos em bibliotecas de BACs. A localização física e precisa de genes ou sequências de DNA não repetitivas, através de hibridização *in situ*, é restrita à utilização dessas grandes

sondas, pois a cromatina condensada impede a localização confiável de sondas menores que 10 kb. Portanto, a disponibilização destas grandes sequências em FISH é de suma importância para o mapeamento físico de genes.

2.6 Mapeamento físico com ênfase em BAC-FISH

Os mapas físicos podem ser representados pelos mapas de sequências, mapas de restrição, mapas de *contig* e mapas cromossômicos, os quais diferem entre si pelo grau de resolução.

O mapa físico de maior resolução mostra a sequência nucleotídica de cada cromossomo do genoma (ou mapa de sequências). Neste mapa é feita a determinação completa de todos os pares de bases, para cada cromossomo, de um dado complemento. O mapa de restrição mostra a ordem e a distância entre os sítios de corte de enzimas de restrição. Cada cromossomo é isolado e cortado com enzimas de restrição em grandes segmentos os quais são posteriormente subdivididos em segmentos menores. Os mapas de *contigs* envolvem a segmentação de um cromossomo em pequenos segmentos que são clonados e ordenados formando blocos contíguos de DNA. Os mapas cromossômicos se baseiam no mapeamento de fragmentos de DNA diretamente nos cromossomos, através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

Apesar de não serem tão detalhados quanto aos mapas físicos baseados em *contigs*, a geração de mapas cromossômicos é financeiramente menos onerosa. Além disso, a FISH permite posicionar as sequências mapeadas em relação à eucromatina, heterocromatina, centrômeros e telômeros, permitindo, também, mapear clone a clone, ao longo dos cromossomos, gerando mapas cada vez mais densos, na medida em que mais clones vão sendo mapeados (JIANG; GILL, 1996).

Mesmo quando um mapa físico de *contigs* está disponível, o mapa cromossômico permite reunir *contigs* que não puderam ser agrupados por outros métodos, ancorar os diferentes *contigs* em relação à estrutura cromossômica e avaliar o tamanho dos *gaps* remanescentes nesses mapas (CHENG et al., 2001). Desta forma, o mapeamento cromossômico por FISH foi utilizado para auxiliar na produção de um mapa de alta resolução dentro de um *contig* em *Arabidopsis* (FRANSZ et al., 1996), e para estimar os tamanhos físicos de lacunas entre BACs

do arroz (CHENG et al., 2001, FENG et al., 2002) e tomate (KOO et al., 2008, SZINAY; CHANG; KHRUSTALEVA, 2001).

Utilizando como sondas os BACs contendo segmentos de interesse, é possível o mapeamento cromossômico de sequências de cópias únicas, como genes ou marcadores geneticamente mapeados. Quando os BACs utilizados são selecionados com base nestes marcadores, é possível a integração dos mapas de ligação e cromossômicos, e o mapa integrado gerado pode ser usado para estimar as frequências de recombinação em diferentes regiões do genoma, além de esclarecer distorções dos mapas de ligação (PEDROSA et al., 2002).

Dong et al. (2000) utilizaram uma biblioteca de batata contendo 23.808 clones para a seleção de clones de BACs os quais foram marcados e utilizados como sonda para a identificação dos 12 cromossomos do complemento ($2n = 24$). Essa caracterização disponibilizou dados para estudos mais detalhados de cada cromossomo, além de gerar ferramentas para análises comparativas com outras espécies de *Solanaceae*, como, por exemplo, o tomate ($2n = 24$). Também, os 13 pares cromossômicos de *Gossypium arboreum* ($2n = 26$) puderam ser identificados em uma só FISH com a utilização de um coquetel contendo 22 sondas de BACs e de sequências contendo sítios de DNAr 5S e 45S. Além disso, a localização desses marcadores foi comparada com o mapa de ligação construído para a espécie (WANG; GUAN; GUO, 2008).

Um mapa cromossômico do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) foi desenvolvido por hibridização de 35 BACs selecionados a partir de marcadores moleculares previamente mapeados em oito grupos de ligação do mapa de *P. vulgaris* ($2n = 22$), mais sondas de DNAr 5S e 45S (FONSECA et al., 2010). Juntamente com três cromossomos previamente mapeados (3, 4 e 7) (PEDROSA-HARAND et al., 2009), foram disponibilizados 43 pontos de ancoragem entre o mapa de ligação e o mapa cromossômico da espécie, e uma nova nomenclatura foi estabelecida para os cromossomos, baseada na numeração dos GLs (Figura 4).

Figura 4 – Idiograma do feijão-comum comparativamente ao mapa de ligação, estabelecido por Vallejos et al. (1992)

Fonte: Fonsêca et al. (2010)

A relação entre o mapa cromossômico (físico) e o de ligação pode mostrar variações nas distâncias e localizações entre marcadores. Um exemplo pode ser evidenciado na comparação entre as distâncias física e a de ligação entre marcadores mapeados no cromossomo 1 de sorgo. A proximidade de marcadores na região mediana do grupo de ligação não corresponde a distâncias equivalentes no cromossomo, indicando que a recombinação é inibida em presença da heterocromatina pericentromérica (ISLAM-FARIDI et al., 2002; Figura 5).

Com a disponibilidade de BACs cromossomos-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; LYSACK et al., 2005). Com o aumento no número de mapas cromossômicos estabelecidos com BACs em plantas, uma grande quantidade de marcadores cromossômicos se tornaram disponíveis para análises comparativas. Essa abordagem possibilita um estudo de evolução cariotípica mais detalhado do que pode ser realizado através de bandamento cromossômico ou FISH com sequências repetitivas e tem permitido revelar a natureza de certos rearranjos cromossômicos.

Figura 5 - Representação diagramática da localização cromossômica de 20 BACs de uma biblioteca de sorgo, do sítio de DNAr 18-28S e do clone CEN38, associado ao centrômero, no cromossomo 1 de sorgo (à direita). As posições correspondentes no respectivo grupo de ligação estão mostradas à esquerda

Fonte: Islam-Faridi (2002)

Como exemplo de estudos comparativos tem-se o caso de *Brassicaceae* realizados por LYSAK; BERR; PECINKA (2006). Neste estudo, um conjunto de BACs cromossomos-específicos foi utilizado como sonda no mapeamento das seguintes espécies: *Arabidopsis thaliana* (n = 5), *A. lyrata* (n = 8), *Capsella rubella* (n

= 8), *Neslia paniculata* (n = 7), *Turritis glabra* (n = 7) e *Hornungia alpina* (n = 6). A partir do pressuposto número cromossômico ancestral, n = 8, foi possível elucidar os mecanismos de evolução, formadores dos cariótipos de *A. thaliana* e das espécies relacionadas. O estudo revelou que os eventos responsáveis pela diminuição do número cromossômico em *A. thaliana* foram: a geração de cromossomos acrocêntricos a partir de inversões pericêntricas, translocação recíproca e, ainda, a eliminação de um microcromossomo decorrente dessa translocação (LYSAK; BERR; PECINKA, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para a construção da biblioteca em BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*), preparação do DNA bloqueador *Cot*, amplificação das sondas utilizadas no *screening* da biblioteca e preparo das sondas usadas nos ensaios de FISH, foi empregado o DNA derivado de folhas jovens de maracujá-azedo (*P. edulis* f. *flavicarpa*), acesso 'IAPAR-123', cedido pela Estação Experimental de Londrina do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Londrina/PR. Este acesso é o genitor feminino de uma população de mapeamento constituída por 160 plantas F_1 , a qual foi utilizada para a construção de mapas de ligação para o maracujá-azedo, baseando-se em diversos tipos de marcadores moleculares (CARNEIRO et al., 2002; LOPES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008).

Para a confecção das lâminas utilizadas nos ensaios de hibridização *in situ* foram utilizadas sementes de maracujá-azedo oriundas da referida população F_1 .

3.2 Extração e quantificação do DNA genômico do maracujá-azedo

A extração do DNA foi realizada conforme o método CTAB, descrito por Murray e Thompson (1980) e Rogers e Bendich (1985). A quantificação do DNA foi feita em géis de agarose 1% (p/v) submetidos à eletroforese e coloração em banho de SyBr Safe® (Invitrogen) a 5 µg/ml durante 25 min., sendo a concentração das amostras estimada por comparação visual com àquela fluorescência emitida pelas bandas de DNA do fago λ , de concentrações conhecidas.

3.3 Construção da biblioteca de maracujá-azedo em BACs

Esta etapa foi realizada no "Centre National de Ressources Génomiques Végétales/Institut National de la Recherche Agronomique" (CNRGV/INRA), em Toulouse, na França, e a biblioteca foi construída baseando-se no protocolo de Peterson et al. (2000), que se resume nas etapas seguintes:

3.3.1 Isolamento dos núcleos contendo o DNA de alto peso molecular

Para o isolamento dos núcleos contendo o DNA de alto peso molecular foram utilizados 30 gramas de folhas jovens de maracujá, as quais foram imersas em nitrogênio líquido. Em seguida, foram maceradas com o auxílio de um cadinho e pistilo até a obtenção de um pó, o qual foi transferido para um béquer, em gelo, contendo 300 ml de tampão SEB-BME [tampão de extração baseado em sucrose: 10% v/v TKE (10mM Tris-HCL, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; 100 mM KCl), 0,5M sucrose, 4 mM espermidina, 1 mM tetrahidrocloretoespermina, 0,1% p/v ácido ascórbico, 2,0% p/v PVP-40, e 1,3% p/v dietilditiocarbamato de sódio]. Essa mistura permaneceu por 12 min. no gelo, e, durante esse tempo, o conteúdo foi gentilmente misturado a cada 2 min. O homogeneizado foi filtrado em duas membranas Miracloth em funis acoplados a tubos do tipo *falcon* de 50 ml. Foi adicionado 1/20 de volume de tampão SEB+BME/Triton (0,2% v/v β -mercaptoetanol; 10% v/v Triton em SEB+BME) em cada um dos tubos, que foram deixados no gelo por 10 min. Durante este tempo, os frascos foram agitados gentilmente a cada 2 min. Em seguida, foi dado um *spin* nos tubos em uma centrífuga a 650xg por 20 min. (4°C).

O sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 10 ml de tampão SEB+BME a cada *pellet*, ressuspensando os núcleos. Esta etapa foi repetida três vezes para que fosse realizada uma completa lavagem dos núcleos e estes pudessem ser concentrados em apenas um tubo *falcon*. A cada tubo, foi colocado tampão SEB+BME até o volume de 50 ml e, em seguida, essa solução foi centrifugada durante 15 min. a 14000 rpm (4°C).

Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e os núcleos foram ressuspensados em 20 ml de tampão SEB (sem β -mercaptoetanol), a amostra foi centrifugada e, devagar, o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma ponteira com a ponta cortada, deixando no tubo apenas 2 ml de solução na qual o *pellet* foi ressuspensado.

3.3.2 Preparação dos *plugs*

Primeiramente, foi preparada, em um tubo de 50 ml, uma solução contendo 0,15 g de agarose LMP (*Low Melting Point*) e 10 ml de tampão SEB. Essa solução

foi transferida para um microondas e aquecida até estar totalmente dissolvida. Após esta dissolução, a mistura foi colocada a 45°C.

Os moldes de *plugs* de agarose (BioRad) foram colocados no gelo. Os moldes devem estar bem limpos, por lavagem com etanol 70% e esterilização sob luz UV. A parte inferior dos moldes foi fechada com fita crepe. Em seguida, o tubo contendo os núcleos foi colocado, em estufa, a 45°C durante 10 min.

Foi misturado um volume igual de solução de agarose e dos nucleos pré-aquecidos, utilizando uma pipeta de 1 ml com ponteira com a ponta cortada, e os poços dos moldes dos *plugs* foram preenchidos com a mistura agarose+núcleos (aproximadamente 80 µl). Em seguida, mantiveram-se os *plugs* a 4°C, durante 30 min., para solidificarem.

Após esta etapa, os *plugs* foram empurrados para fora dos moldes para um tubo de 50 ml contendo tampão de lise (1,0% p/v N-lauroylsarcosina; 0,3 mg/ml proteinase K; 1,3 mg/ml N-dietilditiocarbamato dissolvido em 0,5 M EDTA; pH 9,1).

Os *plugs* foram incubados nesse tampão durante 24 h, a 50°C. Após esse tempo, o tampão foi descartado, e foram adicionados 50 ml de tampão de lise fresco. Essa solução com os *plugs* foi incubada por mais 24 h a 50°C. Após este tempo, os *plugs* foram lavados durante 1 h em EDTA 0,5 M; pH 9,1 a 50°C, 1 h em EDTA 0,05 M pH 8,0 a 4°C. Então, o tampão foi trocado e os *plugs* + tampão foram armazenados a 4°C.

3.3.3 Teste de digestão

Para a realização dos testes de digestão, os *plugs* contendo o DNA foram lavados três vezes em TE (Tris-HCl 10 mM; pH 8,0; EDTA 1 mM) gelado com 0,1 mM PMSF (*Phenylmethyl Sulfonyl Fluoride*), com duração de 1 h cada lavagem. Três *plugs* “testes” foram transferidos para um tubo contendo 10 ml de tampão H3M (Tampão SB 10% p/v; espermidina 10% p/v; BSA 1% p/v; DTT 0,1% p/v), e foram incubados durante 1 h, sob agitação. Foram marcados de **a** a **k** (Tabela 3), 11 tubos tipo *eppendorf*, contendo 250 µl de tampão H3M em cada um deles e, então, colocados em recipiente contendo gelo. Com o auxílio de uma espátula, os três *plugs* testes foram transferidos para uma lâmina de microscópio. Usando uma lamínula, cada *plug* foi cortado lateralmente e transversalmente para resultar em vários pequenos pedaços de tamanhos iguais (aproximadamente 40 pedaços).

Colocou-se $\frac{1}{2}$ *plug* macerado no tubo **a**, e $\frac{1}{4}$ de *plugs* macerados nos outros 10 tubos restantes (**b** - **k**). Em um tubo de 1,5 ml, foram misturados 20 μ l de *HindIII* (10 unidades/ μ l) com 70 μ l de água estéril e 10 μ l de tampão 10X *HindIII* para produzir uma solução a 2 unidades/ μ l (Diluição 1). Adicionaram-se 10 μ l desta solução em 80 μ l de água estéril e 10 μ l do tampão 10X *HindIII* para produzir uma solução a 0,2 unidades/ μ l (Diluição 2).

Utilizando a enzima *HindIII* concentrada e suas diluições 1 e 2, foi acrescentada, uma quantidade específica de enzima em cada um dos 11 tubos para se fazer o teste de digestão (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentrações de *HindIII* utilizadas no teste de concentração de enzima de restrição

Tubo	Solução de enzima adicionada ao tubo (μ l)	Quantidade de enzima (unidade)	Concentração final de enzima no tubo (unidade/ml)
a	0 diluição 2	0	0
b	1,5 diluição 2	0,15	0,6
c	2 diluição 2	0,2	0,8
d	2,5 diluição 2	0,25	1
e	3,5 diluição 2	0,35	1,4
f	5 diluição 2	0,5	2
g	10 diluição 2	1	4
h	0,75 diluição 1	1,5	6
i	1,25 diluição 1	2,5	10
j	2,5 diluição 1	5	20
k	2,5 <i>HindIII</i> não diluída	50	200

O conteúdo de cada tubo foi vagarosamente agitado e, em seguida, foram incubados dentro do gelo durante 1 h, sob agitação (50 rpm). Após, os tubos foram retirados do gelo e colocados em banho-maria a 37°C, por exatos 10 min., sendo retornados, imediatamente, para o gelo.

Em seguida, 40 μ l de 0,5 EDTA (pH 8,0) foram adicionados em cada tubo, e foram agitados gentilmente para promover o contato entre a agarose e o EDTA. Os tubos foram mantidos no gelo.

Foi preparado um gel de agarose 1% (p/v) usando 0,25X TBE (89mM Tris base; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA) usando o aparato CHEF (BioRad), e um pente próprio com 15 dentes. Colocou-se o *ladder* PFG *lambda* (New England Biolabs) nos poços 2 e 14. Usando-se a ponta de uma espátula, o macerado não-digerido (1/2 plug-tubo **a**) foi transferido para o poço nº 3 do gel. Assim por diante, foi transferido 1/4 de *plug* do tubo **b** para o poço nº 4, 1/4 de plug do tubo **c** no poço nº 5, até o poço nº 13. O gel de eletroforese em campo pulsado - PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) foi corrido com os seguintes parâmetros: voltagem = 6 V/cm; tempo de corrida = 18 horas, a 12,5°C. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (5 µg/ml) por 30 min. e fotografado. Foi determinada, observando-se o gel, a concentração ótima de enzima para se produzir fragmentos entre 100 a 300 kb. As concentrações que resultaram em melhores resultados foram selecionadas para a próxima etapa.

3.3.4 Digestão

Após ter sido determinada a concentração ótima de enzima para produzir fragmentos entre 100 a 300 kb, foi feita a digestão dos *plugs* contendo os núcleos. Após a digestão, o DNA foi separado em dois géis (0,25X TBE, 1% agarose p/v) de campo pulsado sucessivos, Seleção I e Seleção II, para se verificar e selecionar os fragmentos de tamanho adequado para a construção da biblioteca. Na primeira seleção, o DNA parcialmente digerido foi colocado em um grande poço cortado no meio de um gel de agarose LMP (*Agarose Pulsed-Field Low Melting Point*, SeaKem Gold) 1% p/v, e separado em eletroforese de campo pulsado (6 V/cm, 18 h, 12,5°C). A região contendo fragmentos entre 80 a 250 pb foi excisada do gel e dividida em três blocos iguais. Para a segunda seleção, esses três blocos foram colocados em um segundo gel e separados por eletroforese de campo pulsado (6 V/cm, 16 h, 12,5°C). Após terminar a segunda seleção, os pedaços de gel com fragmentos de diferentes tamanhos (**a**, **b** e **c**) foram excisados, e submetidos à eletroeluição em 1X TAE durante 90 min. no Electro-Eluter (BioRad) e, em seguida, o DNA recuperado teve suas concentrações estimadas em gel de agarose 1% p/v.

3.3.5 Ligação e transformação

Após a estimativa da concentração do DNA de alto peso molecular, 120 a 200 ng foram misturados com o vetor pIndigoBAC-5 (*HindIII-cloning ready*, Epicentre Technologies) e ligados com DNA T4 ligase, seguido de uma dessalinização em solução de agarose 1%-100 mM sacarose. A ligação então foi submetida à transformação (por eletroporação, a 13 KV/cm) em células eletrocompetentes DH10B (Invitrogen). Fez-se o plaqueamento em meio de cultura para *Escherichia coli* (Luria-Bertani – LB-agar+X-gal+IPTG).

3.3.6 Seleção dos recombinantes e estimativa do tamanho dos insertos

Após o plaqueamento e crescimento das colônias de bactérias, foi realizada uma seleção das colônias azuis (sem inserto) e brancas (com inserto) - sistema *LACz*.

Inicialmente, foi feito um plaqueamento-teste utilizando 100 µl do transformado **a**, **b** e **c**, em três placas de *Petri*. Em seguida, foram selecionados 86 clones para se estimar o tamanho dos insertos. Estes clones foram isolados manualmente e crescidos *overnight* em placas de 96 poços do tipo *deepwell*, contendo 2 ml de meio LB + glicerol 6% + cloranfenicol 12,5 µg/ml, a 350 rpm. No dia seguinte, a placa foi centrifugada durante 10 min. a 10000 rpm, e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o *pellet* resultante foi diluído em 300 µl de solução F1+RNase (Tris-Cl 50 mM; EDTA 10 mM; pH 8,0; RNase 0,1 mg/ml) e foram adicionados 300 µl de solução de lise F2 (NaOH 200 mM; SDS 1%). Esta solução foi homogeneizada, incubada a temperatura ambiente por 5 min., e acrescida de 300 µl de solução de neutralização F3 (C₂H₃KO₂ 3,0 M; pH 5,5).

Posteriormente, foi realizada uma filtração durante 5 min. dessa solução em uma placa-filtro de 96 poços (Macherey-Nagel) no *NucleoVac 96 Vacuum Manifold* (Macherey-Nagel). Após a filtração, o DNA foi submetido à precipitação com 630 µl de isopropanol, centrifugação durante 1 h a 10000 rpm, e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* resultante foi lavado com 500 µl de etanol absoluto gelado. Foi realizada, novamente, uma centrifugação durante 20 min. a 10000 rpm, e o *pellet* foi seco a 37°C. Finalmente, o DNA foi ressuspensionado em 30 µl de água ultra pura, digerido com a enzima *NotI* e separado em gel de agarose em PFGE a 6 V/cm. A

corrida se deu por 16 h, e a coloração foi feita em solução de brometo de etídio (5 µg/ml) para visualização.

Após a realização deste teste, 1 ml dos tubos contendo misturas de transformação selecionadas foi espalhado em placas do tipo Q-trays (22.5 x 22.5 cm) contendo LB-X-Gal-IPTG-CM, que foram incubadas a 37 °C *overnight*.

Para reduzir-se o tempo de seleção, devido à alta quantidade de colônias, a mesma foi realizada usando-se um sistema automatizado e robotizado de seleção (Genetix Q-Pix2, Genetix) (Figura 6). Neste sistema, as placas foram escaneadas e, através de um *software* (Q-Soft XP Picking) que diferencia as cores e a distância entre as colônias, somente as colônias brancas e isoladas foram repicadas automaticamente em novas placas (384 poços cada) contendo meio de cultura apropriado.

Figura 6 - Sistema automatizado e robotizado de seleção de clones (Genetix Q-Pix2, Genetix)

Posteriormente, foi realizada uma réplica por placa, para garantir a manutenção do material, e as mesmas foram organizadas para estocagem a -80 °C.

3.4 *Screening* da biblioteca para o isolamento e a validação de clones contendo genes putativos e sequências de cpDNA e mtDNA de maracujá-azedo

3.4.1 Preparo das membranas

Todos os clones obtidos pela construção da biblioteca foram espotados em pontos duplos usando uma matriz de 6 x 6 em membranas de nylon (Millipore), de 22.2 x 22.2 cm, carregadas positivamente, usando o robô Qpix2 (Genetix). Cada conjunto de duas membranas continha todos os clones da biblioteca.

As membranas de nylon duplamente espotadas foram transferidas para placas do tipo Q-Tray contendo LB-agar+12,5 µg/ml de cloranfenicol. Os clones bacterianos cresceram por 17 h a 37°C, e, em seguida, foram transferidos para 4°C até as colônias ficarem confluentes.

As membranas foram mantidas durante 4 min. 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 e fixadas sob luz violeta (*UV-crosslinked*) durante 50 seg (120,000 µJ.cm⁻²). Em seguida, as membranas foram guardadas a temperatura ambiente até o uso.

3.4.2 Obtenção do DNA para o preparo das sondas

Nove genes putativos de *Passiflora*, que tiveram sua prospecção *in silico*, desenho e síntese de *primers* realizados por Pereira (2010), três sequências de cpDNA (psbA, psbD e ndhb) e três sequências de mtDNA (ccb256, ccb452 e cox3) (DUMINILL; PEMONGE; PETIT, 2002) foram selecionados para serem utilizados como sondas na etapa de *screening* da biblioteca de BACs (Tabela 4). Isolaram-se sequências (via PCR) que tiveram um padrão claro de amplificação, bastante DNA e bandas únicas. Para tal, uma amostra de DNA do acesso 'IAPAR-123' foi utilizada como *template* para a amplificação dos fragmentos especificados por cada par de *primer*. As reações continham cerca de 20 ng de DNA genômico, 1X 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*, e água ultra-pura para um volume final de 16 µl. As amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf) utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min., seguida de 30 ciclos de 94 °C por 40 segundos, 54 °C por 40 segundos e 72 °C por 1 min., e extensão final a 72 °C por 8 min. As amostras foram purificadas utilizando os procedimentos do kit QIAquick 96 PCR Purification Kit (Qiagen). 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 *ladder* 100 pb.

Tabela 4 - Genes putativos de *Passiflora*, códigos, sequências dos *primers* e tamanhos esperados dos amplicons

Gene ou produto gênico	Código	Primers <i>forward</i> e <i>reverse</i>	Amplicon (pb)
<i>Cyclin-dependent protein kinase regulator</i>	<i>CYCD1</i>	CTCTCCAGGTTTCAGTCTCG TTGCTTAGCCCATCACACC	587
<i>NADP-dependent isocitrate dehydrogenase</i>	<i>NDID</i>	CAAGGTCGCTAATCCCATC TTTCTGGTAAGCCGTGTTC	598
<i>Ethylene response sensor</i>	<i>ERS</i>	GCTTATGCAGTTTGGTGC CAGAAAGATCAGGCCAATC	647
<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase</i>	<i>ACCO</i>	AGGATATGGACTGGGAGAGC TCGCACCATCTGTTTGAGC	488
<i>Myo-inositol 1-phosphate synthase</i>	<i>MIPS</i>	AAATGAAGTCCGTCCTGGTG GGAGCCAATCCAATACAAGC	565
<i>Embryo defective 2765</i>	<i>EMB</i>	TGAGAGTGTTGTGCCAAGC GAGGGTTCCTTCTTCATCAC	523
<i>Lipoxygenase</i>	<i>LOX</i>	AACATGCCAACCGAGGAC TTGATGGACATATCTGGAACC	671
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	<i>G3PD</i>	CATCCTTTCTGCGGTGATC CTTTCATGCTGCCCTCTG	595
<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase</i>	<i>ACCS</i>	GTTGGGTACGATCTTGGAC CTCAGGGCAGTGAAAAGAG	592

Fonte: Adaptado de Emshwiller e Doyle (1999)

3.4.3 Marcação, purificação e quantificação das sondas

Para a marcação das sondas foram utilizados, aproximadamente, 100 ng de DNA por membrana e o kit "Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-dCTP)" (GE-Healthcare). O DNA foi desnaturado durante 10 min. a 100°C, resfriado imediatamente no gelo por 2 min. e, em seguida, centrifugado (brevemente). Neste tubo que contém o DNA foi adicionada a esfera do kit que contém a enzima Klenow, os hexanucleotídeos dATP, dTTP, dGTP e, cuidadosamente (com os aparatos necessários para proteção radiológica), 4,5 µl de [α -³³P] dCTP 50 µCi. Essa solução foi vortexada suavemente e deixada por 1 h e 30 min. a 37°C. Após este tempo, a sonda foi purificada utilizando o kit "Illustra Probe Quant G-50 Micro Columns" (GE), que retém os fragmentos de DNA menores que 50 pb e os dNTPs não incorporados. Primeiramente, as colunas foram preparadas para receber o DNA e, em seguida, os 50 µl de sonda marcada foram adicionados à coluna e centrifugados durante 2 min., a 14000 rpm. Após recuperar a sonda purificada, foi feita sua contagem utilizando 1 µl da sonda purificada e 4 ml de líquido de cintilação em tubo específico para o contador de cintilação líquida Triathler LSC (Hidex).

3.4.4 Preparação das membranas, pré-hibridização e hibridização

Antes de iniciar a hibridização, as membranas foram incubadas durante 15 min. em 6X SSC a 50°C. Em seguida, as membranas foram pré-hibridizadas durante 3 h e 30 min. em 50 ml de tampão de hibridização (6X SSC; 5X Denhardt; 0,5% SDS; 100 µg.ml⁻¹ DNA de espermatozoides de salmão desnaturado) a 68°C. As hibridizações foram feitas com altas condições de estrinência a 68°C, *overnight*, usando 50 ml de tampão de hibridização fresco suplementado com a sonda desnaturada. As membranas foram lavadas por 15 min., a 50°C, em tampão 2X SSC - 0,1% SDS, seguindo-se uma segunda lavagem a 50°C, por 30 min., em tampão 0,5X SSC-0,1% SDS. Finalmente, elas foram envoltas em um filme plástico, expostas ao *General Purpose PhosphorImager Screen* (Amersham Biosciences) por três dias e, finalmente escaneadas usando o *Storm System* (Amersham Bioscience), com uma resolução de 50 µm. As análises para a identificação dos clones positivos foram feitas usando o *software HDFR* (Incogen).

3.4.5 Validação dos clones isolados

Os clones previamente selecionados foram submetidos à validação utilizando os *primers* dos genes correspondentes (Tabela 4). Para tal, o DNA dos clones foi extraído utilizando-se o kit NucleoBond® Xtra Maxi/Maxi Plus (Macherey-Nagel), como descrito no item 3.3.6. O DNA destes BACs foi usado como *template* 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* e água ultra-pura para 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, 54 °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 *ladder* 100 pb.

3.5 Estudos cromossômicos em maracujá-azedo

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Citogenética Vegetal de Plantas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), e consistiu das seguintes etapas:

3.5.1 Obtenção de preparações metafásicas

3.5.1.1 Germinação de sementes

Os tratamentos foram compostos por eventos de hidratação das sementes e escarificação da região oposta ao hilo. Primeiramente, as sementes foram tratadas com hipoclorito de sódio 4% durante 20 min. e lavadas com água destilada estéril por 20 min. Em seguida, as sementes foram escarificadas fisicamente por meio de corte. Após a escarificação, as sementes foram deixadas em uma placa de *Petri* contendo papel filtro embebido de água esterilizada. Este papel filtro era trocado a cada dois dias e umidificado diariamente. Elas permaneceram a 23 °C, no escuro, por 10 horas e a 30 °C por 14 horas. Após aproximadamente 10 dias, período

necessário para que as raízes atingissem 1 a 3 cm, as raízes foram coletadas e, imediatamente, iniciou-se a etapa de pré-tratamento.

3.5.1.2 Pré-tratamento das raízes

As raízes foram mergulhadas em uma solução de 8-hidroxiquinolina (8HQ) 2 mM, e testadas em diferentes tempos de incubação e temperaturas (Tabela 5). Após o tratamento com as condições escolhidas, foi utilizada uma pinça para pegar cada raiz, que foi levemente encostada em papel filtro para a retirada do excesso do 8HQ. Então, as raízes foram colocadas em frascos escuros contendo uma solução fixadora (Carnoy, 3 partes de etanol 100%: 1 parte de ácido acético). Estes frascos foram mantidos sob agitação durante 2 h, a temperatura ambiente e, em seguida, a solução fixadora foi trocada por uma nova, e as raízes foram mantidas a -20 °C.

Tabela 5 – Testes de tempo de incubação e temperatura para a escolha do pré-tratamento com 8HQ 2 mM para maracujá-azedo

Tempo de incubação (horas)	Temperatura (°C)
24	8
22	10
20	10
5	18

3.5.1.3 Preparo das lâminas

Para o preparo das lâminas para os ensaios de FISH, primeiramente, as raízes selecionadas (2 raízes por lâmina) foram lavadas durante 5 min., em água destilada, por três vezes. Em seguida, elas foram colocadas no centro de uma lâmina e digeridas durante 1 h e 30 min., a 37 °C, com 8 µl de solução enzimática (Pectinase 20%-Celulase 2%) em câmara úmida. Após a digestão, a solução enzimática foi retirada com papel filtro e foi acrescentada uma gota de ácido acético 60%. Após 10 min, se adicionou uma gota de ácido acético 45%, e as raízes foram maceradas com o auxílio de duas seringas. Uma lamínula foi colocada em cima dessas raízes maceradas, para o espalhamento e esmagamento das células, e a

mesma foi retirada em nitrogênio líquido. As lâminas foram então coradas com 8 µl de fluorocromo DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole) e selecionadas em microscópio de epifluorescência Leica DMLB (Leica). As melhores lâminas contendo metáfases foram descoradas em Carnoy durante 30 min., em etanol 100% durante 1 h, e foram secas durante 30 min. em estufa a 60 °C. As lâminas foram então armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

3.5.2 Obtenção das sondas

3.5.2.1 Extração de DNA de BACs

A extração do DNA dos BACs foi feita segundo as especificações do fabricante do kit Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen), com adaptações. Um pré-inóculo foi preparado a partir da transferência de uma colônia de bactérias crescida em meio sólido em placa de *Petri*, para 2 ml de meio 2YT líquido (1,6 % bacto-triptona; 1,0 % extrato de levedura; 0,5% NaCl pH 7,0) + cloranfenicol (1:2000) em tubos de ensaio de 10 ml. A multiplicação bacteriana se deu por, aproximadamente, 6 h a 37°C, a 300 rpm, sob agitação. Utilizou-se 1 ml desse pré-inóculo para inocular 20 ml de meio 2YT líquido, que cresceu *overnight* a 37°C, sob agitação a 300 rpm. Em seguida, esses 20 ml foram centrifugados em um tubo tipo *falcon* a 3000 rpm, por 10 min., e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspensionado, suavemente, em 2,4 ml de tampão P1 (Tris-Cl 50 mM; EDTA 10 mM, pH 8,0) com RNase (0,1 mg/ml); 2,4 ml do tampão P2 (NaOH 200 mM; SDS 1%) foram adicionados e misturados por inversão até a solução ficar homogênea, e essa solução foi mantida a temperatura ambiente por exatos 5 min. Após este tempo, 2,4 ml do tampão P3 gelado (C₂H₃KO₂ 3,0 M, pH 5,5) foram adicionados e misturados por inversão, sendo em seguida, incubados em gelo por 5 min. e centrifugados a 14.000 rpm por 10 min.

Após a centrifugação, o sobrenadante (incolor) foi transferido, cuidadosamente, para uma coluna do kit *QIAprep spin* (Qiagen) previamente equilibrada com tampão QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15% isopropanol; 0,15% Triton X-100). Cada coluna foi lavada com 1 ml de tampão QC (1,0M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% isopropanol) por quatro vezes. Em seguida, o DNA, que ficou preso à coluna, foi eluído adicionando-se 800 µl de tampão QF (NaCl 1,25 M; Tris-Cl 50 mM, pH 8,5; isopropanol 15%), aquecido a 65°C.

O DNA foi, então, precipitado com 560 µl de isopropanol à temperatura ambiente e centrifugado a 14.000 rpm, durante 30 min. O sobrenadante foi vertido, seco a temperatura ambiente, e foi adicionado 1 ml de etanol 70% (a temperatura ambiente), e o tubo centrifugado imediatamente a 14.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi novamente invertido, seco a temperatura ambiente, ressuspendido em 10 µl de Tris HCl 10 mM pH 8,5, e armazenado a -20°C.

O DNA recém-extraído e submetido à digestão de 1 µl de DNA com 1U de *Hind*III foi quantificado em gel de agarose 1% (p/v), durante 20 min., a 8 V/cm, comparando-se a intensidade das bandas geradas com as bandas do marcador de peso molecular de 1 kb (Biolabs).

3.5.2.2 Seleção de clones a serem utilizados como sondas para FISH

Para a seleção dos clones a serem utilizados como sondas nos ensaios de FISH, 0,6 µl de cada clone em meio líquido pré-selecionado foi espotado em uma membrana de nylon carregada positivamente (Roche) que foi, então, transferida para uma placa de *Petri* contendo LB-agar + 12,5 µg/ml de cloranfenicol. Os clones bacterianos cresceram por 17 h a 37°C. Em seguida, esta membrana foi mantida durante 4 min. em papel Whatmann 3MM saturado com tampão de desnaturação (0,5 M de NaOH; 1,5 M NaCl), tratada durante 10 min. a 100°C com o mesmo tampão, e neutralizada durante 10 min. em papel Whatmann 3 MM saturado com tampão de neutralização (1,5 M Tris-HCl pH 7,4, 1,5 M NaCl). Imediatamente, a membrana foi incubada a 37°C por 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, a membrana foi seca por 2 h a 80°C. Esta membrana foi, então, submetida a uma detecção quimioluminescente. Primeiramente, ela foi submetida a uma pré-hibridização com 5 ml de solução DIG Easy Hyb (Roche Applied Science) em tubo adequado, a 37°C durante 30 min., e sob agitação suave em forno de hibridização. A solução de pré-hibridização foi descartada e 5 ml de DIG Easy Hyb acrescido de 125 ng de sonda desnaturada de DNA genômico do acesso IAPAR-123 foram adicionados ao tubo contendo a membrana. Esta mistura de hibridização permaneceu a 37°C *overnight*, sob agitação suave no forno de hibridização. No dia seguinte, foram realizadas lavagens pós-hibridização, que consistiram em retirar do tubo a solução de hibridização, e lavar a membrana em 60 ml de uma solução de 2X SSC/0,1% SDS

duas vezes, por 5 min., a 68°C, e com uma solução de 0,5X SSC; 0,1% SDS, duas vezes, por 15 min. a 68°C. Após as lavagens sob estringência, a membrana foi lavada durante 5 min. em 25 ml de tampão de lavagem (0,1 M ácido maléico; 0,15 M NaCl; pH 7,5 0,3% v/v; Tween 20%) e incubada em 70 ml de tampão de bloqueio (0,1 M ácido maléico; 0,15 M NaCl; NaOH sólido até chegar a pH 7.5), durante 30 min. Após este tempo, esta solução foi descartada e a membrana foi incubada com 20 ml de tampão de bloqueio+anticorpo Anti-Digoxigenin-AP – 15.000:1 (Roche Applied Science) durante 30 min. A solução de anticorpo foi retirada e a membrana lavada duas vezes, por 15 min. cada, com 70 ml de tampão de lavagem. A solução foi, então, descartada, e foram adicionados 20 ml de tampão de detecção (0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl, pH 9.5), durante 5 min. A membrana foi retirada do tubo e colocada em uma sacola plástica, onde foram adicionados 500 µl de solução diluída de CDP-Star® Reagent (Roche) (0,1% em tampão de detecção) e mantida durante 5 min. a temperatura ambiente. Após este tempo, foi retirado o excesso de líquido, a membrana foi vedada, e prosseguiu-se à etapa de revelação, que foi feita totalmente no escuro. O filme de raios-X (Hyper Film ECL -GE) foi cortado no tamanho da membrana e o conjunto membrana-filme foi exposto dentro de um cassete digital (GE), durante 5 min. Após este tempo, o filme de raios-X foi colocado em uma solução de revelação (Kodak) até aparecer a imagem. Então, este foi lavado em água e transferido para uma solução fixadora (Kodak) durante 10 min. Finalmente, o filme foi lavado em água e secou a temperatura ambiente, para posterior análise.

3.5.2.3 Marcação das sondas

A marcação dos BACs selecionados para o uso como sondas nos ensaios de FISH foi feita por *nick translation*, segundo as recomendações dos fabricantes dos kits *Nick Translation Mix* (Roche) e do *Nick Translation System* (Invitrogen), com algumas modificações. Resumidamente, foram realizadas reações com o volume final de 10 µl, onde foram adicionados: 500 ng de DNA (6,8 µl); 0,2 µl de Cy3-dUTP 1mM ou Cy5-dUTP 1mM; 1µl de dNTPmix-dTTP 0,2 mM e 2 µl de tampão da enzima (0,5 U/µl DNA polimerase I e 10 pg/µl DNase I em Tris-HCl pH 7,5; MgCl₂, glicerol e BSA). As reações foram incubadas a 15°C por 1 a 6 horas até os fragmentos gerados estarem entre 200 e 500 pb. Como forma de controle do tamanho dos fragmentos, de meia em meia hora, 0,4 µl da reação de *nick translation* era corrida

em um gel de agarose 1% (p/v), por 20 min. a 8 V/cm, juntamente com um marcador de peso molecular de 1 kb (Biolabs). Ao atingir o tamanho ideal (entre 200 a 500 pb), a reação foi interrompida com 1 µl EDTA 0,5 M, e precipitada *overnight* com 2 µl de acetato de sódio 3M, pH 5,2 e 50 µl de etanol absoluto a -20°C. No dia seguinte, a reação foi centrifugada durante 30 min., a 4°C, a 14.000 rpm. O sobrenadante foi retirado com uma micropipeta, e foram adicionados 100 µl de etanol 70% a -20°C. Em seguida, essa solução foi centrifugada durante 14.000 rpm por 5 min., o sobrenadante foi retirado, e o *pellet* foi seco na bancada e ressuspendido, suavemente, usando-se uma micropipeta em 10 µl de 1X TE pH 8,0.

3.5.2.4 Obtenção do DNA bloqueador *C_{ot}*

Para a obtenção do DNA bloqueador, seguiu-se o protocolo adaptado de Zwick et al. (1997). Aproximadamente 500 µg de DNA genômico puro foi fragmentado em pedaços menores que 1 kb utilizando água fervente durante 40 min. O tamanho dos fragmentos foi verificado correndo 5 µl do DNA fragmentado em gel de agarose 1%, 20 min. a 8 V/cm, e a concentração foi estimada pelo *Gene Quant* (Amershan Biosciences). Em seguida, o DNA foi diluído para a concentração de 0,5 µg/µl em uma solução de NaCl 0,3M, desnaturado por 10 min., a 95°C, incubado em gelo por 10 segundos e incubado na temperatura de reassociação (*T_{re}*) durante 18 horas e 50 min., a 65°C.

Após este tempo, foram adicionados 4,2 µl de S1 nuclease 100 U/µl (Invitrogen) e 93,8 µl de tampão S1 10X [(0.5 M NaOAc pH 4,5; 45 mM ZnSO₄ (Invitrogen)]. Essa reação foi incubada a 37°C por 90 min., e o DNA foi lavado adicionando o mesmo volume presente no tubo de uma solução de fenol:clorofórmio:isoamil 25:24:1 (ΦCIA). Esta solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 3 min., e a fase aquosa (fase superior) foi pipetada para um tubo novo. O DNA foi então precipitado com 2,5X volumes de etanol absoluto a -20 °C, *overnight*. Na manhã seguinte, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm, por 30 min., a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 100 µl de etanol 70% foram acrescentados no tubo. Uma nova centrifugação foi feita durante 5 min. antes de descartar o sobrenadante novamente. O *pellet* foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 10 µl de 1X TE pH 8,0. O DNA foi quantificado pelo *Gene Quant* (Amershan Biosciences) e diluído para a concentração de 5 µg/µl.

3.5.3 Hibridização *in situ* fluorescente

A hibridização *in situ* fluorescente foi realizada segundo o protocolo descrito por Pedrosa et al. (2002), com algumas modificações, e está descrita a seguir:

3.5.3.1 Pré-tratamento das raízes

As lâminas de cromossomos mitóticos foram primeiramente incubadas a 60°C durante 30 min. e, após esfriarem, foram incubadas em 50 µl de solução de RNase 100 µg/ml em 2X SSC (NaCl 300mM; Na₃C₆H₅O₇ 30 mM; HCl 1N; pH 7,0) por 1 h, a 37°C, em câmara úmida pré-aquecida. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas três vezes, durante 5 min., em 2X SSC. Em seguida, foram incubadas com 100 µl de solução de pepsina 10 µg/ml em HCl 0,01N, por 20 min., a 37°C, em câmara úmida pré-aquecida. Para retirar a solução anterior, as lâminas foram lavadas três vezes, durante 5 min., em 2X SSC e foram incubadas, em jarro de Coplin, em uma solução de formaldeído 3,7% em 1X PBS, por 10 min., a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas três vezes, por 5 min., em 2X SSC. As lâminas foram desidratadas em uma série alcoólica: 3 min. em etanol 70% e 3 min. em etanol 100%, e secaram por 1 hora a temperatura ambiente.

3.5.3.2 Hibridização *in situ*

A mistura de hibridização foi realizada com 76% de estrigência, segundo a tabela mostrada a seguir (Tabela 6):

Tabela 6 – Reagentes, concentrações e volume utilizados no preparo da mistura de hibridização

Reagente	Concentração inicial	Volume (µl)	Concentração final
Formamida	100%	5	50%
Dextrano sulfato	50%	2	10%
SSC	20X	1	2X
DNA bloqueador	5 µg/µl	0-1	0 a 500 ng/µl
Sonda	50 ng/µl	1-2	5 a 10 ng/µl
H ₂ O destilada	q.s.p. 10 µl por lâmina		

A mistura de hibridização foi agitada em vórtex por 10 s aquecida a 75°C por 10 min. e transferida para recipiente com gelo por 5 min. A mistura foi centrifugada e 10 µl foram aplicados em cada lâmina, cobrindo-a com lamínula de vidro (20 mm X 20 mm). As lâminas foram desnaturadas a 75°C por 5 min., em termociclador (Eppendorf) com adaptador para *in situ*. Após a desnaturação, a lamínula foi vedada na lâmina com cola plástica, e as lâminas incubadas em câmara úmida pré-aquecida a 37°C, por 40 horas.

3.5.3.3 Banhos pós-hibridização

Após a hibridização, a cola plástica foi retirada com uma pinça e as lâminas foram mergulhadas em 2X SSC, à temperatura ambiente, por 5 min., até caírem as lamínulas. As lâminas foram incubadas:

- ✓ duas vezes em 2X SSC a 42°C por 5 min.,
- ✓ duas vezes em 0,1X SSC a 42°C por 5 min. (72% de estringência),
- ✓ duas vezes em 2X SSC a 42°C por 5 min.,
- ✓ uma vez em 2X SSC à temperatura ambiente, por 10 min.

As lâminas foram montadas com 8 µl de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), 2 µg/ml em Vectashield (Vector Laboratories), sendo o excesso retirado com papel filtro, e a lamínula foi vedada com esmalte incolor, para posterior análises microscópicas.

3.5.3.4 Rehibridização de lâminas

As lâminas submetidas ao FISH puderam ser reutilizadas em novas hibridizações. Para tal, foram realizadas lavagens para se retirar a sonda anterior que consistiram em, primeiramente, remover o esmalte da lâmina hibridizada com um estilete, e lavá-las em 4X SSC/0,1% Tween 20, até cair a lamínula. As lâminas foram submetidas aos seguintes procedimentos:

- ✓ lavagem três vezes por 30 min. a 1 hora em 4X SSC/0,1% Tween 20,
- ✓ lavagem duas vezes por 5 min. em 2X SSC,
- ✓ desidratação em série alcoólica: 3 min. em etanol 70% e 3 min. em etanol 96%,

✓ secagem por 30 min. a temperatura ambiente.

Após estas lavagens, as lâminas foram submetidas a novas hibridizações.

3.5.4 Medições cromossômicas

As imagens foram capturadas por microscópio de epifluorescência Leica DMLB, equipada com câmera Cohu, utilizando o software Leica QFISH. Para o processamento final, as imagens foram sobrepostas e coloridas artificialmente usando-se o software Adobe® Photoshop® versão 10.0, e ajustadas apenas em brilho e contraste. O tamanho dos braços cromossômicos foi medido a partir das imagens de DAPI, e o tamanho relativo, bem como a razão entre braços foram calculados para cinco metáfases mitóticas, usando a ferramenta do Adobe® Photoshop® 10.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção da biblioteca de maracujá-azedo em BACs

Uma biblioteca de BACs com alta cobertura foi desenvolvida com sucesso neste trabalho. Para isso, foi requerido trabalho de alta qualidade em todas as etapas da construção, que possui vários pontos críticos para se evitar a quebra do DNA de alto peso molecular (aqui designado HMW DNA - *High Molecular Weight DNA*), e que serão discutidos a seguir.

4.1.1 Isolamento dos núcleos contendo o DNA de alto peso molecular

Protocolos convencionais de extração de DNA tendem a promover quebras no DNA em pequenos fragmentos e, com isto, se usados, perde-se a vantagem da capacidade de vetores BACs carregarem grandes insertos. Por isso, para a extração do HMW DNA, foi necessária a utilização de um protocolo adequado a evitar quebras, onde se isolam, primeiramente, os núcleos das células, como será descrito adiante.

Alguns problemas encontrados na tentativa de se isolar o DNA nuclear de plantas não são encontrados em pesquisas com animais. Por exemplo, (i) as paredes celulares de plantas devem ser fisicamente quebradas ou enzimaticamente digeridas sem o prejuízo de integridade dos núcleos, (ii) os cloroplastos devem ser separados dos núcleos e/ou preferencialmente destruídos, um processo importante, uma vez que as cópias do genoma do cloroplasto podem compreender uma grande parte do DNA vegetal, (iii) a presença de compostos secundários voláteis, tais como polifenóis, deve ser evitada por interagirem com o DNA nuclear, e (iv) as matrizes de carboidratos, muitas vezes formadas após a homogeneização do tecido, devem ser evitadas pois servem como uma “armadilha” de núcleos (PETERSON et al., 2000).

A preparação de núcleos adequados para a construção de uma biblioteca de BACs pode ser um dos passos mais difíceis do processo (FRIJTERS et al., 1997; WANG et al., 1995). Neste trabalho, primeiramente, isolaram-se os núcleos das células, para evitar quebras do DNA durante a extração. Estes núcleos foram extraídos de folhas jovens de maracujá-azedo, pois, a utilização de folhas mais velhas, em experimentos prévios, resultaram em fragmentos de DNA de tamanho

pequeno em pouca quantidade (média de fragmentos de 50 kb, e concentração de 0,5 ng/ μ L). São consideradas folhas velhas as que possuem mais de 2 meses de idade. Elas são mais escuras e mais grossas, e possuem maiores concentrações de polifenóis e carboidratos, justificando, portanto, a obtenção de fragmentos DNA em baixa quantidade e de tamanho pequeno.

Para se evitar a contaminação da biblioteca por cpDNA, os exemplares de maracujá-azedo, que tiveram suas folhas utilizadas para a extração, permaneceram por cinco dias no escuro. Também, foi adicionada uma solução de 10% v/v de TritonX-100 no tampão de extração, durante a preparação dos núcleos, para romper rapidamente a membrana da organela (BAIG et al., 2009). Estes cuidados também foram adotados em estudos anteriores, sendo observada uma baixa porcentagem de contaminação de cpDNA (CHENG et al., 2001; LIU et al., 2001; QU et al., 2003; BAIG et al., 2009).

Diferentemente das extrações comuns de DNA (MURRAY; THOMPSON, 1980), utilizou-se, nesta extração, tampão de extração resfriado (4 °C). A solução tampão+núcleos foi suavemente misturada, pois os núcleos ficam extremamente frágeis no tampão utilizado, devido à ausência de cátions bivalentes associados com uma extrema condição osmótica (ZHAO; STODOLSKY, 2004).

Como citado, algumas espécies de plantas possuem altas concentrações de carboidratos e polifenóis, como o amendoim, por exemplo. Estas substâncias resultam, durante a extração dos núcleos, em um extrato de alta viscosidade, que é difícil de ser filtrado, aumentando consideravelmente o tempo de exposição dos núcleos à ação de substâncias oxidantes (GUIMARÃES et al., 2008). Para reduzir a contaminação do DNA com carboidratos e polifenóis, se incluiu, nesta etapa, a combinação do tampão de extração contendo PVP-40 e filtração em membranas Miracloth.

Os núcleos isolados foram colocados em cubos de agarose que fornecem suporte físico para prevenir a quebra do DNA e, então, incubados em tampão de extração contendo proteinases para digerir proteínas e detergente para emulsificar os lipídeos nucleares. Ainda, toda manipulação do HMW DNA foi feita utilizando ponteiras com orifícios largos (cortadas), evitando-se assim, a quebra mecânica. Utilizando estes cuidados, obtiveram-se 35 cubos (Figura 7) contendo HMW DNA e em alta quantidade.

Figura 7 – Cubos de agarose com os núcleos de maracujá-azedo, contendo HMW DNA

4.1.2 Digestão

Após a extração dos núcleos, a construção da biblioteca de BACs requer a clivagem do DNA em fragmentos com elevado peso molecular por ação de enzimas de restrição. Aqui, foram selecionados fragmentos entre 80 a 200 kb e, para a sua obtenção, o HMW DNA foi submetido à digestão parcial. O teste com concentrações crescentes de *HindIII* exigiu que, primeiramente, os cubos de agarose fossem submetidos à clivagem mecânica (com o auxílio de uma lâminula de vidro), visando aumentar a superfície de contato do HMW com a enzima de restrição. Nos cubos de agarose, os HMW DNAs foram parcialmente digeridos com uma enzima de restrição.

A quantidade crescente de *HindIII* mostrou um claro padrão de aumento de digestão, sendo as concentrações de 1, 1,4 e 2 U/ml selecionadas para serem utilizadas nos ensaios finais visando à digestão parcial do HWM DNA (Figura 8). Uma pequena degradação do DNA foi observada no *plug* controle (0 - incubação a 37°C, sem enzima de restrição). Ainda, foi observada digestão total no *plug* “200”, que serviu de controle, já que uma alta concentração de enzima (200 U/ml) foi usada.

Figura 8 – Resultado do teste de digestão por restrição com *HindIII* do HMW DNA de maracujá-azedo. A primeira e a última canaleta contêm o marcador de peso molecular PFGE/*lambda*. Da 2ª até a 12ª canaleta estão as amostras digeridas com concentrações crescentes de *HindIII*

O uso de uma enzima de restrição adequada, em concentração ideal, é importante porque cada enzima reconhece sítios de restrição que são distribuídos em diferentes frequências nos genomas dos organismos (LEWIN et al., 2007). Feito isto, procedeu-se a digestão de 14 cubos contendo o HMW DNA.

Após a digestão, a seleção dos fragmentos por tamanho foi feita por eletroforese de campo pulsado. Dois ciclos de seleção são recomendados para obter fragmentos de tamanhos maiores, uma vez que o segundo ciclo de seleção elimina pequenos fragmentos de DNA, que podem ter ficado “presos” aos fragmentos na primeira seleção (NAKAMURA et al., 1997).

Os resultados do primeiro ciclo de seleção foram satisfatórios, pois se eliminou uma grande quantidade de HWM DNA de tamanhos maiores que 200 kb e menores que 80 kb (Figura 9). Três blocos de agarose contendo o HMW DNA foram excisados do gel em regiões entre: 200 a 160 kb (Bloco 1), 160 a 120 kb (Bloco 2), e

120 a 80 kb (Bloco 3). Os três blocos de agarose foram então sujeitos à segunda etapa de seleção (Figura 10) e eletroeluídos.

Figura 9 – Gel de agarose parcialmente reconstruído. A porção do gel não visível continha fragmentos de tamanho entre 80 a 200 kb, usados no 2º ciclo de seleção. Na primeira e última canaletas, visualiza-se o marcador de peso molecular PFGE

Esses procedimentos permitiram a geração de uma biblioteca de insertos grandes, com uma distribuição de tamanho estreita, aumentando a eficiência de transformação desses grandes insertos nos clones de BACs.

Figura 10 – Gel de agarose parcialmente reconstruído depois do 2º ciclo de seleção. Os blocos 1, 2 e 3 (não visíveis) continham fragmentos de tamanhos entre 80 a 200 kb. Nas canaletas indicadas por “L” visualiza-se o marcador de peso molecular PFGE

A opção pela eletroeluição resultou em altas concentrações de HMW DNA nos isolamentos dos blocos 2 e 3 (3ng/μl e 2ng/μl), e baixa concentração no isolamento do bloco 1 (0,3 ng/μl) (Figura 11). Esta baixa concentração pode ter sido devido a erros durante a recuperação do HMW DNA na eletroeluição, uma vez que havia uma alta quantidade de HMW DNA neste bloco.

Figura 11 – Estimativa em gel de agarose da concentração do HMW DNA eluído (canaletas 1 a 3), por comparação com DNAs do fago λ (canaletas 4 a 13). Os números correspondem às concentrações em ng

4.1.3 Seleção dos recombinantes e estimativa do tamanho dos insertos

Após a conclusão da etapa de isolamento e quantificação do HMW DNA, prosseguiu-se para as etapas de ligação e transformação utilizando o DNA derivado dos três blocos. A baixa quantidade de HMW DNA derivada do bloco 1 resultou em uma baixa eficiência de transformação, com aproximadamente 224 colônias em 100 μl de transformado plaqueado (Figura 12.1). Portanto, este HMW DNA transformado

não foi utilizado nas etapas subsequentes da construção da biblioteca de BACs. Já as transformações realizadas com o HMW DNA derivado dos blocos 2 e 3 mostraram-se eficientes, com uma estimativa de 2400 e 2480 clones em 100 μ l, respectivamente (Figuras 12.2 e 12.3), que foram utilizadas nas etapas subsequentes.

Figura 12 – Resultado dos testes para avaliar a eficiência de transformação, utilizando 100 μ l de transformantes derivados do bloco 1, 2 e 3, em placas de *Petri* contendo LB-ágar+X-gal+IPTG

O número esperado e ideal de colônias por placa, a partir de 100 μ l de transformado plaqueado, é de 1500 a 2000 (ZHAO; STODOLSKY, 2004). O sistema computacional utilizado para replicar as colônias (QSoftXP Picking) diferencia as colônias brancas (com insertos) das azuis (sem insertos). O sistema exclui colônias azuis e aquelas que cresceram muito próximas. Se mais do que duas colônias crescerem próximas, elas não serão repicadas pelo robô (Q-PixII XT - Genetix). Portanto, não são desejáveis altas concentrações de colônias por placa, bem como baixas densidades de colônias, pois isto deixa o trabalho pouco eficiente, sendo necessária uma quantidade muito grande de placas e muitos ciclos de repicagem pelo Q-PixII.

Mesmo quando uma ligação resulta em uma boa quantidade de clones recombinantes (> 200 clones por μ l de ligação), como nos blocos 2 e 3, isto não necessariamente implica que houve uma ligação de boa qualidade para a construção da biblioteca de BACs. Uma biblioteca de boa qualidade, como já discutido, necessita ter insertos de grande tamanho, com representação adequada do genoma alvo, e uma baixa quantidade de clones “vazios”, ou seja, clones de coloração branca, mas que não possuem insertos (ZHANG et al., 2012).

Sendo assim, foi essencial determinar os tamanhos dos insertos e a porcentagem de clones “vazios”, já que a ligação rendeu uma quantidade alta de clones brancos. Isso foi feito analisando a presença e o tamanho de insertos de 86 clones aleatórios da biblioteca, por restrição com a enzima *NotI*. Desses, 41 continham HMW DNA do bloco 2 e 43 do bloco 3 (Figura 13). Nesta amostra, o número de clones sem inserto ou amostra sem vetor+inserto foi igual a 2 (0,02%). A maior parte das bibliotecas de BACs publicadas possui uma frequência de clones “vazios” menor que 5%, embora existam relatos de bibliotecas com frequências de 10% (COYNE et al., 2007; ZHANG et al., 2012).

Figura 13 – BACs derivados do bloco 2 (em cima) e 3 (em baixo) após a digestão com a enzima *NotI*. Na primeira e última canaleta visualiza-se o marcador de peso molecular PFGE (L), e V indica o vetor de 7,5 kb. As setas em vermelho indicam os clones sem inserto ou a ausência dos mesmos

As análises para determinar a distribuição de tamanho dos insertos revelaram que 87% dos clones tiveram insertos maiores do que 90 kb, tendo sido observados fragmentos de 50 até 196 kb (Figura 14). A média do tamanho dos fragmentos derivados do bloco 2 foi 112 kb, e do bloco 3 foi 104,5 kb; a média geral foi de 108 kb. Isto indica que os cuidados tomados na construção da biblioteca de maracujá-azedo para evitar a quebra do HMW DNA foram eficientes.

Figura 14 – Distribuição do tamanho (em kb) dos insertos na biblioteca de BAC de maracujá-azedo

Muitas bibliotecas genômicas com tamanhos de insertos entre 100 a 200 kb vêm sendo construídas e utilizadas em diversas pesquisas genômicas. Em frutíferas, particularmente em pêra, uma biblioteca construída usando o mesmo vetor (pIndigo) e a mesma enzima (*HindIII*) que no presente trabalho, mostrou fragmentos de tamanhos entre 25 a 150 kb, com uma média de 105 kb, sendo que 79% dos clones continham insertos maiores que 100 kb (COYNE et al., 2007).

O tamanho do genoma de *Passiflora* foi estimado em, aproximadamente, 1,6 pg ou 1563 Mpb, por complemento haplóide (SOUZA et al., 2004). Observando-se esta estimativa, seriam necessários 14.472 clones para se ter o genoma todo clonado (com insertos de tamanho igual a 108 kb). Entretanto, devido à redundância, estimou-se ser necessário um maior número de clones. Sendo assim, foram gerados 82.944 clones, o que corresponde a uma densa cobertura de ~6X. Isso significa que a probabilidade de se isolar uma sequência de cópia única desse genoma é maior que 99,69%, segundo a distribuição de Poisson: $[(N=\log(I-P)/\log(G-I/n))]$.

Considerando uma média de inserções em BACs de 100 kb foram necessários 7.000 e 23.000 clones, respectivamente, para cobrir os genomas de

Arabidopsis thaliana (125 Mb) e do arroz (450 Mb) (CHOI et al., 1995; ZHANG et al., 1996). No entanto, para espécies com grandes genomas, tais como a cevada (5.000 Mb) e o trigo diplóide (5.600 Mb), foram requeridos 250.000 e 280.000 clones, respectivamente, para uma cobertura semelhante (LIJAVETZKY et al., 1999; YU et al., 2000; CENCI; CHANTRET; KONG, 2003).

Os clones de uma biblioteca de BAC podem ser individualmente dispostos em placas contendo até 384 clones. Isto fez com que as bibliotecas de HMW DNA fossem transformadas em "verdadeiras bibliotecas", já que todos os clones são dispostos individualmente e etiquetados com nome e código de barras. Com isto, elas podem ser individualmente identificadas e compartilhadas entre pesquisadores. A biblioteca de BACs do maracujá-azedo aqui construída se inicia com o código Ped-B-Flav-35821 indo até Ped-B-Flav-36036. Como cada placa é dividida em colunas identificadas por letras, e colunas numeradas, cada clone é facilmente identificado e isolado.

Portanto, para a pesquisa genômica, é muito mais conveniente se utilizar bibliotecas de grandes insertos organizadas do que bibliotecas de pequenos insertos. Os clones de interesse podem ser obtidos muito mais rapidamente e as bibliotecas de BACs têm tornado possível a condução de diversos experimentos que são difíceis (ou impossíveis) quando se utiliza uma biblioteca convencional de pequenos insertos. Isto inclui, por exemplo, o "*chromosome walking*" em um grande genoma.

4.2 Screening da biblioteca para o isolamento e validação de clones contendo sequências de cpDNA, mtDNA e gênicas de maracujá-azedo

Existem dois métodos de *screening* de uma biblioteca de BAC para uma sequência ou gene de interesse: amplificação por PCR de *pools* de DNA isolados dos clones (GREEN; OLSEN, 1990), e filtros de alta densidade (WOO et al., 1994).

Para a seleção por PCR de *pools* de BACs, é necessário um agrupamento (*pooling*) da biblioteca, envolvendo combinações de placas. Essa combinação é feita de forma que um mínimo de reações de amplificação seja realizado para a identificação de um clone específico dentro da biblioteca (GREEN; OLSEN, 1990). A técnica de PCR e o condensamento da biblioteca, através dos *pools*, representando vários grupos de clones, propiciam uma forma rápida de seleção e caracterização da

biblioteca, sendo possível encontrar uma única sequência alvo (GARDINER et al., 2004). Entretanto, a produção desses *pools* requer tempo e tem custo relativamente elevado, além do gasto com altas quantidades de *primers* para realizar a busca das sequências de interesse.

Portanto, em espécies que não possuem esse *pool* de clones, como o caso do maracujá-azedo, utiliza-se a segunda estratégia, ou seja, filtros de alta densidade ou *macroarrays*. No presente trabalho, utilizou-se o padrão de matrix 6 x 6 e, assim, foi possível se obter todos os clones "espotados" em apenas duas membranas de 22,2 x 22,2 cm.

O *screening* com as sondas de DNA cloroplastidial e mitocondrial, isoladas via PCR (Figura 15), e marcadas radioativamente, permitiram a identificação de 35 e 5 clones, respectivamente (Figura 16). Estes resultados são consistentes com a baixa frequência de contaminação com DNA cloroplastidial e mitocondrial (0,4 – 0%) relatadas em recentes caracterizações de bibliotecas de BACs construídas para plantas (COYNE et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2008; LIN et al., 2011; RAMPANT et al., 2011).

Figura 15 – Gel mostrando os resultados da amplificação de cpDNA e mtDNA, utilizando como *template* o DNA genômico de maracujá-azedo. As canaletas 1 a 3 mostram o DNA amplificado com os *primers* de genes cloroplastidiais *psbA*, *psbD* e *ndhB*, respectivamente, e as canaletas 4 a 6 mostram o DNA amplificado com os *primers* de genes mitocondriais *ccb256*, *ccb452* e *cox3*, respectivamente. Nas canaletas *tc* e *tm* foram usados os *primers* de *psbA* e *ccb256* e o DNA de eucalipto como *template*. Concentrações padrões de 5 a 55 ng de DNA de fago λ são mostradas após o marcador de peso molecular ("L")

Não existem estudos sobre a caracterização do DNA de organelas de espécies de *Passiflora*. Portanto, a detecção destes clones representam ferramentas importantes para investigar a estrutura desses genomas em estudos futuros.

O *screening* com sondas gênicas permitiram a identificação de 78 clones positivos. Como exemplo, na figura 17 podemos observar a hibridização com as sondas dos genes *ACCO*, *LOX* e *EMB*. Todos os clones selecionados foram isolados, submetidos à validação via PCR com um par de *primers* específico para reconhecer cada gene (Tabela 4 - Material e Métodos), e demonstraram produtos de tamanhos preditos para pelo menos, um dos genes-alvo (Figuras 18 a 26).

Figura 16 – *Screening* da biblioteca de maracujá-azedo utilizando como sonda os genes cloroplastidiais *psbA*, *psbD* e *ndhB* (a) e os genes mitocondriais *ccb256*, *ccb452* e *cox3* (b)

Figura 17 – *Screening* da biblioteca de maracujá-azedo utilizando como sonda os genes *ACCO*, *LOX* e *EMB*

Encontraram-se nove clones contendo os produtos da PCR com os *primers* específicos para o gene *ERS* (*Ethylene response sensor* - Figura 18), 14 clones para o gene *G3PD* (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* - Figura 19), 18 clones para o gene *ACCO* (*Aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* - Figura 20), 7 clones para o gene *MIPS* (*Myo-inositol 1-phosphate synthase* - Figura 21), 5 clones para o gene *NDID* (*NADP-dependent isocitrate dehydrogenase* - Figura 22), 7 clones para o gene *CYCD1* (*Cyclin-dependent protein kinase regulator* - Figura 23), 8 clones para o gene *EMB* (*Embryo defective 2765* - Figura 24) e 10 clones para o gene *LOX* (*Lipoxygenase* - Figura 25). Na amplificação usando os *primers* para o gene *ACCS* (Figura 26), todos os clones apresentaram-se positivos. Estes dados foram descartados, pois, provavelmente, devia se tratar de contaminação.

Figura 18 – Validação dos clones, utilizando *primers* específicos para o gene *ERS*. As setas indicam os amplicons dos clones positivos. Na canaleta "L" visualiza-se o marcador de peso molecular, na canaleta "G" o DNA genômico de maracujá-azedo (controle positivo), e na canaleta "C" está o controle negativo

Figura 19 – Validação dos clones, utilizando *primers* específicos para o gene *G3PD*. As setas indicam os amplicons dos clones positivos. Na canaleta "L" visualiza-se o marcador de peso molecular, na canaleta "B" o DNA genômico de maracujá-azedo (controle positivo), e na canaleta "C" está o controle negativo

Figura 20 – Validação dos clones, utilizando *primers* específicos para o gene *ACCO*. As setas indicam os amplicons dos clones positivos. Na canaleta "L" visualiza-se o marcador de peso molecular, na canaleta "G" o DNA genômico de maracujá-azedo (controle positivo), e na canaleta "C" está o controle negativo

Figura 21 – Validação dos clones, utilizando *primers* específicos para o gene *MIPS*. As setas indicam os amplicons dos clones positivos. Na canaleta "L" visualiza-se o marcador de peso molecular, na canaleta "G" o DNA genômico de maracujá-azedo (controle positivo), e na canaleta "C" está o controle negativo

Figura 22 – Validação dos clones, utilizando *primers* específicos para o gene *NDID*. As setas indicam os amplicons dos clones positivos. Na canaleta "L" visualiza-se o marcador de peso molecular, na canaleta "G" o DNA genômico de maracujá-azedo (controle positivo), e na canaleta "C" está o controle negativo

Figura 23 – Validação dos clones, utilizando *primers* específicos para o gene *CYCD1*. As setas indicam os amplicons dos clones positivos. Na canaleta "L" visualiza-se o marcador de peso molecular, na canaleta "G" o DNA genômico de maracujá-azedo (controle positivo), e na canaleta "C" está o controle negativo

Figura 24 – Validação dos clones, utilizando *primers* específicos para o gene *EMB*. As setas indicam os amplicons dos clones positivos. Na canaleta "L" visualiza-se o marcador de peso molecular, na canaleta "G" o DNA genômico de maracujá-azedo (controle positivo), e na canaleta "C" está o controle negativo

Figura 25 – Validação dos clones, utilizando *primers* específicos para o gene *LOX*. As setas indicam os amplicons dos clones positivos. Na canaleta "L" visualiza-se o marcador de peso molecular, na canaleta "G" o DNA genômico de maracujá-azedo (controle positivo), e na canaleta "C" está o controle negativo

Figura 26 – Validação dos clones, utilizando *primers* específicos para o gene *ACCS*. As setas indicam os amplicons dos clones positivos. Na canaleta "L" visualiza-se o marcador de peso molecular, na canaleta "G" o DNA genômico de maracujá-azedo (controle positivo), e na canaleta "C" está o controle negativo

Os dados de hibridização demonstraram a utilidade da biblioteca construída no presente trabalho, na facilitação do isolamento de genes e validação da cobertura do genoma da espécie. Estes clones que foram validados foram isolados e rearranjados em uma nova placa, conforme demonstrado na Figura 27.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	101L20	194M11	135G05	111F12	23L16	192F06	29G08	63N22
B	120H21	205A19	143N08	117F23	47A13	215I08	73O09	79K16
C	120J01	79I13	187G07	161K19	105P16	121D09	104N10	152I06
D	122M21	209G15	205A19	198H23	113O05	125I23	140D14	205D10
E	134H15	37C02	19H23	206C02	130K19	126G05	170O10	
F	134J03	32N10	34A10	17P18	146E17	131B02	178K06	
G	140C15	61N17	54N20	18O06	175K02	204P21	170O10	
H	191K22	99C16	97J17	22E03	175L01	215N23	43P24	

 <i>ACCO</i>	 <i>G3PD</i>
 <i>LOX</i>	 <i>CYCD1</i>
 <i>EMB</i>	 <i>MIPS</i>
 <i>ERS</i>	 <i>NDID</i>

Figura 27 – Rearranjo dos clones contendo oito genes de maracujá-azedo e validados via PCR

4.3 Obtenção e marcação das sondas utilizadas nas etapas de FISH

Os clones que foram validados e isolados na etapa anterior foram então submetidos às etapas de isolamento e marcação para uso em FISH.

Clones contendo insertos de grande tamanho podem abrigar sequências repetitivas que, por sua vez, podem impedir a visualização e a localização de sequências de cópia única (JIANG; GILL, 1996). Portanto, foi necessária a

realização de um teste, por *dot-blot*, para quantificar o DNA repetitivo em cada clone selecionado. Assim, o DNA desnaturado de cada BAC selecionado foi "espotado", seguindo o mesmo padrão da placa de rearranjo (Figura 27), em uma membrana e submetido à hibridização utilizando a fração *C_ot*-100, derivada do genoma de maracujá-azedo (Figura 28), que corresponde à fração repetitiva do genoma isolada no presente trabalho.

Os clones que apresentaram sinais mais fracos de hibridização foram, então, selecionados, isolados e marcados para serem utilizados como sonda para FISH: 135G05 (gene *EMB*), 79I13 (gene *LOX*), 215I08 (gene *G3PD*), 63N22 (gene *NDID*), 125I23 (gene *CVCD*), 134H15 (gene *ACCO*), 170O10 (gene *MIPS*) e 198H23 (gene *ERS*). Anteriormente a esta pré-seleção, outros clones tinham sido selecionados aleatoriamente: 187G07 (gene *EMB*), 209G15 (gene *LOX*), 191K22 (gene *ACCO*) e 178K06 (gene *MIPS*).

Figura 28 - Hibridização dos clones contendo genes putativos de maracujá-azedo com uma sonda de DNA repetitivo (fração *C_ot*-100 do genoma)

A extração dos insertos dos BACs é feita de forma semelhante à extração de DNA plasmidial, técnica comumente conhecida como *miniprep*. Entretanto, esta extração, em geral, é mais difícil pelo fato de apenas uma cópia do BAC estar presente por célula. O rendimento é, portanto, muito menor e, frequentemente, pode haver contaminação por DNA fragmentado, visível como um rastro em eletroforese em gel de agarose. Por isso, a utilização de kits para a *miniprep* com colunas de

purificação é bastante conveniente. Altas concentrações de DNA, variando de 50 ng/μl até 400 ng/μl foram obtidas usando-se estes kits (Figura 29).

Figura 29 - Quantificação de 1μl de DNA resultante da *miniprep* de diversos clones, digerido com a enzima *HindIII*, cuja concentração variou de 50 ng/μl (2ª canaleta) até 400 ng/μl (5ª canaleta). Na última canaleta visualiza-se o marcador de peso molecular utilizado, também, para a quantificação das amostras

A marcação dos BACs para uso como sonda foi feita por *nick translation*, da mesma forma que para outras sondas geradas a partir de segmentos maiores que 200 pb. Diferentes moléculas marcadoras podem ser utilizadas, inclusive fluoróforos acoplados a nucleotídeos, como o Cy3-dUTP. Embora essa marcação direta não permita a amplificação do sinal, a ausência de *background* oriundo da detecção leva a um melhor contraste entre o sinal fraco e o fundo, tornando a visualização do sinal mais clara.

A reação de *nick translation* foi feita marcando-se 1 μg de DNA, que mostrou-se limpo e razoavelmente bem quantificado. Finalmente, uma boa marcação da sonda só é assegurada se o tamanho dos fragmentos gerados pela polimerização for acompanhado por eletroforese em gel de agarose. Espera-se encontrar fragmentos de 200 a 500 pb (Figura 30).

Figura 30 – Digestão do inserto dos BACs 17N01 (à esquerda) e 178K06 (à direita), visando obter fragmentos de tamanho adequado para a marcação por *nick translation*. Na última canaleta visualiza-se o marcador de peso molecular

4.4 Estudos cromossômicos em maracujá-azedo

4.4.1 Obtenção de raízes e preparações metafásicas

Uma questão importante colocada por citogeneticistas é qual deve ser o grau de condensação dos cromossomos para se definir o cariótipo e mapeamento por FISH. Os cromossomos mitóticos metafásicos são os mais utilizados, por que as pontas de raízes são facilmente obtidas em diversas espécies de plantas (JIANG; GILL, 2006). Este foi o tipo celular utilizado no presente trabalho, pela facilidade de germinar sementes de maracujá-azedo em laboratório.

A germinação de sementes, segundo Bewley e Black (1994) e Castro, Bradford e Hilhorst (2004) é um processo composto por três fases, quais sejam, embebição (fase I), ativação dos processos metabólicos requeridos para o crescimento do embrião (fase II) e iniciação do crescimento do embrião (fase III). A duração de cada fase depende de propriedades inerentes à semente, como a permeabilidade do tegumento, composição química e o tamanho das sementes e, também, das condições durante a embebição, como temperatura, composição do substrato e presença de reguladores vegetais (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

As sementes de maracujá-azedo não requerem limpeza, secagem ou armazenamento antes da semeadura. Porém, a remoção da polpa e a lavagem das sementes aceleram a sua germinação. Observou-se, em testes iniciais de germinação de sementes envoltas pelo arilo, uma alta taxa de desenvolvimento de fungos, o que acarretou a morte das sementes e a perda de material. Posteriormente, as sementes foram lavadas, diversas vezes, para se extrair manualmente o arilo, tratadas com hipoclorito de sódio 4% (v/v) durante 20 min., e lavadas com água destilada esterilizada, durante 20 min. Desta forma, reduziu-se drasticamente a contaminação por fungos, aumentando a taxa de germinação. Os tratamentos foram compostos por eventos de hidratação das sementes e escarificação da região apical. Esses tratamentos foram escolhidos baseando-se em experimentos levando à quebra de dormência para diferentes espécies de *Passiflora* (ELLIS; HONG; ROBRECHTD, 1985; ESPINOSA et al., 1992; MELO, 1999; ALEXANDRE et al., 2004; DELANOY et al., 2006). Tsuboi e Nakagawa (1992) observaram que a escarificação com lixa promoveu uma maior germinação e vigor de sementes de maracujá-azedo. Ainda, as sementes permaneceram a 23°C, no

escuro, durante 10 horas, e a 30 °C durante 14 horas, conforme sugerido por Ferreira (1998), com algumas adaptações.

Outro fator importante para a germinação é a composição do substrato onde as sementes serão germinadas. No presente trabalho, a manutenção das sementes em papel filtro umedecido levou a uma alta taxa de germinação, maior que 80%. Esta taxa se deve a cuidados na condição das sementes, com troca de papel filtro a cada dois dias, e umidificação diária, com água esterilizada. Todos esses cuidados resultaram em germinações a partir de 7 dias, com uma média de 10 dias para obter raízes de 1 cm, tamanho ideal para se iniciar as etapas de pré-tratamento (Figura 31).

Figura 31 - Sementes de maracujá-azedo em papel umedecido, após 8 dias de incubação

Segundo Guerra e Souza (2002), os meristemas destacados da planta e mantidos em ambiente úmido continuam seus ciclos celulares, normalmente, durante horas, ou mesmo, dias, dependendo do órgão de origem. Daí a importância de se pré-tratar, adequadamente, os meristemas para a análise cromossômica. As substâncias utilizadas atuam (i) bloqueando o ciclo mitótico em metáfase, acarretando um acúmulo de células neste estágio, (ii) provocando maior contração cromossômica, permitindo melhor visualização das constrições primárias e secundárias e, conseqüentemente, proporcionando melhor definição da morfologia cromossômica, e (iii) produzindo um maior espalhamento cromossômico, devido à destruição ou inibição das fibras do fuso (WALKER, 1973; GUERRA, 1986; SHARMA; SHARMA, 1999; SINGH, 1993).

Vários testes foram feitos a fim de se obter uma boa morfologia cromossômica, sendo que a concentração de 8-hidroxiquinolina (8-HQ) de 2 mM e o tempo de 5 h, a 18°C, foram adequados. Temperaturas mais elevadas com essa substância podem causar aderências cromossômicas (SINGH, 1993).

A principal finalidade da fixação é permitir a precipitação das proteínas, mantendo a forma e estrutura do conteúdo celular sem causar qualquer distorção dos componentes celulares da raiz, promovendo, assim, a conservação por longos períodos, sem que a amostra sofra decomposição. Por isso é importante a utilização de um fixador que penetre rapidamente no tecido, pois esta é uma etapa bastante crítica para a obtenção de bons resultados, especialmente quando se pretende, posteriormente, aplicar técnicas de bandamento cromossômico e hibridização *in situ* (GUERRA; SOUZA, 2002). No presente trabalho, o fixador em solução de 3 partes de etanol para 1 parte de ácido acético mostrou-se adequado.

A condição de hidrólise mais adequada, mediante digestão enzimática com celulase (Sigma) a 2% e pectinase (Sigma) a 20%, a 37°C, durante 1h e 30 min., usada neste trabalho, coincidiu com aquela sugerida em protocolos rotineiros usados em diversas espécies vegetais (GUERRA; SOUZA, 2002). Nesta etapa, objetiva-se o rompimento da parede celular de forma a propiciar condições adequadas para o espalhamento cromossômico, além de possibilitar a contagem cromossômica, sendo fundamental para o sucesso da aplicação da técnica de hibridização de DNA *in situ* (GUERRA; SOUZA, 2002; PEDROSA-HARAND; GUERRA, 2004).

A remoção da parede celular possibilitou a visualização de cromossomos íntegros e espalhados sobre as lâminas. A qualidade dos cromossomos também foi observada em função da ausência de sobreposição e por estarem no mesmo plano focal. Tais características nem sempre são observadas em preparações cromossômicas realizadas com a técnica convencional de esmagamento, devido à presença de fragmentos celulares, como restos de parede celular. Esse procedimento vem sendo aplicado por diferentes autores na preparação de lâminas metafásicas, em maracujá-azedo (MAYEDA, 1997; SOARES-SCOTT, 1998; MELO; CERVI; GUERRA, 2001; CUCO; MONDIN; VIEIRA; AGUIAR-PERECIN, 2003; MELO; GUERRA, 2003).

4.4.2 Estabelecimento do cariótipo

Visualizaram-se metáfases completas com 18 cromossomos individualizados, sem sobreposição, no mesmo plano de foco da lâmina e com constrições primárias e secundárias definidas (Figura 32), facilitando a montagem dos kariogramas e a classificação dos pares cromossômicos.

Este número cromossômico ($2n = 18$) coincide com o de um grande número de espécies de *Passiflora*, incluindo as espécies do mesmo subgênero que o maracujá-azedo (subgênero *Passiflora*): *P. incarnata*, *P. edmundoi*, *P. kermesia*, *P. nitida*, *P. laurifolia*, *P. amethystina*, *P. caerulea*, *P. elegans*, *P. gilberti*, *P. cincinnata*, *P. edulis* Sims. f. *edulis*, *P. filamentosa*, *P. alata*, *P. quadrangularis*, *P. seemannii*, *P. malacophylla*, *P. setacea*, *P. actinia*, *P. galbana*, *P. jilekii*, *P. mucronata*, *P. ligularis*, *P. maliformis* (veja revisão de SOUZA; PEREIRA; VIEIRA, 2008). Coincide, também, com os trabalhos publicados com a mesma espécie aqui estudada, o maracujá-azedo (STOREY, 1950; OLIVEIRA, 1996; MAYEDA, 1997; SOARES-SCOTT, 1998; MELO; CERVI; GUERRA, 2001; CUCO; VIEIRA; AGUIAR-PERECIN, 2003; MELO; GUERRA, 2003; PRAÇA et al., 2008).

Figura 32 – Metáfase mitótica de maracujá-azedo mostrando $2n = 18$ cromossomos corados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindole)

As espécies de *Passiflora* podem ser divididas em quatro grupos cariológicos, representados por $x = 6$, $x = 9$, $x = 10$ e $x = 12$ (MELO; GUERRA, 2003). A maior parte apresenta $2n = 12$ ou 18 , mas $2n = 14, 20, 22, 24, 36, 72$ e 84 também foram encontrados em espécies nativas e introduzidas no Brasil. Isto indica a ocorrência de mecanismos evolutivos por disploidia (por exemplo, $2n + 2 = 22$) e poliploidia ($2n = 4x = 36$) (MAYEDA et al., 1997). Alguns autores sugerem que as espécies com $2n = 12$ seriam as mais primitivas, ou ancestrais dos maracujazeiros, enquanto as espécies do grupo $2n = 18$ seriam originárias de uma possível triploidização do número básico $x = 6$. Esta hipótese, entretanto, não condiz com a microsporogênese normal e elevada fertilidade encontrada nas espécies com $2n = 18$, uma vez que os triplóides apresentam meiose irregular e esterilidade elevada, derivadas de anormalidades meióticas durante o pareamento e a segregação cromossômica. Ainda, Melo, Cervi e Guerra (2001) sugeriram que o número $x = 9$ seria derivado de $x = 6$ por poliploidia (de $x = 6$ a $x = 12$) seguida de disploidia reducional ($x = 12$ a $x = 9$), considerando, dessa forma, as espécies com $2n = 18$ como diplóides.

A montagem dos kariogramas, feita a partir das análises do comprimento absoluto e da relação de braços (Tabela 7), e a observação microscópica da morfologia dos pares cromossômicos, bem como a sua organização em ordem decrescente de tamanho, possibilitaram a classificação dos cromossomos de maracujá-azedo. Foram observados sete pares metacêntricos (2 a 7 e 9) e dois pares submetacêntricos (1 e 8) (Figura 33 e Tabela 7). Observou-se a presença de constrição secundária na porção subterminal do braço longo do cromossomo 8 e na porção subterminal do braço curto do cromossomo 7, apresentando-se consistente nos dez kariogramas analisados. Vale ressaltar que se observaram satélites nos pares cromossômicos 7 e 8 (Figura 33). Quanto ao tamanho dos cromossomos, observou-se uma variação de $2,3$ a $3,55 \mu\text{m}$ (Tabela 7).

Tabela 7 – Morfometria dos cromossomos mitóticos e metafásicos do maracujá-azedo

Cromossomo	Comprimento absoluto (μm)	r	Classe	Comprimento relativo (%)
1	3,55	1,73	SM	13,87
2	3,30	1,02	M	12,90
3	3,05	1,29	M	11,92
4	2,95	1,04	M	11,53
5	2,90	1,10	M	11,33
6	2,73	1,10	M	10,67
7	2,45	1,15	M	9,57
8	2,35	1,80	SM	9,18
9	2,30	1,01	M	8,99
Total	25,58			100,00

r - razão entre braços longo e curto

M - Metacêntrico

SM – Submetacêntrico

Figura 33 – Cariograma dos 18 cromossomos de maracujá-azedo, mostrando, em evidência, os satélites nos pares cromossômicos 7 e 8

Quanto à classificação centromérica, os resultados encontrados foram semelhantes àqueles publicados por Cuco et al. (2005), que indicaram que os pares 1 e 8 eram submetacêntricos, e os demais metacêntricos. Entretanto, foram diferentes dos resultados observados por Soares-Scott (1998), que descreveu outros dois pares de cromossomos submetacêntricos (4 e 7) além de sete metacêntricos (1, 2, 3, 5, 6, 8, 9), e também diferentes do observado por Praça et al. (2008) que indicaram como submetacêntricos os cromossomos 1, 8 e 9.

As análises morfométricas mostraram-se próximas às de Cuco et al. (2005) e Soares-Scott (1998); os valores encontrados para o complemento haplóide por esses autores foram de 22,66 e 21,59 μm , respectivamente. No presente estudo, o complemento haplóide totalizou 25,58 μm (Tabela 7). Este valor é semelhante ao obtido por Praça et al. (2008), que foi igual a 26,65 μm . Estas diferenças podem ser justificadas, em parte, pelo grau de compactação dos cromossomos e por diferenças metodológicas nas preparações das lâminas, como o uso de diferentes enzimas ou de suas concentrações, e variações no agente antimitótico. Soares-Scott (1998), por exemplo, submeteu os meristemas radiculares a tratamentos com colchicina, enquanto Cuco et al. (2003) aplicaram 8-HQ (300 ppm) em conjunto com o inibidor de síntese protéica, ciclohexamida (3,125 ppm). Os corantes utilizados para visualizar a morfologia cromossômica também podem influenciar na visualização de suas estruturas. Como exemplo, alguns autores empregaram a metodologia de Feulgen, que utiliza o reativo de Schiff à base de fucsina, para preparar suas lâminas (CUCO et al., 2005), outros a solução de Giemsa (PRAÇA et al., 2008), colorações que permitem a visualização em microscopia de campo claro. No presente trabalho, utilizou-se o DAPI associado à FISH, o qual permite visualizar os cromossomos apenas na microscopia de fluorescência; isto pode dificultar a visualização de detalhes morfológicos.

Mayeda (1997) analisou outras oito espécies do subgênero *Passiflora* e concluiu que os cariótipos são bem similares. O cromossomo 1 apresentou centrômero submediano em todos os *taxa*, à exceção de *P. maliformis*, que é metacêntrico. Os cromossomos 2 e 4 são metacêntricos, à exceção de *P. capsularis* e *P. amethystina*, que se apresentaram submetacêntricos. Ainda, o cromossomo 6 apresentou-se muito variável, sendo metacêntrico em seis *taxa*, e submetacêntrico em *P. alata*, *P. incarnata* e *P. coccinea*.

O número e a posição das constrições secundárias presentes no cariótipo do maracujá-azedo vêm sendo descritos de forma diferente, dependendo do autor. Oliveira (1996) encontrou apenas uma constrição secundária, localizada no cromossomo 8, Mayeda (1997) relatou a presença de dois pares de cromossomos com satélites. Já Soares-Scott (1998) encontrou duas constrições secundárias, uma no cromossomo 4 e outra no cromossomo 7, ambas no braço longo. Em trabalhos posteriores, a autora relatou a presença de, pelo menos, três constrições secundárias, porém não especificou a posição. Cuco et al. (2003) observaram a

presença de constrições secundárias nos cromossomos 8 e 9, os menores da espécie. Todos esses autores utilizaram a técnica de esmagamento nas preparações cromossômicas. No presente trabalho, foi possível identificar duas constrições secundárias, localizadas na porção subterminal do braço longo do cromossomo 8 e na porção subterminal do braço curto do cromossomo 7 (Figura 33).

As duas constrições secundárias encontradas no cariótipo do maracujá-azedo apresentaram marcação por FISH (Figura 34). Este resultado está de acordo com trabalhos anteriores. Quanto à localização dessas regiões, nossos resultados concordam em parte com os de Cuco et al. (2005), que identificaram esses sítios nos cromossomos 8 e 9, e com os de Melo e Guerra (2003), que identificaram sítios de DNAr 45S no braço longo dos cromossomos 7 e 9. No presente trabalho, as marcações foram evidentes no braço curto do cromossomo 7 e no braço longo do cromossomo 8, discordando dos dados obtidos pelos referidos autores quanto à presença de marcação no cromossomo 9. Essas diferenças podem ocorrer em função do pequeno tamanho dos cromossomos ou devido ao grau de compactação ou ainda à qualidade da morfologia dos cromossomos.

As RONS (Regiões Organizadoras de Nucléolos) estão em sítios cromossômicos que contêm sequências de DNA repetitivas que codificam RNAr 18S, 5,8S e 26S (18S-26S) (BESENDORFER et al., 2002), sendo que, citologicamente, estas regiões são visualizadas em constrições secundárias nos cromossomos metafásicos (LANGER; KOUL, 1983; SATO et al., 1988). Segundo Sumner (2003), tais genes são transcritos como uma única unidade (45S). Outra sequência que codifica RNAr é a 5S, porém encontra-se dispersa pelo genoma. Um sítio de DNAr 5S foi observado no braço longo do cromossomo 5, correspondendo com o observado por Melo e Guerra (2003).

Figura 34 - Metáfase de maracujá-azedo hibridizada com as sondas de DNAr 5S (marcada em vermelho, setas brancas), e DNAr 45S (marcadas em verde, setas amarelas). Notar, em evidência, os pares cromossômicos com as respectivas marcações

Todas as RONS estão localizadas em constrições secundárias, mas nem todas as constrições secundárias são sítios de RON. Pelo menos três dessas constrições foram encontradas, nos cromossomos do maracujá, por Soares-Scott (1998), e um ou dois sítios de RON foram relatados por diferentes autores (OLIVEIRA, 1996; CUCO; VIEIRA; AGUIAR-PERECIN, 2003; MELO; GUERRA, 2003). No presente trabalho, entretanto, com auxílio das técnicas utilizadas, foi possível identificar duas constrições secundárias no cariótipo de maracujá-azedo, como já descrito. Com a aplicação da técnica de FISH, pode-se observar que estas constrições dos cromossomos 7 e 8 estão associadas às RONS.

4.4.3 Mapeamento cromossômico de genes

Existem três formas de se construir um mapa físico. A primeira se baseia na correlação entre a presença de determinado marcador citológico e a ausência de um fragmento cromossômico, em estoques (ou genótipos) contendo deleções e translocações. A segunda, na construção de sequências contíguas (*contigs*) de BACs ou YACs abrangendo parte ou todo o genoma. E a última é baseada no

mapeamento de clones de DNA *in situ* nos cromossomos, através da hibridização fluorescente, conhecida como FISH (JIANG; GILL, 2006).

Os pontos fortes da FISH incluem a visualização da localização exata do DNA clonado, a atribuição das sequências mapeadas em regiões de heterocromatina ou eucromatina, e o potencial de se construir um mapa físico em um curto tempo e a um relativo baixo custo (JIANG; GILL, 2006).

O limite do tamanho da sonda para que seja possível a sua visualização *in situ* por FISH é um dos principais problemas para os citogeneticistas. Várias modificações nesta técnica têm sido propostas, por diversos laboratórios, para aumentar a sensibilidade da hibridização. As menores sondas hibridizadas em plantas possuem entre 1 a 3 kb (FRANSZ et al., 1996; OHMIDO; AKIYAMA; FUKUI; 1998, DESEL et al.; 2001, KHRUSTALEVA; KIK, 2001; STEPHENS et al., 2004; WANG; HARPER; CANDE, 2006). O uso de sondas menores que 1 kb foi satisfatório em raros trabalhos (DESEL et al., 2001, STEPHENS et al., 2004); entretanto, sondas pequenas são geralmente detectadas em baixa frequência, e os resultados podem ser inconsistentes. Uma solução para isso foi o uso de sondas de DNA de grande tamanho as quais contêm o pequeno fragmento de interesse a ser hibridizado (JIANG; GILL, 2006). Vários tipos de clones de DNAs genômicos vêm sendo utilizados no mapeamento físico, incluindo clones λ (PETERSON; LAPITAN; STACK, 1999), cosmídeos (SADDER; WEBER, 2002), YACs (FRANSZ et al., 2000), e clones de BACs (JIANG et al., 1995; LAPITAN et al., 1997; ZWICK et al., 1998; TOR et al., 2002; SCHNABEL et al., 2001).

No presente trabalho, utilizaram-se oito BACs contendo genes putativos de *Passiflora* como sondas para FISH, sendo que quatro clones evidenciaram sinal único e puderam ser mapeados. Destes, o BAC 198H23 (gene *ERS*) foi mapeado no cromossomo 1, o BAC 134H15 (gene *ACCO*) no cromossomo 3, os BACs 125I23 e 215I08 (genes *CYCD1* e *G3PD*, respectivamente) foram mapeados no cromossomo 4 (Tabela 8).

Tabela 8 - Clones utilizados nos ensaios de FISH e padrões de hibridizações observados com e sem o uso de DNA bloqueador (fração C_{ot} 100 do genoma)

Gene	Clone de BAC	Padrão de hibridização sem DNA bloqueador	Padrão de hibridização com DNA bloqueador	Cromossomo mapeado
<i>EMB</i>	187G07	Sem sinal	-	-
	135G05	Pontos dispersos	Pontos dispersos	-
<i>LOX</i>	209G15	Blocos subteloméricos	Blocos subteloméricos (100X – C_{ot} -100)	-
	79I13	Pontos dispersos	Sinal único (50X – C_{ot} -100)	-
<i>G3PD</i>	215I08	Sinal único	Sinal único	4
<i>NDID</i>	63N22	Blocos Subteloméricos	Blocos subteloméricos (100X- C_{ot} -100)	-
<i>CYCD1</i>	125I23	Sinal único	Sinal único	4
<i>ACCO</i>	191K22	Blocos	Blocos (100X – C_{ot} -100)	-
	134H15	Pontos dispersos	Sinal único (50X – C_{ot} -100)	3
<i>MIPS</i>	178K06	Blocos pericentroméricos	Blocos pericentroméricos (100X- C_{ot} -100)	-
	170O10	Blocos pericentroméricos	Blocos pericentroméricos (100X- C_{ot} -100)	-
<i>ERS</i>	198H23	Sinal único	-	1

Os clones de BACs, especialmente de espécies de grande tamanho, podem conter uma grande quantidade de sequências repetitivas. Desta forma, ao se utilizar estes clones em FISH, a probabilidade de obter hibridizações inespecíficas é alta, dificultando, assim, a localização de sequências de cópia única (JIANG; GILL, 1996). Para se realizar o mapeamento por BAC-FISH em milho, por exemplo, não se podem usar BACs derivados do seu próprio genoma, devido à presença de uma grande quantidade de sequências repetitivas. Uma solução, neste caso, foi a utilização de BACs sem sequências repetitivas de uma espécie próxima, como o sorgo (KOUMBARIS; BASS, 2003). Portanto, esta metodologia é mais apropriada para o mapeamento físico de espécies com genomas menores (JIANG; GILL, 1996; DONG et al., 2000; ISLAM-FARIDI et al., 2002; PEDROSA et al., 2002; KIM et al., 2005).

Mesmo com a pré-seleção de clones contendo uma menor quantidade de DNA repetitivo (etapa descrita no item 4.3), a hibridização com os BACs contendo os genes *EMB*, *LOX*, *ACCO* e os genes *NDID* e *MIPS* (Figura 35) resultaram em fortes sinais de padrões dispersos, subteloméricos ou pericentroméricos na maioria dos cromossomos do complemento. Isto significa que essas regiões são repetitivas. Padrão parecido foi obtido por Fonseca et al. (2010), que encontraram fortes sinais repetitivos em 38% dos BACs hibridizados, predominantemente pericentroméricos ou subteloméricos, estudando *Phaseolus vulgaris*. Zhang et al. (2004) não obtiveram sucesso ao tentar visualizar o sinal de hibridização em 56 BACs identificados em trigo, utilizando sondas de cópia única derivadas da técnica de RFLP, devido à grande quantidade de sequências repetitivas presentes no clones da espécie.

Figura 35 - Metáfase cromossômica de maracujá-azedo hibridizada com a sonda (a) 63N22 (gene *NDID*) e (b) 178K06 (gene *MIPS*) aonde se notam os sinais subteloméricos e pericentroméricos, respectivamente

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 *C_ot*-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.

Por isso, a hibridização dos BACs contendo os genes *EMB*, *LOX*, *NDID*, *ACCO* e *MIPS* foi repetida, utilizando a fração do *C_ot*-100 do DNA genômico de maracujá-azedo, em excesso de 20 a 100 vezes. Para os BACs 209G15 (*LOX*), 63N22 (*NDID*) (Figura 35.a), 191K22 (*ACCO*), e 178K06 (*MIPS*) (Figura 35.b), mesmo usando o bloqueador em excesso (100 vezes), o sinal disperso se manteve. Isto significa que a proporção dessas sequências altamente repetitivas no genoma são muito altas, sendo impossível a remoção dos sinais subteloméricos e pericentroméricos. Muitas tentativas de bloqueio de sequências subteloméricas e pericentroméricas presentes em BACs, usando como bloqueador as frações de *C_ot*-100 ou um bloqueador específico (satélite *khpu*) vêm sendo feitas (DAVID; CHEN; PEDROSA-HARAND, 2009, FONSECA et al., 2010), e não têm sido bem sucedidas.

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. Fonseca 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 "BAT93", devido às diferentes intensidades e à localização dos sinais, além do tamanho cromossômico. Não foi possível, no presente trabalho, observar padrões diferenciados nos cromossomos do maracujá-azedo, por não terem sido realizadas hibridizações em cromossomos com uma morfologia distendida o suficiente para se evidenciar esses padrões.

O clone 135G05 (gene *EMB*) apresentou, sem o uso do DNA bloqueador, um padrão disperso de hibridização. Mesmo utilizando uma fração de *C_ot*-100 100 vezes

maior que a sonda, este padrão se manteve (Figura 36). Isto se deve, provavelmente, ao DNA altamente repetitivo presente no BAC. Entretanto, para os clones 79I13 (gene *LOX*) e 134H15 (gene *ACCO*), que também apresentaram padrões dispersos de hibridização, obtiveram-se sinais únicos após o uso do DNA bloqueador 50X (Figura 37 e 38). Isto indica que, usando o DNA bloqueador, foram recuperados dois BACs. Pedrosa-Harand et al. (2009) e Fonseca 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.

Figura 36 - Metáfase cromossômica de maracujá-azedo hibridizada com a sonda 135G05 (gene *EMB*): (a) sem *Cot*-100, e (b) com 100 vezes a *Cot*-100

Figura 37 - Metáfase cromossômica de maracujá-azedo (a) corada com DAPI; visualizada com o fluoróforo CY3 e hibridizada com a sonda 79I13 (gene *LOX*): (b) sem a utilização de *Cot*-100; (c) com a utilização do *Cot*-100; (d) imagens a e c sobrepostas, evidenciando o sinal único

Figura 38 - Metáfase cromossômica de maracujá-azedo (a) corada com DAPI; visualizada com o fluoróforo CY3 e hibridizada com a sonda 134H15 (gene *ACCO*): (b) sem a utilização de *Cot*-100; (c) com a utilização do *Cot*-100; (d) imagens a e c sobrepostas evidenciando o sinal único

O BAC 187G07 (gene *EMB*) não apresentou sinal de hibridização (Figura 39). Como a intensidade de visualização dos sinais de FISH de BACs é muito fraca, pode-se, em alguns casos, não conseguir um sinal forte o suficiente para sua visualização.

Figura 39 - Metáfase cromossômica de maracujá-azedo (a) corada com DAPI; (b) hibridizada com a sonda 187G07 marcada com o fluoróforo CY3 (gene *EMB*)

As hibridizações com os BACs 215I08 (gene *G3PD*), 134H15 (gene *ACCO*), e 198H23 (gene *ERS*) revelaram sinais únicos, sem a necessidade do uso de DNA bloqueador e, como descrito anteriormente, puderam ser mapeados nos cromossomos 4, 3 e 1, respectivamente (Tabela 8; Figura 40).

Figura 40 - a - Metáfase cromossômica de maracujá-azedo corada com DAPI e hibridizada com as sondas 198H23 (gene *ERS*), em azul, indicada por setas brancas; 134H15 (*ACCO*), em vermelho, indicada por setas vermelhas, e 215I08 (gene *G3PD*), em amarelo, indicada por setas amarelas. Em b, cariograma da mesma metáfase, mostrando os pares de cromossomos que possuem regiões homólogas a cada sonda

Dois BACs, correspondentes aos genes *G3PD* e *CYCD1*, apresentaram-se co-localizados na região terminal do braço longo do cromossomo 4 (Figura 41). O poder de resolução da FISH depende, principalmente, do nível de condensação do DNA-alvo usado na preparação. Durante a metáfase mitótica, os cromossomos apresentam seu nível máximo de condensação e se calcula que duas sequências devam estar separadas por pelo menos 2 a 5 Mpb para serem visualizadas como

sinais distintos (PEDROSA-HARAND; GUERRA, 2004). Mesmo com o grande tamanho das sondas (em média 108 Mpb), a proximidade entre elas não permitiu distinguí-las como sinais isolados. Uma solução seria a hibridização destes BACs em células paquitênicas da espécie. Cromossomos paquitênicos podem se apresentar até 40 vezes mais longos que os mitóticos metafásicos e o nível de resolução pode chegar a 120 kb como em tomate e 60 kb como em *Arabidopsis* (PEDROSA-HARAND; GUERRA, 2004). Como a condensação não é uniforme ao longo de um cromossomo paquitênico, o nível de resolução é variável, principalmente se há regiões de eucromatina e de heterocromatina (de JONG et al., 1999). Fibras estendidas (Fiber-FISH) também são utilizadas em plantas em casos em que se necessita de resolução ainda maior (FRANSZ et al., 1996).

Figura 41 - Metáfase cromossômica de maracujá-azedo corada com DAPI e hibridizada com a sonda (a) 215I08 (gene *G3PD*), cujo sinal aparece em vermelho (CY3), e (b) 125I23 (gene *CYCD1*), cujo sinal aparece em azul (CY5). Notar a co-localização dos genes

Como discutido, os cromossomos de *Passiflora* possuem morfologia muito semelhante, sendo difícil reconhecer em qual cromossomo a sonda está hibridizada. O BAC 198H23 (gene *ERS*) foi facilmente mapeado, pois apresentou sinal na região distal do braço longo do maior par cromossômico, o 1. Entretanto, isto não ocorreu ao se tentar mapear os BACs 215I08 (*G3PD*), 125I23 (*CYCD1*) e 134H15 (*ACCO*), pois os cromossomos 3 e 4 possuem tamanhos e relação de braços muito próximos. Ao se analisar o cariótipo, verifica-se que cada par cromossômico possui, na maior parte, algumas características sutis próprias, que auxiliam na sua diferenciação.

Neste caso, além do tamanho um pouco menor, o cromossomo 4 possui uma leve descondensação na região terminal do braço longo, fato este observado em diversas metáfases analisadas. Entretanto, isto pode levar a erros, e o ideal é realizar uma hibridização destes dois BACs em uma única célula.

É comum se desejar hibridizar com mais de um BAC em uma mesma célula. Para isso, utiliza-se uma segunda sonda, na mesma preparação, marcada com outro fluoróforo, por exemplo, com FITC ou *Spectrum Green*, ou rehibridiza-se a preparação (ou lâmina) diversas vezes (HESLOP-HARRISON; HARRISON; LEITCH, 1992). Usando-se mais de uma sonda em uma única hibridização, verificou-se que os BACs 215I08 (*G3PD*)/125I23 (*CYCD1*) e 134H15 (*ACCO*) estão localizados em cromossomos distintos, quais sejam 4 e 3, respectivamente (Figura 40). Ainda, com esta técnica, confirmou-se que os BACs 215I08 (*G3PD*) e 125I23 (*CYCD1*) co-localizam-se, na região terminal do braço curto do cromossomo 4 (Figura 41).

É difícil fazer várias hibridizações em uma mesma lâmina, pois, a cada lavagem para se retirar a sonda anterior, uma quantidade significativa de células também é perdida. Inúmeras foram as tentativas para se obter células apresentando hibridizações com todas as sondas. Com a combinação de rehibridizações e hibridizações com mais de uma sonda, obtiveram-se metáfases com sinais de hibridização dos BACs 215I08 (gene *G3PD*), 198H23 (gene *ERS*) e 134H15 (gene *ACCO*) (Figura 40).

Definiu-se, no presente trabalho, um novo cariótipo para o maracujá-azedo com base em análises de FISH. Definiu-se que há marcadores específicos para os cromossomos 1, 3 e 4, sítios de DNAr 45S presentes nos pares 7 e 8, e um sítio de DNAr 5S, presente no cromossomo 5 (Figura 42). Como pode ser observado na Figura 43, a técnica de identificação cromossômica utilizando BACs cromossomo-específicos contribuiu significativamente para um incremento na definição do cariótipo do maracujá-azedo.

Figura 42 - Cariótipo de maracujá-azedo, determinado com base em análises de FISH no qual aparecem identificados os cromossomos 1, 3, 4, 5, 7 e 8

Figura 43 - Ideogramas de maracujá-azedo ($n = 9$), desenhados com base nos trabalhos de (a) Mayeda (1997); (b) Melo e Guerra (2003); (c) Cuco et al. (2005); (d) Praça et al. (2008); (e) presente trabalho. Embaixo está a legenda dos marcadores específicos, definidos com base em ensaios de FISH. O ideograma b foi desenhado seguindo as mensurações do presente trabalho, por não constarem nos trabalhos originais

A técnica de identificação cromossômica utilizando BACs cromossomo-específicos vem sendo utilizada em diversos estudos com plantas, redefinindo cariótipos pré-existentes. Isto evita as limitações associadas com os clássicos métodos de identificação cromossômica, sendo particularmente útil para espécies de plantas com cromossomos semelhantes, como é o caso dos maracujás cultivados no Brasil, ou de espécies com muitos cromossomos ou cromossomos pequenos (DONG et al., 2000; CHENG et al., 2002; KIM; ISLAM-FARIDI; KLEIN, 2005; TANG et al., 2009).

Os resultados do presente trabalho corroboram que o desenvolvimento da FISH tornou a identificação cromossômica mais versátil e acurada, utilizando sequências repetitivas e clones com grandes insertos como sonda (BAC-FISH), propiciando o desenvolvimento de marcadores cromossomo-específicos. A

identificação cromossômica usando marcadores cromossomo-específicos com esta técnica vem sendo demonstrada em diversas espécies de interesse agrônomo, como arroz (CHENG et al., 2001), algodão (WANG; GUAN; GUO, 2008), sorgo (KIM et al., 2005), tomate (TANG et al., 2009), batata (DONG et al., 2000) and feijão comum (FONSECA et al., 2010).

Como exemplo mais detalhado, os 12 pares cromossômicos de *Silene latifolia* foram distinguidos com a hibridização de três sondas repetitivas e cinco clones de BACs (LENGEROVA et al., 2004). Em batata, um grupo de clones de BACs de cromossomos específicos foi desenvolvido e utilizado para mapear a localização cromossômica do gene de resistência "*late blight*" (DONG et al., 2000). Os marcadores em BACs também possibilitaram 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). Com o aumento no número de mapas cromossômicos estabelecidos com BACs em plantas, uma grande quantidade de marcadores cromossômicos se tornaram disponíveis para análises comparativas. Essa abordagem possibilitou um estudo de evolução cariotípica mais detalhado do que pode ser realizado através de bandamento cromossômico ou FISH com sequências repetitivas.

Outro aspecto relevante diz respeito à associação entre marcadores cromossômico-específicos e marcas genéticas mapeadas em grupos de ligação. Isto facilita a integração de mapas de ligação com mapas cromossômicos. Estas integrações vêm sendo feitas em plantas na tentativa de atribuir os GLs aos respectivos cromossomos e para elucidar a relação entre as estruturas cromossômicas e taxas de recombinação (KIM; ISLAM-FARIDI; KLEIN, 2005; WANG; HARPER; CANDE, 2006; IOVENE et al., 2008; PETERS et al., 2009).

Um mapa integrado do maracujá-azedo poderá facilitar a montagem do genoma e aumentar a capacidade de clonagem posicional de genes da espécie, ressaltando-se os de interesse agrônomo. Ainda, poderá contribuir para estudos de genômica comparativa entre o maracujá-azedo e outras espécies de grupos próximos, e permitirá o estudo de relações entre a estrutura da cromatina e taxa de recombinação ao longo dos cromossomos.

5 CONCLUSÕES

A construção de uma biblioteca genômica de grandes insertos, realizada no presente trabalho, composta por 82.944 clones de BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*), com fragmentos de tamanho médio de 108 kb, correspondendo a uma alta cobertura do genoma do maracujá-azedo, da ordem de ~6x e com baixa contaminação por DNA cloroplastidial e mitocondrial e (0,04 a 0%, respectivamente), representa um avanço inédito e essencial para as pesquisas sobre o gênero *Passiflora*.

Oito BACs contendo genes putativos de *Passiflora* foram isolados da biblioteca e utilizados no mapeamento físico-cromossômico da espécie. Esta abordagem permitiu a definição de um novo cariótipo para o maracujá-azedo, com marcadores específicos nos cromossomos 1 (gene *ERS*), 3 (*ACCO*) e 4 (genes *CYCD1* e *G3PD*), além de um sítio de DNAr 5S no cromossomo 5 e de sítios de DNAr 45S, sendo um no cromossomo 7 e outro no cromossomo 8.

Com a disponibilidade de uma grande quantidade de BACs contendo sequências de cópia única, visualiza-se a possibilidade de mapear, pelo menos, dois marcadores específicos para cada par cromossômico, obtendo-se um cariótipo mais bem definido. Também, abre-se a possibilidade de integrar os mapas citológicos com os de ligação do maracujá-azedo, e do maracujá-doce, uma vez que nosso grupo de pesquisa estabeleceu esses mapas de ligação.

REFERÊNCIAS

- AMARILLO, F.I.E.; BASS, H.W. A transgenomic cytogenetic sorghum (*Sorghum propinquum*) bacterial artificial chromosome fluorescence *in situ* hybridization map of maize (*Zea mays* L.) pachytene chromosome 9: evidence for regions of genome hyperexpansion. **Genetics**, Bethesda, v. 177, p. 1509-1526, 2007.
- AMMIRAJU, J.S.; LUO, M.; GOICOECHEA, J.L.; WANG, W.; KUDRNA, D.; MUELLER, C.; TALAG, J.; KIM, H.; SISNEROS, N.B.; BLACKMON, B.; FANG, E.; TOMKINS, J.B.; BRAR, D.; MACKILL, D.; MCCOUCH, S.; KURATA, N.; LAMBERT, G.; GALBRAITH, D.W.; ARUMUGANATHAN, K.; RAO, K.; WALLING, J.G.; GILL, N.; YU, Y.; SANMIGUEL, P.; SODERLUND, C.; JACKSON, S.; WING, R.A. The *Oryza* bacterial artificial chromosome library resource: construction and analysis of 12 deep-coverage large e-insert BAC libraries that represent the 10 genome types of the genus *Oryza*. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 16, p. 140-147, 2006.
- ALEXANDRE, R.S.; AMÉRICO JÚNIOR, W.A.; NEGREIROS, J.R.S.; PARIZZOTO, A.; BRUCKNER, C.H. Germinação de sementes de genótipos de maracujazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 12, p. 1239-1245, 2004.
- BAIG, M.N.R.; YU, A.; GUO, W.W.; DENG, X.X. Construction and characterization of two Citrus BAC libraries and identification of clones containing the phytoene synthase gene. **Genome**, Ottawa, v. 52, p. 484-489, 2009.
- BEAL, P.R. Chromosome number of the exotic *Passiflora* species in Australia. **Queensland Journal of Agricultural and Sciences**, Brisbane, v. 26, p. 407-421, 1969a.
- _____. Cytology of the native Australian *Passiflora* species. 1. Chromosome number and horticultural value. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences**, Brisbane, v. 26, p. 73-81, 1969b.
- _____. Cytology of native Australian and several exotic *Passiflora* species. 3. Morphology of satellite chromosomes. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences**, Brisbane, v. 30, p. 19-24, 1973.
- BESENDORFER, V.; SAMARDZIJA, M.; ZOLDOS, V.; SOLIC, M.E.; PAPES, D. 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**, Malden, v. 139, p. 99-108, 2002.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- BOUZIDI, M.F.; FRANCHÉL, J.; TAO, Q.; STORMO, K.; MRAZ, A.; NICOLAS, P.; MOUZEYAR, S. A sunflower BAC library suitable for PCR screening and physical mapping of targeted genomic regions. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 113, p. 81-89, 2006.

BOWDEN, W.M. A list of chromosome numbers in higher plants. II *Menispermaceae* to *Verbenaceae*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 32, p. 191-201, 1945.

BRAGA, M.F. **Mapeamento de QTL (Quantitative Trait Loci) associados à resistência do maracujá-doce à bacteriose**. 2011. 288 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

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

BRASILEIRO-VIDAL, A.C.; CUADRADO, A.; BRAMMER, S.P.; ZANATTA, A.C.; PRESTES, A.M.; MORAES-FERNANDES, M.I.B.; GUERRA, M. Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum* (Triticeae, Poaceae) using *in situ* hybridization with different DNA sequences. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, n. 26, p. 505-510, 2003.

BRUCKNER, C.H.; CASALI, V.W.D.; MORAES, C.F.; REDAZZI, A.J.; SILVA, E.A.M. Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Acta Horticultrae**, Lima, n. 370, p. 45-57, 1995.

BUDIMAN, M.A.; MAO, L.; WOOD, T.C.; WING, R.A. A deep-coverage tomato BAC library and prospects toward development of an STC framework for genome sequencing. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 10, p. 129-136, 2000.

BUONGIORNO-NARDELLI, M.; MALDI, F. Autoradiographic detection of molecular hybrids between rRNA and DNA in tissue section. **Nature**, London, v. 225, p. 946-947, 1969.

BURKE, D.T.; CARLE, G.F.; OLSON, M.V. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. **Science**, Washington, v. 236, p. 806-811, 1987.

CARNEIRO, M.S.; CAMARGO, L.E.A.; COELHO, A.S.G.; VENCovsky, R.; LEITE JÚNIOR, R.P.; STENZEL, N.M.C.; VIEIRA, M.L.C. RAPD-based genetic linkage maps of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **Genome**, Ottawa, v. 45, n. 4, p. 670-678, 2002.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.

CASTRO, R.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Ed.). **Germinação: do Básico ao Aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 149-162.

CENCI, A.; CHANTRET, N.; KONG X. Construction and characterization of a halfmillion clone BAC library of durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 107, n. 5, p. 931-939, 2003.

CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; BERNACCI, L.C.; NUNES, T.S. 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.

CHANG, Y.L.; CHUANG, H.W.; MEKSEM, K.; WU, F.C.; CHANG, C.Y.; ZHANG, M.; ZHANG, H.B. A plant-transformation-ready large-insert BIBAC library of *Arabidopsis* and bombardment transformation and expression of its large-insert BIBACs in tobacco. **Genome**, Ottawa, v. 54, p. 437-447, 2011.

CHENG, Z.; PRESTING, G.G.; BUELL, C.R.; WING, R.A.; JIANG, J. 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**, Bethesda, v. 157, p. 1749-1757, 2001.

CHENG, Z.; BUELL, C.R.; WING, R.A.; JIANG, J. Resolution of fluorescence *in situ* hybridization mapping on rice mitotic prometaphase chromosomes, meiotic pachytene chromosomes and extended DNA fibers. **Chromosome Research**, Dordrecht, v. 10, p. 379-387, 2002.

CHENG-CANG, W.U.; SHUKU, S.U.N.; NIMMAKAYALA, P.; SANTOS, F.A.; MEKSEM, K.; SPRINGMAN, R.; DING, K.; LIGHTFOOT, D.A.; ZHANG, A.-B. A BAC- and BIBAC-Based Physical Map of the Soybean. **Genome**, Ottawa, v. 14, p. 319-326, 2004.

CHOI, S.; CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E.; WING, R.A. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 13, p. 124-128, 1995.

COYNE, C.J.; MCCLENDON, M.T.; WALLING, J.G.; TIMMERMAN-VAUGHAN, G.M.; MURRAY, S.; MEKSEM, K.; LIGHTFOOT, D.A.; SHULTZ, J.L.; KELLER, K.E.; MARTIN, R.R.; INGLIS, D.A.; RAJESH, P.N.; MCPHEE, K.E.; WEEDEN, N.F.; GRUSAK, M.A.; LI, C.-M.; STORLIE, E.W. Construction and characterization of two bacterial artificial chromosome libraries of pea (*Pisum sativum* L.) for the isolation of economically important genes. **Genome**, Ottawa, v. 50, p. 871-875, 2007.

CUCO, S.M.; MONDIN, M.; VIEIRA, M.L.C.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 17, n. 3, p. 1-7, 2003.

CUCO, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. **Caryologia**, Firenze, v. 58, p. 220-228, 2005.

DAVID, P.; CHEN, N.W.G.; PEDROSA-HARAND. A nomadic subtelomeric disease gene cluster in common bean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 151, p. 1048-1065, 2009.

DELANOY, M.; VAN DAMME, P.; SCHELDEMAN, X.; BELTRAN, J. Germination of *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey, *Passiflora tricuspid* Mast. and *Passiflora* nov sp. seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 110, p. 198-203, 2006.

DESEL, C.; JUNG, C.; CAI, D.G.; KLEINE, M.; SCHMIDT, T. High-resolution mapping of YACs and the single-copy gene Hs1(pro)-1 on *Beta vulgaris* chromosomes by multi-colour fluorescence *in situ* hybridization. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 45, p. 113-122, 2001.

DONG, F.; SONG J.; NAESS, S.K.; HELGESON, J.P.; GEBHARDT, C.L. Development and applications of a set of chromosome- specific cytogenetic DNA markers in potato. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 101, p. 1001-1007, 2000.

DONG, J.; KHARB, P. CERVERA, M.; HALL, T. C. The use of FISH in chromosomal localization of transgenes in rice. **Methods in Cell Science**, Dordrecht, v. 23, p. 105-113, 2001.

DUMINIL J.; PEMONGE, M.H.; PETIT, R.J. A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA. **Molecular Ecology Notes**, Malden, v. 4, p. 428-430, 2002.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBRECHTS, E.H. **Handbook for Seed Technology for Genebanks**. Rome: IBPGR, 1985. v. 2: Compendium of specific germination-information and test recommendations, 89 p.

EMSHWILLER, E.; DOYLE, J.J. Chloroplast-expressed glutamine synthetase (ncpGS): potential utility for phylogenetic studies with an example from *Oxalis* (Oxalidaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 12, n. 3, p. 310-319, 1999.

ESPINOSA, T.C. The culture of curuba (*Passiflora mollissima* (H.B.K.) Bailey) in Colombia. **Acta Horticulturae**, Lima, n. 310, p. 215-231, 1992.

FEBRER, M.; GOICOECHEA, J.L.; WRIGHT, J.; MCKENZIE, N.; SONG, X. An integrated physical, genetic and cytogenetic map of *Brachypodium distachyon*, a model system for grass research. **Plos One**, San Francisco, v. 5, p. 134-146, 2010.

FENG, Q.; ZHANG, Y.J.; HAO, P.; WANG, S.Y.; FU, G.; HUANG, Y.C. Sequence and analysis of rice chromosome 4. **Nature**, London, v. 420, p. 316-320, 2002.

FERREIRA, G. **Estudo da embebição e efeito de fitorreguladores na germinação de sementes de Passifloráceas**. 1998. 146 p. Tese (Doutorado em Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1998.

FERREIRA, T.G.T.; PENHA, H.A.; ZUCCHI, M.I.; SANTOS, A.A.; HANAI, L.R.; JUNQUEIRA, N.; BRAGA, M.F.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Outcrossing rate in sweet passion fruit based on molecular markers. **Plant Breeding**, Malden, v. 6, p. 727-730, 2010.

FEUILLET, C. Passifloraceae (Passion Flower Family). In: SMITH, N.; MORI, S.A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D.W.; HEALD, S.V. (Ed.). **Flowering plants of the neotropics**. Oxford: Princeton University Press; New York Botanical Garden, 2004. p. 286-287.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J.M. Checklist of recognized species names of passion flowers. **Passiflora**, Beltsville, v. 12, n. 2, p. 41-43, 2003.

FIGUEIRA, T.R.S.F.; OKURA, V.; SILVA, F.R.; SILVA, M.J.; KUDMA, D.; AMMIRAJU, J.S.S.; TAAG, J.; WING, R.; ARRUDA, P. A BAC library of the SP80-3280 sugarcane variety (*Saccharum* sp.) and its inferred microsynteny with the sorghum genome. **BMC Research Notes**, London, v. 5, p. 185, 2012.

FNP CONSULTORIA E AGROINFORMATIVOS. **AGRIANUAL 2004**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2004. 496 p.

FONSÊCA, A.; FERREIRA, J.; DOS SANTOS, T.R.B.; MOSIOLEK, M.; BELLUCCI, E.; KAMI, J.; GEPTS, P.; GEFROY, V.; SCHWEIZER, D.; SANTOS, K.G.B. dos, PEDROSA-HARAND, A. Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Chromosome Research**, Dordrecht, v. 18, p. 487-502, 2010.

FRANSZ, P.F.; ALONSO-BLANCO, C.; LIHARSKA, T.B.; PEETERS, A.J.M.; ZABEL, P.; DE JONG, J.H. High-resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibres. **Plant Journal**, Malden, v. 9, p. 421-430, 1996.

FRANSZ, P.; ARMSTRONG, S.; DE JONG, J.H.; PARNELL, L.D.; VAN DRUNEN, C. Integrated cytogenetics map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: structural organization of heterochromatin knob and centromere region. **Cell**, Cambridge, v. 10, p. 367-376, 2000.

FRIJTERS, A.C.J.; ZHANG, Z.; DAMME, M.V.; WANG, G.L.; RONALD, P.C.; MICHELMORE, R.W. Construction of a bacterial artificial chromosome library containing large *EcoRI* and *HindIII* genomic fragments of lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 94, p. 390-399, 1997.

FUCHS, J.; KÜHNE, M.; SCHUBERT, I. Assignment of linkage groups to pea chromosomes after karyotyping and gene mapping by fluorescent *in situ* hybridization. **Chromosoma**, New York, v. 107, p. 272-276, 1998.

GALL, J.G.; PARDUE, M.L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 63, p. 378-383, 1969.

GARDINER, J.; SCHROEDER, S.; POLACCO, M.L.; SANCHEZ-VILLEDA, H.; FANG, Z.; MORGANTE, M.; LANDEWE, T.; FENGLER, K.; USECHE, F.; HANAFEY, M. Anchoring 9,371 maize expressed sequence tagged unigenes to the bacterial artificial chromosome contig map by two-dimensional overgo hybridization. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, p. 1317-1326, 2004.

GONCALVES, G.M. Genetic parameter estimates in yellow passion fruit based on design I. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 3, p. 523-530, 2009.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, Austin, v. 137, p. 1121-1137, 1994.

GREEN, E.D.; OLSEN, M.V. Systematic screening of yeast artificial-chromosome libraries by use of the polymerase chain reaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 87, p. 1213-1217, 1990.

GUERRA, M. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco, I. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 9, p. 21-40, 1986.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como analisar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002, 132 p.

GUERRA, M. Hibridização *in situ*: princípios básicos. In: GUERRA, M. (Org.) **FISH-Conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 2004. P. 1-32.

GUIMARÃES, P.M.; GARSMEUR, O.; PROITE, K.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M. BAC libraries construction from the ancestral diploid genomes of the allotetraploid cultivated peanut. **BMC Plant Biology**, London, v. 8, p. 1-8, 2008.

HAMILTON, C.M.; FRARY, A.; LEWIS, C.; TANKSLEY, S.D. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 93, n. 18, p. 9975-9979, 1996.

HAN Y.; ZHENG, D.; VIMOLMANGKANG, S.; KHAN, M.; BEEVER, J.E.; KORBAN, S.S. Integration of physical and genetic maps in apple confirms whole-genome and segmental duplications in the apple genome. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 14, p. 5117-5130, 2011.

HESLOP-HARRISON, J.S.; HARRISON, G.E.; LEITCH, I.J. Reprobing of DNA: DNA *in situ* hybridization preparations, **Trends in Genetics**, London, v. 8, p. 372-373, 1992.

HOWELL, E.C.; ARMSTRONG, S.J.; BARKER, G.C.; JONES, G.H.; KING, G.J. Physical organization of the major duplication on *Brassica oleracea* chromosome 6 revealed through fluorescence *in situ* hybridization with *Arabidopsis* and *Brassica* BAC probes. **Genome**, Berlin, v. 48, p.1093-1103, 2005.

HU, Y.; LU, Y.; MA, D.; GUO, W.; ZHANG, T. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library for the a-genome of cotton (*G. arboreum* L.). **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, New York, v. 2, p. 138-144, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**. Disponível em: <<http://sidra.ibge.gov.br/2010>>. Acesso em: 12 nov. 2010

IOANNOU, P.A.; AMEMIYA, C.T.; GARNES, J.; KROISEL, P.M.; SHIRUYA, H.; CHEN, C.; BATZER, M.A.; DE JONG, P. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. **Nature Genetics**, New York, v. 6, n. 1, p. 84–89, 1994.

IOVENE, M.; WIELGUS, S.M.; SIMON, P.W.; BUELL, C.R.; JIANG, J. Chromatin structure and physical mapping of chromosome 6 of potato and comparative analyses with tomato. **Genetics**, Austin, v. 180, p. 1307-1317, 2008.

ISLAM-FARIDI, M.N.; CHILDS, K.L.; KLEIN, P.E. A molecular cytogenetic map of sorghum chromosome: 1. Fluorescence *in situ* hybridization analysis with mapped bacterial artificial chromosomes. **Genetics**, Austin, v. 161, p. 345-353, 2002.

JIANG J.; GILL B.S. Current status and potential of fluorescence *in situ* hybridization in plant genome mapping. In: PATERSON, A.H. (Ed.). **Genome mapping in plants**. Georgetown: RG Landes Company, 1996. p. 127-135.

_____. Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. **Genome**, Berlin, v. 49, p. 1057-1068, 2006.

JIANG, J.; FRIEBE, B.; GILL, B.S. Recent advances in alien gene transfer in wheat. **Euphytica**, Wageningen, v. 73, p. 199-212, 1994.

JIANG, J.; GILL, B.S.; WANG, G.L.; RONALD, P.C.; WARD, D.C. Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 92, p. 4487-4491, 1995.

JOHNSON, S.J.; WADE-MARTINS, R. A BACwards glance at neurodegeneration: molecular insights into disease from LRRK2, SNCA and MAPT BAC-transgenic mice. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 39, p. 862–867, 2011.

KELLEY, J.M.; FIELD, C.E.; CRAVEN, M.B.; BOCSKAI, D.; KIM, U.J.; ROUNSLEY, S.D.; ADAMS, M.D. High throughput direct end sequencing of BAC clones. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 27, p. 1539-1546, 1999.

KHRUSTALEVA, L.I.; KIK, C. Localization of single-copy T-DNA insertion in transgenic shallots (*Allium cepa*) by using ultra-sensitive FISH with tyramide signal amplification. **Plant Journal**, Malden, v. 25, p. 699-707, 2001.

KILLIP, E.P. The American species of Passifloraceae. **Field Museum of Natural History**. Botanical Series, v. 19, 1938. 331 p.

- KIM, J.S.; ISLAM-FARIDI, M.N.; KLEIN, P.E. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of sorghum genome architecture: distribution of euchromatin, heterochromatin, genes and recombination in comparison to rice. **Genetics**, Berlin, v. 171, p. 1963-1976, 2005.
- KIM, J.S.; KLEIN, P.E.; KLEIN, R.R. Molecular cytogenetic maps of *Sorghum* linkage groups 2 and 8. **Genetics**, Berlin, v. 169, p.955-965, 2005.
- KIM, J.S.; KLEIN, P.E.; KLEIN, R.R.; PRICE, H.J.; MULLET, J.E.; STELLY, D.M. Chromosome identification and nomenclature of *Sorghum bicolor*. **Genetics**, Berlin, v. 169, p. 1169-1173, 2005.
- KOO, D.H.; JO, S.H.; BANG, J.W.; PARK, H.M.; LEE, S.; CHOI, D. Integration of cytogenetic and genetic linkage maps unveils the physical architecture of tomato chromosome 2. **Genetics**, Berlin, v. 179, p. 1211-1220, 2008.
- KOUMBARIS, G.L.; BASS, H.W. A new single-locus cytogenetic mapping system for maize (*Zea mays* L.): overcoming FISH detection limits with marker-selected sorghum (*S. propinquum* L.) BAC clones. **Plant Journal**, Malden, v. 35, p. 647-659, 2003.
- KULIKOVA, O.; GUALTIERI, G.; GEURTS, R.; KIM, D.J.; COOK, D. Integration of the FISH pachytene and genetic maps of *Medicago truncatula*. **Plant Journal**, Malden, v. 27, p. 49-58, 2001.
- LANGER, A.; KOUL, A.K. Studies on nucleolus and nucleolar chromosomes in angiosperms IX. *Lilium* Linn. **Cytologia**, Tokyo, v. 48, p. 519-526, 1983.
- LAPITAN, N.L.V.; BROWN, S.E.; KENNARD, W.; STEPHENS, J.L.; KNUDSON, D.L. FISH physical mapping with barley BAC clones. **Plant Journal**, Malden, v. 11, p.149-156, 1997.
- LEITCH, A.R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I.J. An introduction to *in situ* hybridization. In: LEITCH, A.R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I.J. **In situ hybridization: a practical guide**. Oxford: Bios Scientific, 1994. chap. 1, p. 1-2.
- LENGEROVA, M.; KEJNOVSKY, E.; HOBZA, R.; MACAS, J.; GRANT, S.R.; VYSKOT, B. Multicolor FISH mapping of the dioecious model plant, *Silene latifolia*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 108, p. 1193-1199, 2004.
- LEWIN, B.; WATSON, J.D.; BAKER, T.A.; BELL, S.P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. **Genes VIII and molecular biology of the gene**. New Jersey: Prentice Hall, 2007. 892 p.
- LIJAVETZKY, D.; MUZZI, G.; WICKER, T.; KELLER, B.; WING, R.; DUBCOVSKY, J. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for the A genome of wheat. **Genome**, Ottawa, v. 42, p.1176-1182, 1999.

LIMA, A.A. **O cultivo do maracujá**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1999. 32 p.

LIMA, A.A.; CUNHA, M.A.P. **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 396 p.

LIMA, M.M. **Competitividade da cadeia produtiva do maracujá na região integrada de desenvolvimento do Distrito Federal e Entorno-Ride**. 2001. 171 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2001.

LIN, J.; DAVEKUDRNA, L.; WING R.A. Construction, characterization, and preliminary BAC-end sequence analysis of a bacterial artificial chromosome library of the tea plant (*Camellia sinensis*). **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, New York, v. 20, p. 1-8, 2011.

LIU, Y.G.; SHIRANO, Y.; FUKAKI, H.; YANAI, Y.; TASAKA, M.; TABATA S.; SHIBATA D. Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 96, p. 6535–6540, 1999.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; CARNEIRO, M.S.; MATTA, F.P.; CAMARGO, L.E.A.; VIEIRA, M.L.C. Linkage and mapping of resistance genes to *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in yellow passion fruit. **Genome**, Ottawa, v. 49, n. 1, p. 17-29, 2006.

LYSAK, M.A.; FRANSZ, P.F.; ALI, H.B.; SCHUBERT, I. Chromosome painting in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, Malden, v. 28, p. 689-697, 2001.

LYSAK, M.A.; KOCH, M.; PECINKA, A.; SCHUBERT, I. Chromosome triplication found across the tribe *Brassicaceae*. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 15, p. 516–525, 2005.

LYSAK, M.A.; BERR, A.; PECINKA, A. Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related *Brassicaceae* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, p. 5224-5229, 2006.

MA, L.; VU, G.T.H.; SCHUBERT, V.; WATANABE, K.; STEIN, N.; HOUBEN, A.; SCHUBERT, I. Synteny between *Brachypodium distachyon* and *Hordeum vulgare* as revealed by FISH. **Chromosome Research**, Dordrecht, n. 7, p. 841-850, 2010.

MARCON, A.B.; BARROS, I.C.L.; GUERRA, M. Variation in chromosome numbers, CMA bands and 45S rDNA sites in species of *Selaginella* (Pteridophyta). **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, p. 271-276, 2005.

MAREK, L.F.; SHOEMAKER, R.C. BAC contig development by fingerprint analysis in soybean. **Genome**, Ottawa, v. 40, p. 420-427, 1997.

MARGARIDO, G.R.A.; SOUZA, A.P.; GARCIA, A.A.F. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. **Hereditas**, London, n. 144, p. 78–79, 2007.

MAYEDA, L.Y. **Estudo citogenético em dez táxons do gênero *Passiflora* L. (*Passifloraceae*)**. 1997. 89 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

MELETTI, L.M.M.; BERNACCI, L.C.; SCOTT, M.D.S.; AZEVEDO FILHO, J.A.; MARTINS, A.L.M. Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agronômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 275-278, 2003.

MELO, A.L. **Métodos de quebra de dormência, e de armazenamento de sementes, e aspectos da obtenção de mudas de maracujá-suspiro (*Passiflora nitida* H. B. K.)**. 1999. 95 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 1999.

MELO, N.F.; GUERRA, M. Variability of 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, Oxford, v. 92, p. 309-316, 2003.

MELO, N.F.; CERVI, A.C.; GUERRA, M. Karyology and citotaxonomy of the genus *Passiflora* L. **Plant Systematics and Evolution**, Berlin, v. 226, p. 69-84, 2001.

MONTIJN, M.B.; HOOPEN, R.T.; FRANSZ, P.F.; NANNINGA, O.N. Characterization of the nucleolar organizing regions during the cell cycle in two varieties of *Petunia hybrida* as visualized by fluorescence *in situ* hybridization and silver staining. **Chromosoma**, Berlin, v. 107, p. 80-86, 1998.

MORAES, M.C.; GERALDI, I.O.; MATTA, F.P.; VIEIRA, M.L.C. Genetic and phenotypic parameter estimates for yield and fruit quality traits from a single wide cross in yellow passion fruit. **HortScience**, Alexandria, v. 40, n. 7, p. 1978-1981, 2005.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Standford, v. 8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.

NAKAMURA, S.; ASAKAWA, S.; OHMIDO, N.; FUKUI, K.; SHIMIZU, N.; KAWASAKI, S. Construction of an 800-kb contig in the near-centromeric region of the rice blast resistance gene Pi-ta2 using a highly representative rice BAC library. **Molecular Genetics Genomics**, Dordrecht, v. 254, p. 611-620, 1997.

NOIR, S.; PATHEYRON, S.; COMBES, M.C.; LASH ERMES, P.; CHALHOUB, B. Construction and characterisation of a BAC library for genome analysis of the allotetraploid coffee species (*Coffea arabica* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 109, p. 225-230, 2004.

NUNES, E.S. **Caracterização fenotípica e molecular de uma população F1 de maracujá-doce visando à construção de mapas de ligação e identificação de QTL**. 2010. 138 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

OHMIDO, N.; AKIYAMA, Y.; FUKUI, K. Physical mapping of unique nucleotide sequences on identified rice chromosomes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 38, p. 1043–1052, 1998.

OLIVEIRA, A.M.A. **Reprodução e citogenética de espécies de *Passiflora***. 1996. 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, 1996.

OLIVEIRA, E.J.; VIEIRA, M.L.C.; GARCIA, A.A.F.; MUNHOZ, C.F.; MARGARIDO, G.R.A.; CONSOLI, L.; MATTA, F.P.; MORAES, M.C.; ZUCCHI, M.I.; FUNGARO, M.H.P. 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, v. 133, n. 1, p. 35-41, 2008.

PAIVA-JORGE, A.P.; PRAT, E.; VAUTRIN, S.; SANTOS, M.D.; SAN-CLEMENTE, H.; BROMMONSCHENKEL, S.; FONSECA, P.G.S.; GRATTAPAGLIA, D.; SONG, X.; AMMIRAJU, J.S.S.; KUDRNA, D.; WING, R.A.; FREITAS, A.T.; BERGÈS, H.; GRIMA-PETTENATI, J. Advancing *Eucalyptus* genomics : identification and sequencing of lignin biosynthesis genes from deep-coverage BAC libraries. **BMC Genomics**, London, v. 12, p. 137, 2012

PEDERSEN, C.; GIESE, H.; LINDE-LAURSEN I. Towards an integration of the physical and the genetic chromosome maps of barley by *in situ* hybridization. **Hereditas**, Landskrona, v. 123, p. 77-88, 1995.

PEDROSA, A.; VALLEJOS, C.E.; BACHMAIR, A.; SCHWEIZER, D. Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 106, p. 205–212, 1997.

PEDROSA, A.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J.; SCHWEIZER, D.; BACHMAIR, A. Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. **Genetics**, Bethesda, v. 161, p. 1661–1672, 2002.

PEDROSA-HARAND, A.; GUERRA, M. Contribuições da FISH para a citogenética de plantas. In: GUERRA, M. (Org.). **FISH: conceito e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. p. 33-60.

PEDROSA-HARAND, A.; KAMI, J.; GEPTS, P.; GEFFROY, V.; SCHWEIZER, D. Cytogenetic mapping of common bean chromosomes reveals a less compartmentalized small-genome plant species. **Chromosome Research**, Dordrecht, v. 17, p. 405-417, 2009.

PEREIRA, G.S. **Desenvolvimento de marcadores SSR, M-AFLP e SNP visando à integração de mapas genético-moleculares de *Passiflora alata* Curtis**. 2010. 154 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PETERS, S.A.; DATEMA, E.; SZINAY, D.; VAN-STAVEREN, M.J.; SCHIJLEN, E.G.; VAN-HAARST, J.C.; HESSELINK, T.; ABMA-HENKENS, M.H.; BAI, Y.; JONG, H.; STIEKEMA, W.J.; LANKHORST, R.M.K.; VAN-HAM, R.C. *Solanum lycopersicum* cv. Heinz 1706 chromosome 6: distribution and abundance of genes and retrotransposable elements. **Plant Journal**, Malden, v. 58, p. 857-869, 2009.

PETERSON, D.G.; LAPITAN, N.L.V.; STACK, S.M. Localization of single-and low-copy sequences on tomato synaptonemal complex spreads using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Genetics**, Bethesda, v. 152, p. 427–439, 1999.

PETERSON, D.G.; TOMKINS, J.P.; FRISCH, D.A.; WING, R.A.; PATERSON, A.H. Construction of plant artificial chromosome (BAC) libraries: An illustrated guide. **Journal of Agricultural Genomics**, Wallingford, v. 5, p. 1-3, 2000.

PRAÇA, M.M.; CARVALHO, R.C.; MARCELINO, F.C.; MENDONÇA, M.A.C. Morphological aspects of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* chromosomes using acridine orange banding and rDNA-FISH tools. **Caryologia**, Florence, v. 61, n. 2, p. 154-159, 2008.

QU, S.; COAKER, G.; FRANCIS, D.; ZHOU, B.; WANG G.L. Development of a new transformation-competent artificial chromosome (TAC) vector and construction of tomato and rice TAC libraries. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 12, n. 4, p. 297-308, 2003.

RABBI, I.Y.; KULEMBEKA, H.P.; MASUMBA, E.; MARRI, P.R.; FERGUSON, M. An EST-derived SNP and SSR genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 12, p. 1836, 2012.

RAMPANT, R.P.F.; LESUR, E.; BOUSSARDON, C.; BITTON, F.; MARTIN-MAGNIETTE, M.L.; BODÉNÈS, C.; PROVOST, G.; BERGÈS, H.; FLUCH, S.; KREMER, A.; PLOMION, C. Analysis of BAC end sequences in oak, a keystone forest tree species, providing insight into the composition of its genome. **BMC Genomics**, London, v. 12, p. 292, 2011.

REN, C.; LEE, M.K.; YAN, B.; DING, K.; COX, B.; ROMANOV, M.N.; PRICE, J.A.; DODGSON, J.B.; ZHANG, H.B. A BAC-based physical map of the chicken genome. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 13, p. 2754–2758, 2003.

ROGERS, S.O.; BENDICH, A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. **Plant Molecular Biology**, Clifton, v. 5, n. 2, p. 69-76, 1985.

RUGGIERO, C.; LAM-SANCHEZ, A.; BANZATTO, D.A. Studies on natural and controlled pollination in yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Acta Horticulturae**, Lima, n. 57, p. 121-124, 1976.

SADDER, T.; WEBER, G. Comparison between genetic and physical maps in *Zea mays* L. of molecular markers linked to resistance against *Diatraea* spp. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 104, p. 908–915, 2002.

SATO, K.; MOTOI, Y.; YAMAJI, N.; YOSHIDA, H. 454 sequencing of pooled BAC clones on chromosome 3H of barley. **BMC Genomics**, London, v. 12, p. 246, 2011.

SATO, S. Color differential staining of NOR- associated heterochromatic segments using acridine orange. **Stain Technology**, Baltimore, v. 63, n. 4, p. 235-240, 1988.

SCHMIDT, T.; HESLOP-HARRISON J. S. Genomes, genes and junk: the large scale organization of plant chromosomes. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 3, p. 195-199, 1998.

SCHNABEL, E.; KULIKOVA, O.; PENMETSA, R.V.; BISSELING, T.; COOK, D.R.; FRUGOLI, J. An integrated physical, genetic and cytogenetic map around the sun locus of *Medicago truncatula*. **Genome**, Ottawa, v. 46, p. 665-672, 2001

SCHWARZARCHER, H.G.; MIKELSAAR, A.V.; SCHNEDL, W. The nature of Ag-staining of nucleolus organizer regions. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v. 20, p. 24-39, 1980.

SHARMA, A.K.; SHARMA, A. **Plant chromosomes: analysis, manipulation and engineering**. Amsterdam: Harwood Academic, 1999. 371 p.

SHIZUYA, H.; BIRREN, B.; UNG-JIN, KIM; MANCINO, V.; SLEPAK, T.; TACHIRI, Y.; SIMON, M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 89, p. 8794-8797, 1992.

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 391 p.

SNOW, N.; MACDOUGAL, J.M. New chromosome reports in *Passiflora* (Passifloraceae). **Systematics Botany**, Laramie, v. 18, p. 261-273, 1993.

SOARES-SCOTT, M.D. **Caracterização citogenética de algumas espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora***. 1998. 89 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

SOARES-SCOTT, M.D.; MELETTI, L.M.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R.S. Citogenética clássica e molecular em passifloras. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. v. 1, p. 213-239.

SONG, J.F.; JIANG, D.J. Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for potato molecular cytogenetics research. **Genome**, Ottawa, v. 43, p. 199-204, 2001.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; VIEIRA, M.L.C. Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasizing Brazilian species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, p. 247-258, 2008.

- SOUZA, M.M.; PALOMINO, G.; PEREIRA, M.G.; VIANA, A.P. Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species. **Hereditas**, Landskrona, v. 141, p. 31-38, 2004.
- STEPHENS, J.L.; BROWN, S.E.; LAPITAN, N.L.V.; KNUDSON, D.L. Physical mapping of barley genes using an ultrasensitive fluorescence *in situ* hybridization technique. **Genome**, Ottawa, v. 47, p. 179-189, 2004.
- STOREY, W.B. Chromosomes numbers of some species of *Passiflora* occurring in Hawaii. **Pacific Science**, Hawaii, v. 4, p. 37-42, 1950.
- SUMNER, A.T. **Chromosomes - organization and function**. Malden: BlackWell, 2003. 287 p.
- SZINAY, D.; CHANG, S.B.; KHRUSTALEVA, L. High- resolution chromosome mapping of BACs using multi-colour FISH and pooled BAC FISH as a backbone for sequencing tomato chromosome 6. **Plant Journal**, Malden, v. 56, p. 627-637, 2001.
- TANG, X.; DE BOER, J.M.; VAN ECK, H.J.; BACHEM, C.; VISSER, R.G.; DE JONG, H. Assignment of genetic linkage maps to diploid *Solanum tuberosum* pachytene chromosomes by BAC-FISH technology. **Chromosome Research**, Oxford, v. 17, p. 899-915, 2009.
- TAO, Q.; CHANG, Y.L.; WANG, J.; CHEN, H.; ISLAM-FARIDI, M.N.; SCHEURING, C.; WANG, B.; STELLY, D.M.; ZHANG, H.B. Bacterial artificial chromosome-based physical map of the rice genome constructed by restriction fingerprint analysis. **Genetics**, Bethesda, v. 158, p. 1711-1724, 2001.
- TAO, Q.Z.; ZHANG, H.B. Cloning and stable maintenance of DNA fragments over 300 kb in *Escherichia coli* with conventional plasmid-based vectors. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 26, p. 4901-4909, 1998.
- TOR, M.; MANNING, K.; KING, G.J.; THOMPSON, A.J.; JONES, G.H.; SEYMOUR, G.B.; ARMSTRONG, S.J. Genetic analysis and FISH mapping of the Colourless non-ripening locus of tomato. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 104, p. 165-170, 2002.
- TSUBOI, H.; NAKAGAWA, J. Efeito da escarificação por lixa, ácido sulfúrico e água quente na germinação de sementes de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). **Científica**, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 63-72, 1992.
- ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. **Passiflora**: passionflower of the world. Cambridge: Timber Press, 2004. 432 p.
- VALLEJOS, C.E.; SAKIYAMA, N.S.; CHASE, C.D.) A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. **Genetics**, Bethesda, v. 131, p. 733-740, 1992.
- VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. 2nd ed. Cambridge: Cassell, 1996. 224 p.
- _____. **Passion flowers**. 3rd ed. Cambridge: The MIT Press, 2000. 224 p.

VENTER, J.C.; SMITH, H.O.; HOOD, L. A new strategy for genome sequencing. **Nature**, London, v. 381, p. 364-366, 1996.

VENTER, J.C.; ADAMS, M.D.; SUTTON, G.G.; KERLAVAGE, A.R.; SMITH, H.O.; HUNKAPILLER, M. Shotgun sequencing of the human genome. **Science**, Washington, v. 280, p. 1540-1542, 1998.

VIEIRA, M.L.C.; CARNEIRO, M.C. *Passiflora* spp. Passionfruit. In: LITZ, R. (Ed). **Biotechnology of fruit and nut crops**. Oxford: CABI, 2004. p. 436-453.

WAI, C.M.; MING, R.; MOORE, P.H.; PAULL, R.E.; YU, Q. Development of chromosome-specific cytogenetic markers and merging of linkage fragments in papaya. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 3, p. 171-181, 2010.

WALKER, S. Cytogenetics. In: SHEPPARD, P.M. (Ed.). **Practical genetics**. Oxford: Blackwell Scientific, 1973. p. 130-172.

WALLING, J.G.; SHOEMAKER, R.C.; YOUNG, N.D.; MUDGE, J.; JACKSON, S.A. Chromosome level homeology in paleopolyploid soybean (*Glycine max*) revealed through integration of genetic and chromosome maps. **Genetics**, Austin, v. 172, p. 1893-1900, 2006.

WANG, C.J.R.; HARPER, L.; CANDE, Z.W. High-resolution single-copy gene fluorescence *in situ* hybridization and its use in the construction of a cytogenetic map of maize chromosome 9. **Plant Cell**, Berlin, v. 18, p. 529-544, 2006.

WANG, G.L.; HOLSTEN, T.E.; SONG, W.Y.; WANG, H.P.; RONALD, P.C. Construction of a rice bacterial artificial chromosome library and identification of clones linked to the Xa-21 disease resistance locus. **Plant Journal**, Malden, v. 7, p. 525-533, 1995.

WANG, K.; GUAN, B.; GUO, W. Completely distinguishing individual A-genome chromosomes and their karyotyping analysis by multiple bacterial artificial chromosome fluorescence *in-situ* hybridization. **Genetics**, Austin, v. 178, p. 1117-1122, 2008.

WATSON, L.; DALLWITZ, M.J. **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval**. Disponível em: <<http://biodiversity.uno.edu/delta>>. Acesso em: 20 jan. 2012.

WEI, F.; STEIN, J.C.; LIANG, C.; ZHANG, J.; FULTON, R.S.; BAUCOM, R.S.; PAOLI, E.D.; ZHOU, S.; YANG, L.; HAN, Y.; PASTERNAK, S.; NARECHANIA, A.; ZHANG, L.; YEH, X.-T.; YING, K.; NAGEL, D.H.; COLLURA, K.; KUDRNA, D.; CURRIE, J.; LIN, J.; KIM, H.R.; ANGELOVA, A.; SCARA, G.; WISSOTSKI, M.; GOLSER, W.; COURTNEY, L.; KRUCHOWSKI, S.; GRAVES, T.A.; ROCK, S.M.; ADAMS, S.; FULTON, L.A.; FRONICK, C.; COURTNEY, W.; KRAMER, M.; SPIEGEL, L.; NASCIMENTO, L.; KALYANARAMAN, A.; CHAPARRO, C.; DERAGON, J.M.O.; MIGUEL, P.S.; JIANG, N.; WESSLER, S.R.; GREEN, P.J.; YU, Y.; SCHWARTZ, D.C.; MEYERS, B.C.; BENNETZEN, J.L.; MARTIENSSSEN, R.A.; MCCOMBIE, W.R.; ALURU, S.; CLIFTON, S.W.; SCHNABLE, P.S.; WARE, D.;

WILSON, R.K.; WING, R.A. Detailed analysis of a contiguous 22-Mb region of maize genome. **Plos Genetics**, San Francisco, v. 5, n. 11, p. 39-43, 2009.

WOO, S.S.; JIANG, J.; GILL, B.G.; PATERSON, A.H.; WING, R.A. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4922- 931, 1994.

WU, C.; SUN, S.; LEE, M.-K.; XU, Z.; REN, C.; SANTOS, T.S.; ZHANG, H.-B. Whole-genome physical mapping: an overview on methods for DNA fingerprinting. In: MEKSEM, K.; KAHL, G. (Ed.). **Handbook of plant genome mapping: genetic and physical mapping**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. v. 11, p. 257-284.

WU, C.; SUN, S.; NIMMAKAYALA, P.; SANTOS, F.A.; MEKSEM, K.; SPRINGMAN, R.; DING, K.; LIGHTFOOT, D.A.; ZHANG, H.B. A BAC and BIBAC-based physical map of the soybean genome. **Genome Research**, New York, v. 14, p. 319-326, 2004.

WU, R.; MA, C.-X.; PAINTER, I.; ZENG, Z.-B. Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species. **Theoretical Population Biology**, New York, v. 61, p. 349-363, 2002.

YOTOKO, K.S.C.; DORNELAS, M.C.; TOGNI, P.D.; FONSECA, T.C.; SALZANO, F.M.; BONATTO, S.L.; FREITAS, L.B. Does variation in genome sizes reflect adaptive or neutral processes? New clues from *Passiflora*. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 3, p. 127-131, 2011.

YU, Y.; TOMKINS, J.P.; WAUGH, R.; FRISCH, D.A.; KUDRNA, D.; KLEINHOF, A.; BRUEGGEMAN, R.S.; MUEHLBAUER, G.J.; WISE, R.P.; WING, R.A. A bacterial artificial chromosome library for barley (*Hordeum vulgare* L.) and the identification of clones containing putative resistance genes. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 101, p.1093-1099, 2000.

YUKSEL, B.; PATERSON, A. H. Construction and characterization of a peanut HindII BAC library. **Theoretical and Applied Genetics**, Oxford, v. 111, p. 630-639, 2005.

ZHANG, H.B.; WOO, S.S.; WING, R.A. BAC, YAC and cosmid library construction. In FOSTER, G.; TWELL, D. **Plant gene isolation: principles and practice**. Michigan: John Wiley, 1996. p. 75-99.

ZHANG, H.B.; CHOI S.; WOO, S.S.; LI, Z.; WING, R.A. Construction and characterization of two rice bacterial artificial chromosome libraries from the parents of a permanent recombinant inbred mapping population. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 2, p. 11-24, 1996.

ZHANG, H.-B.; WU, C.C. BACs as tools for genome sequencing. **Plant Physiology and Biochemistry**. Amsterdam, v. 39, p. 195-209, 2001.

ZHANG, P.; LI, W.; FELLERS, J.; FRIEBE, B.; GILL, B.S. BAC-FISH in wheat identifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements. **Chromosoma**, New York, v. 112, p. 288-299, 2004.

ZHANG, X.; SCHEURING, C.; TRIPATHY, S.; XU, Z.; WU, C.; KO, A.; TIAN, S.K.; ARREDONDO, F.; LEE, M.K.; SANTOS, F.A.; JIANG, R.H.; ZHANG, H.B.; TYLER, B.M. An integrated BAC and genome sequence physical map of *Phytophthora sojae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 19, p. 1302-1310, 2006.

ZHANG, H.-B. Map-based cloning of genes and quantitative trait loci. In: KOLE, C.; ABBOTT, A.G. (Ed.). **Principles and practices of plant genomics**. New Hampshire: Science Publ., 2007. v. 1, p. 229-267.

ZHANG, Y.; ZHANG, X.; O'HARE, T.H.; PAYNE, W.S.; DONG, J.J.; SCHEURING, C.F.; ZHANG, M.; HUANG, J.J.; LEE, M.K.; DELANY, M.E.; ZHANG, H.B.; DODGSON, J.B. A comparative physical map reveals the pattern of chromosomal evolution between the turkey (*Meleagris gallopavo*) and chicken (*Gallus gallus*) genomes. **BMC Genomics**, London, v. 12, p. 447, 2011.

ZHANG, H.B.; SCHEURING, F.C.; ZHANG, M.; ZHANG, Y.; WU, C.C.; DONG, J.J.; LI, Y. Construction of BIBAC and BAC libraries from a variety of organisms for advanced genomics research. **Nature Protocols**, London, v. 7, p. 479-499, 2012.

ZHAO, S.; STODOLSKY, M. **Bacterial artificial chromosomes**. New Jersey: Humana Press, 2004. 208 p.

ZHONG, X.B.; JONG, H.; ZABEL, P. Preparation of tomato meiotic pachytene and mitotic metaphase chromosomes suitable for fluorescence in situ hybridization (FISH). **Chromosome Research**, Dordrecht, v. 4, p. 24-28, 1996.

ZWICK, M.S.; HANSON, R.E.; MCKNIGHT, T.D.; ISLAM-FARIDI, M.N.; STELLY, D.M.; WING, R.A.; PRICE, H.J. A rapid procedure for isolation of C0t -1 DNA from plants. **Genome**, Ottawa, v. 40, p. 138-142, 1997.

ZWICK, M.S.; ISLAM-FARIDI, M.N.; CZESCHIN, D.G.; WING, R.A.; HART, G.E.; STELLY, D.M.; PRICE, H.J. Physical mapping of the liguleless linkage group in *Sorghum bicolor* using rice RFLP-selected sorghum BACs. **Genetics**, Berlin, v. 148, p. 1983-1992, 1998.