

Métodos biotecnológicos aplicados ao melhoramento genético do maracujá

Maria Lucia Carneiro Vieira

Eder Jorge de Oliveira

Frederico de Pina Matta

Juliano Gomes Pádua

Mariza Monteiro

Introdução

A Biotecnologia, no sentido mais amplo do conceito, tem sido aplicada para melhorar espécies de plantas desde os primórdios da atividade agrícola há 10.000 anos. Esta melhoria não se restringe à produção, qualidade e rusticidade das lavouras (em termos de resistência às pestes), mas se estende ao desenvolvimento de processos, sobretudo, de fermentação, tais como aqueles envolvidos na panificação e na produção de bebidas alcoólicas. A moderna Biotecnologia, desenvolvida no final do século XX, incorpora várias técnicas moleculares e se apresenta como tecnologia revolucionária, ganhando créditos na comunidade científica, no setor produtivo e na mídia.

Neste capítulo, pretende-se listar e discutir as abordagens da nova biotecnologia que vêm sendo usadas ou guardam potencial para assistir o melhoramento genético de espécies frutíferas, em especial, à cultura do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e do maracujá-doce (*Passiflora alata*).

Os objetivos do melhoramento genético das espécies de *Passiflora* são, nomeadamente, (i) maior produtividade e melhor qualidade dos frutos, (ii) resistência a doenças fúngicas que afetam a copa ou o porta-enxerto, quando usado, (iii) resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e ao *Passion fruit woodiness virus* (PWV). A caracterização da diversidade genética presente entre e dentro das espécies cultivadas e silvestres de *Passiflora* é essencial

para se atingir tais objetivos e pode-se adiantar que todos esses aspectos podem ser beneficiados pela incorporação de tecnologias moleculares. Para facilitar o entendimento, este capítulo será apresentado em subtítulos.

Micropropagação

Estudos sobre cultivo *in vitro* têm sido relatados por vários autores e foram revisados por Vieira & Carneiro (2004). A micropropagação, a partir de meristemas preexistentes - brotos axilares ou segmentos nodais - tem sido aplicada para propagação clonal (Drew, 1997), limpeza viral (Huang et al., 1997) e como fonte de células e tecidos (Tabela 1). No que tange à conservação de germoplasma, os protocolos foram estabelecidos (Dornelas & Vieira, 1994, Figura 1), mas a tecnologia não tem sido utilizada em bancos oficiais, embora promissora para compor coleções de acessos silvestres.

Os tecidos de *Passiflora* são bastante responsivos à ação da citocinina BA (*6-benzylaminopurine*) que induz a formação de meristemóides e gemas por organogênese direta ou indireta (Apezzato-da-Gloria et al., 2005) em concentrações $< 10 \mu\text{M}$. A formação de raízes nos brotos individualizados é induzida mediante tratamento com auxinas, como o NAA (*1-Naphthaleneacetic acid*) (Tabela 1) e, também, na ausência de fitorreguladores em meio com baixa concentração de sais e compostos orgânicos.

Na Austrália, outras práticas de micropropagação são adotadas: a cultivar E23, um híbrido entre *P. edulis* e *P. edulis f. flavicarpa*, é propagada por microestaquia. Brotos apicais de plantas adultas são enxertados em secções de caule e mantidos, no escuro, em MS basal (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com $150 \mu\text{M}$ 2iP (N6-[2-Isopentenyl]adenine), $200 \mu\text{M}$ de sulfato de adenina e $17,1 \mu\text{M}$ IAA (*Indole-3-acetic acid*), desenvolvendo-se em plântulas em MS + $4,9 \mu\text{M}$ 2iP e $5,7 \mu\text{M}$ IAA. Ápices juvenis de E23 e as espécies *P. edulis f. flavicarpa*, *P. edulis*, *P. alata*, *P. caerulea*, *P. mollissima*, *P. coccinea*, *P. herbertiana* e *P. suberosa* crescem rapidamente em MS + $10 \mu\text{M}$ de cinetina (*6-Furfurylaminopurine*) + $5 \mu\text{M}$ IAA. Rápida multiplicação foi igualmente obtida em MS suplementado com $20 \mu\text{M}$ BA, $10 \mu\text{M}$ cinetina e $5 \mu\text{M}$ IAA enquanto o enraizamento se deu em MS + $5 \mu\text{M}$ IAA (Drew, 1991).

Dornelas & Vieira (1994) relataram a proliferação de brotos a partir de ápices caulinares (5 cm) desinfetados em solução de NaOCl (1% a 2%) de *P. edulis f. flavicarpa*, *P. mollissima*, *P. giberti*, *P. maliformis* e de *P. amethystina* em ½ MS livre de fitoreguladores. *Passiflora mollissima*, que é nativa da região andina, mostrou-se bem adaptada *in vitro*, com o maior número de folhas expandidas. A formação de raízes se deu nas mesmas condições ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, 16 h sob $23 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação luminosa), aos 28 dias, quando se procedeu a transferência para a casa de vegetação. Essa prática pode ser usada para a conservação de coleções de germoplasma, procedendo-se subcultivos a cada 45 dias ou sob temperatura mais baixa (16°C) e dois subcultivos anuais. A formação de múltiplos brotos também foi relatada para *P. edulis f. flavicarpa* a partir de ápices excisados de plântulas axênicas e cultivados em MS + BA (Faria & Segura, 1997a). Os benefícios dessa citocinina também foram utilizados para estabelecer culturas de ápices de *Passiflora nitida*, uma espécie típica da Amazônia cujas sementes têm taxas de germinação muito baixas (Passos, 1999).

A microenxertia é uma prática que tem sido usada para a eliminação de viroses de cultivares asiáticas de maracujás (Huang et al., 1997). Em certas regiões do Brasil, entretanto, onde a incidência de PWV é generalizada, a limpeza clonal terá efeito passageiro.



Figura 1. Exemplos de passifloras silvestres conservados em ½ MS, na ausência de fitoreguladores.

Tabela 1. Estudos sobre cultura *in vitro* de *Passiflora*, divulgados em periódicos científicos de 1990 a 2004, de acordo com a espécie, fonte de explante, tipo e concentração (em μM) do fitorregulador usado para induzir a regeneração em meio MS (Murashige e Skoog, 1962)*.

Espécie	Fonte de explante	Tipo e concentração de fitorregulador	Referência
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Disco foliar	0,0; 2,2; 4,4; 6,6 BA ou 0,0; 1,1; 2,2; 3,4 Thidiazuron	Trevisan e Mendes (2005)
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Disco foliar	4,44 BA + 2,32 cinetina	Becerra et al., (2004)
<i>P. edulis</i> var. <i>edulis</i>	Ápices	22,2 BA	Isutsa (2004)
<i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>	caulinares	22,2 BA + 11,6 GA3	
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Ápices caulinares	Inibidores (STS e AVG) da ação do etileno	Reis et al. (2003)
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Entrenó	4,4-17,7 BA	Biasi et al. (2000)
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Disco foliar	0,0-5,3 BA	Otahola (2000)
<i>P. edulis</i> x <i>P. edulis flavicarpa</i>	Cotilédone	10,0 BA + 10% água de coco; transferência para 10,0 NAA	Hall et al., (2000)
<i>P. suberosa</i>	Disco foliar	0,0; 2,2 ou 4,4 BA	Monteiro et al. (2000a)
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Segmento nodal	MS ou MSM + 13,3 BA	Monteiro et al. (2000b)
<i>P. caerulea</i>	Folha	10,0 BA + 0,1 IAA	Jasrai e Mudgil (1999)
<i>P. mollissima</i>	Segmento nodal	Várias concentrações e combinações de BA e cinetina	Cancino et al. (1998)
<i>P. edulis flavicarpa</i>			
<i>P. giberti</i>			
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Hipocótilo	5,0 BA + 2 IAA	Faria e Segura (1997a)
	Folha		
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Ápices caulinares	2,0 a 20,0 BA + 2,0 IAA	Faria e Segura (1997b)
<i>P. foetida</i>	Endosperma triplóide	8,8 BA	Mohamed et al. (1996)
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Primórdios de brotos	1,0 BA + 1 IBA; transferência para 10,0 BA	Kawata et al., (1995)
<i>P. edulis flavicarpa</i>	Cotilédone	8,88 BA + 10% água de coco	Dornelas e Vieira (1994)
<i>P. mollissima</i>	Hipocótilo		
<i>P. giberti</i>	Folha		
<i>P. maliformis</i>			
<i>P. amethystina</i>			
<i>P. edulis</i> x <i>P. edulis flavicarpa</i>	Ápices adultos e juvenis	10,0 cinetina + 5,0 IAA	Drew (1991)
<i>P. edulis</i>	Segmento nodal	8,8 BA	Kantharajah e Dodd (1990)

*Fonte: Vieira & Carneiro (2004), modificada.

Geração de variabilidade genética

Via hibridação sexual

As estratégias aplicadas para expandir a variabilidade genética a partir da exploração do germoplasma silvestre são: a hibridação sexual (interespecífica), a hibridação somática e a engenharia genética, por meio da tecnologia do DNA recombinante e dos métodos de transformação de plantas.

A hibridação interespecífica tem sido extensivamente utilizada, mas seu sucesso depende do relacionamento filogenético entre as espécies envolvidas no cruzamento. Essa afinidade vai determinar a fertilidade dos híbridos F_1 e, conseqüentemente, seu potencial para utilização em programas de melhoramento. Sucessivas gerações de retrocruzamento com o genitor cultivado são conduzidas com a finalidade de introduzir o(s) gene(s) do genitor silvestre e recuperar o desempenho da espécie comercial. Entretanto, esse método é limitado a certas espécies por barreiras de incompatibilidade: os cruzamentos são incompatíveis ou ocorre a formação do zigoto, porém ele é abortivo. Uma alternativa usada para contornar esse problema implica na excisão do embrião imaturo e o seu posterior desenvolvimento *in vitro*. Esse resgate tem facilitado, por exemplo, a incorporação de genes exóticos na cultura da batata e do tomate.

A síntese de híbridos F_1 entre *Passiflora edulis flavicarpa* e espécies silvestres é uma estratégia importante e deve ser adotada para promover a introgressão de genes. No entanto, representa apenas o primeiro passo, pois o pareamento entre cromossomos homeólogos é essencial para a fertilidade do F_1 e, não menos importante para propiciar a recombinação gênica via *crossing over*. Há relatos em trigo, por exemplo, cujo pareamento entre homeólogos pode ser suprimido pela ação de genes específicos (Jauhar & Chibbar, 1999). Também, as sucessivas gerações de cruzamento com o genitor recorrente devem ser acompanhadas por estudos meióticos e moleculares. Estes, por sua vez, prestam-se para identificar alelos específicos

de cada genitor e, por conseguinte, o número de gerações para a recuperação do genoma recorrente poderá ser abreviado. Cabe lembrar que o número de plantas a ser analisado a cada geração deve ser grande o suficiente para contemplar todas as combinações alélicas favoráveis, possibilitando ao melhorista, a oportunidade de escolha.

Via hibridação somática

As duas outras estratégias anteriormente mencionadas (transgenia e fusão celular) incluem procedimentos biotecnológicos. Os avanços na pesquisa sobre cultura de tecidos vegetais, especialmente sobre a regeneração de brotos a partir de protoplastos (células isoladas, desprovidas de parede celular), possibilitaram a geração de híbridos por fusão somática (Figura 2), inclusive, de *Passiflora* (Dornelas et al., 1995; Otoni et al., 1995; Vieira & Dornelas, 1996).

Contudo, esse é um procedimento laborioso, e os ganhos em termos de introgressão se restringem a poucos exemplos, como ocorre em *Solanum*. O desenvolvimento da fusão assimétrica de protoplastos (o núcleo da espécie silvestre é fragmentado antes da fusão) representa certo avanço no uso da tecnologia de fusão para fins de introgressão.

A hibridação somática oferece também a oportunidade de se combinar dois citoplasmas, o que não ocorre na hibridação sexual, pois o citoplasma materno é preferencialmente herdado. Associada a essa vantagem, cabe advertir que os produtos de fusão são poliplóides artificiais e por isso, em geral, apresentam bom crescimento vegetativo se prestando como porta-enxertos. No caso de *Passiflora*, esta seria, atualmente, a única justificativa para a produção desses híbridos, visando ao convívio dos pomares enxertados com doenças de solo.

A avaliação da compatibilidade dos híbridos de fusão de protoplastos com o acesso comercial usado como copa, bem como a sua produção, vai delinear seu real potencial de aproveitamento como porta-enxertos. Também, por razões de natureza citológica, os híbridos somáticos tendem a produzir

pólen, mas não frutos, mesmo quando submetidos a cruzamentos artificiais, o que impossibilita sua multiplicação via semente. Como a pesquisa para sua produção não é de custo alto, os híbridos somáticos de *Passiflora* poderão ser usados desde que sejam de fácil propagação, via estaquia, compatíveis com o enxerto, além de se mostrarem resistentes a doenças de solo.



Figura 2. Enxertia de *P. edulis flavicarpa* acesso FB-100 no híbrido somático *Passiflora edulis flavicarpa* + *Passiflora cincinnata*.

A instabilidade cromossômica que é peculiar aos poliplóides artificiais, inclusive, aos híbridos somáticos de *Passiflora* (Barbosa & Vieira, 1997; Cuco et al., 2005) restringe a sua utilização prática. Some-se a isto o vasto campo de estudos que se abriu pelo desenvolvimento das técnicas de transformação. Em que pese a restrição ao uso da agricultura transgênica em *Passiflora* devido (i) a alogamia das espécies cultivadas, (ii) ao Brasil ser o centro de diversidade genética do gênero e (iii) a outras considerações relativas à biossegurança, mormente por se tratar de uma fruteira, a pesquisa na área deve fornecer soluções para a cultura do maracujá, principalmente, no que tange à resistência a vírus. Caberá à comunidade interessada decidir sobre a sua liberação ou não.

Via transformação de plantas

Desde que a primeira planta transgênica foi liberada, em 1996, para consumo humano – o tomate *Flavr Savr*, modificado para reduzir seus níveis de poligalacturonase e, por isso, resistir mais ao “tempo nas prateleiras” – registra-se massiva expansão de culturas transgênicas no campo (Dunwell, 2000, James, 2004).

A agricultura transgênica teve como alvo imediato o produtor agrícola. Os caracteres mais freqüentemente incorporados têm sido aqueles que reduzem o custo da produção de uma cultivar, como a resistência a herbicidas e a pragas. O exemplo mais divulgado (e comercializado em vários países) é a soja transgênica que expressa o gene de resistência ao glifosato, princípio ativo do herbicida *Roundup*, produzida pela empresa Monsanto (Quecini & Vieira, 2001).

Quanto à resistência a pragas, os transgenes foram isolados de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) e codificam endotoxinas (Frutos et al., 1999). Existem variedades comerciais resistentes a insetos, produzidas pela inserção de genes *Bt* no seu genoma, entre elas, o tomate (Fischhoff et al., 1987), algodão (Perlak et al., 1990), tabaco (Willians et al., 1993), milho (Koziel et al., 1993) e canola (Stewart et al., 1996). Genes codificadores de peptídeos que atuam como inibidores de proteínases (IPs) também têm sido usados para induzir resistência a lagartas em plantas transgênicas (Silva-Filho & Falco, 2001).

A área global cultivada com plantas transgênicas em 2005 foi de 81,0 milhões de hectares, sendo os principais países produtores: os Estados Unidos, com 47,6 milhões de hectares; a Argentina, com 16,2 e o Canadá, com 5,4; o Brasil, com 5,0; a China, com 3,7; o Paraguai, com 1,2 milhão de hectare, além da Índia e da África do Sul, cada um com 0,5 milhão de hectare de transgênicos (<http://www.isaaa.org>).

Há vários estudos sobre transformação genética em espécies frutíferas, por exemplo, *Malus pumila* (James et al., 1989; Lambert & Tepfer, 1992); *Vitis vinifera* e *V. rupestris* (Mullins et al., 1990); *Actinidia deliciosa* (Rugini et al., 1991); *Prunus persica* (Smigocki & Hammerschlag, 1991), *P. domestica* (Mante et al., 1991) e *P. armeniaca* (Machado et al., 1992); *Citrus auratifolia* (Moore et

al., 1992; Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo, 1998), *C. sinensis* (Peña et al., 1995a, 1995b) e *C. sinensis* cv. Halmlin (Boscariol, 2004); *Poncirus trifoliata* (Kaneyoshi et al., 1994); *Diospyrus kaki* (Nakamura et al., 1998); *Persea americana* (Cruz-Hernández et al., 1998) e *Passiflora edulis* (Manders et al., 1994; Silva, 1998; Hall et al., 2000; Takahashi, 2002; Alfenas et al., 2005; Castro, 2005; Monteiro, 2005; Trevisan, 2005).

No caso específico de maracujás e de várias outras fruteiras, a transgenia se aplica, mormente, para a produção de plantas resistentes a patógenos. Para resistência a vírus, são utilizados genes que expressam proteínas virais, sendo os mais usados os genes da capa protéica. A presença dessas proteínas na célula hospedeira interrompe a transcrição, replicação ou mesmo a disseminação do vírus (Silva-Filho & Falco, 2001). Em *Passiflora*, o primeiro trabalho de transformação visando à resistência a vírus foi o de Braz (1999) que introduziu, via *Agrobacterium tumefaciens*, uma seqüência que inibe a tradução do RNA do vírus responsável pela doença que causa o endurecimento dos frutos. O autor isolou um fragmento do genoma do vírus contendo a região 3' do gene da replicase e a região 5' da proteína capsidial e inseriu no vetor de clonagem. Apesar de não ter observado amplificação do gene de interesse nas plantas regeneradas, os genes *uidA* e o *npII* foram detectados por reação em cadeia da polimerase (PCR). Recentemente, o mesmo grupo publicou a obtenção de uma planta resistente ao vírus, aqui reconhecido como *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (Alfenas et al., 2005).

Com esse mesmo objetivo, Trevisan (2005) introduziu o gene completo da proteína capsidial, também via *A. tumefaciens*, em maracujá-amarelo. Neste trabalho, o autor transformou discos foliares excisados de plântulas das cultivares IAC-275 e IAC-277, as quais regeneraram 119 e 109 plantas respectivamente. A integração do transgene foi confirmada em 7 das 8 plantas analisadas pela técnica de *Southern blot*, com diferentes números de cópias do transgene. Dessas, três plantas expressaram o RNA viral e uma delas foi imune ao PWV depois de sucessivas inoculações.

Outras abordagens que podem ser usadas para a obtenção de plantas tolerantes a vírus são: (i) pela expressão da replicase viral (Hellwald et al.,

1995), (ii) pela expressão de proteínas envolvidas no movimento do vírus na planta (Lapidot et al., 1993), (iii) uso de RNA anti-senso ("antisense RNA"), que é complementar a uma das fitas do genoma viral (Bejarano & Lichtenstein, 1994), (iv) uso de RNA satélite, que tem a propriedade de reduzir a replicação do vírus e atenuar o sintoma (McGarvey & Kaper, 1993) e (v) uso de RNA defectivo interferente, estratégia freqüentemente associada à diminuição dos sintomas da doença (Stenger, 1994).

A exploração das defesas naturais das plantas também pode ser aplicada e baseia-se na (a) produção de elicitores (Wegener et al., 1996), (b) introdução de genes de origem vegetal, semelhante ao em arroz pela inserção do gene *Xa21* para obter resistência à *Xanthomonas oryza* pv. *oryza* (Wang et al., 1996) ou (c) superexpressão de genes de defesa pela produção de fitoalexinas, como as tioninas (Carmona et al., 1993).

Quanto à geração de plantas transgênicas resistentes a doenças bacterianas, as estratégias aplicadas envolvem, mormente, a introdução de genes que codificam proteínas bactericidas. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são de ocorrência generalizada nos organismos multicelulares, sendo responsáveis pelas respostas imunes ou de defesa. Como dito, em plantas, os peptídeos líticos, isolados de insetos, como as cecropinas e análogos, as lisozimas e as atacinas têm sido usados para induzir resistência a patógenos. Particularmente, as atacinas têm ação contra bactérias Gram-negativas, interferindo na transcrição de genes *omp* que, por sua vez, estão envolvidos na síntese de porinas, proteínas constituintes dos poros da membrana plasmática. Isto resulta em um desarranjo na membrana externa bacteriana e na drástica redução no seu crescimento (Imler & Bulet, 2005).

Reynoird et al. (1999) transformaram plantas de pêra com o gene da atacina E (*attE*), isolado de *Hyalophora cecropia*, via *A. tumefaciens*, visando controlar *Erwinia amylovora*. A expressão e a presença da proteína foram confirmadas por técnicas moleculares, e a análise de resistência dos transformantes foi conduzida *in vitro*, inoculando-se a estirpe do patógeno. Os transformantes mostraram-se resistentes enquanto os não-transformantes foram suscetíveis.

Em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, o gene que codifica a atacina A (*attA*), isolado de *Trichoplusia ni* (Kang et al., 1996), foi introduzido via biobalística (Takahashi, 2002; Castro, 2005) e *A. tumefaciens* (Monteiro, 2005) com o objetivo de gerar plantas resistentes à bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. As plantas, oriundas da biobalística, foram analisadas quanto à presença do gene exógeno via PCR e *Southern blot*, resistência ao herbicida Finale®, usado como agente seletivo e resistência à bacteriose e oito delas se mostraram resistentes à doença (Tabela 2). As taxas de transformação foram da ordem de 0,13%.

Tabela 2. Resposta de plantas transgênicas (T) e de suas matrizes (M) à infecção por *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, avaliada após 18 dias. Dados (em %) da área foliar lesionada.

Código ¹	Área de lesão T ²	Área de lesão ² M	M/T
2	3,68	10,60	2,88
11	7,00	22,04	3,15
16	8,85	17,14	1,94
18	2,17	32,86	15,14
20	11,11	19,68	1,77
32	14,33	25,13	1,75
33	1,89	36,44	19,28
43	5,97	25,94	4,34

¹ Códigos designados pelo autor; ² Média de quatro repetições.

Fonte: Castro, 2005;

Plantas de *Citrus*, também, foram transformadas com o gene *attA* via *A. tumefaciens* para induzir resistência à bacteriose causada por *X. axonopodis* pv. *citri* (Boscariol, 2004). Posteriormente, as plantas transgênicas (*Southern+*) foram infectadas com a bactéria. Os resultados mostraram que a expressão do peptídeo antimicrobiano proveu tolerância à bactéria, em um período de incubação maior e lesões com diâmetros menores do que aquelas das plantas-controle.

A eficiência das plantas transgênicas em manifestar resistência a um patógeno depende do nível de expressão (Florack et al., 1995), da estabilidade e da localização do peptídeo heterólogo na célula hospedeira

(Düring, 1996). Segundo Silva-Filho (2003), a localização específica das proteínas dentro da célula é condição essencial para seu funcionamento, assim como o direcionamento dos peptídeos é um processo bem controlado e eficiente. Grande parte das proteínas endógenas relacionadas à defesa, além das fitoalexinas e ligninas, está localizada no espaço intercelular (apoplasto) onde a bactéria fitopatogênica se multiplica antes de penetrar na célula vegetal (Bogs et al., 1998). Duas seqüências de direcionamento relacionadas ao processo de secreção foram identificadas: os peptídeos sinais (PS), que são aqueles clivados a partir de uma cadeia nascente e as âncoras sinais (AS), que não são clivadas, liberando as proteínas na membrana do retículo endoplasmático. As atacinas nativas encontram-se na hemolinfa dos insetos e possuem um peptídeo sinal que as direciona para uma via secretória. Monteiro (2005) confirmou que a atacina A é direcionada para o meio extracelular em células vegetais. Para isto, o gene *attA* foi fusionado aos genes repórteres *gfp* e *uidA* cuja expressão é facilmente visualizada, e células do bulbo da cebola foram transformadas com essa construção genética. A expressão de ambos os genes repórteres foi detectada no apoplasto, indicando que o produto da fusão foi secretado. Isso explicaria a menor área de lesão observada nas plantas transgênicas de maracujá transformadas com o gene *attA*, comparativamente àquela presente nas plantas matrizes (Tabela 2).

Melhoramento molecular: a construção de mapas genéticos e suas aplicações

Os marcadores moleculares ou de DNA têm contribuído substancialmente para dar suporte aos estudos de genética de populações de diversas espécies e tendem, pouco a pouco, a ser usados para assistir os procedimentos de seleção e melhoramento. Por intermédio deles, é possível analisar a variabilidade genética, identificar genótipos ou genes específicos e detectar possíveis associações entre os marcadores e características fenotípicas.

Considerando os caracteres qualitativos, a simples ligação entre a marca e a característica já permite ao melhorista proceder à seleção com base no marcador, sem instalar ensaios no campo e esperar o término do

ciclo produtivo para sua confirmação. Esse é o fundamento da estratégia denominada por seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), desde que essa ligação seja forte. A estratégia deve ser adotada, sobretudo, nos casos em que a característica de interesse é de avaliação difícil e em espécies perenes de ciclo longo, possibilitando a redução no tempo e no custo do programa de melhoramento.

Levando-se em consideração os caracteres quantitativos, ou seja, aqueles controlados por grande número de genes que, em geral, mostram baixa herdabilidade, o uso de marcadores moleculares para assistir a seleção não é imediato. Há necessidade de se mapear os locos (via construção de mapas genéticos ou não) e daí estimar o efeito desses locos responsáveis pela expressão do fenótipo quantitativo (QTL) na população em estudo. Mais importante ao melhorista é perceber que a associação detectada é própria do cruzamento sob avaliação e que a vantagem da SAM em relação à seleção fenotípica vai depender da herdabilidade do caráter. Ressalte-se que outros alelos de efeito igual ou até maior provavelmente existam podendo se manifestar (ou não) em outros ambientes.

A construção de mapas de ligação, com base em marcadores genéticos, advém da teoria proposta por Sturtevant, em 1913, a qual faz uso da frequência de recombinantes como medida da distância entre dois genes. Assim, as bases teóricas da construção de mapas genéticos foram estabelecidas na primeira metade do século passado, porém, com o advento das técnicas de DNA, novos delineamentos genéticos e um maior número de marcas e de indivíduos passaram a ser usados exigindo novas ferramentas estatísticas para a construção de mapas.

Entre as principais aplicações dos mapas genéticos podem-se destacar: (a) o mapeamento de genes que controlam características agrônômicas, tanto de herança qualitativa como quantitativa, sendo esse atributo a base para a SAM (Tanksley, 1993; Liu, 1998); (b) o mapeamento comparativo (Ahn & Tanksley, 1993; Jones et al., 2002); (c) a clonagem posicional de genes (*positional cloning*), que permite a clonagem sem a necessidade de se conhecer *a priori* o gene e seus produtos, mas apenas sua

posição no genoma (Collins, 1992; Martin et al., 1993); (d) a atribuição de marcas aos cromossomos da espécie por diferentes estratégias, como FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*); (e) a integração com mapas físicos, isto é, mapas derivados das técnicas de seqüenciamento.

A construção de um mapa genético exige a geração de uma população segregante e sua análise com algum tipo de marcador genético, a separação das marcas em grupos de ligação, a determinação da ordem dos locos dentro dos grupos e as estimativas das distâncias entre as marcas (Staub et al., 1996).

Há mapas genéticos desenvolvidos para várias espécies frutíferas, entre elas: abacaxi (Carlier et al., 2004), cacau (Risterucci et al., 2000), kiwi (Testolin et al., 2001), maçã (Kenis & Keulemans, 2005), mamão (Ma et al., 2004), pêra (Oliveira et al., 2004) e uva (Doucleff et al., 2004; Riaz et al., 2004).

Para a cultura do maracujazeiro, já foram desenvolvidos quatro trabalhos visando à construção de mapas genéticos. O primeiro deles foi elaborado por Carneiro et al., (2002), utilizando marcadores do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Neste trabalho, foi possível revelar, claramente, o potencial das técnicas de mapeamento para o melhoramento da cultura do maracujá-amarelo. Assim, um segundo mapa foi desenvolvido por Lopes (2003), com base em marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Figura 3). No estudo de Lopes (2003), foi identificado o primeiro loco quantitativo no genoma de *Passiflora* associado à resposta da população à infecção por *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

O terceiro mapa de ligação foi obtido por Matta (2005) em complemento ao estudo anterior, porém, adicionando marcadores de segregação 3:1 e incluindo outras estratégias de análise estatística, possibilitando, assim, a integração dos mapas dos dois genitores usados no cruzamento. Um exemplo desse procedimento é ilustrado na Figura 4. De forma similar, Moraes (2005) utilizou ambos os tipos de marcadores (1:1 e 3:1) para estabelecer um mapa de referência de AFLP para *P. edulis* f. *flavicarpa*. Esse autor realizou um trabalho inédito e respeitável, pois mapeou vários QTL associados à produção e à qualidade de frutos de maracujá. Parâmetros genético-estatísticos foram avaliados na população de mapeamento que mostra potencial para seleção via seleção recorrente (Moraes et al., 2005).

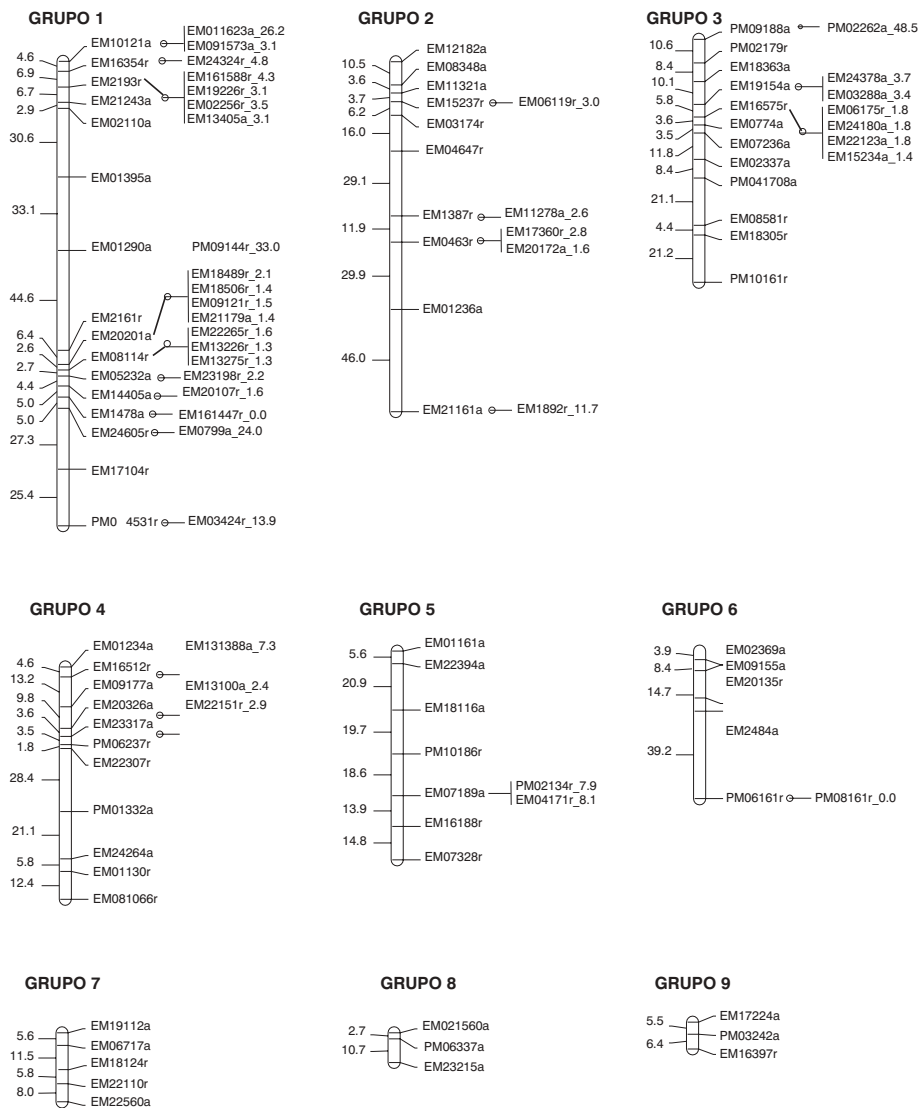


Figura 3. Mapa genético do acesso 'IAPAR-06' de *Passiflora edulis flavicarpa* ($2n=18$) com marcadores AFLP alocados em nove grupos de ligação.

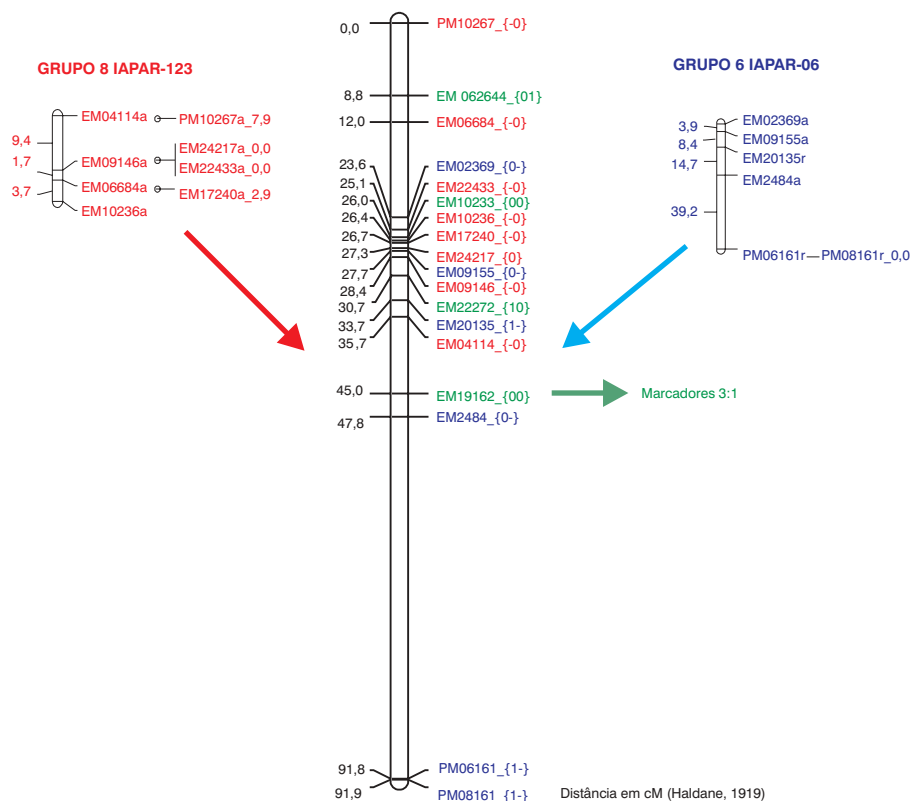


Figura 4. Integração dos mapas genéticos dos acessos 'IAPAR-123' (Grupo 8) e 'IAPAR-06' (Grupo 6) de *Passiflora edulis flavicarpa*.

Fonte: Matta, 2005.

A população de mapeamento utilizada nesses quatro trabalhos foi obtida do cruzamento entre duas plantas pertencentes ao Lote de Introdução e Seleção de Materiais do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Londrina, PR. O acesso 'IAPAR-123' foi usado como genitor feminino e apresenta boas características agrônômicas, além de ser resistente a certos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. O 'IAPAR-06', que é uma introdução de Marrocos, foi usado como genitor masculino, mostra-se inferior ao acesso 'IAPAR-123' e é tido como suscetível à moléstia.

No caso do maracujazeiro, a auto-incompatibilidade dificulta a obtenção de linhas puras e leva a elevada depressão causada pela endogamia. Sendo assim, os delineamentos genéticos recomendados para a construção de mapas (populações F_2 ou de retrocruzamento, ou *NILs* e *RILs*) não podem ser usados, devendo-se lançar mão de outra estratégia. Uma alternativa para essa situação, usada em *Eucalyptus* (Grattapaglia & Sederoff, 1994), é a *two-way pseudo-testcross*. Nessa estratégia, a fase de ligação não é conhecida *a priori*, mas sim inferida *a posteriori*, pela análise da segregação das marcas em uma população F_1 . Feita a genotipagem de várias dezenas de indivíduos F_1 para marcadores que segreguem 1:1, dois conjuntos de marcas são gerados, sendo um para cada genitor do cruzamento, resultando em dois mapas de ligação, indivíduos-específicos (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Os marcadores já alocados nos mapas de maracujá-amarelo (RAPD e AFLP) são do tipo dominante, pois apenas um alelo é detectado no gel (presença da banda) e todos os demais são tidos como nulos (ausência da banda). Os polimorfismos, portanto, são decorrentes de duas situações: (1) o loco é heterozigótico para a marca em um dos pais e nulo no outro, segregando na proporção 1:1 para a presença e ausência da banda, respectivamente ou (2) o loco é heterozigótico em ambos os genitores, segregando 3:1 (presença: ausência da banda). Quando se usam os polimorfismos com segregação 1:1, dois mapas são gerados, um para cada genitor.

A análise de ligação realizada por Lopes et al. (2006) abrigou 250 marcadores AFLP do tipo 1:1, sendo que 112 e 138 marcas foram alocadas em nove grupos de ligação do genitor 'IAPAR-06' e 'IAPAR-123' respectivamente. Como dito, um QTL responsável pelo controle de 15,8% da variação fenotípica apresentada pela progênie em resposta à inoculação com um isolado de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foi descrito.

Embora o fato de se gerar mapas individuais (por genitor) não impossibilite o mapeamento de QTL, o melhor é proceder ao mapeamento de locos quantitativos com base em um único mapa, usando uma abordagem biométrica que possa integrar todos os marcadores, inclusive, aqueles

comuns a ambos os genitores. Na verdade, o mapa é do cruzamento e deve representar todos os genótipos da população segregante (Maliepaard et al., 1998). No trabalho realizado por Matta (2005), foram utilizadas 114 (30,9%) marcas informativas no genitor 'IAPAR-06', 139 (37,7%) marcas informativas no genitor 'IAPAR-123' e 116 (31,4%) marcas biparentais que mostraram segregação 3:1. Todos os grupos de ligação foram integrados, ou seja, os homólogos de cada genitor formaram um só grupo. Quanto ao mapeamento de QTL, os resultados obtidos corroboraram os de Lopes (2003), contribuindo para o entendimento do controle genético da resistência à bactéria.

Genômica

Genômica é o estudo da estrutura, função e evolução de genomas completos e de seqüências expressas (genes) usando tecnologias de alto desempenho para análise de ácidos nucléicos tais como seqüenciamento, mapeamento genético e físico e expressão gênica diferencial (Mir, 2004). Nos últimos anos, com o avanço das plataformas de seqüenciamento, o conhecimento dos genomas de diversos organismos tornou-se uma realidade, gerando imensa quantidade de dados que tem sido utilizada para o entendimento da organização e do funcionamento dos genomas.

O uso de ferramentas computacionais tornou-se imprescindível para o avanço dos *projetos genoma*, criando uma nova área do conhecimento, a *bioinformática*. Tal ferramenta é usada para armazenar, disponibilizar e analisar dados genômicos. A bioinformática também permite a comparação das seqüências disponíveis nos bancos de dados, dando suporte à genômica comparativa. Novas seqüências são depositadas a todo o minuto, literalmente, assim como métodos para a sua análise têm sido propostos, permitindo a formulação de novas teorias e o avanço do conhecimento sobre genômica.

Do ponto de vista aplicado, as informações depositadas nos bancos (*datbank*) permitem especular sobre qual é a porção funcional dos genomas,

gerar mapas físicos, identificar genes envolvidos na expressão de características importantes e desenvolver métodos e tecnologias visando a sua utilização no melhoramento de plantas e animais.

Haverá um momento na história da ciência que várias espécies cultivadas terão seus genomas, ou parte deles, seqüenciados. Contudo, atualmente, os projetos de seqüenciamento de genomas completos restringem-se às espécies-modelo como *Arabidopsis thaliana* e àquelas de grande importância econômica, como o arroz. Para outras espécies, entre elas milho, soja, trigo, alfafa, *Populus*, há grande volume de informações sobre seqüenciamento, completo ou parcial, de cromossomos específicos e grandes bibliotecas de seqüências expressas já estão disponíveis.

A construção de bibliotecas de seqüências expressas (EST), a clonagem de regiões cromossômicas em BAC, isto é, em cromossomos artificiais de bactérias e a manutenção de microarranjos de DNA são tecnologias importantes que têm sido adotadas na genômica vegetal. É de fundamental importância que as descobertas derivadas dos *projetos genoma* sejam integradas aos esforços despendidos para o melhoramento. O desenvolvimento de marcadores moleculares, por exemplo, constitui uma das aplicações da genômica em curtíssimo prazo, contribuindo para a análise da variação genética entre indivíduos e espécies, para estudos sobre a arquitetura genética de caracteres complexos e para os trabalhos de genética de populações e evolução molecular.

Os principais tipos de marcadores moleculares desenvolvidos pelas estratégias de seqüenciamento são os microssatélites, conhecidos como *Simple Sequence Repeats*, e os polimorfismos de um único nucleotídeo ou SNPs (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphisms*). Tais marcadores são bastante abundantes em plantas, permitindo a construção de mapas genéticos de alta precisão; também, se prestam como ferramentas para mapear e seqüenciar genes, investigar famílias de genes, identificar elementos transponíveis e rearranjos do genoma.

No caso de *Passiflora*, trabalhos de seqüenciamento são restritos às regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) dos genes ribossomais e espaçadores

dos genes plastidiais *trnL-trnF* e *psbA-trnH* (Muschner et al., 2003; Lorenz-Lemke et al., 2005; Pádua et al., 2005) que têm sido usados em estudos de filogenia molecular. Recentemente, no Departamento de Genética da Esalq/ Usp bibliotecas genômicas enriquecidas com microssatélites foram construídas e seqüenciadas, constituindo pequeno banco de dados de *P. edulis flavicarpa*, *P. alata* e *P. pohlii*.

A construção de bibliotecas genômicas enriquecidas envolve a fragmentação do DNA em pequenos segmentos que são ligados a adaptadores específicos para promover o aumento do número de seqüências via PCR. Em seguida, é feita uma hibridização seletiva para as seqüências de interesse, com o uso de uma sonda 5' biotinizada que tem afinidade pela estreptavidina, por sua vez, ligada a contas magnéticas (Kijas et al., 1994). Assim, o DNA hibridizado com as repetições do microssatélite pode ser seletivamente removido. Depois da hibridização e muitas etapas de lavagem para remover o DNA não ligado, o DNA é eluído e amplificado por PCR. Em seguida, o DNA enriquecido é clonado em um vetor adequado. Dependendo da eficiência do procedimento, os clones podem ser seqüenciados diretamente ou sofrer um *screening* por *Southern blot* ou por PCR.

Os microssatélites possuem uma série de vantagens em relação a outros marcadores, pois são codominantes, multialélicos, altamente reprodutíveis, além de ser derivados da PCR. Contudo, apresentam uma vantagem especial para a cultura do maracujá, que é prover alelos-ponte para a integração de mapas genéticos construídos até então, separadamente, para cada genitor do cruzamento. Além disso, a amplificação de locos de SSR a partir de diferentes *pedigrees* deve facilitar a comparação dos dados de QTL já identificados em maracujá-amarelo (Moraes, 2005; Lopes et al., 2006). Também, a busca de novos alelos de QTL em populações de maracujá-amarelo ou em espécies afins, deve contribuir para assistir a introgressão de genes importantes.

Apesar das dificuldades, o desenvolvimento de microssatélites tem-se tornado cada vez mais acessível, principalmente, devido às novas estratégias de enriquecimento de bibliotecas genômicas e a tecnologias rápidas de seqüenciamento automático baseadas em fluorescência (Rafalski et al., 1996).

Em maracujá-amarelo, foram construídas duas bibliotecas genômicas enriquecidas com repetições GT e CT gerando 947 seqüências, sendo 501 para o acesso 'IAPAR 06' e 446 para o 'IAPAR 123' (Oliveira et al., 2005b). Do total de seqüências, 134 (14,15%) foram consideradas redundantes por apresentarem similaridade de até 90% no número de bases. Tal redundância pode ser atribuída à presença de clones duplicados durante as etapas de enriquecimento, à existência de diferentes alelos, uma vez que os genitores utilizados na construção da biblioteca são não endogâmicos, e à presença de locos duplicados no genoma de *Passiflora*. Seqüências com mais de 90% de similaridade foram consideradas redundantes, sendo que muitas delas apresentar variações na composição de nucleotídeos. A redundância das seqüências diminui a eficiência da biblioteca, exigindo a construção de novas bibliotecas com número maior de seqüências para, conseqüentemente, prover um número maior de locos de microssatélites.

Nessa experiência pioneira de desenvolvimento de microssatélites em maracujá-amarelo, foram encontradas 127 seqüências contendo microssatélites não redundantes, indicando eficiência de enriquecimento de 13,41%. Para 20 dessas seqüências, não foi possível promover o desenho de *primers*, reduzindo esse valor para 11,30%.

De acordo com Weber (1990), os microssatélites podem ser classificados em: (i) perfeitos, quando a seqüência repetida não é interrompida por qualquer base atípica, por exemplo, TATATATATATATA; (ii) imperfeitos, quando existe entre os motivos um par de bases atípico, tal como em TATATATAcTATATA e (iii) compostos, quando há duas seqüências repetidas distintas adjacentes, tal como em TATATATAGTGTGTGTGTGTGT.

Foram encontrados 66 microssatélites perfeitos, 55 imperfeitos e 6 compostos em *P. edulis flavicarpa*. Do total de microssatélites, 3,94% foram de mononucleotídeos, 78,74% de dinucleotídeos, 3,94% de trinucleotídeos, 7,09% de tetranucleotídeos, 2,36% de pentanucleotídeos, 3,15% de hexanucleotídeos e 0,79% de heptanucleotídeos. Como esperado, a classe de dinucleotídeos foi a mais freqüente em virtude das sondas utilizadas (CT e GT). Nessa classe, microssatélites com repetições AC/GT e CA/TG foram mais freqüentes (52,7%) do que aqueles com repetições AG/CT e GA/TC (25,2%).

Observou-se que, quanto maior o tamanho do motivo, menor é o número de repetições. Os hexa, penta e tetranucleotídeos apresentaram, em média, $3,75 \pm 0,95$; $5,0 \pm 2,0$ e $5,88 \pm 2,8$ repetições respectivamente. Já os trinucleotídeos apresentaram, em média, $6,4 \pm 2,79$ repetições. O número médio de repetições foi de $14,75 \pm 8,9$, no caso dos dinucleotídeos, média esta associada a uma elevada variância, já que os valores variaram de 6 a 42. Já para os mononucleotídeos e microssatélites compostos, as médias foram de $23,6 \pm 7,0$ e $24,0 \pm 11,3$ repetições, com amplitudes elevadas.

Segundo Wang et al. (1994), a frequência das classes de microssatélites é bastante variável em plantas. Em revisão feita por Powell et al. (1996), os autores relataram que as repetições AG são mais abundantes no genoma de plantas do que as repetições AC, diferentemente do que ocorre no genoma de mamíferos (Weissenbach et al., 1992). Nossos dados apontam para uma maior frequência de repetições GT no genoma de *P. edulis flavicarpa*, embora seja recomendável analisar mais seqüências. É possível afirmar que a presença dos microssatélites em maracujá-amarelo é tão abundante quanto em outras espécies frutíferas, como mamão (Santos et al., 2003), melão (Ritschel et al., 2004) e abacate (Ashworth et al., 2004).

Nossos próximos passos visam à caracterização genética dos locos de microssatélites em um conjunto de acessos de *P. edulis flavicarpa*, o depósito das seqüências no banco de dados, e a completa genotipagem da população segregante 'IAPAR-06' x 'IAPAR-123' para a construção de mapas de ligação altamente saturados (Figura 5). Nosso propósito é identificar, com maior exatidão, regiões genômicas associadas a características agronômicas.



Figura 5. Loco de microssatélite com segregação 1: 1: 1: 1 em população de maracujá-amarelo derivado do cruzamento 'IAPAR-06' x 'IAPAR-123'.
Fonte: Oliveira et al. (2005b).

Diversidade genética

A classificação taxonômica das passifloras tem sido objeto de estudo e controvérsia, porém a descrição clássica das espécies americanas da família *Passifloraceae*, elaborada por Ellsworth Killip, em 1938, e divulgada em *Publications of the Field Museum of Natural History*, tem sido a principal referência. A classificação de Killip é um tanto complexa, sendo o gênero *Passiflora* dividido em 22 subgêneros e alguns destes em séries e seções.

Outro estudioso importante é John Vanderplank cuja obra *Passion Flowers*, em 3ª edição, foi publicada em 2000. A ampla variação na forma das folhas, frutos e flores, característica marcante das passifloras, é muito bem ilustrada na obra que discute vários aspectos horticulturais.

Mais recentemente, em 2004, o grupo liderado por John MacDougal publicou *PASSIFLORA Passionflowers of the world*, propondo nova estruturação para o gênero *Passiflora* baseada em evidências morfológicas e citológicas e reduzindo-o a apenas quatro subgêneros: *Astrophea* (DC) Mast., com 57 espécies; *Deidamioides* (Harms) Killip, com 13 espécies; *Decaloba* (DC.) Rchb., com 214 espécies e *Passiflora*, com 236 espécies, entre as quais estão várias das passifloras típicas, cultivadas como ornamentais ou para o consumo da fruta (Killip, 1938; Vanderplank, 1996; Ulmer & MacDougal, 2004).

Na Tabela 3, ilustra-se a correspondência entre as classificações de Killip (1938) e de Feuillet e MacDougal (2004).

Tabela 3. Correspondência entre as classificações propostas por Feuillet e MacDougal (2004) e a de Killip (1938) para o gênero *Passiflora*.

Feuillet e Mac Dougal (2004)	Killip (1938)
Decaloba	Apodogyne, Astephia, Plectostemma (exceto seção Mayapathanthus), Chloropathanthus, Murucuja, Pseudomurucuja e Psilanthus
Astrophea Deidamioides	Astrophea Tryphostemmatoides, Deidamioides, Seção Mayapathanthus (subgênero Plectostemma) e Polyanthea
Passiflora	Adenosepala, Tacsoniopsis, Rathea, Tacsonia, Granadillastrum, Distephana, Calopathanthus, Tacsonioides, Granadilla, Dysosmia, Dysosmioides

Melo et al. (2001) realizaram estudos de citogenética que sugerem a reorganização taxonômica da família. Esses autores, mesmo não tendo como objetivo principal apresentar uma nova organização sistemática para o gênero, obtiveram resultados que contribuiriam para a elucidação das relações genéticas entre as espécies de *Passiflora*. Os resultados de Melo et al. (2001) apresentam-se bem próximos àqueles que embasam a nova organização taxonômica proposta por Ulmer & MacDougal (2004). Melo & Guerra (2003) sugerem que o número e a localização de sítios de rDNA 5S e 45S rDNA são consistentes com a hipótese de que espécies com $x = 6$ seriam mais primitivas, enquanto as espécies com $x = 9$, $x = 10$ e $x = 12$ teriam origem tetraplóide por disploidia ($12 \rightarrow 10 \rightarrow 9$) e diminuição de sítios redundantes como os de rDNA 5S. Igualmente, Cuco et al. (2005) mapearam sítios de rDNA 45S e 5S em *P. edulis flavicarpa* (E), *P. amethystina* (A) e *P. cincinnata* (C) e nos respectivos híbridos somáticos (E + A) e (E + C). Estabeleceram, também, o cariótipo *standard* para o gênero o qual servirá de base aos programas de melhoramento, mormente, aqueles que usam a hibridação interespecífica como estratégia de introgressão de genes. A definição do cariótipo de *P. edulis flavicarpa* é ainda particularmente importante para a alocação de grupos de ligação em mapas físicos e, obviamente, para estudos de evolução cariotípica.

Em complemento a esses estudos, o gênero tem sido contemplado com trabalhos de filogenia molecular (Muschner et al., 2003; Yockteng & Nadot, 2004; Pádua, 2004) e de morfometria (Plotze et al., 2005). São apresentados, aqui, alguns dados de Pádua (2004) resultantes da análise filogenética baseada na comparação de seqüências dos genes do cloroplasto, *trnT-trnL-trnF* em combinação com dados morfométricos de folhas de *Passiflora*.

O subgênero mais heterogêneo, isto é, o que abriga maior variabilidade é *Astrophea*, com uma distância média de 0,052. Já o grupo de menor distância é o que compõe o subgênero *Deidamioides*, com um valor de 0,0036. Na Tabela 4, mostram-se os demais valores, incluindo as distâncias entre as espécies dentro de subgêneros, apresentadas na diagonal.

Foi possível verificar, de forma clara, o agrupamento das espécies em quatro grandes grupos, com altos valores de *bootstrap*. Num primeiro, foram agrupadas todas as espécies do subgênero *Decaloba*, além de *P. tulae*, do subgênero *Murucuja*. A inclusão do subgênero *Murucuja* dentro do grado *Decaloba* coincide com a reorganização proposta por Feuillet e MacDougal (2004). Algumas características morfológicas são comuns a esses dois subgêneros, conforme descrito por Killip (1938).

O subgênero *Deidamioides* caracteriza-se por ser o único do gênero que apresenta folhas compostas, trifoliadas. A característica que o aproxima de *Decaloba* seria o opérculo plissado. No entanto, a distância entre as espécies *P. microstipula* e *P. deidamioides* comparativamente àquela entre as espécies de *Decaloba* e a característica foliar que lhe é peculiar (folhas compostas, trifoliadas) indicam que este pode constituir um subgênero distinto tal como propõem Feuillet & MacDougal (2004). Em nosso estudo, fica evidente que as distâncias entre os grupos são bem superiores às distâncias dentro dos grupos, dando destaque à homogeneidade intragrupo e a perfeita distinção entre grupos. A distância entre *Decaloba* e *Deidamioides* é praticamente a mesma existente entre *Decaloba* e *Astrophea* que, definitivamente, são subgêneros distintos. Portanto, a disposição de *Deidamioides* como um dos quatro subgêneros propostos por Feuillet & MacDougal recebe suporte do presente trabalho.

Tabela 4. Distância patristica entre os subgêneros de *Passiflora* estudados por Pádua (2004)

Táxon	<i>Tacsonioides</i>	<i>Passiflora</i>	<i>Dysosmia</i>	<i>Distephana</i>	<i>Astrophea</i>	<i>Deidamioides</i>	<i>Decaloba</i>
<i>Tacsonioides</i>	0,0158						
<i>Passiflora</i>	0,0224	0,02725					
<i>Dysosmia</i>	0,0180	0,0267	0,01505				
<i>Distephana</i>	0,0113	0,0192	0,0165	0,00717			
<i>Astrophea</i>	0,0563	0,0641	0,0609	0,0707	0,05200		
<i>Deidamioides</i>	0,0508	0,0576	0,0536	0,0456	0,0640	0,00362	
<i>Decaloba</i>	0,0889	0,0892	0,0877	0,0803	0,0910	0,0562	0,04326

Outro grande grupo formado foi o que alocou as espécies do subgênero *Passiflora*. Além destas, foram incluídas espécies dos subgêneros *Dysosmia* (*P. foetida* e *P. palmeri*), *Distephana* (*P. speciosa* e *P. coccinea*),

Granadillatrum (*P. manicata*), Dysosmioides (*P. villosa*, *P. campanulata* e *P. setulosa*) e Tacsonioides (*P. reflexiflora* e *P. mendoncae*). Esse agrupamento, apesar de não acolher qualquer característica morfológica compartilhada por esses subgêneros, também foi estabelecido nas filogenias anteriormente publicadas para *Passiflora*. Agrupando-se ao grado Decaloba, além das espécies que pertencem a este subgênero, estão as espécies: *P. manicata* (Granadillastrum) e *P. tulae* (Murucuja). Assim como no caso do subgênero Decaloba, a reunião desses subgêneros em um único está de acordo com a idéia de Feuillet e MacDougal. Nesse grupo, incluem-se as espécies de Dysosmia que, em outras filogenias, aparecem alocadas em grupo-irmão do subgênero *Passiflora*.

A provável inclusão desses subgêneros junto a *Passiflora* pode ser devida ao fato de a divergência de Decaloba ser mais antiga que a divergência dos demais subgêneros. Por *Passiflora* e os demais subgêneros serem mais recentes, não houve tempo hábil e suficiente para sua completa separação. Tal fato é corroborado, por exemplo, pela dispersão da série Lobatae ao longo de vários subgrupos de *Passiflora*.

A proximidade observada entre *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá-amarelo) e *P. edulis* (maracujá-roxo) corrobora a hipótese de que a forma amarela deva ter surgido de forma roxa por mutações (Degener, 1933). A facilidade de cruzamento entre essas duas formas também fortalece a teoria de origem por mutação. Todavia, analisando as distâncias patrísticas das várias espécies em relação à forma amarela de *P. edulis*, verifica-se que a menor distância está associada à *P. incarnata*, o que traz dúvidas quanto à hipótese de origem por mutação. Esse resultado é um tanto quanto inesperado, uma vez que essas duas espécies não são simpátricas. Enquanto *P. edulis* é um táxon nativo das regiões do Brasil e da Argentina, *P. incarnata* é restrito aos Estados Unidos (Martin & Nakasone, 1970). No entanto, a proximidade das duas formas de *P. edulis*, detectada tanto por marcadores de cloroplasto (presente trabalho) quanto por marcadores nucleares (Yockteng & Nadot, 2004), mostra que a hipótese de origem de *P. edulis* f. *flavicarpa* por hibridação (Pope, 1935) é menos provável.

O terceiro grupo, com altos valores de *bootstrap* (média de 94) é formado exclusivamente por espécies do subgênero *Astrophea*. Entretanto, o grupo não pode ser considerado monofilético, pois a espécie *P. alliacea* não se agrupou neste clado. Isto também foi observado na filogenia proposta por Yockteng & Nadot (2004) que observaram o agrupamento de *P. candida* (secção *Pseudoastrophea*) com espécies de *Decaloba*. A posição basal de *Decaloba* confirma a hipótese de Benson et al. (1975) de que este grupo seria o ancestral das passifloras.

Ressalte-se que os valores de *bootstrap* para os nós situados dentro dos quatro grandes clados são baixos, evidenciando a proximidade genética existente entre as espécies dentro dos subgêneros, corroborando, novamente, a redução do número de subgêneros proposta por Feuillet & MacDougal (2004).

Para a análise morfométrica (Plotze et al., 2005; Figura 6), amostras de folhas de quatro indivíduos de 10 espécies de *Passiflora* foram utilizadas visando englobar a grande variabilidade foliar do gênero. Os caracteres morfométricos foram capazes de distinguir as 10 espécies, enquanto o dendrograma (Figura 7) mostra, claramente, a segregação das espécies em dois grupos, *Passiflora* e *Decaloba* que correspondem aos subgêneros *Passiflora* e *Plectostemma*, respectivamente, segundo a classificação de Killip (1938).

A única exceção foi *P. miersii*, uma espécie que pertence ao subgênero *Passiflora*, mas que foi agrupada juntamente com o grupo que contém as espécies do subgênero *Decaloba*. Esse agrupamento pode ser explicado por aspectos morfológicos que aproximam a série *Kermesinae* (*P. miersii*) do subgênero *Decaloba*, como a presença de opérculo plissado.

P. foetida foi agrupada com as espécies do subgênero *Decaloba*, porém esta pertence ao subgênero *Dysosmia*. Além da filogenia aqui apresentada, duas outras recentemente publicadas para *Passiflora* (Muschner et al., 2003; Yockteng & Nadot, 2004) mostraram que esse subgênero parece ser filogeneticamente mais relacionado às espécies do subgênero *Passiflora* que *Decaloba*. Contudo, a presença de flores pequenas salienta a proximidade

da Decaloba. Outro fato que revela essa proximidade é o número cromossômico $2n = 20$ ou 18 , também característico de *P. gracilis*, uma espécie de Decaloba seção Cieca (Bowden, 1945; Soares-Scott, 1998).

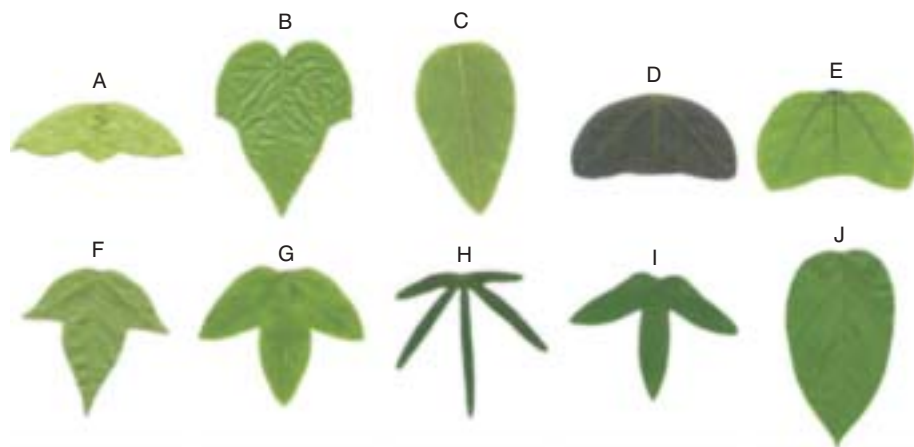


Figura 6. Espécies de *Passiflora* utilizadas no ensaio morfométrico: (a) *P. coriacea*, (b) *P. foetida*, (c) *P. miersii*, (d) *P. organensis*, (e) *P. pohlii*, (f) *P. suberosa*, (g) *P. amethystina*, (h) *P. caerulea*, (i) *P. gibertii* e (j) *P. maliformis*.

Fonte: Modificado de Plotze et al. (2005).

Esses resultados mostram que o subgênero *Dysosmia* (*P. foetida*, *P. chlatrata* e *P. palmeri*) parece ser intermediário entre Decaloba e Passiflora, mesmo apresentando um conjunto de características morfológicas únicas (Yockteng & Nadot, 2004) e número cromossômico igual a $2n = 20$, 18 ou 22 (Melo et al., 2001; Soares-Scott, 1998). Essa posição intermediária é também suportada pelos resultados de Melo & Guerra (2003) que mostram que *P. foetida* ($2n = 20$) apresenta quatro sítios 5S, enquanto em *Passiflora* são detectados apenas 2 desses sítios e em Decaloba 2, 4 ou 6 sítios. Neste mesmo trabalho, os 6 sítios 45S estão posicionados na região proximal dos cromossomos de *P. foetida*. No subgênero *Passiflora*, os sítios 4 ou 6, dependendo da espécie, estão situados em regiões subterminais, enquanto em algumas espécies de Decaloba, esses sítios estão situados na região proximal dos cromossomos.

O segundo grupo foi composto de espécies que pertencem exclusivamente ao subgênero *Passiflora*. É interessante notar que as espécies da série *Lobatae* (*P. amethystina*, *P. caerulea* e *P. gibertii*) formaram um agrupamento consistente dentro do grupo *Passiflora* no qual há grande variabilidade infra-específica, com ênfase para *P. caerulea*.

A despeito da variabilidade presente, as espécies formaram grupos altamente consistentes: as quatro amostras de cada espécie sempre se agruparam entre si, mostrando a eficácia do método em segregá-las corretamente (Figura 7).

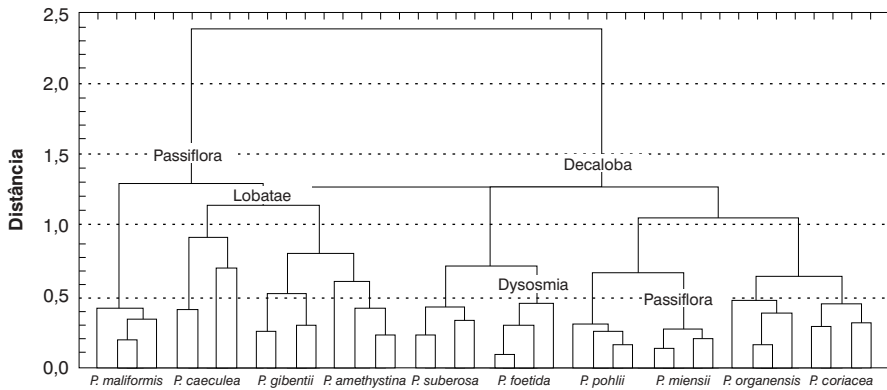


Figura 7. Agrupamento de 10 espécies de *Passiflora* segundo a sua morfometria foliar. Fonte: Plotze et al. (2005).

O dendrograma gerado dos dados morfométricos apresenta alta similaridade com a classificação botânica atualmente aceita para o gênero *Passiflora*. Esse aspecto mostra a eficácia do método e revela a presença de um conceito cladístico e filogenético, uma vez que a forma das folhas é muito bem descrita pela curva de dimensão fractal multiescala. Como a classificação botânica mostra-se correlacionada à caracterização das espécies por dimensão fractal multiescala, podem-se estimar distâncias genéticas entre as espécies analisadas e conseqüentemente correlacioná-las àquelas obtidas pelas diferenças encontradas entre as seqüências de DNA cloroplastidial. As análises mostraram que a correlação entre as topologias do dendrograma e

das árvores filogenéticas é bastante alta: 0,777 (p -valor = 0,004). Essa semelhança reflete-se também nas distâncias entre as espécies geradas de diferentes enfoques. Mesmo esta sendo apenas igual a 0,38, mostra-se significativa, com um p -valor de 0,018.

A eficiência do método pode ser facilmente verificada pela distinção entre duas espécies muito aparentadas e com formato de folha similar: *P. amethystina* e *P. gibertii*. A despeito da distinção, a proximidade filogenética entre elas fica igualmente evidenciada, pois o dendrograma mostra que elas são mais próximas entre si do que, individualmente, em relação à *P. caerulea* que, também, pertence à série Lobatae.

Algumas conclusões acerca do gênero *Passiflora* são destacadas a seguir:

- Os altos níveis de transferibilidade indicam uma distância genética não muito grande entre as espécies, mostrando que a diversificação do gênero ocorreu num passado recente;
- A atual classificação botânica, considerando-se os *taxa* supra-específicos, parece não refletir grupos monofiléticos;
- O subgênero *Dysosmia* abriga um conjunto de espécies com características únicas dentro do gênero, além de características intermediárias entre os dois principais subgêneros de *Passiflora*: *Decaloba* e *Passiflora*;
- A proposta de divisão do gênero em apenas quatro subgêneros é respaldada por observações filogenéticas, com fortes evidências de *Deidamioides* ser um desses subgêneros.

O dendrograma gerado da análise morfométrica revelou forte similaridade com a atual classificação botânica aceita para o gênero, demonstrando a eficiência do método, além de mostrar o apelo cladístico, uma vez que a forma das folhas e seu padrão de nervação foram eficazmente descritos pela curva de dimensão fractal multiescala;

Por refletir o relacionamento filogenético entre as espécies, as características foliares (formato e padrão de nervação) podem ser usadas em

estudos que utilizem informações sobre a ancestralidade de espécies, bem como em sistemática e ecologia.

Finalizando o item, cabe dizer que estudos de variabilidade populacional ou infra-específica são de extrema valia. Em *Passiflora*, do ponto de vista molecular, esse tipo de estudo tem sido realizado utilizando-se RAPD (Fajardo et al., 1998), padrão de sítios de restrição do cpDNA (Sánchez et al., 1999), isoenzimas (Segura et al., 2003) e AFLP (Segura et al., 2002). Marcadores microsatélites foram desenvolvidos por Oliveira et al. (2005) e Pádua et al. (2005) e tendem contribuir na caracterização da variabilidade genética disponível no gênero, pois essa classe de marcadores apresenta características muito favoráveis para estudos de diversidade.

Conclusões

São incontestes os ganhos na produção agrícola devido à adoção de práticas de seleção e hibridação. A intenção dos autores deste texto foi mostrar um conjunto de dados obtidos mais recentemente com tecnologias moleculares relacionados à geração (via transgenia e fusão celular) e exploração da variabilidade genética, mormente, de *Passiflora*.

A eficiência de um programa de melhoramento de maracujá (amarelo ou doce) será tanto maior quanto mais adequado for o método escolhido, como a seleção recorrente, por exemplo, e vai depender da escolha da população-alvo da seleção. A adoção de técnicas moleculares deverá acelerar o processo. Nós aqui recomendamos investimentos intelectuais (e financeiros) em genética aplicada ao melhoramento, em genômica e mapeamento de genes, pois são estratégias fundamentais no processo de geração de variedades melhoradas, '*em tempos modernos*'.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e às agências federais, CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro. Ao técnico de laboratório, Carlos Alberto de Oliveira, pelo inestimável apoio.

Referências bibliográficas

AHN, S. N.; TANKSLEY, S. D. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 7980-7984, 1993.

ALFENAS, P. F.; BRAZ, A. S. K.; TORRES, L. B.; SANTANA, E.; NASCIMENTO, V. S.; CARVALHO, M. G.; OTONI, W. C.; ZERBINI, F. M. Transgenic passion fruit expressing RNA derived from Cowpea aphid-borne mosaic virus is resistant to passion fruit woodiness disease. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 33-38, 2005.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FERNANDO, J. A.; MACHADO, S. R.; VIEIRA, M. L. C. Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais da organogênese in vitro do maracujazeiro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 387-407.

ASHWORTH, V. E. T. M.; KOBAYASHI, M. C.; CRUZ, M.; CLEGG, M. T. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers. **Scientia Horticulturae**, v. 101, p. 255-267, 2004.

BARBOSA, L. V.; VIEIRA, M. L. C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener + *P. amethystina* Mikan. **Euphytica**, v. 98, p. 121-127, 1997.

BECERRA, D. C.; FORERO, A. P.; GONGORA, G. A. Age and physiological condition of donor plants affect in vitro morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell Tissue And Organ Culture**, v. 79, p. 87-90, 2004.

BEJARANO, E. R.; LICHTENSTEIN, C. P. Expression of TGMV antisense RNA in transgenic tobacco inhibits replication of BCTV but not ACMV geminiviruses. **Plant Molecular Biology**, v. 24, p. 241-248, 1994.

BENSON, W. W.; BROWN, K. S.; GILBERT, L. E. Coevolution of plants and herbivores: passion flowers butterflies. **Evolution**, v. 29, p. 659-680, 1975.

BIASI, L. A.; FALCO, M. C.; RODRIGUEZ, A. P. M.; MENDES, B. M. J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola** v. 57, p. 661-665, 2000.

BOGS, J.; BRUCHMÜLLER, I.; ERBAR, C.; GEIDER, K. Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. **Phytopathology**, v. 88, p. 416-421, 1998.

BOSCARIOL, R. L. **Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. *Obseck*) com o gene *atacina A***. 2004. 137 f. Tese (Doutorado)- Centro de Energia Nuclear Aplicado à Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

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

BRAZ, A. S. K. **Clonagem e seqüenciamento dos genes da proteína capsidial e da replicase de um Potyvirus causador de endurecimento dos frutos do maracujazeiro, e transformação de maracujá-amarelo com construção derivada desses genes**. 1999. 106 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

CANCINO, G. O.; DAVEY, M. R.; LOWE, K. C.; POWER, J. B. Shoot regeneration from leaf and root explants of *Passiflora mollissima*. **Journal of Experimental Botany**, v. 49 (Suppl.), 65 (Abstract), 1998.

CARLIER, J. D.; REIS, A.; DUVAL, M. F.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; LEITÃO, J. M. Genetic maps of RAPD, AFLP and ISSR markers in *Ananas bracteatus* and *A. comosus* using the pseudo-testcross strategy. **Plant Breeding**, v. 123, p. 186-192, 2004.

CARMONA, M. J.; MOLINA, A.; FERNÁNDEZ, J. A.; LÓPEZ-FANDO, J.; GARCIA-OLMEDO, F. Expression of the β -thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. **Plant Journal**, v. 3, p. 457-462, 1993.

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**, v. 45, p. 670-678, 2002.

CASTRO, A. P. **Resistência à bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em maracujá amarelo via expressão da proteína heteróloga *Atacina A***. 2005. 151 f. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2005.

COLLINS, F. S. Positional cloning: let's not call it reverse any more. **Nature Genetics**, v. 1, p. 3-5, 1992.

CRUZ-HERNANDEZ, A.; WITJAKSONO, J.; LITZ, R. E.; GOMEZ-LIM, M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic avocado cultures and regeneration of somatic embryos. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 497-503, 1998.

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**, v. 58, p. 220-228, 2005.

DEGENER, O. **Flora Hawaiiensis: new illustrated flora of the Hawaiian Islands.** Honolulu: University of Hawaii Press, 1933. 400 p.

DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Tissue culture studies on species of *Passiflora* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 36, p. 211-217, 1994.

DORNELAS, M. C.; TAVARES, F. C. A.; OLIVEIRA, J. C.; VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* spp. **Plant Cell Reports**, v. 15. p.106-110, 1995.

DOUCLEFF, M.; JIN, Y.; GAO, F.; RIAZ, S.; KRIVANEK, A. F.; WALKER, M. A. A genetic linkage map of grape, utilizing *Vitis rupestris* and *Vitis arizonica*. **Theoretical Applied Genetics**, v. 109, p. 1178-1187, 2004.

DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 26, p. 23-27, 1991.

DREW, R. A. Micropropagation of *Passiflora* species (Passionfruit). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry: high-tech and micropropagation V.** Berlin: Springer Verlag, 1997. p.135-149.

DUNWELL, J. M. Transgenic approaches to crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 487-496, 2000.

DÜRING, K. Genetic engineering for resistance to bacteria in transgenic plants by introduction of foreign genes. **Molecular Breeding**, v. 2, p. 297-305, 1996.

FAJARDO, D.; ANGEL, F.; GRUM, M.; THOME, J.; LOBO, M.; ROCA, W.; SÁNCHEZ, I. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. **Euphytica**, v. 101, p. 341-347, 1998.

FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passion fruit by axillary bud proliferation. **Hortscience**, v. 32, p. 1276-1277, 1997a.

FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. *In vitro* control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **In Vitro Cell Developmental Biology-Plant**, v. 33, p. 209-212, 1997b.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília, DF: Embrapa Cenargen, 1996. 220 p.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. A new infrageneric classification of *Passiflora*. **Passiflora**, v. 14, p. 34-38, 2004.

FISCHOFF, D. A.; BOWDISH, K. S.; PERLAK, F. J.; MARRONE, P. G.; McCORMICK, S. M.; NIEDERMEYER, J. G.; DEAN, D. A.; KUSANO-KRETZMER, K.; MAYER, E. J.;

ROCHESTER, D. E.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Bio/Technology**, v. 5, p. 807-813, 1987.

FLORACK, D.; ALLEFS, S.; BOLLEN, R.; BOSCH, D.; VISSER, B.; STIEKEMA, W. Expression of giant silkmoth cecropin B genes in tobacco. **Transgenic Research**, v. 4, p. 132-141, 1995.

FRUTOS, R.; RANG, C.; ROYER, M. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, p. 227-276, 1999.

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

HALDANE, J. B. S. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. **Journal of Genetics**, v. 8, p. 299-309, 1919.

HALL, R. M.; DREW, R. A.; HIGGIN, C. M.; DIETZGEN, R. G. Efficient organogenesis of an Australian passionfruit hybrid (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. **Australian Journal of Botany**, v. 48, p. 673-680, 2000.

HELLWALD, K. -H.; PALUKAITIS, P. Viral RNA serves as a potential target for two independent mechanisms of replicase-mediated resistance against cucumber mosaic virus. **Cell**, v. 83, p. 937-946, 1995.

HUANG, B. H.; YANG, Y. S.; WENG, S. W.; CHEN, B. S.; CHANG, C. A.; CHEN, Y. W.; CHANG, L. R. Study on the growth of passion fruit tissue culture plants. **Taichung District Agricultural Improvement Station**, v. 38 (Special Publication), p. 301-311, 1997.

IMLER, J. -L.; BULET, P. Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 86, p. 1-21, 2005.

ISUTSA, D. K. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae**, v. 99, p. 395-400, 2004.

JAMES, C. Situação global das lavouras geneticamente modificadas (GM): 2004. **ISAAA Briefs**, v. 32, p. 42, 2004.

JAMES, D. J.; PASSEY, A. J.; BARBARA, D. J.; BEVAN, M. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 658-661, 1989.

JASRAI, Y.T.; MUDGIL, Y. Direct shoot regeneration from cultured leaves of *Passiflora caerulea* L. and field performance of regenerated plants. **Phytomorphology**, v. 49, p. 289-293, 1999.

JONES, E. S.; MAHONEY, N. L.; HAYWARD, M. D.; ARMSTEAD, I. P.; JONES, J. G.; HUMPHREYS, M. O.; KING, I. P.; KISHIDA, T.; YAMADA, T.; BALFOURIER, F.; CHARMET, G.; FORSTER, J. W. An enhanced molecular marker based genetic map of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) reveals comparative relationships with other Poaceae genomes. **Genome**, v. 45, p. 282-295, 2002.

JAUHAR, P. P.; CHIBBAR, R. N. Chromosome-mediated and direct gene transfers in wheat. **Genome**, v. 42, p. 570-583, 1999.

KANEYOSHI, J.; KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, Y.; SHIGEMOTO, N.; DOI, Y. A simple and efficient gene-transfer system of trifoliolate orange (*Poncirus-trifoliata*). **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 541-545, 1994.

KANG, D.; LUNSTROM, A.; STEINER, H. *Trichoplusa ni attacinA*, a differentially displayed insect gene coding for an antimicrobial protein. **Gene**, v. 174, p. 245-249, 1996.

KANTHARAJAH, A. S.; DODD, W. A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). **Annals of Botany**, v. 65, p. 337-339, 1990.

KAWATA, K.; USHIDA, C.; KAWAI, F.; KANAMORI, M.; KURYAMA, A. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. **Journal of Plant Physiology**, v. 147, p. 281-284, 1995.

KENIS, K.; KEULEMANS, J. Genetic linkage maps of two apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.) based on AFLP and microsatellite markers. **Molecular Breeding**, v. 15, p. 205-219, 2005.

KIJAS, J. M.; FOWLER, J. C.; GARBETT, C. A.; THOMAS, M. R. Enrichment of microsatellites from the *Citrus* genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. **Biotechniques**, v. 16, p. 656-662, 1994.

KILLIP, E. P. The American species of Passifloraceae. **Field Museum of Natural History, Botanical Series**, v. 19, p. 1-613, 1938.

KOZIEL, M. G.; BELAND, G. L.; BOWMAN, C. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Bio/Tecnology**, v. 11, p. 194-200, 1993.

LAMBERT, C.; TEPFER, D. Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create transgenic apple trees having an altered organogenic response to hormones. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, p. 105-109, 1992.

LAPIDOT, M.; GAFNEY, R.; DING, B.; WOLF, S.; LUCAS, J.; BEACHY, R. A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. **The Plant Journal**, v. 4, p. 959-970, 1993.

LIU, B. H. **Statistical genomics**. New York: CRC Press, 1998, 610 p.

LOPES, R. **Mapas de ligação AFLP e identificação de genes de resistência à *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em maracujá amarelo**. 2003. 115 f. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2003.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; CARNEIRO, M. S. C.; MATTA, F. P.; CAMARGO, L. E. A.; VIEIRA, M. L. C. AFLP linkage analysis and mapping of resistance genes to *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in yellow passion fruit. **Genome**, 2006. In press.

LORENZ-LEMKE, A. P.; MUSCHNER, V. C.; BONATTO, S. L.; CERVI, A. C.; SALZANO, F. M.; FREITAS, L. B. Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (*Passifloraceae*) based on ITS (nrDNA) variation. **Annals of Botany**, v. 95, p. 799-806, 2005.

MA, H.; MOORE, P. H.; LIU, Z.; KIM, M. S.; YU, Q.; FITCH, M. M. M.; SEKIOKA, T.; PATERSON, A. H.; MING, R. High-density linkage mapping revealed suppression of recombination at the sex determination locus in papaya. **Genetics**, v. 166, p. 419-436, 2004.

MACHADO, M. L. C.; MACHADO, A. C.; HANZER, V.; WEISS, H.; REGNER, F.; STEINKELLNER, H.; MATTANOVICH, D.; PLAIL, R.; KNAPP, E.; KALTHOFF, B.;

KATINGER, H. Regeneration of transgenic plants of *Prunus armeniaca* containing the coat protein gene of Plum Pox Virus. **Plant Cell Reports**, v. 11, p. 25-29, 1992.

MALIEPAARD, C.; ALSTON, F. H.; VAN ARKEL, G.; BROWN, L. M.; CHEVREAU, E.; DUNEMANN, F.; EVANS, K. M.; GARDINER, D. G. P.; VAN HEUSDEN, A. W.; JANSE, J.; LAURENS, F.; LYNN, J. R.; MANGANARIS, A. G.; DEN NIJS, A. P. M.; PERIAM, N.; RIKKERINK, E.; ROCHE, P.; RYDER, C.; SANSVINI, S.; SCHMIDT, H.; TARTARINI, S.; VERHAEGH, J. J.; VRIELINK-VAN GINKEL, M.; KING, G. J. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 60-73, 1998.

MANDERS, G.; OTONI, W. C.; d'UTRA VAZ, F. B.; BLACKHALL, N. W.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* fv *flavicarpa* Degener) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 697-702, 1994.

MANTE, S.; MORGENS, P. H.; SCORZA, R.; CORDTS, J. M.; CALLAHAM, A. M. *Agrobacterium*-mediated transformation of plum (*Prunus domestica* L.) hypocotyl slices and regeneration of transgenic plants. **Bio/Technology**, v. 9, p. 853-857, 1991.

MARTIN, F. W.; NAKASONE, H. Y. The edible species of *Passiflora*. **Economical Botany**, v. 24, p. 333-343, 1970.

MARTIN, G. B.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; CHUNNWONGSE, J.; FRARY, A.; GANAL, M. W.; SPIVEY, R.; WU, T.; EARLY, E. D.; TANKSLEY, S. D. Map-based cloning of a

protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science**, v. 262, p. 1432-1435, 1993.

MATTA, F. P. Mapeamento de QTL para *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). 2005. 230 f. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2005.

MCGARVEY, P. B.; KAPER, J. M. Transgenic plants for conferring virus tolerance: satellite approach. In: KUNG, S. D.; WU, R. **Transgenic Plants**. New York: Academic Press, 1993. p. 277-296.

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

MELO, N. F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, v. 92, p. 1-8, 2003.

MIR, L. **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004. 1114 p.

MOHAMED, M. E.; HICKS, R. G. T.; BLAKESLEY, D. Shoot regeneration from mature endosperm of *Passiflora foetida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 46, p. 161-164, 1996.

MONTEIRO, A. C. B.; HIGASHI, E. N.; GONÇALVES, A. N.; RODRIGUES, A. P. M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*). **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v. 36, p. 527-531, 2000b.

MONTEIRO, A. C. B.; NAKASAWA, G. T.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUES, A. P. M. Regeneração in vitro de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agrícola**, v. 57, p. 571-573, 2000a.

MONTEIRO, M. **Transformação genética de maracujá amarelo visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae***. 2005. 134 f. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2005.

MOORE, G. A.; JACOMO, C. C.; NEIDIGH, J. L.; LAWRENCE, S. D.; CLINE, K. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus* stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v. 11, p. 238-242, 1992.

MORAES, M. C. **Mapas de ligação e mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*) em maracujá-amarelo**. 2005. 144 f. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2005.

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**, v. 40, 2005. In press.

MULLINS, M. G.; TANG, F. C. A.; FACCIOTTI, D. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevines: transgenic plants of *Vitis rupestris* Scheele and buds of *Vitis vinifera* L. **BioTechnology**, v. 8, p. 1041-1045, 1990.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

MUSCHNER, V. C.; LORENZ, A. P.; CERVI, A. C.; BONATTO, S. L.; SOUZA-CHIES, T. T.; SALZANO, F. M.; FREITAS, L. B. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany**, v. 90, p. 1229-1238, 2003.

NAKAMURA, Y.; KOBAYASHI, S., NAKAJIMA, I. *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration from hypocotyls segments of Japonese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb). **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 435-440, 1998.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 331-333, 2005a.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; CONSOLI, L.; MUNHOZ, C. F.; MARGARIDO, G. R. A.; GARCIA, A. A. F.; FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Desenvolvimento de marcadores microssatélites em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) com base em uma biblioteca genômica enriquecida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Genética, 2005b. 1 CD ROM.

OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Genetic linkage maps of 'Pêra' sweet orange and 'Cravo' mandarin with RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 159-165, 2004.

OTAHOLA, V. Regeneración de plantas de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) a partir del cultivo *in vitro* de discos de hojas. **Bioagro**, v. 12, p. 71-74, 2000.

OTONI, W. C.; BLACKHALL, N. W.; D'UTRA VAZ, F. B.; CASALI, V. W.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Somatic hybridization of the *Passiflora* species, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener, and *P. incarnata* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 46, p. 777-785, 1995.

PÁDUA, J. G. **Análises genéticas de espécies do gênero *Passiflora* L. com base em abordagens filogenéticas, morfométricas e em marcadores microssatélites.** 2004. 112 f. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2004.

PÁDUA, J. G.; OLIVEIRA, E. J.; ZUCCHI, M. I.; OLIVEIRA, G. C. X.; CAMARGO, L. E. A.; VIEIRA, M. L. C. Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: Passifloraceae). **Molecular Ecology Notes**. Disponível em: < <http://www.blackwell-synergy.com/action/doSearch>>. Acesso em: 2 ago. 2005.

PASSOS, I. R. S. **Comportamento *in vitro* em *Vitis* spp. e em *Passiflora nitida* H.B.K.** Piracicaba, 1999, 112 f. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1999.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J. A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v. 14, p. 616-619, 1995a.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J. A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, v. 104, p. 183-191, 1995b.

PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E.; OCHOA-ALEJO, N. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed tissues. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 591-596, 1998.

PERLAK, F. J.; DEATON, R. W.; ARMSTRONG, T. O.; FUCHS, R. L.; SIMS, S. R.; GREENPLATE, J. T.; FISCHOFF, D. A. Insect resistant cotton plants. **Bio/Technology**, v. 8, p. 939-943, 1990.

PLOTZE, R. O.; FALVO, M.; PÁDUA, J. G.; BERNACCI, L. C.; VIEIRA, M. L. C.; OLIVEIRA, G. C. X.; BRUNO, O. M. Leaf shape analysis using the multiscale Minkowski fractal dimension, a new morphometric method: a study with *Passiflora* (Passifloraceae). **Canadian Journal of Botany**, v. 83, p. 287-301, 2005.

POPE, W.T. The edible passion fruit in Hawaii. **Hawaii Agricultural Experimental Station Bulletin**, v. 74, p. 1-22, 1935.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 209-245, 1996.

QUECINI, V. M.; VIEIRA, M. L. C. Plantas transgênicas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. de; AZEVEDO, J. L. de. (Coord.). **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. p. 279-331.

RAFALSKI, J. A.; MORGANTE, M.; VOGEL, J. M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plant. In: BIRREN, B.; LAI, E. (Ed.). **Nonmammalian genomes: a practical guide**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 75-134.

REIS, L. B.; PAIVA NETO, V. B.; TOLEDO PICOLI, E. A.; COSTA, M. G. C.; RÊGO, M. M.; CARVALHO, C. R.; FINGER, F. L.; OTONI, W. C. Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 39, p. 618-622, 2003.

REYNOIRD, J. P.; MOURGUES, F.; NORELLI, J.; ALDWINCKLE, H. S.; BRISSET, M. N.; CHEVREAU, E. First evidence for improved resistance to fire blight in transgenic pear expressing the *attacinE* gene from *Hyalophora cecropia*. **Plant Science**, v. 149, p. 23-31, 1999.

RIAZ, S.; DANGL, G. S.; EDWARDS, K. J.; MEREDITH, C. P. A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. **Theoretical Applied Genetics**, v. 108, p. 864-872, 2004.

RITSCHHEL, P. S.; LINS, T. C. L.; TRISTAN, R. L.; BUSO, G. S. C.; BUSO, J. A.; FERREIRA, M. E. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.) **BMC Plant Biology**, v. 4, p. 9-23, 2004.

RISTERUCCI, A. M.; GRIVET, L.; N'GORAN, J. A. K.; PIERETTI, I.; FLAMENT, M. H.; LANAUD, C. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. **Theoretical Applied Genetics**, v. 101, p. 948-955, 2000.

RUGINI, E.; MARIOTTI, D.; PELLEGRINESHI, A.; MENCUCCINI, M. Increase of rooting ability in the wood species kiwi (*Actinidia deliciosa* A. Chev.) by transformation with *Agrobacterium rhizogenes rol* gene. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 291-295, 1991.

SÁNCHEZ, I.; ANGEL, F.; GRUM, M.; DUQUE, M. C.; LOBO, M.; TOHME, J.; ROCA, W. Variability of chloroplast DNA in the genus *Passiflora* L. **Euphytica**, v. 106, p. 15-26, 1999.

SANTOS, S. C.; RUGGIERO, C.; SILVA, C. L. S. P.; LEMOS, E. G. M. A microsatellite library for *Carica papaya* L. cv. Sunrise Solo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, p. 263-267, 2003.

SEGURA, S. D.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; BOHORQUEZ, A.; OLLITRAULT, P.; TOHME, J. An AFLP diversity study of the genus *Passiflora* focusing on subgenus *Tacsonia*. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 49, p. 111-123, 2002.

SEGURA, S. D.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; OCAMPO, N. C. H.; OLLITRAULT, P. Isozyme variation in *Passiflora* subgenera *Tacsonia* and *Manicata*. Relationships between cultivated and wild species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, p. 417-427, 2003.

SILVA, M. B. **Transformação genética de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) mediada por *Agrobacterium tumefaciens***. 1998. 45 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

SILVA-FILHO, M. C. One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. **Current opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 589-595, 2003.

SILVA-FILHO, M. C.; FALCO, M. C. Plantas transgênicas no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 1011-1056.

SMIGOCKI, A. C.; HAMMERSCHLAG, F. A. Regeneration of plants from peach embryo cells infected with a shooty mutant strain of *Agrobacterium*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 116, p. 1092-1097, 1991.

SOARES-SCOTT, M. D. **Caracterização citogenética de algumas espécies e híbrido interespecíficos de *Passiflora***. 1998. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

STAUB, J. E.; SERQUEN, F. C.; GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience**, v. 31, p. 729-740, 1996.

STENGER, D. C. Strain-specific mobilization and amplification of a transgenic defective-interfering DNA of the geminivirus beet curly top virus. **Virology**, v. 203, p. 397-402, 1994.

STEWART, C. N.; ADANG, M. J.; ALL, J. N.; RAYMER, P. L.; RAMACHANDRAM, S.; PARROTT, W. A. Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIac gene. **Plant Physiology**, v. 112, p. 115-120, 1996.

TAKAHASHI, E. K. **Transferência do gene atacinaA para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística**. 2002. 137 f. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2002.

TANKSLEY, S. D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v. 27, p. 205-33, 1993.

TESTOLIN, R.; HUANG, W. G.; LAIN, O.; MESSINA, R.; VECCHIONE, A.; CIPRIANI, G. A kiwifruit (*Actinidia* spp.) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers. **Theoretical Applied Genetics**, v. 103, p. 30-36, 2001.

TREVISAN, F. **Resistência ao vírus *Passion fruit woodiness virus* em maracujá transgênico expressando a capa protéica do vírus**. 2005. Dissertação (Mestrado)- Centro de Energia Nuclear Aplicado à Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

TREVISAN, F.; MENDES, B. M. J. Optimization of *in vitro* organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Scientia Agricola**, v. 62, p. 346-350, 2005.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. **Passiflora Passionflowers of the World**. Portland: Timber Press, 2004. 432 p.

VANDERPLANK, J. **Passion Flowers**. Cambridge: The MIT Press, 1996. 224 p.

VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS, M. C. Regeneration of plants from protoplasts of *Passiflora* species (Passion Fruit). In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: plant protoplasts and genetic engineering VII**. Berlin: Springer Verlag, 1996. p. 108-119.

VIEIRA, M. L. C.; CARNEIRO, M. S. Passifloraceae *Passiflora* spp. Passionfruit. In: LITZ, R. (Ed.). **Biotechnology of Fruit and Nut Crops**. Orfordshire: CAB International, 2004. p. 436-453.

WANG, G. L.; SONG, W. Y.; RUAN, D. L.; SIDERIS, S.; RONALD, P. C. The cloned gene, *Xa21*, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates in transgenic plants **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 9, p. 850-855, 1996.

WANG, Z.; WEBER, J. L.; ZHONG, G.; TANKSLEY, S. D. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 1-6, 1994.

WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)n (dG-dT)n polymorphisms. **Genomics**, v. 7, p. 524-530, 1990.

WEGENER, C.; BARTLING, S.; OLSEN, O.; WEBER, J.; VON WETTSTEIN, D. Pectatelyase in transgenic potatoes confers pre-activation of defense against *Erwinia carotovora*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 359-376, 1996.

WEISSENBACH, J.; GYAPAY, G.; DIB, C.; VIGNAL, A.; MORISETTE, J.; MILLASEAU, P.; VAYSSEIX, G.; LATHROP, M. A second-generation linkage map of the human genome. **Nature**, v. 359, p. 794-801, 1992.

WILLIAMS, S.; FRIEDRICH, L.; DINCHER, S.; CAROZZI, N.; KESSMAN, E.; RYALS, J. Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis* delta endo-toxin expression in transgenic plants. **Bio/Technology**, v. 7, p. 194-200, 1993.

YOCKTENG, R.; NADOT, S. Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (*ncpGS*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 31, p. 379-396, 2004.