



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

MARIELA ANALÍA SADER

**EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM
PASSIFLORA L. (PASSIFLORACEAE)**

Recife
2020

MARIELA ANALÍA SADER

**EVOLUÇÃO CAROTÍPICA EM
PASSIFLORA L. (PASSIFLORACEAE)**

Tese apresentada por Mariela Analía Sader
ao Programa de Pós-graduação em Biologia
Vegetal da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Doutor
em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Florística e
Sistemática

Orientador: Prof. Andrea Pedrosa-Harand (Depto.Botânica, UFPE)

Recife

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, RB4/1752

Sader, Mariela Analía

Evolução cariotípica em *Passiflora* L. (Passifloraceae) / Mariela Analía Sader - 2020.

135 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Andrea Pedrosa-Harand

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. Recife, 2020.

Inclui referências, apêndice e anexo.

1. Maracujá 2. Displóidias 3. Evolução cariotípica
I. Pedrosa-Harand, Andrea (Orientador) II. Título

583.626 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-128

MARIELA ANALÍA SADER

“EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM *PASSIFLORA* L. PASSIFLORACEAE)”

Tese apresentada por Mariela Analía Sader ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal .

Aprovada em: 17/02/2020

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Andrea Pedrosa-Harand (Orientador) – UFPE

Prof. Dr. Marcelo dos Santos Guerra Filho – UFPE

Prof. Dra. Ana Christina Basileiro Vidal – UFPE

Dra. Mariana Alejandra Báez – INSA

Prof. Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira – USP

Dedico

Ao meu filho Emilio, meu amor maior, quem me inspira a viver e melhorar cada día...

A Pablo pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nas minhas ausências mesmo presente, e nos momentos de incerteza, muito comuns na nossa vida...

Aos meus pais, Nancy e Anibal, e irmãos, Dianela e Hernán, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim...

Agradeço pela paciência e compreensão com minha ausência durante todos esses anos...

Muitíssimo obrigada.

Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.

AGRADECIMIENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que colaboraram para que este, meu sonho, se torne realidade.

Especialmente:

À minha família, **Pablo** e **Emilio**, pelo apoio constante, por suportar todos os sacrifícios necessários para chegar aqui.

Aos meus pais, **Anibal** e **Nancy**, por sempre me ajudarem, por me encorajarem a estudar e respeitar sempre minhas "loucuras", mesmo sem entender o que faço, ou para que serve tudo isso!

Aos meus irmãos **Dianela** e **Hernán** e aos meus cunhados, **Cecilia** e **Rodrigo**, pelas ajuda constante, sempre presentes mesmo à distância, suas visitas, tornaram a nossa estadia aqui em Recife mais leve.

À minha Mãe acadêmica, **Andrea**, por me aceitar trabalhar, mesmo sabendo que com uma criança teria mais “pedras no caminho”, por sua eterna paciência e por respeitar sempre meus tempos. Você sempre será meu guia neste caminho.

A **Marcelo Guerra**, por sempre me ensinar tudo, por sempre trazer minhas mudas quando ele viaja e por confiar em mim para trabalhar com ele.

A **Gustavo**, **Karol** e **Jão**, por serem nossos amigos e por estarmos quando precisamos deles. Gustavo, obrigado pelo seu positivismo e seu entusiasmo, ;como sempre!

A **Magdalena**, **Paola** e à **Universidade da República** por me receberem em Montevideú, sempre com boa disposição.

Para **Mariana** e **Iara**, por toda a ajuda desde o começo, quando chegamos em Recife, nos receberam em sua casa e nossa amizade só cresce a cada dia.

A **Amalia** pela sua amizade, por suas conversas e conselhos, por estar sempre presente. Obrigada principalmente por me emprestar seu computador para que eu possa finalizar esta tese.

A **Yennifer**, por ser uma amiga de verdade, por sua sinceridade, pela sua ajuda, especialmente nestos últimos días.

A **Bruno Amorim**, por ser aquele amigo que está sempre, mesmo à distância. Obrigada também por me ensinar filogenias!

A **Herberth**, por sua amizade, ajuda com Emilio, com o computador e sempre que precisarmos.

Para o laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal: **Gustavinho**, **Jéssica**, **Géssica**, **Amandão**, **Amandinha**, **Lamonier**, **Marianita**, **Amalia**, **Brena**, **Sandra**, **Thalitha**, **Ribeiro**, **Espositão**, **Paulo**, **Erton**, **Marcus**, **André**, **Fernanda**, **Bruna**, **Claudio**, **Daniela**, **Ana**, **Duda**, **Rayssa**, **Karol**, **Lucas**, **Yhanndra**, **Natalia**.

Para toda a rede de apoio que criamos ao redor quando temos filhos e precisamos de alguém para cuidar deles para conseguir trabalhar, são muitas pessoas ao longo desses anos: **Dishita, Salima e Antonio, Laudenir, Fernanda, Cynthia, Tia Lala, Mariana, Yennifer, Herberth, Brena, Bruna, Rayssa, Erton, Fernando Roa**, todo o **LabCito**.

Para os colaboradores do projeto, porque sem eles não seria possível este trabalho: **Maria Lucia Carneiro Vieira, Helene Bergues, Nataniel Melo, Jardim Botânico de Recife, Nilton Junqueira, Daniela Imig, Luiz Augusto Cauz, Carla Munhoz e Zirlane Portugal**.

A todos os meus “filhos” do laboratório (**Bruna, Claudio, Erton, Thales, Yennifer, Yhanndra**) e àqueles que me confiaram outros trabalhos (**Edlley e Rayanne**) por me darem a oportunidade de aprender coisas novas e trabalhar com eles.

Aos órgãos de fomento (FACEPE, Propesq, CNPq), e a minha família Mami, Papi, Hernán e Dianela pelo financiamento de minha pesquisa e meus estudos.

À Universidade (**UFPE**), à Pós-graduação **PPGBV**, e especialmente aos secretários **Hildebrando, Soraya e Felipe**, pela ajuda e por facilitar a nossa rotina.

Para todas as pessoas que estão presentes na minha vida, mesmo à distância...

Obrigada a todos!

RESUMO

Passiflora L. (Passifloraceae) possui mais de 575 espécies distribuídas especialmente nos neotrópicos. As passifloras, também conhecidas como maracujás, são cultivadas como plantas frutíferas, ornamentais ou exploradas pelas suas propriedades medicinais. Uma grande variação no tamanho do genoma e números cromossômicos é observada no gênero, relacionada ao seus principais subgêneros. No entanto, o número básico de cromossomos (x) e os eventos responsáveis por essas variações cariotípicas permanecem controversos. O objetivo deste trabalho foi entender os principais mecanismos de evolução cariotípica do gênero *Passiflora* num contexto filogenético. Após a reconstrução filogenética e de número cromossômico, foi constatado que o gênero surgiu há 42,9 Mya, com diversificação no final do Paleogeno (Eoceno-Oligoceno). O número básico de cromossomos ancestral inferido foi $x = 6$, com uma alta diversificação de espécies no subgênero *Passiflora* (Mioceno) correlacionada a uma mudança cromossômica de $n = 6$ para $n = 9$ por disploidia ascendente. Esta diversificação do subgênero *Passiflora* também foi acompanhada por aumento do tamanho do genoma. A poliploidia, por outro lado, foi pouco frequente, observada nos subgêneros *Astrophea* e *Deidamioides*, e não levou a aumentos de diversificação. A análise comparativa da fração repetitiva em três espécies que representam o spectrum de variação de conteúdo de DNA do gênero identificou retrotransposons LTR como os mais abundante nos três genomas, mostrando uma variação considerável principalmente nos elementos Ty3/Gypsy/Tekay e Ty1/Copia/Angela. Os DNAs satélite (satDNAs) foram menos representativos, mostrando localização preferencial em regiões pericentroméricas ou proximais e subteloméricas. Enquanto os maiores genomas (do subgênero *Passiflora*) apresentaram maior acúmulo de Ty3/Gypsy/Tekay e Ty1/Copia/Angela, o menor genoma (do subgênero *Decaloba*) apresentou maior diversidade e abundância de satDNA. Em conjunto, a disploidia ascendente seguida de aumento no tamanho do genoma por amplificação de retrotransposons Angela e Tekay podem ter contribuído para características morfológicas e ecológicas que favoreceram uma diversificação mais rápida no subgênero *Passiflora*.

Palavras chave: Disploidias. DNAs satélite. Evolução cariotípica. Maracujá. Reconstrução filogenética. Retrotransposons.

ABSTRACT

Passiflora L. (Passifloraceae) has more than 575 species distributed especially in the neotropics. Passifloras, also known as passion fruit, are grown as fruit plants, ornamental or exploited for their medicinal properties. A great variation in the genome size and chromosomes number is observed in the genus, congruent with its main subgenera. However, its basic chromosomes number (x) and the events responsible for these karyotype variations remain controversial. The aim of this work was to understand the main mechanisms of karyotype evolution of the *Passiflora* genus in a phylogenetic context. After phylogenetic and chromosome number reconstruction, it was found that the genus appeared 42.9 Mya, with diversification at the end of the Paleogene (Eocene-Oligocene). The basic ancestral chromosomes number inferred was $x = 6$, with a high species diversification in the *Passiflora* subgenus (Miocene) correlated with a chromosomal change from $n = 6$ to $n = 9$ due to ascending dysploidy. This diversification in *Passiflora* subgenus was also accompanied by an increase in the genome size. Polyploidy, on the other hand, was infrequent, as in the subgenera *Astropheia* and *Deidamioides*, and did not lead to increases in diversification. A comparative analysis of the repetitive fraction in three species representing the spectrum of variation of DNA content of the genus identified LTR retrotransposons as the most abundant in the three genomes, showing considerable variation mainly in the elements Ty3/Gypsy/Tekay and Ty1/Copia/Angela. Satellite DNAs (satDNAs) were less representative, showing preferential location in pericentromeric or proximal and subtelomeric regions. While the largest genomes (*Passiflora* subgenus) presented the highest accumulation of Ty3/Gypsy/Tekay and Ty1/Copia/Angela, the smallest genome (*Decaloba* subgenus) showed greater diversity and abundance of satDNA. Together, ascending dysploidy followed by an increase in the genome size by amplification of retrotransposons Angela and Tekay may have contributed to morphological and ecological characteristics that favored faster diversification in the subgenus *Passiflora*.

Keywords: Dysploidy. Satellite DNAs. Karyotype evolution. Passion fruit. Phylogenetic reconstruction. Retrotransposons.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	RECONSTRUÇÃO DE CARACTERES ANCESTRAIS	11
2.2	EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA	13
2.2.1	Displóidia e Poliploidia	16
2.2.2	Evolução no tamanho do genoma	21
2.2.3	Sequências de DNA	24
2.2.4	A fração repetitiva do genoma	25
2.2.5	Distribuição cromossômica da fração repetitiva	27
2.3	O GÊNERO <i>PASSIFLORA</i> L.	28
2.3.1	Citogenética de <i>Passiflora</i>	30
3	RESULTADOS	36
3.1	LARGE VS SMALL GENOMES IN PASSIFLORA: THE INFLUENCE OF THE MOBILOME AND THE SATELLITOME	36
4	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA SYSTEMATICS AND BIODIVERSITY (A2).....	97
	ANEXO A - NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA PLANTA	135

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* (Passifloraceae), possui distribuição principalmente em regiões tropicais e subtropicais da América, África e Ásia, com aproximadamente 575 espécies (ULMER; MACDOUGAL, 2004). Com base em caracteres florais e vegetativos, o gênero foi tradicionalmente dividido em 22 subgêneros, no entanto, diferentes estudos filogenéticos baseados em marcadores plastidiais e nucleares, juntamente com caracteres morfológicos, leva a redução no número de subgêneros propostos para quatro (*Astrophea*, *Deidamioides*, *Decaloba* e *Passiflora*). Revisões subsequentes propuseram adicionar o subgênero *Tryphostemmatoides* (BUITRAGO; MACDOUGAL; COCA, 2018; MUSCHNER et al., 2012) e *Tetrapathea* (KROSNICK et al., 2009), com uma e três espécies cada respectivamente. As espécies do gênero apresentam uma ampla variação no tamanho e número cromossômico, sendo observados quatro grupos em relação ao número básico: $x = 6$, 9, 10 e 12. O número cromossômico básico $x = 6$ foi proposto como primário, sendo que $x = 9$, $x = 10$ e $x = 12$ foram considerados como secundários (MELO et al., 2001).

Dados sobre o conteúdo de DNA também estão disponíveis para várias espécies do gênero e mostram uma variação maior que 10 vezes, sendo de $1C = 0,212$ pg em *P. organensis*, subgênero *Decaloba*, a $1C = 2,680$ pg para *P. quadrangularis*, subgênero *Passiflora* (SOUZA et al., 2004; YOTOKO et al., 2011). A variação do tamanho do genoma está correlacionada positivamente com o tamanho das flores dentro deste gênero (YOTOKO et al., 2011). O gênero *Passiflora* é um excelente modelo de estudo para investigação do papel das mudanças cromossômicas na diversificação e expansão das espécies devido à sua ampla distribuição e variabilidade nas características morfológicas e citogenéticas.

O conteúdo desta tese está dividido em dois capítulos: o primeiro contém uma filogenia datada, com 102 espécies com números cromossômicos disponíveis. Foi feita uma reconstrução de números cromossômicos com varias abordagens e uma análise de taxas de diversificação no gênero. Este artigo foi publicado na revista *Systematics and Biodiversity*. No segundo capítulo, analisamos a fração repetitiva de três espécies de *Passiflora* com diferentes tamanhos genômicos. Este artigo será submetido à revista *Planta*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RECONSTRUÇÃO DE CARACTERES ANCESTRAIS

A utilização de filogenia molecular tem contribuído para o entendimento da direção de mudanças cromossômicas. A interpretação dos dados citogenéticos considerando as relações filogenéticas entre as espécies é fundamental para traçar a origem e evolução das mudanças cariotípicas envolvidas na diversificação das espécies (VAIO et al., 2013; COSTA et al., 2017; PÉREZ-ESCOBAR et al., 2017). A diversidade de dados citogenéticos pode ser usada para essas análises. A reconstrução de números cromossômicos para inferir eventos de poliploidia e disploidia têm demonstrado que disploidias descendentes, ou seja, diminuição do número cromossômico, são mais frequentes que as ascendentes, quando este número aumenta (GUERRA, 2008). Porém, um trabalho recente mostrou que as disploidias ascendentes são mais frequentes do que as descendentes, já que a disploidia seria menos desvantajosa que a poliploidia em termos de geração de linhagens persistentes a longo prazo, porque as transições displóides não implicam necessariamente alterações no conteúdo do DNA, mas apenas rearranjos estruturais do genoma (ESCUDERO et al., 2014).

Além do número cromossômico, as análises filogenéticas podem ser utilizadas para estudar os padrões de bandamento cromossômico, número e distribuição de sítios de DNA ribossomal, tamanho do genoma, entre outros (COSTA et al., 2017; VAN-LUME et al., 2017). Algumas dessas análises são feitas simplesmente comparando os dados citogenéticos com as relações entre as espécies presentes em uma árvore filogenética. Como foi realizado para *Passiflora*, utilizando dados de números cromossômicos “plotados” numa filogenia molecular (HANSEN et al., 2006). Uma outra opção é fazer a reconstrução de caracteres ancestrais utilizando métodos baseados em análises probabilísticas, o que têm permitido testar hipóteses de evolução cromossômica dentro de uma filogenia, reconstruindo os caracteres ancestrais como, por exemplo, número cromossômico (MORAES et al., 2015). A reconstrução de caracteres pode ser feita utilizando o programa Mesquite (MADDISON; MADDISON, 2008), o qual não é específico para números cromossômicos, ou por meio de ferramentas como o ChromEvol (MAYROSE, 2010; GLICK; MAYROSE, 2014), que é capaz de estimar o número cromossômico ancestral ao longo de cada ramo de uma filogenia, levando em consideração mecanismos como poliploidia e disploidia. Além disso, é possível incluir tamanho genômico nessas análises utilizando acessórios como a ferramenta phytools do R, que possibilita a reconstrução do tamanho do genoma das espécies.

Para o gênero *Passiflora* existem dois trabalhos de reconstrução de número

cromossômico, ambos utilizando a filogenia de HANSEN et al. (2006). O primeiro deles teve como objetivo testar se, a topologia das árvores filogenéticas influenciava nos resultados da reconstrução utilizando vários gêneros. Para *Passiflora*, os autores observaram que o número básico ancestral variou a depender do método utilizado, obtendo $x = 6$ e $x = 12$ em árvores ultramétricas (em que é pressuposta uma taxa constante - ou seja, as distâncias a partir da raiz para cada ponta de ramo são iguais) e não ultramétricas (em que a taxa varia e as distâncias a partir da raiz para cada ponta de ramo são diferentes), respectivamente (CUSIMANO; RENNER, 2014). O segundo trabalho investigou o papel das disploidias e poliploidias e de possíveis alterações do tamanho do genoma associados à evolução das angiospermas (ESCUERO et al., 2014). Para isso, utilizaram 15 clados de angiospermas, entre eles *Passiflora*, e observaram que, para o gênero, a disploidia ascendente foi a força evolutiva atuante. Poliploides originados recentemente não conseguem persistir, sugerindo que a disploidia pode ter persistência comparativamente mais prolongada do que a poliploidia (ESCUERO et al., 2014).

Novas abordagens vêm sendo empregadas em estudos filogenéticos, o que tem permitido analisar e sugerir direções para mudanças cromossômicas. Por meio da combinação de dados cariotípicos e análises moleculares (BAKKER et al., 2000; MARTEL et al., 2004; ENKE; GEMEINHOLZER, 2008; STUESSY et al., 2011; COSTA et al., 2017), os estudos filogenéticos comparativos permitem inferir de maneira mais clara os eventos de hibridização ou mudanças nos números cromossômicos que levam à formação de novas espécies (MURRAY, 2002), em alguns casos, este tipo de estudo tem revelado tendências de evolução cromossômica não evidenciadas anteriormente. No gênero *Melampodium*, além de características morfológicas consideradas ancestrais, o número básico $x = 10$ era tido como ancestral, uma vez que era encontrado em mais de 50% dos representantes deste grupo (STUESSY, 2009). Análises filogenéticas moleculares, entretanto, permitiram reconstruir o estado cromossômico ancestral (plesiomórfico) e revelaram $x = 11$ como número mais provável, sendo os demais números resultantes de disploidias ascendentes ou descendentes (BLÖCH et al., 2009). Estas análises combinadas (filogenia molecular + citogenética) têm demonstrado também que as disploidias descendentes são mais frequentes que as ascendentes na maioria dos grupos de plantas analisados, embora, ambos casos tenham ocorrido durante a evolução, como em *Melampodium* (BAKKER et al., 2000; STUESSY et al., 2011; CUSIMANO et al., 2012).

Além dos números cromossômicos básicos ancestrais, as análises filogenéticas podem ser utilizadas para estudar a evolução nos padrões de bandamento cromossômico, bem como do número e distribuição dos sítios de DNA ribossomais 5S e 35S (MURRAY, 2002;

DOBIGNY et al., 2004). Mais recentemente, essas análises combinadas com estudos de tamanho do genoma em plantas sugeriram que o tamanho do genoma ancestral em plantas seria pequeno, mas tanto ganhos como perdas de DNA ocorreram ao longo da evolução, além de permitir reconhecer a direção das mudanças ocorridas. No caso da família Liliaceae há indícios de que o genoma ancestral fosse pequeno e que este, ao longo de sua evolução, teria sofrido grandes mudanças em alguns dos gêneros, tanto no sentido de aumento quanto a redução do tamanho do genoma (LEITCH et al., 2007).

Nas famílias *Araceae* e *Portulacaceae* (CUSIMANO et al., 2012; OCAMPO; COLUMBUS, 2012) estes modelos permitiram propor um número cromossômico básico maior do que esperado no primeiro caso e confirmar um daqueles anteriormente propostos para *Portulacaceae* família, além disso, eventos de poliploidia e disploidias foram identificados como recorrentes na evolução cariotípica das mesmas. Embora este método apresente algumas limitações, tais como em casos de múltiplos números cromossômicos para uma mesma espécie, bem como na inferência de eventos de poliploidia ímpar, ele representa uma forma rápida e relativamente simples de analisar números cromossômicos ancestrais e eventos cromossômicos ocorridos durante a evolução de espécies vegetais (ver GUERRA, 2012).

2.2 EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA

Os cromossomos são as unidades herdáveis dentro do núcleo das células dos eucariotos, cada um deles está representado por uma única molécula de DNA linear e de dupla fita que corresponde geneticamente a um grupo de ligação. Estas moléculas lineares permitem a acumulação de DNA (geralmente redundante), ocasionando a alta diversificação tanto qualitativa como quantitativa que é observada nos cromossomos de eucariotos. O uso de dados cariotípicos na taxonomia é conhecido como citotaxonomia e tem contribuído significativamente na determinação das relações genéticas entre espécies ou dentro de populações, tanto em plantas como em animais. A maioria dos estudos cromossômicos inclui a descrição do cariótipo, o qual se refere ao aspecto fenotípico do complemento cromossômico na metáfase mitótica. Na descrição do cariótipo de uma espécie, são consideradas diferentes características cromossômicas como morfologia, número, tamanho absoluto e relativo dos cromossomos, simetria cariotípica (determinada pela posição do centrômero e tamanho dos cromossomos), distribuição da heterocromatina e número e localização do DNAr, além do tamanho do genoma (LEVIN, 2002). Esses dados têm sido observados na maioria das espécies de plantas e animais, e 90% dessas espécies analisadas diferem no cariótipo (RIESBERG, 2001;

LAI et al., 2005).

A morfologia dos cromossomos está determinada pela posição da constrição primária, denominada centrômero, a qual subdivide o cromossomo em braços. Os braços cromossômicos podem ser de tamanho igual ou diferente e, dependendo da relação de ambos os braços, podem ser classificados em quatro tipos diferentes: metacêntrico, submetacêntrico, acrocêntrico e telocêntrico (GUERRA, 1986). As mudanças na morfologia dos cromossomos são, em geral, produzidas por rearranjos cromossômicos. Esses rearranjos podem ser na sequência do próprio DNA, na composição das proteínas relacionadas ou na morfologia, tamanho e número de cromossomos, todas estas características podem estar sujeitas a mudanças evolutivas e, portanto, diferir entre e dentro dos mais variados organismos (SCHUBERT, 2007). Um rearranjo resulta da união das extremidades de DNA livres diferentes, e dependendo do tipo, pode ocorrer mudança no tamanho e número de cromossomos, assim como alteração na ordem e combinação gênica nos grupos de ligação. Os rearranjos cromossômicos que mudam a morfologia cromossômica são as inversões pericêntricas, neste caso, as quebras ocorrem em ambos os lados do centrômero dos braços cromossômicos. Outros tipos de rearranjos cromossômicos envolvem mudanças na morfologia e no tamanho dos cromossomos. Nas translocações recíprocas são trocados segmentos cromossômicos entre dois cromossomos não homólogos enquanto nas translocações não recíprocas a troca de segmentos é unidirecional. Outros tipos de mudanças que podem afetar o tamanho e a morfologia são a perda (deleção), e a duplicação ou inserção de segmentos de DNA. As primeiras são mais toleradas naqueles organismos nos quais existem mais de duas cópias do genoma (poliploides) e nos casos que envolvem sequências dispensáveis. A segunda ocorre em geral por inserção de elementos transponíveis que, além de propiciar rearranjos cromossômicos, tem sido indicada como uma das principais causas para o aumento do tamanho do genoma entre diferentes organismos (SCHUBERT; LYSACK, 2011).

Os números cromossômicos variam amplamente nas plantas. O menor número conhecido é de $2n = 4$, descrito para espécies pertencentes a distintas famílias, sendo duas espécies de Poaceae, uma espécie de Hyacinthaceae, uma Cyperaceae e duas Asteraceae (BENNET, 1998). Por outro lado, os maiores números cromossômicos têm sido observados em *Ophioglossum reticulatum* (Pteridófita), com $2n = \text{ca. } 1200$, no gênero *Sedum* (Crassulaceae), com $2n = 640$ e na monocotiledônea *Voanioala gerardii* (Arecaceae), com $2n = \text{ca. } 596$. Vários grupos de plantas apresentam um número constante de cromossomos, como por exemplo, os gêneros *Lilium* e *Pinus*, nos quais todas as espécies apresentam $2n = 24$, a subfamília Aurantioideae da família Rutaceae com $2n = 18$ ou ainda nas famílias Magnoliaceae,

Bromeliaceae e Cactaceae, nas quais a maioria das espécies apresentam $2n = 38, 50$ e 22 , respectivamente (GUERRA, 2008; IPCN 2012 <http://www.tropicos.org/project/ipcn>). Embora vários grupos apresentem essa estabilidade no número de cromossomos, uma grande porcentagem de plantas apresenta mudanças geralmente relacionadas a diferenças taxonômicas e evolução desse grupo de organismos.

Um conceito fundamental em taxonomia relacionado com o número cromossômico, é o do número cromossômico básico (x). STUESSY (2009) o definiu como o menor número haploide de um grupo de taxa relacionados. Entretanto, segundo GUERRA (2008), o número cromossômico básico seria aquele que está presente na população inicial de um clado ou táxon e, portanto, cada espécie, gênero ou família teria um único número básico ancestral.

As mudanças cariotípicas ocorrem devido a mudanças estruturais que levam a adições e deleções de nucleotídeos, duplicações totais do genoma ou duplicação em pequenos blocos cromossômicos, além de hibridização interespecífica (SCHUBERT, 2007). As alterações cromossômicas podem ocorrer devido a mudanças na composição de DNA, como resultado de eventos de rearranjos primários e secundários. Os rearranjos primários ocorrem durante o mecanismo de reparo de DNA como inserções, deleções, duplicações, inversões e translocações recíproca, já os rearranjos secundários são recombinações homólogas entre regiões cromossômicas rearranjadas, que originam novos cariótipos (SCHUBERT; LYSAK, 2011). Uma forma de estudar essas mudanças, é a comparação de números cromossômicos ou na ordem de fragmentos cromossômicos entre as espécies por métodos como hibridização *in situ* fluorescente (FISH). A FISH permite usar uma sequência de DNA de interesse marcada com um fluorocromo ou molécula sinalizadora e, ao hibridiza-la no cromossomo, permite localizar as sequências mapeadas em relação à eucromatina, heterocromatina, centrômeros e telômeros, e permite também mapear clone a clone ao longo dos cromossomos. A FISH de BACs (cromossomos artificiais de bactérias - BACs) é especialmente indicada para construir mapas cromossômicos de espécies que apresentam um genoma pequeno, uma vez que BACs de espécies com grandes genomas frequentemente possuem sequências repetidas que inviabilizam o mapeamento das sequências únicas de interesse contidas nos mesmos (JIANG; GILL, 2006). A BAC-FISH é importante para realizar mapeamentos comparativos utilizando, individualmente ou em grupos, BACs marcadores de uma espécie em espécies próximas do gênero ou família (LYSAK et al., 2010; IOVENE et al., 2008; TANG et al., 2008; FONSÊCA; PEDROSA-HARAND, 2013). A utilização de BAC-FISH em *Brachypodium*, que também apresenta genoma sequenciado, demonstrou que a variação de número cromossômico dispoloide nesse gênero está principalmente associada a eventos de inserção cêntrica (IDZIAK et al., 2014), mecanismo até pouco tempo desconhecido em plantas e

demonstrado em estudos comparativos em gramíneas (MURAT et al., 2010). Com o sequenciamento do genoma completo em larga escala, é possível fazer análises comparativas entre genomas e detectar quebras de macro e microsintenia de forma ainda mais acurada (EICHLER, 2003; HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2011).

2.2.1 Disploidia e Poliploidia

Existem dois tipos de mudanças no número cromossômico que estão relacionados com a filogenia e a evolução cariotípica, as quais são a poliploidia e a disploidia, enquanto as aneuploidias não possuem implicações na evolução (GUERRA, 2000). A disploidia é uma mudança gradativa no número cromossômico haploide observado entre espécies evolutivamente próximas, esta mudança pode resultar no aumento ou na diminuição do número cromossômico, sendo denominadas disploidia ascendente e descendente, respectivamente. Essas mudanças têm como consequência a formação de uma série cromossômica (série disploide) e têm sido observadas em vários gêneros de plantas. Um exemplo bem estudado é o do gênero *Melampodium*, no qual existe uma série disploide $n = 9, 10, 11, 12, 14$, sendo um dos maiores padrões de variação dentro de Asteraceae. Análises moleculares recentes neste gênero têm mostrado que $x = 11$ seria o número cromossômico basal e, portanto, disploidia ascendente e descendente teriam ocorrido durante sua evolução (STUESSY et al., 2011).

Essas mudanças em número são devidas principalmente a translocações Robertsonianas, fissões centroméricas de cromossomos bibrâquiais (disploidia ascendente) ou fusões cêntricas dos braços longos de dois cromossomos acrocêntricos ou telocêntricos (disploidia descendente). Um exemplo disso ocorre no gênero *Nothoscordum*, com espécies apresentando $2n = 8$, todos metacêntricos, e $2n = 10$, com seis pares metacêntricos e dois acrocêntricos. Em outros casos, os mecanismos relacionados com a mudança de número não são claros e envolvem distintos tipos de reestruturações cromossômicas (SCHUBERT; RIEGER, 1985; SCHUBERT, 2007; SCHUBERT; LYSACK, 2011). As disploidias descendentes parecem ter sido mais frequentes durante a evolução das plantas (GUERRA, 2000).

Atualmente, o uso de técnicas mais especializadas, tanto citogenéticas como moleculares, têm possibilitado determinar com mais detalhe as diferentes reestruturações cromossômicas que levaram à mudança de número e ordem das mesmas. Na família Brassicaceae, estudos citogenéticos permitiram mostrar que as mudanças de números cromossômicos dentro da família foram4ew mais complexas do que apenas a ocorrência de simples translocações Robertsonianas. Os números cromossômicos em Brassicaceae variam desde $2n = 8$ até $2n = 256$ (LYSACK et al.,

2006). *Arabidopsis thaliana* (L.), Heynh. apresenta $2n = 10$ e este número representa um caráter derivado do ancestral do clado ao qual pertence ($n = 8$) e no qual podem ser encontrados também *A. lyrata* L. e *Capsella rubella* L. com $2n = 16$. Utilizando pintura cromossômica comparativa, LYSAK et al. (2006), determinaram que na redução do número cromossômico de *A. thaliana* para $n = 5$ estiveram envolvidos vários rearranjos cromossômicos que incluíram quatro inversões, duas translocações e três eventos de fusão cromossômica. No gênero *Brassica*, no entanto, as análises de MANDÁKOVÁ e LYSAK (2008) mostraram uma translocação entre dois cromossomos na origem de algumas espécies com $x = 7$ e que a redução de $x = 8$ para $x = 7$ teria ocorrido mais de uma vez na evolução do gênero, envolvendo diferentes inversões e fusões cromossômicas.

Muitos dos rearranjos ocorridos durante a evolução têm sido também detectados mediante a comparação de sequências de DNA em genomas completos montados. Por exemplo, LUO et al. (2009) demonstraram, mediante a análise de sintenia de determinadas regiões cromossômicas, que em Triticeae o número cromossômico básico $x = 7$ derivou de $x = 12$ pela inserção de quatro cromossomos nas regiões centroméricas de outros quatro cromossomos, além de um outro evento de fusão e translocação. Recentemente, o sequenciamento de duas espécies de *Solanum*, *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum*, e a comparação destes com o genoma de *S. tuberosum*, tem mostrado a existência de 11 inversões cromossômicas entre os genomas do tomate e da batata (The Tomato Genome Consortium, 2012).

Outra importante fonte de variação de número cromossômico é a poliploidia, a qual consiste na duplicação de todo o complemento cromossômico de uma espécie (WENDEL, 2000), sendo um evento importante para plantas, animais, fungos e protozoários, como vem sendo evidenciado por duplicações genômicas antigas que têm sido observadas nos genomas desses grupos. Nas angiospermas se acredita que entre 50 e 70% das espécies são poliploides, e se forem considerados os eventos antigos de duplicação essa porcentagem chega a 100% (MASTERSON, 1994; WENDEL, 2000; CUI et al., 2006, SOLTIS; SOLTIS, 2009).

Diferentes estudos têm sugerido que as espécies poliploides possuem uma maior adaptabilidade e um aumento da tolerância a diferentes condições ambientais, provavelmente devido à presença de maiores combinações de alelos disponíveis para a seleção, permitindo adaptações a mudanças drásticas ocorridas no ambiente (FAWCETT et al., 2009). Isso pode estar relacionado com alterações na morfologia, fenologia, fisiologia e ecologia que são inerentes à poliploidia e podem ocorrer em poucas gerações (LEVIN, 2002). Baseado nisso tem sido proposto que a poliploidia teria contribuído na sobrevivência, propagação e êxito evolutivo de várias linhagens de plantas durante os eventos de extinção que ocorreram entre o Cretáceo e Terciário (FAWCETT et al., 2009; SOLTIS; BURLEIGH, 2009).

Os poliploides podem ser classificados de duas formas diferentes resultando em quatro tipos principais: neopoliploides, paleopoliploides, alopoliploides e autopoliploides (GUERRA, 2008). Os conceitos de paleo e neopoliploide estão relacionados com o tempo de formação dos poliploides, entre aqueles de uma origem antiga e recente, respectivamente. Os paleopoliploides, são aqueles nos quais os ancestrais são desconhecidos ou estão extintos, sendo difíceis de caracterizar, mas análises de sequenciamento do genoma de plantas têm auxiliado na detecção dos eventos de paleopoliploidia, levando inclusive à constatação de que muitas espécies teriam sofrido uma ou mais duplicações do genoma durante a evolução. Por exemplo, o sequenciamento de *Arabidopsis thaliana* confirmou duas duplicações recentes compartilhadas com a linhagem das Brassicaceae e um terceiro evento provavelmente compartilhado com o resto das eudicotiledôneas (ver BARKER et al., 2009). Para o milho também foram detectadas duas duplicações genômicas antigas, uma no ancestral que deu origem às gramíneas e um outro evento mais recente na linhagem do milho (PATERSON et al., 2003). Eventos mais recentes de duplicação ocorreram no ancestral das solanáceas, nas leguminosas *Glycine* e *Medicago* e no ancestral comum ao gênero *Gossypium* (ver ADAMS; WENDEL, 2005). Por outro lado, os neopoliploides, por serem de origem recente, são mais fáceis de reconhecer e caracterizar (STEBBINS, 1971).

A outra forma de classificação da poliploidia está baseada na similaridade genética dos genomas envolvidos na origem do poliploide, sendo reconhecidos dois tipos principais, alo e autopoliploides (STEBBINS, 1971). Os alopoliploides são aqueles surgidos por hibridização interespecífica, em alguns casos intergenérica, enquanto os autopoliploides são originados a partir da autofecundação ou do cruzamento entre ou dentro de populações pertencentes a uma mesma espécie (SOLTIS; SOLTIS, 2000b), tradicionalmente tem sido aceito que a alopoliploidia seja a via mais frequente para a formação de poliploides em plantas (VEILLEUX, 1985; CARPUTO et al., 2003), embora análises recentes sugiram que autopoliploides também apresentem uma alta frequência na natureza (SOLTIS et al., 2007). Tanto em alo- quanto em autopoliploides a produção de gametas não reduzidos tem sido a via mais frequente para a formação do poliploide. A produção de gametas não reduzidos é uma condição herdada e governada por poucos genes e aumenta com o estresse ambiental o que pode favorecer a formação de poliploides durante mudanças climáticas (PARISOD et al., 2010).

A alopoliploidia é um dos mecanismos mais frequentes de especiação em angiospermas, sendo um dos principais responsáveis pela diversidade deste grupo de plantas. Na sua formação podem estar envolvidos gametas não reduzidos ou a hibridização pode ser seguida por duplicação somática, restaurando a fertilidade de um híbrido estéril. A maioria dos eventos

ocorre entre espécies filogeneticamente próximas e existem registros de aloploidos na maioria das famílias das angiospermas. Estes eventos de aloploidia podem ser extremamente recentes, em alguns casos surgindo nos últimos 150 anos, como observado em *Spartina anglica*, *Senecio cambrensis*, *Cardamine schultzii*, *Tragopogon mirus* e *T. miscellus* (ver referências em SOLTIS; SOLTIS, 2009). Um dos casos mais conhecidos e estudados é o evento de aloploidização que deu origem ao trigo, *Triticum aestivum*, aproximadamente 8.500 anos atrás (LEVY; FELDMAN, 2004). O mesmo surgiu a partir da hibridização entre uma espécie tetraploide e uma espécie diploide pertencentes aos gêneros *Triticum* e *Aegilops*, respectivamente (FELDMAN, 2001). Trigo, algodão e *Arabidopsis* teriam surgido a partir de um ou poucos eventos de hibridização. No entanto, para a maioria dos casos tem sido demonstrado que os aloploidos são formados através de múltiplas origens (SOLTIS; SOLTIS, 2009), e por cruzamentos recíprocos (diferentes combinações de citoplasma-núcleo, materno e paterno), como nos casos dos gêneros *Tragopogon* e *Brassica* (CHEN; NI, 2006). Esta formação recorrente que envolve, em geral, diploides geneticamente distintos, tem como consequência a produção de uma série de populações geneticamente diferentes, e o fluxo gênico entre essas populações independentes, pode permitir recombinação e formação de genótipos adicionais (SOLTIS; SOLTIS, 2000b).

Já os autopoliploides são caracterizados por uma redundância no genoma, pela presença de herança polissômica e pela formação de multivalentes durante a meiose (RAMSEY; SHEMAKE, 2002). Por essas razões, por muito tempo a autopoliploidia foi considerada como um evento raro e representando um “caminho sem saída” na evolução. Além disso, a autopoliploidia é mais difícil de ser detectada pois, em geral, os autopoliploides são morfológicamente similares aos progenitores diploides (SOLTIS et al., 2009). Entretanto, estudos recentes comprovaram que a frequência dos autopoliploides é maior do que foi considerada (SOLTIS et al., 2009; RAMSEY; SHEMAKE, 1998), sugerindo que a simples duplicação do genoma representa uma vantagem evolutiva (PARISOD et al., 2010).

Os eventos de poliploidização, tanto aloploidia como autopoliploidia, acarretam frequentemente em incompatibilidades em vários níveis, desde um desenvolvimento anormal e *fitness* reduzido até falhas na reprodução. Todas essas incompatibilidades têm que ser resolvidas no poliploide recente, de maneira a permitir a sua sobrevivência e seu estabelecimento e assegurar o êxito evolutivo a longo prazo (LIU et al., 2009). Os estudos citogenéticos foram os primeiros a mostrar o choque genômico e a instabilidade genômica nos híbridos e poliploides recém-formados (ver GAETA; PIRES, 2010). Um dos trabalhos pioneiros mostrou que rearranjos genômicos podem ocorrer imediatamente após a duplicação

genômica em alotetraploides sintéticos de *Brassica* (SONG et al., 1995), a partir desse trabalho, baseados em várias técnicas de análise, diversos pesquisadores têm mostrado que as mudanças genéticas e epigenéticas são uma consequência comum na pós-poliploidização, denominadas diploidização, tanto em eventos naturais como em artificiais (WENDEL, 2000; DOYLE et al., 2008; LEITCH; LEITCH, 2008). A resposta a cada evento de poliploidização, entretanto, parece ser diferente entre diferentes organismos e inclusive dentro de um mesmo taxa, podendo ser encontrado desde uma grande reestruturação do genoma até uma estase genômica, além disso, a resposta pode ser imediata ou ao longo de várias gerações, indicando que não existem regras que possam prever a reação do genoma a esses eventos (HUFTON; PANOPOULUS, 2009).

As mudanças no genoma dos poliploides têm sido explicadas por diferentes mecanismos, incluindo recombinação, ativação de elementos transponíveis, defeitos na meiose e mitose, alterações epigenéticas que levam a mudanças nos padrões de expressão, deleção de DNA, entre outros rearranjos cromossômicos (MADLUNG et al., 2005; HUFTON; PANOPOULUS, 2009). Em alopoliploides do gênero *Brassica* têm sido observados ganhos e perdas frequentes de marcadores moleculares nas primeiras gerações logo depois da poliploidização, indicando rearranjos genômicos, a maioria dos mesmos, parece ser devido à recombinação entre os cromossomos homoeólogos que resulta do pareamento meiótico irregular. No caso do trigo, os mecanismos envolvidos nas mudanças parecem ser diferentes, pois tanto em poliploides naturais como em sintéticos tem sido observada uma perda de DNA entre 5-15% em poucas gerações (LIU et al., 2009; QI et al., 2010). No caso do milho, aproximadamente a metade dos genes duplicados foram perdidos durante os 11 milhões de anos posteriores ao evento de poliploidia que deu origem ao progenitor dessa espécie (MESSING et al., 2004). A eliminação de DNA tem sido observada em outros poliploides como *Spartina* e *Tragopogon* (TATE et al., 2006; SALMON et al., 2005; LIM et al., 2008). Essa perda de DNA estaria relacionada com a manutenção ou estabelecimento de pareamento cromossômico em bivalentes durante a meiose e, portanto, seria mais prevalente nos alopoliploides do que nos autopoliploides (PARISOD et al., 2010). No caso de *Arabidopsis*, tem sido observada uma perda preferencial de algumas classes de genes. Por exemplo, aqueles genes envolvidos na transcrição e tradução de sinais têm sido mantidos, mas outros, como os relacionados com o reparo do DNA ou proteínas de organelas, têm sido preferencialmente perdidos (BLANC; WOLFE, 2004).

Além de rearranjos no genoma, podem ocorrer mudanças epigenéticas nos poliploides, as quais podem contribuir para aumentar a diversidade, plasticidade e heterose e gerar variação,

que pode permitir adaptações a novas condições (COMAI, 2005). As taxas e direção das mudanças genéticas e epigenéticas são influenciadas pelo modo de poliploidização (alopoliploidia ou autopoliploidia) (BEEST et al., 2012). Reorganizações epigenéticas e mudanças na expressão dos genes têm sido descritas para vários aloploidos (LIU; WENDEL, 2003; LEVY; FELDMAN, 2004; PAUN et al., 2006), mas não em autopolíptidos (PARISOD et al., 2009). Os aloploidos, portanto, parecem precisar de maiores modificações epigenéticas para reestabelecer a compatibilidade entre genomas divergentes (RIESBERG, 2001). Embora existam muitos exemplos de mudanças logo depois dos eventos de poliploidia, existem outros casos em que tais mudanças não têm sido observadas. Por exemplo, aloploidos sintéticos de *Gossypium* apresentam aditividade genômica dos parentais e uma estase epigenética, mostrando a diversidade de respostas à poliploidização entre diferentes organismos.

A diploidização inclui todas as respostas à poliploidia, tanto os efeitos genéticos como os epigenéticos, e ocorre diferencialmente em autopolíptidos e aloploidos (CIFUENTES et al., 2010). Isso porque, em geral, a duplicação do genoma seria um evento menos drástico que a união de dois genomas diferentes (CHEN; NI, 2006). Dessa forma, nos aloploidos formados pela união de genomas mais divergentes, é esperado que ocorram várias das mudanças descritas acima (DOYLE et al., 2008).

2.2.2 Evolução no tamanho do genoma

Cada espécie de planta possui um número específico de pares de bases de DNA em seu núcleo, o qual é referido como conteúdo de DNA nuclear ou tamanho do genoma. O conteúdo de DNA nuclear tanto em animais como em plantas foi durante muito tempo mensurado por meio da microdensitometria de Feulgen e na atualidade por citometria de fluxo. Na primeira, os núcleos, fixos numa lâmina e corados com o reativo de Schiff, tem seus conteúdos de DNA medidos ao microscópio óptico com base na quantidade de energia emitida. Ao passo que, na citometria de fluxo, os núcleos se encontram em solução e podem ser corados com diferentes fluorocromos. Neste caso é medida a intensidade da energia emitida quando os fluorocromos são excitados por um laser ou outra fonte de energia. Com o desenvolvimento destas técnicas muito mais rápidas e eficientes, um número cada vez mais alto de medições de conteúdo de DNA, em diferentes organismos, têm sido realizadas e os dados tem sido compilados em diferentes bases de dados para plantas (<http://data.kew.org/cvalues>).

Embora o conteúdo de DNA seja praticamente constante dentro de uma espécie

(GREILHUBER, 2005), o mesmo varia em várias ordens de magnitude entre e dentro dos grupos filogenéticos (NARAYAN, 1998). O maior registro entre plantas, e também para todos os eucariotos, é em *Paris japonica* (*Melanthiaceae*), um octaploide ($2n = 8x = 40$) que apresenta um valor 1C de 152,23 pg (PELLICER et al., 2010). Já o menor conteúdo de DNA nuclear entre plantas pertence à família Lentibulariaceae, *Genlisea margaretae* com um valor 1C de 0,06 pg (GREILHUBER et al., 2006; BENNET; LEITCH, 2011). Apesar desta grande variação, a maioria das plantas apresenta um valor 1C relativo pequeno e só algumas linhagens apresentam tamanhos elevados (KELLY; LEITCH, 2011). Interessantemente, as espécies com grandes genomas não estão distribuídas de forma uniforme na árvore evolutiva, mas restritas a alguns clados, como o de Liliales (monocotiledôneas), Santalales (eudicotiledôneas) e Ophioglossales (Pteridófitas), (LEITCH et al., 2005; LEITCH et al., 2010) indicando que o aumento do genoma representa um evento recorrente e independente na evolução das plantas (LEITCH et al., 2005).

As diferenças existentes no conteúdo de DNA entre diferentes grupos de plantas têm começado a ser utilizadas na sistemática. Embora as espécies de um gênero possam apresentar um mesmo número cromossômico e características cariotípicas, estas podem mostrar grande variação no conteúdo de DNA, podendo a mesma ser efetiva na delimitação infragenérica (OHRI, 1998; ZONNEVELD, 2001; TORRELL; VALLÉS, 2001; ZONNEVELD, 2008; HAWKINS et al., 2008). O tamanho do genoma também está relacionado com várias características fenotípicas e com alguns caracteres relevantes para o melhoramento genético ou para estudos ecológicos (BENNET, 1998).

Entre as principais causas do aumento no tamanho do genoma em plantas estão os eventos de poliploidização (BENNET; LEITCH, 2005). Em pteridófitas, por exemplo, a maioria das espécies apresentam grandes conteúdos de DNA, como é o caso de *Ophioglossum petiolatum* com um valor 1C de 65,6 pg e aproximadamente $2n = 960$ (OBERMAYER et al., 2002). Em outros grupos, entretanto, este aumento do genoma não mostra nenhuma relação direta com a poliploidia, como em *Pinus*, no qual as espécies são todas diploides ($2n = 24$) e o valor 1C pode ser igual ou maior a 35 pg (BENNET; LEITCH, 2011) ou em *Fritillaria japonica*, espécie diploide ($2n = 22$) com $1C = 87,3$ pg (AMBROŽOVÁ et al., 2011). Estas diferenças entre os tamanhos do genoma e a ausência de relação direta com a complexidade dos organismos foi denominada de paradoxo do valor C (SWIFT, 1950). Atualmente é sabido que variações na fração não codificante do genoma, tais como sequências satélite e elementos transponíveis, e, sobretudo os retrotransposons são um dos principais fatores envolvidos no paradoxo C (BENNET; LEITCH, 2005). Os elementos repetitivos podem alcançar um alto

número de cópias nos genomas vegetais, podendo, no caso dos retrotransposons, chegar a constituir mais da metade de um genoma (BENNETZEN, 2000), variando, por exemplo, entre 14% em mamão (MING et al., 2008) até > 75% no milho (BAUCOM et al., 2009).

Em geral, os modelos de dinâmica evolutiva de elementos transponíveis assumem a ocorrência de uma amplificação em massa nas gerações seguintes ao evento de transposição, o qual é seguido pela estabilização no número de cópias quando a transposição replicativa é equilibrada pela seleção natural contra as inserções (BOUTIN et al., 2012). Porém, análises de retrotransposons e outros elementos transponíveis em diferentes organismos têm mostrado que a taxa de transposição não é constante (HAWKINS et al., 2009). A proliferação seria um processo dinâmico que ocorreria repetidamente e em pouco tempo durante a evolução (HAWKINS et al., 2009), com diferentes famílias se alternando em picos de amplificação. O resultado é que as linhagens experimentam ganhos recorrentes de DNA, controlados por vários fatores como modificações nos padrões de metilação e taxas de recombinação, entre outras (RABINOWICZ et al., 2003; TSUKAHARA et al., 2009; GROVER; WENDEL, 2010; BOUTIN et al., 2012). Estes episódios estariam relacionados com uma resposta a fatores genômicos e ambientais, como eventos de hibridização, poliploidia ou estresse ambiental (GRANDBASTIEN, 1998; KASHKUSH et al., 2003; MADLUNG; COMAI, 2004; YAAKOV; KASHKUSH, 2011).

Proliferações recentes de elementos transponíveis têm sido observadas em milho, arroz e algodão. No primeiro caso, os estudos sugerem que o genoma foi duplicado em pouco mais de três milhões de anos devido somente à amplificação de elementos transponíveis (SAN MIGUEL et al., 1998). Esse mesmo padrão foi observado em *Oryza australiensis*, o qual experimentou uma duplicação no tamanho do genoma nos últimos dois milhões de anos devido à rápida proliferação de três tipos de retrotransposons do tipo LTR (*Long Terminal Repeat*) (PIEGU et al., 2006). No caso do algodão, as diferenças genômicas entre espécies distintas de *Gossypium* são devidas principalmente à variação no número de cópias de um retrotransposon tipo Ty3/Gypsy, ocorrida em distintos eventos (HAWKINS et al., 2009). Outro exemplo de aumento no tamanho do genoma sem poliploidia é no pimentão, *Capsicum annuum*, que apresenta um elevado tamanho do genoma (2.700 Mpb). Neste caso, a expansão está relacionada apenas ao acúmulo de uma única família de elemento repetitivo tipo Ty3-Gypsy (PARK et al., 2012).

Nas pesquisas sobre tamanho do genoma em plantas, BENNETZEN e KELLOG (1997) propuseram que a evolução deste parâmetro seria unidirecional, com genomas pequenos tendendo ao processo de ‘engordamento’ por meio dos processos de poliploidia e amplificação

de retrotransposons. Porém, agora é sabido que embora o genoma ancestral fosse provavelmente pequeno, ao longo da evolução das plantas ocorreram diversos eventos não somente de aumento do conteúdo de DNA mas também de redução (DEVOS et al., 2002; LEITCH et al., 2005). Por exemplo, estudos em diferentes espécies de *Gossypium* mostraram que a taxa de remoção dos elementos transponíveis é suficiente para compensar a proliferação dos mesmos, indicando que a taxa de perda de DNA pode ser extremamente variável dentro de um gênero e que os mecanismos de perda de DNA podem reverter um aumento do genoma. Os mecanismos de diminuição do tamanho do genoma são pouco conhecidos. Têm sido propostos principalmente dois como responsáveis das diminuições observadas, que são a recombinação homóloga desigual e recombinação ilegítima (BENNETZEN et al., 2005; HAWKINS et al., 2008). Estes mecanismos que permitem a eliminação de DNA, principalmente elementos transponíveis variam entre espécies, por exemplo, em *Arabidopsis*, a recombinação ilegítima apresenta um maior impacto que a recombinação desigual não homóloga, enquanto no arroz foi encontrado o contrário (DEVOS et al., 2002; MA et al., 2004), embora a recombinação desigual consiga remover uma quantidade maior de DNA, a recombinação ilegítima apresenta um alcance maior de ação, por não depender de homologia de sequências (GROVER; WENDEL, 2010).

As diferenças encontradas no conteúdo de DNA entre espécies parecem, portanto, responder a um equilíbrio entre o aumento dos elementos transponíveis e a resposta do genoma à eliminação dos mesmos. Algumas espécies possuem uma baixa taxa de deleção dos elementos transponíveis e uma alta proliferação dos mesmos e, portanto, uma tendência a aumentar o tamanho do genoma. As que apresentam genomas pequenos, entretanto, como *Arabidopsis*, *Oryza* e *Gossypium raimondii*, apresentam pouca tolerância à proliferação ou um eficiente mecanismo de eliminação dos elementos transponíveis e por isto apresentam a tendência a diminuir ou manter um pequeno conteúdo de DNA (GROVER; WENDEL, 2010).

2.2.3 Sequências de DNA

Além da morfologia e número cromossômico, outras características podem ser analisadas nos cariótipos, como a distribuição e diversidade de bandas heterocromáticas e localização de genes e outras sequências únicas (WEISS-SCHNEEWEISS; SCHNEEWEISS, 2013). O DNA nuclear de plantas é constituído por sequências de cópia única e também por várias classes de sequências repetitivas estas constituem grande parte dos genomas e podem ser encontradas tanto organizadas em *tandem* (micro-, mini- e satélites DNA), quanto dispersas no

genoma (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2011). Estas sequências repetitivas usualmente estão associadas a formação de heterocromatina que, no geral, podem estar localizadas nos centrômeros, telômeros e em blocos heterocromáticos intersticiais (GREWAL; JIA, 2007).

Apesar da grande variedade de tamanho, número cromossômico e quantidade de DNA presente nas espécies vegetais, características estruturais dos cromossomos como centrômeros, telômeros e compactação da cromatina são em geral bem conservadas. As sequências repetitivas que compõem essas regiões, exceto pelo telômeros, evoluem mais rapidamente que as sequências únicas e estão envolvidas com mecanismos de evolução genômica. Os elementos transponíveis, por exemplo, são sequências capazes de se movimentar dentro do genoma e gerar expansão do mesmo e, até mesmo, alterar a função dos genes (TENAILLON; HOLLISTER; GAUT, 2010), estes elementos também podem facilitar a ocorrência de rearranjos cromossômicos, devido a eventos de recombinação homóloga ectópica entre as várias cópias de elementos transponíveis presentes no genoma (GRAY, 2000).

2.2.4 A fração repetitiva do genoma

A grande maioria dos genomas são compostos por sequências de DNA repetitivo. Em humanos, por exemplo, essa porção corresponde a mais de 50% do genoma total. Essas repetições surgem por mecanismos que geram cópias extras de uma sequência que é inserida no genoma, elas podem se apresentar intercaladas com sequências únicas, chamadas de DNA repetitivo disperso, ou alinhadas lado a lado, ou seja, em *tandem* (TREANGEN; SALZBERG, 2012). O DNA repetitivo pode ser espécie-específico ou, até mesmo, cromossomo-específico. Algumas cópias são altamente conservadas, como o DNAr 5S e 35S; e outras apresentar mudanças rápidas, gerando diferenciação. Por muito tempo o DNA repetitivo foi considerado DNA “lixo” ou “egoísta”, porém, sabe-se hoje que o DNA repetitivo desempenha importante papel na composição e evolução dos genomas (BISCOTTI; OLMO; HESLOP-HARRISON, 2015).

As sequências repetidas em *tandem* ou DNA satélite são sequências geralmente não codificantes, abundantes e dispostas em uma conformação *head-to-tail*, ou seja, orientadas na mesma direção. Essas sequências são dinâmicas, alterando-se rapidamente em número e posição de sítios (BISCOTTI; OLMO; HESLOP-HARRISON, 2015; GARRIDO-RAMOS, 2015). Além disso, os DNAs satélite são formados por monômeros que podem variar em comprimento, composição de nucleotídeos, complexidade das sequências e abundância

(PLOHL; MEŠTROVIĆ; MRAVINAC, 2012). O *crossing over* desigual entre regiões homólogas é um dos mecanismos que pode levar a expansão e redução dos arranjos de sequências. Além disso, uma mutação que ocorre em um monômero pode se espalhar dentro das unidades de repetição ou ser eliminada por homogeneização. Os mecanismos envolvem transferência de sequência não recíproca por recombinação desigual, conversão gênica ou transposição. A fixação de uma variante na população é resultado da recombinação na meiose e segregação cromossômica, esse fenômeno é conhecido como evolução em concerto, e origina padrões variados de famílias de DNA repetitivo, gerando em geral homogeneidade dentro das espécies e diversidade entre as espécies (FELINER; ROSSELLÓ, 2012; PLOHL; MEŠTROVIĆ; MRAVINAC, 2012). Assim, espécies distintas podem apresentar famílias de DNA satélites diferentes ou esses satélites podem ser compartilhados entre espécies relacionadas. Em *Phaseolus* L., diferentes famílias de satélites, como o satélite *kipu* e o satélite *jumper* compõem as regiões subteloméricas e pericentroméricas de algumas espécies analisadas deste gênero (RIBEIRO et al., 2017a).

Além das sequências distribuídas em *tandem*, os organismos eucariontes possuem sequências de DNA repetidas no genoma de maneira dispersa. Conhecidas como elementos transponíveis, essas sequências são capazes de se mover ao longo do genoma e se inserir de forma autônoma em lugares diferentes. Podendo compor 75% do DNA nuclear, os elementos transponíveis foram caracterizados pela primeira vez em 1940 por Barbara McClintock no genoma de milho (LEE; KIM, 2014; NEUMANN et al., 2019). Os elementos transponíveis podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de transposição em duas classes, os elementos de Classe I, ou retrotransposons, se transpõem por meio de um mecanismo de *copy-and-paste*, para se transpor, esses elementos são transcritos em RNA mensageiro e, por meio da ação da transcriptase reversa, cópias de DNA complementar são geradas e posteriormente reintegradas no genoma. Os elementos de Classe I são subdivididos em subclasses de acordo com seu mecanismo de reinserção no genoma, são essas LTR e não LTR, conforme apresentam presença ou ausência do *Long Terminal Repeat* (LTR) (BOURQUE et al., 2018; WICKER et al., 2018; NEUMANN et al., 2019). Já os elementos de Classe II, ou transposons de DNA, são elementos que possuem em seus terminais sequências invertidas que são reconhecidas por uma enzima transposase, que é responsável pelo corte e reinserção destes elementos em outros locais do genoma (WICKER et al., 2018; BOURQUE et al., 2018). Além dessas classificações, os elementos transponíveis também podem ser ordenados em superfamílias e famílias de acordo com a similaridade e organização dos seus domínios proteicos, por exemplo, os retrotransposons do tipo LTR possuem uma estrutura bem conservada e apresentam pelo menos

os domínios: GAG, protease (PROT), transcriptase reversa (RT), ribonuclease H (RH) e integrase (INT). A ordem desses domínios classifica os elementos LTRs nas subfamílias Ty1/Copia e Ty3/Gypsy (NEUMANN et al., 2019).

Os elementos transponíveis apresentam regiões preferenciais para sua inserção e são extensas fontes de mutações e polimorfismos, estando assim associados a rearranjos genômicos. Podem também desempenhar funções específicas nos cromossomos. Em *Drosophila*, um elemento do tipo LINE é responsável pela manutenção dos telômeros para compensar a perda da telomerase que ocorreu em dípteros (PARDUE; DEBARYSHE, 2011; BOURQUE et al., 2018). Os efeitos dos elementos transponíveis no genoma podem ser bastante dinâmicos, eles podem se expandir em massa e gerar genomas grandes ou se acumular em regiões heterocromáticas de genomas pequenos. Em espécies do gênero *Zea* L., o aumento de algumas famílias de elementos resultou em um genoma 2× maior de *Zea luxurians* (Durieu e Asch.) R.M. Bird em relação a *Z. mays* L. e *Z. diploperennis* Itlis, Doebley e R. Guzmán em menos de 2 milhões de anos (ESTEP; DEBARRY; BENNETZEN, 2015). A transposição desses elementos pode também alterar a expressão gênica ao se inserir perto ou dentro de regiões como éxons, introns e regiões reguladoras.

Com o avanço das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS), ficou cada vez mais fácil fazer um sequenciamento de baixa cobertura para identificação das sequências repetitivas mais abundantes (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2015). Dessa forma, também foi possível notar um avanço em programas e metodologias para a análise e montagem dessas sequências. O RepeatExplorer é uma ferramenta cada vez mais utilizada na caracterização das sequências repetitivas, é acessível através da web (<https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz>) e, usando um algoritmo de agrupamento de sequências, facilita a identificação de repetições sem a necessidade de bancos de dados de referência de elementos conhecidos. Como o algoritmo usa sequências curtas e aleatórias do genoma, é ideal para análise de dados gerados por sequenciamento de nova geração, algumas ferramentas adicionais auxiliam não só na classificação do DNA repetitivo, mas também na comparação de sequências repetitivas entre múltiplas espécies (NOVAK et al., 2013). Diversos trabalhos recentes demonstram a aplicabilidade desse programa na identificação e caracterização de sequências repetitivas (MARQUES et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017b; UTSUNOMIA et al., 2017).

2.2.5 Distribuição cromossômica da fração repetitiva

O uso de técnicas moleculares como a FISH é indispensável para o mapeamento das

sequências repetitivas nos cromossomos, possibilitando o entendimento da distribuição e dinâmica dessas sequências (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2015). Em muitos eucariontes, as regiões centroméricas e teloméricas são compostas por sequências repetitivas que podem influenciar nos rearranjos cromossômicos. Regiões subteloméricas e pericentroméricas são consideradas *hotspots* de inserções ou retenção de sequências repetitivas (EICHLER; SANKOFF, 2003). Uma família do elemento LTR- Ty3/Gypsy-Chromovirus-CRM (retrotransposon centromérico de milho) foi encontrada na mesma região em diversas outras espécies e interagem com a proteína centromérica CENH3 (NAGAKI et al., 2004; ZHANG et al., 2017). Em *Rhynchospora pubera* (Vahl) Boeckeler foram identificadas e confirmadas sequências específicas das regiões centroméricas, pela primeira vez em uma espécie com cromossomos holocêntricos, a família de DNA satélite *Tyba* e retrolementos centroméricos são as principais sequências de DNA associadas com os centrômeros difusos dessa espécie (MARQUES et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017b).

Em alguns grupos o número cromossômico básico tem sido conservado com pouca ou quase nenhuma mudança e, portanto, é facilmente identificado, mas em outros grupos o número cromossômico básico tem experimentado várias mudanças, de forma que se torna difícil reconhecer o número original (GUERRA, 2000).

2.3 O GÊNERO *PASSIFLORA* L.

Passifloraceae s.s. (TOKUOKA, 2012) originou-se há 65,5 milhões de anos atrás, (Paleoceno), na África, atravessou para a Europa/Ásia alcançando o Novo Mundo por meio de pontes terrestres (MUSCHNER et al., 2012). *Passiflora* L. é o maior gênero da família, e engloba mais de 575 das 705 espécies, distribuídas especialmente nos Neotrópicos (ULMER; MACDOUGAL, 2004). A América do Sul é o centro de origem de mais de 95% das espécies do gênero, sendo o Brasil um dos principais centros de diversidade (Flora do Brasil, 2020). O gênero apresenta uma morfologia floral particularmente marcante e diversificada, com simetria radial, presença de discos nectaríferos na base do hipanto, além da corola filamentosa (JUDD et al., 2015). O gênero é monofilético (FEUILLET; MACDOUGAL, 2003; HANSEN et al., 2006; KROSNICK et al., 2013; YOCKTENG; NADOT, 2004a, 2004b), o que é suportado por três caracteres diagnósticos: as séries de filamentos da coroa, gavinhas axilares e flores especializadas (JUDD et al., 2015). Sua ampla variação morfológica parece ser o resultado de seu habitat diverso, bem como suas relações coevolutivas com muitos organismos, incluindo uma ampla gama de polinizadores, como pequenos e grandes insetos, pássaros e morcegos

(OCAMPO PEREZ; COPPENS D'EECKENBRUGGE, 2017). Com base em caracteres florais e vegetativos, o gênero foi tradicionalmente dividido em 22 subgêneros (KILLIP, 1938), mais recentemente reunidos em quatro subgêneros principais: *Astrophea*, *Deidamioides*, *Decaloba* e *Passiflora* (ULMER; MACDOUGAL, 2004). Revisões subsequentes propuseram adicionar o subgênero *Tryphostemmatoides* (BUITRAGO; MACDOUGAL; COCA, 2018; MUSCHNER et al., 2012) e *Tetrapathea* (KROSNICK et al., 2009), com uma e três espécies cada.

O subgênero *Decaloba*, com 230 espécies, tem como características as glândulas ocelares, pequenas flores e é o único subgênero que possui tanto espécies do Novo Mundo como do Velho Mundo. O subgênero *Deidamioides* é um grupo de 14 espécies encontradas em América Central e do Sul. Subgênero *Astrophea* consiste em 60 espécies de lianas e árvores pequenas a médias que são mais diversas nas planícies de norte da América do Sul (KROSNICK et al., 2013). Por fim, o subgênero *Passiflora* inclui 250 espécies e, caracteristicamente, exibe grandes flores com múltiplas séries de filamentos coronais. É o mais diversificado em América do Sul e é o maior e mais conhecido dos subgêneros, em parte pela importância econômica de algumas das espécies, tais como o maracujá amarelo (*P. edulis* Sims) ou o maracujá doce (*P. alata* Curtis) (ULMER; MACDOUGAL, 2004).

Muitas espécies selvagens possuem frutos comestíveis e são plantadas na América Latina, mas não são amplamente exploradas comercialmente. Cruzamentos interespecíficos foram realizados como uma alternativa para a introdução de genes selvagens para as espécies cultivadas. Alguns híbridos sexuais foram obtidos com o objetivo de aumentar o valor ornamental das plantas (VANDERPLANK, 1991), tolerar baixas temperaturas (KNIGHT, 1991) ou melhorar as características agronômicas (KNIGHT, 1991; RUBERTÉ-TORRES; MARTIN, 1974). Híbridos somáticos também foram produzidos para obter plantas resistentes a doenças ou baixas temperaturas (DORNELAS et al., 1995; OTONI et al., 1995; BARBOSA; VIEIRA, 1997). A auto-incompatibilidade é um mecanismo bastante comum em *Passiflora* (PAYÁN; MARTIN, 1975; RÊGO et al., 2001).

Em *Passiflora* a primeira filogenia molecular foi reconstruída em 2003, por MUSCHNER e colaboradores. Foram investigadas as relações filogenéticas de 61 espécies, classificadas em 11 dos 23 subgêneros sugeridos. Foram utilizados três marcadores moleculares, os espaçadores internos transcritos ribossômicos nucleares (*nrITS*), as regiões espaçadoras plastidial *trnL - trnF* (~1000 pb) e o gene plastidial *rps4* (~570 pb). Três principais clados foram altamente suportados, independentemente do marcador e método filogenético utilizado. Um clado incluiu os subgêneros *Distephana*, *Dysosmia*, *Dysosmioides*, *Passiflora* e *Tacsonioides*, um segundo, os subgêneros *Adopogyne*, *Decaloba*, *Murucuja* e *Pseudomurucuja*,

e um terceiro, o subgênero *Astrophea*. Os autores os nomearam como *Passiflora*, *Decaloba* e *Astrophea*, respectivamente. A posição do subgênero *Deidamioides* não foi definida (MUSCHNER et al., 2003).

No trabalho seguinte, foi elaborada uma filogenia molecular utilizando o gene *ncpGS* (nuclear-encoded chloroplast-expressed glutamine synthetase gene) para examinar as relações entre as espécies de *Passiflora* e a árvore resultante foi comparada com a classificação proposta por FEUILLET e MACDOUGAL (2003). As 90 espécies examinadas se dividiram em oito subgêneros principais: *Plectostemma*, *Granadilla*, *Astrophea*, *Deidamioides*, *Polyanthea*, *Disosmia*, *Tetrapathea* e *Tryphostemmatoides*. Também observaram uma correlação geral entre a posição filogenética das diferentes espécies e seu número de cromossomos (YOCKTENG; NADOT, 2004).

As relações filogenéticas do gênero também foram analisadas usando dados de dois marcadores de cloroplasto: o íntron *rpoC1* e a região espaçadora *trnL/trnT*. Os resultados das análises filogenéticas dos dados da sequência *trnL/trnT* apoiaram a redução dos 22 subgêneros de KILLIP para quatro, conforme tinha sido proposto em um novo sistema de classificação por FEUILLET e MACDOUGAL (2004) (HANSEN et al., 2006).

Com o objetivo principal de avaliar a distribuição biogeográfica do gênero para compreender sua história evolutiva, um total de 106 espécies amplamente distribuídas, com amostras representativas dos quatro subgêneros aceitos por FEUILLET e MACDOUGAL (2004), foram analisadas a partir de sequências de sete regiões de DNA (genomas plastidiais, mitocondriais e nucleares) (MUSCHNER et al., 2012). Três subgêneros principais foram monofiléticos (*Astrophea*, *Passiflora* e *Decaloba*) e foi proposta a inclusão de outro subgênero (*Tryphostemmatoides*) na classificação infragenerérica de *Passiflora*. A divergência observada pelos autores, entre os quatro subgêneros em *Passiflora* foi muito antiga, variando de ~32 a ~38 Mya.

2.3.1 Citogenética de *Passiflora*

Embora os números de cromossomos e outros parâmetros citogenéticos de *Passiflora* tenham sido estudados, o número de espécies com valor $2n$ (104) ou $2C$ conhecidos (50) é proporcionalmente pequeno considerando sua possível contribuição para os estudos de melhoramento e evolução. Além desses parâmetros, o comportamento meiótico e a viabilidade do pólen, o estabelecimento de cariótipos e os marcadores cromossômicos como bandas e hibridização *in situ* são ferramentas importantes que podem ser úteis para desenvolver

estratégias para a conservação de germoplasma e para entender as relações entre as espécies de *Passiflora*. O conhecimento citogenético colabora para o planejamento das hibridizações interespecíficas e também fornece informações relacionadas ao efeito do genoma individual no pareamento no híbrido.

O número de cromossomos é conhecido em menos de 20% das espécies de *Passiflora* (SOARES-SCOTT et al., 2005). As espécies podem ser divididas em quatro grupos cariológicos, representados por $x = 6$, $x = 9$, $x = 10$ e $x = 12$ (MELO; GUERRA, 2003). A maior parte apresentou $2n = 12$ ou 18, mas $2n = 14$, 20, 22, 24, 36, 72 e 84 também foram encontradas nas espécies nativas e introduzidas de Brasil. Aneuploidia e poliploidia têm sido relatadas como mecanismos evolutivos (MELO et al., 2001), embora a maioria das espécies de *Passiflora* seja diploide. Citotipos foram descritos para *P. misera* Kunth com $2n = 12$ e 36 e *P. suberosa* L. com $2n = 12$, 24, 36. O número de cromossomos 22 foi relatado para *P. foetida*, mas segundo MELO et al. (2001), esta espécie apresentou as constrições secundárias proximais distendidas na prófase e na prometáfase que podem ser confundidas com dois cromossomos, levando à interpretação incorreta de $2n = 20$.

STOREY (1950) examinou diferentes espécies, híbridos interespecíficos e raças poliploides de *Passiflora* e concluiu que o número cromossômico básico desse gênero era $x = 3$ ou $x = 6$. Para DARLINGTON e WYLIE (1956, citado por MEHETRE; DAHAT, 2000), o número cromossômico básico foi $x = 9$. Estudos subsequentes sugeriram que o número cromossômico básico do gênero poderia ser $x_1 = 6$, enquanto $x_2 = 9$, $x_2 = 10$ e $x_2 = 12$ são apenas números básicos secundários (MELO et al., 2001; MELO; GUERRA, 2003). No entanto, $x = 12$ pareceu desempenhar um papel importante na evolução do grupo, pois estava melhor representado nos demais gêneros da família. Nesse caso, os mecanismos de alteração cromossômica provavelmente relacionados a essas alterações seriam displóidia descendente ($x = 12 \gg 6$) ou poliploidia ($x = 6 \gg 12$). A análise do cariótipo do gênero *Passiflora* possibilitou a observação de variações intra e interespecíficas na morfologia dos cromossomos. A análise indicou que o número e a posição dos satélites, constrições secundárias, número e comprimento dos cromossomos e a posição do centrômero eram provavelmente características dos subgêneros e seções (BEAL, 1973a, b; SNOW; MACDOUGAL, 1993; MAYEDA, 1997; VIEIRA et al., 2004).

Vários cariótipos foram propostos para o maracujá amarelo (OLIVEIRA; COLEMAN, 1996; SOARES-SCOTT, 1998; MELO et al., 2001; MELO; GUERRA, 2003; CUCO et al., 2001; PRAÇA et al., 2008; VIANA; SOUZA, 2012), mas não há consenso sobre a morfologia cromossômica, com valores relatados variando entre dois pares (1 e 8) de cromossomos

submetacêntricos e sete pares de metacêntricos (CUCO et al., 2001) a três pares de submetacêntricos (1, 8 e 9) e seis pares de metacêntricos (2 a 7) (PRAÇA et al., 2008). O número e localização de constrições secundárias detectados no cariótipo do maracujá também variam, e foram detectados no cromossomo 8 (OLIVEIRA, 1996); nos braços longos dos cromossomos 4 e 7 (SOARES-SCOTT, 1998); e nos cromossomos 1, 2, 7 e 8 (PRAÇA et al., 2008). Regiões organizadoras nucleolares ativas (NORs) foram detectadas por coloração com nitrato de prata em cromossomos 8 e 9 de *P. edulis*, associados às suas constrições secundárias (MAYEDA, 1997).

Usando a dupla coloração CMA (cromomicina A3) e DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol), foram detectados blocos positivos para CMA na região terminal de dois pares de cromossomos e não foi visualizada heterocromatina positiva para DAPI. Os blocos CMA+ foram restritos ao DNA ribossomal 35S (DNAr) no braço longo dos cromossomos 7 e 9 (MELO et al., 2001; MELO; GUERRA, 2003). Contudo, também foram relatados sítios de DNAr 35S no braço curto do cromossomo 7 e braço longo do cromossomo 8 (PRAÇA et al., 2008). De acordo com CUCO et al. (2005), o DNAr 5S estava localizado no braço longo do cromossomo 4 e segundo MELO e GUERRA (2003), no braço longo do cromossomo 5.

O conteúdo de DNA nas espécies do gênero *Passiflora* mostram uma variação maior que 10×, variando desde 1C = 0,212 pg em *P. organensis*, subgênero *Decaloba*, a 1C = 2,680 pg para *P. quadrangularis*, subgênero *Passiflora* (SOUZA et al., 2004; YOTOKO et al., 2011). Dentro do subgênero *Passiflora*, a variação no tamanho genômico é considerável, variando desde 1C = 0,263 em *P. palmieri* e 1C = 0,481 em *P. foetida* até 1C = 2,208 em *P. alata* e 1C = 2,680 pg para *P. quadrangularis* (YOTOKO et al., 2011). Existe dentro do gênero uma correlação positiva entre tamanho do genoma e tamanho de flores. Assim, as espécies do gênero se tornam modelos ideais para investigar evolução cariotípica considerando a composição da fração repetitiva e rearranjos estruturais e numéricos, como também uma possível associação desses fatores à sua diversificação morfológica e ecológica. Não existem na literatura dados do tamanho genômico para espécies dos subgêneros *Astrophea*, *Tryphostemmatoïdes* e *Tetrapathea*, e para o subgênero *Deidamioides* só são conhecidos dados para o tamanho do genoma de *P. deidamioides* com 1C = 0,80 pg (YOTOKO et al., 2011).

Devido ao seu interesse comercial, mapas de ligação baseados em marcadores moleculares foram construídos para o maracujá (CARNEIRO et al., 2002; LOPES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008). No entanto, apenas dados parciais de sequenciamento do genoma foram publicados (ARAYA et al., 2017; MUNHOZ et al., 2018). Foi desenvolvida uma biblioteca de BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*) que contém o genoma da espécie

fragmentado e clonado. A facilidade de sequenciamento possibilitou o desenvolvimento de uma estratégia para sequenciamento parcial dos clones de BAC, obtendo sequências dos terminais dos BACs ou *BAC-end Sequences* BES (VENTER et al., 1998). Essa estratégia tem facilitado aos pesquisadores a ter uma primeira visão sobre a composição de um genoma. Para *Passiflora edulis* Sims, o maracujá-azedo, foi construída uma biblioteca genômica com 82.944 clones BAC, com tamanho médio dos insertos de 108 kb. Dez mil BES foram analisados e identificados como portadores de elementos móveis repetitivos (19,6% de todas as BES), sequências simples e proteínas putativas (SANTOS et al., 2014). Com a disponibilidade de BACs cromossomos-específicos (SANTOS et al., 2014; SADER et al., 2019b), foi possível definir um cariótipo para o maracujá azedo (*P. edulis*) e realizar o mapeamento comparativo entre espécies próximas (DIAS et al., 2020), uma vez que as sequências nucleotídicas entre táxons próximos em geral são suficientemente conservadas (PEDROSA et al., 2002; LYSAK et al., 2005).

Alguns autores observaram polimorfismo intraespecífico, principalmente em relação ao número de satélites e à localização (OLIVEIRA; COLEMAN, 1996; MAYEDA, 1997; SOUZA et al., 2003c). MAYEDA (1997) sugeriu a presença de dois pares maiores de cromossomos (cariótipo assimétrico) e dois satélites como características do gênero *Passiflora*. De acordo com MELO et al. (2001), as seções *Xerogona*, *Decaloba* e *Cieca* do subgênero *Plectostemma* apresentaram constrições secundárias muito características e seu número e posição foram as características cariológicas mais importantes, principalmente na seção *Decaloba*. Basicamente, as espécies apresentaram cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, com simetria de cariótipo variável (MELO et al., 2001; BEAL, 1973a, b; VIEIRA et al., 1997; OLIVEIRA; COLEMAN, 1996; SOARES-SCOTT et al., 1999).

O comprimento do complemento cromossômico varia significativamente de 32,9 a 62,3 μm (BEAL, 1973a, b; MAYEDA, 1997; SOUZA et al., 2003c; VIEIRA et al., 2004). Compreender essa diversificação no comprimento do genoma é importante porque é um processo significativo durante a especiação da planta (GREILHUBER, 1998). Estudos de padrões de bandas foram realizados usando corantes com afinidade para as bases A-T ou C-G (MELO et al., 2001) e com prata para colorir a região organizadora do nucléolo (Ag-NOR) (MAYEDA, 1997). Os estudos envolvendo bandas Ag-NOR, onde apenas as NOR ativas foram detectáveis (SCHWARZACHER et al., 1980) foram realizadas em *P. alata*, *P. amethystina*, *P. coccinea*, *P. edulis*, *P. incarnata* e *P. maliformis*. Em algumas espécies, havia mais de um par de cromossomos portador de região organizadora do nucléolo, como em *P. coccinea* (MAYEDA, 1997; VIEIRA et al., 2004).

O bandeamento CMA-DAPI foi realizado em oito espécies: *P. amethystina*, *P. caerulea*, *P. capsularis*, *P. edulis*, *P. foetida*, *P. racemosa*, *P. rubra* e *P. tricuspidis*, que apresentaram de um a três pares de blocos CMA+, mas não apresentaram a heterocromatina DAPI+, sendo que as posições do bloco CMA+ estavam de acordo com as características morfológicas observado nos pares de cromossomos em relação à presença das constrições secundárias (MELO et al., 2001) e com o número e a posição dos locais de DNAr 35S detectados pela FISH. Por outro lado, o número de sítios DNAr 5S não se correlacionou com nenhum outro parâmetro citológico (MELO; GUERRA 2003). Os estudos visando o mapeamento do DNAr 35S mostraram a presença de constrições secundárias e satélites associados aos cromossomos 8 e 9 em *P. edulis*, com quatro sítios, e *P. amethystina*, com seis sítios. Ambas as espécies foram utilizadas como progenitoras e o híbrido somático apresentou dois locais a mais que a progenitora (CUCO et al., 2001). MELO e GUERRA (2003) analisaram a variação nos locais DNAr 5S e 35S em 20 espécies de *Passiflora* (21 táxons) e observaram que as espécies diploides com $x = 6$, em geral, apresentavam apenas dois sítios de DNAr 5S e dois ou quatro de DNAr 35S. Esses estavam relacionados ao nível de ploidia, enquanto outras espécies com $x = 9$ e $x = 10$ frequentemente exibiam mais de dois locos do DNAr 35S e 5S. Segundo esses autores, em geral, o número e a localização dos locais DNAr 5S e 35S foram consistentes com a hipótese de $x = 6$, originalmente diploide, como o provável genoma ancestral do gênero, enquanto o grupo de espécies com $x = 9$, $x = 10$ e $x = 12$ foram considerados de origem tetraplóide com displóidia descendente ($12 \gg 10 \gg 9$) e redução (silenciamento de genes) de alguns locais redundantes, principalmente os do 5S DNAr.

Estudos meióticos realizados nas espécies cultivadas e selvagens de *Passiflora* indicaram estabilidade meiótica (BARBOSA; VIEIRA 1997a, b; MELO et al., 2001; SOUZA, 2002; SOUZA et al., 2003a). As espécies com $2n = 18$, em geral, apresentaram meiose regular e alta fertilidade (FERREIRA, 1994). Algumas espécies com $2n = 24$, *P. pentagona* e *P. suberosa*, apresentaram comportamento meiótico incomum. Foram observadas muitas irregularidades que poderiam levar essas espécies a um índice meiótico abaixo de 90% (SOUZA, 2002). Os cromossomos retardatários, pontes de anáfase (BARBOSA; VIEIRA, 1997b; SOUZA, 2002), segregação não orientada na metáfase e anáfase I (SOUZA et al., 1996), anormalidades na orientação do fuso e assincronismo foram as irregularidades mais comuns observadas e, conseqüentemente, produtos pós meióticos anômalos como mônadas, díades, tríades e políades foram formados (SOUZA, 2002; SOUZA et al., 2003a). As espécies apresentaram bivalentes como as associações cromossômicas predominantes, mas também foram observados univalentes e quadrivalentes em espécies diploides (MELO et al., 2001;

SOUZA, 2002; SOUZA et al., 2003a). Estudos nos híbridos F1 interespecíficos demonstraram instabilidade meiótica. Segundo SOARES-SCOTT et al. (2003), houve claras diferenças no comportamento meiótico entre os híbridos, e o híbrido sexual mostrou meiose mais regular do que o híbrido somático. Estudos sobre a frequência e posição dos quiasmas são raros em *Passiflora*. SOUZA (2002) observou que o número total médio de quiasmas nas espécies de *Passiflora* com $n = 6$ foi de 6,6, enquanto nas espécies com $n = 9$ e $n = 12$ foram 10,5 e 12,1, consecutivamente. O índice de recombinação variou de 16,49% entre as espécies com $n = 6$ e até 34% entre as espécies com $n = 9$, enquanto nas espécies com $n = 12$ a variação entre espécies foi praticamente nenhuma (apenas 0,7%). Os quiasmas intersticiais predominaram. O índice meiótico (IM), ficou abaixo de 89% em espécies com $n = 12$ e acima de 92% para todas as outras espécies estudadas. O comportamento meiótico no grupo de espécies com $n = 12$ foi o único considerado semelhante devido aos aproximadamente 12 quiasmas por célula. O quiasma tendia a ocorrer na posição intersticial e o IM foi de aproximadamente 88%. Segundo LOVE (1951), as plantas com um IM de 90 a 100% poderiam ser consideradas citologicamente estáveis, mas na verdade era impossível garantir a estabilidade nas plantas com índice de 88 a 92%, uma vez que as plantas com um MI menor que 90% provavelmente apresentavam dificuldades para cruzamentos interespecíficos.

O estudo citogenômico de regiões repetitivas no genoma de *P. edulis*, uma espécie de valor agrônomo relevante, foi realizado mediante sequenciamento de próxima geração (NGS) e análise de bioinformática realizada pelo pipeline RepeatExplorer. Os autores observaram que *P. edulis* possui um genoma altamente repetitivo, com predomínio do retrotransposon LTR Ty3/Gypsy. Três grupos de DNAs de satélite (Clusters 69, 118 e 207) e sete grupos de (LTR) retrotransposons das superfamílias Ty1/Copia e Ty3/Gypsy e famílias Angela, Athila, Chromovirus e Maximus Sire (6, 11, 36, 43, 86, 94 e 135) foram caracterizados e analisados. O mapeamento cromossômico de DNAs satélite mostrou dois locais de hibridação co-localizados na região do DNAr 5S (PeSat_1), hibridizações subterminais (PeSat_3) e hibridização em quatro locais, co-localizados na região 45S DNAr (PeSat_2). A maioria das hibridizações de retroelementos mostraram sinais dispersos nos cromossomos, divergindo em abundância, e apenas o cluster 6 apresentou marcação de regiões pericentroméricas. Não foram observados DNAs de satélites e retroelementos associados ao centrômero (PAMPONET et al., 2019).

3 RESULTADOS

3.1 LARGE VS SMALL GENOMES IN PASSIFLORA: THE INFLUENCE OF THE MOBILOME AND THE SATELLITOME

Mariela Sader¹, Magdalena Vaio², Luiz Augusto Cauz-Santos³, Marcelo Carnier Dornelas⁴, Maria Lucia Carneiro Vieira³, Nataniel Melo⁵, Andrea Pedrosa-Harand¹.

Artigo a ser submetido à revista Planta (A1)
<https://www.springer.com/journal/425>

Large vs small genomes in *Passiflora*: the influence of the mobilome and the satellitome

Mariela Sader¹, Magdalena Vaio², Luiz Augusto Cauz-Santos³, Marcelo Carnier Dornelas⁴,
Maria Lucia Carneiro Vieira³, Nataniel Melo⁵, Andrea Pedrosa-Harand¹.

¹Department of Botany, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

²Department of Plant Biology, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo. Uruguay.

³Department of Genetics, College of Agriculture “Luiz de Queiroz”, University of São Paulo, Piracicaba, Brazil

⁴Department of Plant Biology, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-862, Campinas, Brazil.

⁵Laboratory of Biotechnology, Embrapa Semiárid, Petrolina, Brazil

MAS: <https://orcid.org/0000-0001-8188-2217>

MV <https://orcid.org/0000-0001-8377-6485>

LAC <https://orcid.org/0000-0003-1694-2433>

MCD <https://orcid.org/0000-0002-6710-3050>

MLC: <https://orcid.org/0000-0003-0341-5714>

NM <https://orcid.org/0000-0001-6888-4090>

Corresponding author: email: andrea.harand@ufpe.br

APH <http://orcid.org/0000-0001-5213-4770>

Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Biociências, Departamento de Botânica

Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal

R. Prof. Moraes Rego, s/n, CDU. 50670-901 Recife PE Brazil

Tel: + 55 81 2126 8846 or 8352; Fax: + 55 81 2126 8348

Main Conclusions

While two lineages of retrotransposons were more abundant in larger *Passiflora* genomes, the satellitome was more diverse and abundant in the smallest genome.

Abstract

Repetitive sequences are ubiquitous and fast-evolving elements responsible for size variation and large-scale organization of plant genomes. Within *Passiflora* genus, a ten-fold variation in genome size, not attributed to polyploidy, is known. Here, we applied a combined *in silico* and cytological approach to study the organization and diversification of repetitive elements in three species of these genera representing its known range in genome size variation. Sequences were classified in terms of type and repetitiveness and the most abundant were mapped to chromosomes. We identified Long Terminal Repeat (LTR) retrotransposons as the most abundant elements in the three genomes, showing a considerable variation among species. Satellite DNAs (satDNAs) were less representative, but highly diverse among species, showing preferential location at pericentromeres and subtelomeres. SatDNA repeats were genus-distributed and species-specific. Our results clearly confirm that the largest genome species (*Passiflora quadrangularis*) presents a higher accumulation of repetitive DNA sequences, specially Angela and Tekay elements, making up most of its genome. *Passiflora cincinnata*, with intermediate genome and from the same subgenus, showed similarity with *P. quadrangularis* regarding the families of repetitive DNA sequences, but in different proportions. On the other hand, *Passiflora organensis*, the smallest genome, from a different subgenus, presented greater diversity and the highest proportion of satDNA. Altogether, our data indicate that while large genome evolve to an accumulation of retrotransposons, small genomes evolve to diverse and accumulate a different repeat type and satDNAs.

Keywords: chromosomes, genome skimming, NGS, passion-fruit, retrotransposons, satDNA.

Abbreviations

Cy3-dUTP: 5-amino-propargyl-2'-deoxyuridine 5'- triphosphate coupled to red cyanine fluorescent dye

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

FISH: Fluorescent *in situ* hybridization

LTR: Long terminal repeat

NGS: Next-generation sequencing

rDNA: Ribosomal DNA

RT: Retrotransposons

satDNA: Satellite DNA

TAREAN: TAndem REpeat ANalyser

TEs: Transposable elements

Introduction

Eukaryotic genomes are composed of a large amount of different classes of repetitive DNA sequences, either dispersed (mainly transposons and retrotransposons, as well as some protein-coding gene families) or arranged in *tandem* (ribosomal RNA, protein-coding gene families, and mostly satDNAs, mini- or microsatDNA) (López-Flores & Garrido-Ramos, 2012; Biscotti et al. 2015). Transposable elements (TEs) represent up to 90% of the genome size, for example, 45% of the human genome (Lander et al. 2001), the 52% of the opossum genome (Mikkelsen et al. 2007), or 85% of the maize genome (Schnable et al. 2009). Repetitive DNA sequences has been referred to as the repeatome (Goubert et al. 2015; Jouffroy et al. 2016; Pita et al. 2017; Hannan 2018). Repeat motifs can vary extensively in sequence and abundance (De Koning et al. 2011; Biscotti et al. 2015; Maumus & Quesneville 2016). Thus, transposable elements (retroelements and DNA transposons) and tandem repeats (satDNA and rDNA) have been postulated to have multiple roles in the genome, including genome stability, recombination, chromatin modulation and modification of gene expression (Biscotti et al. 2015). Apart from polyploidy, genome size variation in plants has been a consequence of variation in these two

types of sequences and may reflect different evolutionary strategies in speciation (Albach & Greilhuber 2004).

TEs are repeated and mobile DNA sequences, with the ability to move within genomes. Two classes of TEs are distinguished: Class I elements, or retrotransposons, use reverse transcriptase to copy an RNA intermediate into the host DNA, they are divided into Long Terminal Repeat (LTR) and non-LTR elements. Class II elements, or DNA transposons, use the genome DNA of the element itself as the template for transposition, either by a “cut and paste” mechanism, involving the excision and reinsertion of the DNA sequence of the element, by using a rolling circle process or a virus-like process (Levin and Moran, 2011; Pritham, 2009). These two classes are subdivided into super-families and families on the basis of their transposition mechanism, sequence similarities and structural relationships (Wicker et al. 2007). The set of transposable elements in a genome is also known as mobilome (Siefert 2009).

Satellite DNAs (satDNA) have been the most unknown part of genomes. Initially also considered as junk DNA, and currently is an increasing appreciation of the functional significance of satDNA repeats (Kidwell 2002; Garrido-Ramos 2017). SatDNA families accumulate in the heterochromatin at different parts of the eukaryotic chromosomes, mainly in pericentromeric and subtelomeric regions, but they also span the functional centromere (Garrido-Ramos 2015). Their rapid evolution and constant homogenization (“concerted evolution”) (Hemleben et al. 2007) give rise to sequences that are species- or genome-specific (Lane Rayburn and Gill 1986; Metzlaf et al. 1986; King 1995). This process generates divergence between species or reproductive groups (López-Flores and Garrido-Ramos 2012).

The genus *Passiflora* L. belongs to the family Passifloraceae Juss. ex Kunth, which is a member of the Malpighiales order (Judd et al. 2008). *Passiflora* is a large and morphologically variable genus and it includes 575 species distributed in the tropical and subtropical regions of America, Africa and Asia (Ulmer and MacDougal, 2004), with its diversity center in South

America (Bernacci et al. 2015). A substantial variation of genome sizes has been reported for the genus (Yotoko et al. 2011). Considering all data available for genome size of 62 species, comprising (10% of the genus), the difference between the largest and smallest genomes is currently as high as 10 times [0.212 pg in *P. organensis* Gardner, (*Decaloba* subgenus); and 2.68 pg in *P. quadrangularis* L., (*Passiflora* subgenus)] (Souza et al. 2004; Yotoko et al. 2011). The species of *Passiflora* also show variation in chromosome size and number, and are arranged into four groups according to their basic chromosome numbers: $x = 6, 9, 10$, and 12 (Melo and Guerra 2003; Hansen et al. 2006). A recent diversification in the subgenus *Passiflora* (Miocene) was associated to chromosome number change from $n = 6$ to $n = 9$ and an increase in genome size. Polyploidy was restricted to few lineages and was not associated with species diversification or genome size variation. Thus, dysploidy together with genome size increase could have been acted as the main drivers in the evolution of *Passiflora* (Sader et al. 2019a).

The study of repetitive DNA and its impact in genome size evolution has been facilitated significantly since the introduction of next generation sequencing (NGS) technologies (Margulies et al. 2005). The clustering procedure of genome sequence reads based on similarity has been improved by employing graph-based methods (Novák et al. 2010). This approach has been efficient in the identification and characterization of repeat elements in several organisms (Aversano et al. 2015; Derks et al. 2015; Wolf et al. 2015).

In the *Passiflora* genus, there are two recent works describing the repetitive fraction of the genome, both were performed in the “yellow passion-fruit”, *P. edulis* Sims. (Costa et al. 2019; Pamponet et al. 2019). A total of 250 different TE sequences were identified (96% Class I, and 4% Class II), corresponding to ~19% of the *P. edulis* draft genome (assembled “De novo” from Illumina NGS reads) (Araya et al. 2019). TEs were found preferentially in intergenic spaces (70.4%), but also overlapping genes (30.6%). A higher proportion of LTR retrotransposons (LTR-retrotransposons) was observed in *P. edulis*, totaling 53% of the

genome. Ty3/gypsy superfamily was the most abundant (33.33%), followed by Ty1/copia (16.89%) (Pamponet et al. 2019). Ribosomal DNA (5S and 35S) accounted for 1% of the genome, and the lowest proportion was observed for satDNAs, reaching less than 0.1%. LTR-retrotransposons accounted for 181 single elements corresponding to ~ 13% of the draft genome (Costa et al., 2019). A phylogenetic inference of the reverse transcriptase domain of the LTR-retrotransposons revealed association of 37 elements with the Copia superfamily (Angela, Ale, Tork, and Sire) and 128 with the Gypsy (Del, Athila, Reina, CRM, and Galadriel) superfamily, and Del elements were the most frequent. According to insertion time analysis, the majority (95.9%) of the LTR-retrotransposons were recently inserted into the *P. edulis* genome (< 2.0 Mya), and with the exception of the Athila lineage, all LTR-retrotransposons were transcriptionally active. Some lineages appear to be conserved in wild *Passiflora* species (Costa et al. 2019).

In the light of this information, the aim of this work was to identify and classify the repetitive elements in the *Passiflora* genome, considering the range of genome size variation, in order to understand the cause of the large variation of genome size in the genus. For this, three species were chosen, the smallest genome species, the largest genome species and a medium-sized genome. Their genomes were sequenced with low coverage and reads were clustered by sequence similarities to recognize and characterize the most abundant sequences at chromosomal level.

Material and Methods

Plant material

The materials used in this work included *P. organensis* Gardner ($2n = 2x = 12$), *P. cincinnata* Maxwell ($2n = 2x = 18$) and *P. quadrangularis* L. ($2n = 2x = 18$) plants. Although *P. organensis* is considered synonymous of *P. porophylla* Vell. (The Plant List, <http://www.theplantlist.org/>), the individuals from Bahía, Brazil) correspond to *P. organensis* (Cauz, personal

communication). The plants used for sequencing and cytogenetics were maintained in the Experimental Garden of the Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

Next generation sequencing, processing data, and clustering analysis

DNA isolation from leaves of *P. cincinnata* and *P. quadrangularis* plants was carried out according to Weising (2005). Sequencing was performed on an Illumina MiSeq for each species using 250 nt paired-end reads in BGI Group (China). Sequences of *P. organensis*, provided by Prof. Marcelo Dornelas (UNICAMP), as performed in the Earlham Institute (Norwich, UK).

We performed a quality trimming in the three reads libraries (Quality cut-of value: 20 Percent of bases in sequence that must have quality equal to/higher than the cut-of value: 90). The similarity-based clustering analysis was performed in RepeatExplorer (<https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz>) (Novák et al. 2010, 2013), with a read similarity cut-off of 90%. We have performed two different analyses: 1) an individual analysis for each species, with a larger coverage (Table S1) to better characterize all TE families using automatic option sampling in RepeatExplorer and 2) a comparative analysis, using reads libraries of the three species.

Resulted clusters with genomic percentage above 0.01% were further manually examined to characterize the most abundant repetitive families. The TAREAN tool from Repeat Explorer was applied for satellite DNA repeat identification (Novák et al.2017). Clusters that were not classified in that way were annotated by the examination of cluster graph shape to know if they showed any potential satDNA characteristic, and by similarity searches using BLASTN and BLASTX against non-redundant protein sequences public databases (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Repeat composition was calculated excluding clusters of organelle DNA probably representing extranuclear DNA from chloroplast and mitochondria.

We perform comparative clustering in RepeatExplorer using 561,853 total reads.

Combined, the repeats identified for each species represented 41,542 reads for *P. organensis* (0.05×), 235,288 reads for *P. cincinnata* (0.04×), and 285,022 for *P. quadrangularis* (0.03×) of the total genome for each species (Table S1).

Satellite DNA characterization

To perform a high-throughput analysis of satellite DNA we used satMiner pipeline, a toolkit for mining and analyzing satDNA families (<https://github.com/fjruizruano/satminer>). The satMiner protocol consists of the extraction of tandem repeat sequences and their subsequent analyses. For satDNA mining, we first performed a standard RepeatExplorer individual clustering on $2 \times 200,000$ paired reads. Then, we followed the protocol suggested by Ruiz-Ruano et al. (2016) using the satMiner toolkit, in order to detect as many satDNAs as possible in the genome. Briefly, the protocol consists of reads quality trimming with Trimmomatic and then clustering a selection of $2 \times 200,000$ reads with RepeatExplorer. In those assembled contigs of clusters with a typical tandem repeat structure (i.e., spherical or ring-shaped), we searched for tandem repeated structures with DotPlots tools in Geneious R8.1 software (Kearse et al. 2012). Then, we used DeconSeq software to filter out reads showing homology with all previously identified clusters. Then, using a sample of the remaining reads, we started an additional round performing a new RepeatExplorer clustering duplicating the number of reads for each new run, until no new repeat was identified or not reads available.

We performed a homology search between all repeat unit sequences found and grouped them as the same sequence variant, same family and same superfamily if identity was higher than 95%, 80% and 50%, respectively. The satDNA were named using the two letters for species name followed by the monomer size. We determined the abundance for each variant by using the ‘map to reference’ tool in Geneious Prime 2019.0.4 and we calculated the relative abundance by dividing the amount of mapped reads by the total number of reads. In order to amplify the annotated satDNAs by PCR, we aligned satDNA

monomers to get a consensus sequence and selected the most conserved region to design primers with Primer3 tool (Untergasser 2012) in Geneious R8.1 software (Kearse et al. 2012). Primers were designed facing towards ensuring to minimize the distance between them or even overlapping them up to 3 bp at the 5' end, when necessary.

To know if all satDNA found in *P. organensis* were present in the other two species, we used 'map to reference' tool in Geneious Prime 2019.0.4 to search for these sequences against all reads (12,222,646 reads in *P. quadrangularis*; 6,758,428 reads in *P. cincinnata* and, 112,367,646 reads in *P. organensis*). In addition, to check if satDNA corresponded to the IGS region of the rDNA, we assembled the complete 35S rDNA sequence of the three species with NOVOPlasty (Dierckxsens et al. 2016) using a random selection of 10 million read pairs. As a seed reference, we used the 5.8S rDNA sequence from *Passiflora edulis* species obtained from GenBank (accession number MF327245).

Phylogeny of Gypsy-Tekay

To better understand the dynamics of Gypsy-Tekay retrotransposons in the three species, we analyzed these elements in more detail using similarity searches against all Gypsy elements identified in the Gypsy Database (Neumann et al. 2019). The Gypsy-Tekay Integrase protein domains were extracted from full-length REs using the RepeatExplorer platform (Novak et al. 2010). Further, nucleotide sequences were translated in all possible reading frames and the resulting peptides were aligned together with a specific set of integrases from Ty3/gypsy elements using MAFFT (Katoh & Standley, 2013) with "Auto" option. The alignment was used to construct phylogenetic trees using Neighbor Joining Tree Protein using Geneious Prime 2019.0.4 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al. 2012).

Molecular cytogenetic techniques

Root tips obtained from plants growing in pots were pretreated with 2 mM 8-hydroxyquinoline for 4,5 h at 10°C, fixed in ethanol–acetic acid (3:1 v/v), and stored in fixative at –20°C. Root

tips were digested using a solution containing 2% cellulase and 20% pectinase (w/v) for 90 min at 37 °C and chromosome preparations were performed according to Carvalho and Saraiva (1993).

For each species, the repetitive DNA for the probes were isolated by PCR. The PCR mix contained 1 µl of template DNA (25 ng), 0.5 U Taq DNA polymerase (homemade), 5 µl 10× Taq buffer, 0.25 mM of each dNTP, and 0.5 µM of each primer in a total volume of 50 µl. The PCR program consisted of 35 cycles, each with 1 min denaturation at 94°C, 1 min annealing 55–57°C (depending on the primer pair used), 1 min extension at 72°C, and a final extension of 10 min. PCR products were purified by precipitation and one microgram each was labeled by nick translation (Invitrogen or Roche Diagnostics) with Cy3-dUTP (GE) or Alexa 448-5-dUTP (Life Technologies). The 25-28S, 5.8S, and 18S rDNA clone (pTa71) from *Triticum aestivum* (Gerlach and Bedbrook 1979), labeled with digoxigenin-11-dUTP (Roche) was used to localize 35S rDNA sites.

The Fluorescent *in situ* Hybridization procedure applied to mitotic chromosomes was essentially the same as previously described (Fonsêca et al. 2010). Hybridization mix consisted of 50% (v/v) formamide, 10% (w/v) dextran sulfate, 2X SSC, and 2–5 ng/µl probe. The slides were denatured for 5 min at 75°C and hybridized for 24 h at 37°C. The final stringency was 76%. Image capture was done in an epifluorescence Leica DMLB microscope using the Leica QFISH software. For final processing, images were artificially coloured using the Adobe Photoshop software version 10.0 and uniformly adjusted for brightness and contrast only.

Results

Genomic Composition

***P. organensis*:** The 299 clusters that corresponded to at least 0.01% of the genome (from 84 up to 11,269 reads) contained 722,865 reads corresponding to 28.38% of the genome. One cluster corresponded to 5S rDNA (0.02%) and three clusters to 35S rDNA (1.9%). The superfamilies

Ty3/gypsy retrotransposons were the most abundant dominated by Tekay (17.37%) and Galadriel (), against 2.70% of Ty1/copia, mainly Bianca. This is followed by satellite DNA (1.50%) (Table 1).

***P. cincinnata*:** All 252 clusters (from 49 up to 10,774 reads) contained 455,846 reads corresponding to 60.49% of the genome and their identification showed that the most abundant superfamilies corresponded to Ty1/copia (35.69%, mainly Angela), followed by Ty3/gypsy retrotransposons (18.47%, from which 9.98% of Chromovirus, Tekay, while 8.48% Gypsy/non-Chromovirus, Athila). LINEs, 35S rDNA and 5S rDNA represent (0.04%), (0.72%) and (0.025%) of the genome (Table 1).

***P. quadrangularis*:** All 161 clusters (from 106 up to 34,517 reads) contained 994,022 reads corresponding to 73.05% of the genome and their identification showed that the most abundant superfamilies corresponded to Ty3/gypsy [41.23%, Tekay (35.71%) and Athila (5.51%)]. followed by Ty1/copia [25.45%, Angela (24%), Ale (0.92%), Tork (0.30%), SIRE (0.21%) and Bianca (0.01%)] and LINEs (2.38%). The 35S rDNA corresponded to 0.74% of the genome (Table 1).

Comparative analyses: of repeats in the three species revealed that Ty3-Tekay, Ty1-Angela, and Ty1-SIRE elements, were shared by the two species of the *Passiflora* subgenus, with the exception of cluster 26 (which was only found in *P. quadrangularis*). For *P. organensis* we only found cluster 29, that was not present in the other two species (Figure 1).

Phylogeny of Gypsy-Tekay

Because Gypsy-Tekay was the element present in the three sampled species, was analyzed this element in more detail using similarity searches against the GypsyDatabase to better understand its divergency. Most of the Tekay elements identified were incomplete or truncated. The phylogenetic reconstruction of the integrase of full-length Tekay elements revealed that similar elements are shared among species (Figure 2). The first and second clades were shared by the

three species. The third clade is shared by the *Passiflora* subgenera species (*P. cincinnata* and *P. quadrangularis*) and the fourth lineage has grouped only *P. organensis* elements.

Satellitome in Passiflora

Because no satDNA was identified among the most abundant repeats in the *Passiflora* subgenus, we used the toolkit satMiner to find repeats that were in lower abundance in the genome. We performed nine iterations in *P. organensis* and two in *P. cincinnata* and *P. quadrangularis* (because there remained no readings available for both species). In total we found 45 different satDNA families, with repeat unit lengths ranging between 52 and 3,998 bp, with 977 bp mean value (Table 2). The A+T content of the consensus satDNA sequences varied between 38.2% and 76.2% among families, with 60.9% median value, indicating a slight bias towards A+T rich satDNA. Sequence comparison between repeat units of the 45 satDNA monomers detected homology between PorSat01-161 and PorSat01-162 (83.6%). PciSat01-145 and PquSat01-145 shared 86.1% of sequences homology. These four satDNA showed 54.5% of homology and were grouped into superfamily 1 (PassSF01) (Figure S1).

PorSat25-3100 was also found in *P. cincinnata* (0.0000001%) and *P. quadrangularis* (0.000001%), while PorSat23-970 was presented in *P. quadrangularis* (0.04%), but absent in *P. cincinnata*.

After assembling the *Passiflora* rDNAs, we have performed automatic gene annotation and described the gene sequences corresponding to the 26S, 18S and 5.8S genes and the transcribed spacer regions (ITS1 and ITS2) (Figure S2). Also, using bioinformatics tools we have observed high similarity (100% identity) between PquSat05-100 satellite and the IGS region of the 35S rDNA sequence. The region of similarity is made up of four subunits, two of 595 and two of 344, with smaller (100 to 200bp) subrepeats (Figure S3). We hypothesize that PquSat05-100 satellite derives from a small fraction of IGS, which was amplified in the *P. quadrangularis* genome.

Chromosomal Localization

To determine the chromosomal location of the most abundant TE families, Ty1/Angela and Ty3/Tekay, we prepared probes containing the integrase domain from clusters CL5 and CL6, respectively, from *P. quadrangularis* for Fluorescence *in Situ* Hybridization (FISH). Ty1/Angela retroelements were dispersed in *P. quadrangularis* chromosomes, with an increased signal at proximal regions in some chromosomes. Tekay elements also showed a dispersed distribution in all chromosomes in *P. quadrangularis* and *P. cincinnata*, while in *P. organensis* it was present in pericentromeric regions (Figure 3).

To determine the chromosome location of the tandem repeats, we used the most abundant satDNA found using Tarean and the first rounds of satMiner (R0 and R1) as probe. PquSat01-145 hybridized predominantly in subterminal sites in most chromosomes of *P. quadrangularis* and *P. cincinnata* (Figure 4). Satellite PquSat05-100 showed six terminal signals, as well as weak dispersed signals in 10 chromosomes of *P. quadrangularis*, and four terminal signals in *P. cincinnata*. In both species, the strong signals co-localized with the 35S rDNA sites (Figure 4). The other satDNAs from *P. quadrangularis* and *P. cincinnata* (PquSat02-408, PquSat03-55, PquSat04-457, PquSat06-1083 and PciSat02-111) showed variable dispersed patterns (Figure 4).

In *P. organensis*, PorSat01-161 and PorSat12-167 showed subterminal distribution in one chromosome pair each. PorSat02-1800 showed a subterminal site in one chromosome pair and a pericentromeric site in another. PorSat04-1004 showed pericentromeric signals in another chromosome pair. These four repeats are useful markers for chromosome identification. PorSat07-641 showed pericentromeric distribution in all chromosome pairs, with variable intensity (Figure 5). PorSat05-510 showed dispersed distribution in all chromosome pairs, while PorSat09-52, PorSat11-371 and PorSat13-398 showed a scattered distribution throughout the genome.

Discussion

In the present work, we report the first comparative study using genomic *in silico* analysis and cytogenomics for comprehensive characterization of repetitive elements in *Passiflora*. Here, we analyzed three *Passiflora* genomes with at least ten-fold difference in genome size (207 to 2,621 Mbp). Plant genome sizes span several orders of magnitude ranging from the 63–64 Mbp in *Genlisea* sp. (Fleischmann et al. 2014) to the more than 148,851 Mbp genome of *Paris japonica* (Pellicer et al. 2010). Significant genome size variations are also common even within a single genus such as *Gossypium*, *Oryza* and *Oxalis* where 3, 3.6 and 70-fold genome size variations have been reported, respectively (Ammiraju et al. 2006; Hendrix and Stewart, 2005; Vaio et al. 2018). This genome size variation in plants is mainly due to polyploidization (Adams and Wendel, 2005; Bennetzen et al. 2005) and TE proliferation and/or elimination (Devos et al. 2002; Hawkins et al. 2009; Ma et al. 2006; Neumann et al. 2006).

We observed that about 28 to 73% of the genome is composed by TEs and between 0.1% and 4% by satellite DNA, which is comparable to other plant genomes of similar sizes (Macas et al. 2011; Macas et al. 2015). In *P. quadrangularis*, we observed that Ty3/gypsy dominated (35%), represented by Tekay and Athila, and Ty1/Angela was highly abundant with (24%). while Ty1/copia retrotransposons showed higher proportion (35.7%) in *P. cincinnata* (Angela being the most abundant lineage, 29%). This high abundance of Copia has already been observed in the passion-fruit, *Passiflora edulis* (16.89%, Pamponet et al. 2019), another species from the *Passiflora* subgenus (1,232 Mpb, Yotoko et al. 2011). In *Passiflora edulis*, Costa et al. (2019) corroborated Angela as the most abundant lineage (1.9%) from the Copia superfamily (3.12%) and Tekay (8.5%, referred to as *Del*) from Gypsy (10.52%). In *P. organensis*, Angela was not detected, but Tekay accounted for most of its repeats (17.37% out of 28.38% of repeats). Thus, we can affirm that the increase in genome size within the genus, so far apparently concentrated in the *Passiflora* subgenus, was caused by an increase in both Gypsy with 33% in

P. edulis (Pamponet et al. 2019), 18.45% in *P. cincinnata* and 41.22% in *P. quadrangularis* compared to 20.26% in *P. organensis* (*Decaloba* subgenus), and to Copia elements with 35.66% in *P. cincinnata*, 25.44% in *P. quadrangularis* and 16.89% in *P. edulis* vs. 2.7% in *P. organensis*. Angela elements appear in large proportion in the *Passiflora* subgenus, but was not present in *Decaloba* subgenus (*P. organensis*).

We observed that most transposable element families are represented only by two or three clusters indicating their long term presence without changes in sequence or structure. Only Athila, Angela and Tekay (and SIRE in *P. cincinnata* only) retrotransposons were found in multiple clusters suggesting higher divergence and abundance. Most of the Tekay elements were incomplete or truncated in the three species, suggesting active elimination. Thus, the increase in genome size may be due to large and long term bursts, so far not counterbalanced by sufficient removal mechanisms (Ibarra-Laclette et al. 2013). The opposite was observed in *Fritillaria*, where the evolution of truly obese genomes were largely determined by the failure of the mechanisms responsible for repeated elimination that effectively operate in species with smaller genomes to counteract genome expansion (Ambrozová et al. 2011). Transposable elements are frequently recognized as “genomic fossils” that were once autonomous, but, at some point, they experience a mutation that leaves them inactive (Cruz et al. 2014). The majority of *P. edulis* TEs (70.8%) were incomplete, corroborating previous findings showing that most TE copies are either defective or fossilized (Costa et al. 2019). Only Angela showed a higher proportion of complete elements in *P. edulis* (Costa et al. 2019), compatible with a burst of amplification restricted to the subgenus *Passiflora*.

Divergence in repetitive DNA is a primary driving force for genome and chromosome evolution. The relationships of full-length Tekay elements from the three species in the phylogenetic reconstruction showed that most of the clusters are shared by *P. cincinnata* and *P. quadrangularis*. This similarity probably reflects that they already existed 12 Mya in the

common ancestor of these species (Sader et al. 2019a). The clusters that are shared by the three species probably belong to a *Gypsy* element that was already present in the common ancestral between the two subgenus, before its evolutionary divergence >40 Mya (Sader et al. 2019a). According to Costa et al. (2019), insertions of retroelements in *P. edulis* were dated between 1 and 2 Mya. In our work we have seen that some Tekay clusters were present in the last common ancestral among the three species. Apart from methodological differences, a possible explanation for this discrepancy could be that the authors analyzed TEs from gene-rich regions, which are located at chromosomal ends (Sader et al. 2019b). In our case, we used elements from the most abundant clusters that may have accumulated in the pericentromeric regions for longer time. Furthermore, it is possible that young, full-length elements representing older Tekay lineages are present in these genomes. The prevalence of young, full-length LTR retrotransposons has been found previously in plants (SanMiguel et al. 1998; McCarthy et al. 2002), baker's yeast (Jordan and McDonald 1999), *C. elegans* (Bowen and McDonald 1999), and *D. melanogaster* (Bowen and McDonald 2001).

In situ localization of the retrotransposons in pericentromeric regions or dispersed throughout the chromosomes is a common feature of plant genomes of similar sizes, small and large, respectively (Miller et al. 1998; Cheng and Murata 2003; Nagaki et al. 2004, Neumann et al. 2011). The literature indicates that retrotransposons generally accumulate in dispersed patterns across plant chromosomes, unlike satellite DNAs that form more defined clusters (Heslop-Harrison and Schwarzacher 2011; Heslop-Harrison and Schmidt 2012; Ribeiro et al. 2017; de Souza et al. 2018). A dispersed distribution was also observed in *P. edulis*, where terminal or subterminal regions of the chromosome arms are gene-rich, while the proximal regions are gene-poor and consist of dispersed repetitive sequences (Pamponet et al. 2019; Sader et al. 2019; Stack et al. 2009). This distribution patterns suggest that gene-rich regions, and probably recombination, is more evenly distributed in *P. organensis*, except in

pericentromeric regions, while higher in chromosomal ends in *P. quadrangularis* and *P. cincinnata*, as well as in *P. edulis*.

The PquSat05-100, observed in *P. quadrangularis* and *P. cincinnata*, was probably originated from the IGS regions of the 35S rDNA. There are several examples where satDNA originated from the IGS or rDNA coding genes (Garrido-Ramos 2015; Plohl 2012), for example, the satDNA Jumper, in the *Phaseolus* genus, derives from the NTS of the 5S rDNA (Ribeiro et al. 2016), showing that this phenomenon is rather common than rare in plants.

We have found one subtelomeric superfamily (SF1) of satDNA present in all three species studied here and in *P. edulis* (Pamponet et al. 2019), but no conserved putative centromeric repeat was found. Conserved centromeric repeats in a genus or beyond is rare (Zhong et al. 2002), but conserved subtelomeric repeat was also found in *Phaseolus* (Ribeiro et al. 2019). Only PorSat06-1200 is a possible centromeric satellite (data not shown). Furthermore, the CRM elements, which are centromeric in other species such as maize (Zhong et al. 2002), are in very low abundance in *Passiflora* (no detected in *P. quadrangularis*; 0.4% in *P. cincinnata*; and 0.31% in *P. organensis*). Therefore, the nature of *Passiflora* centromeres needs to be further characterized.

Passiflora organensis, the species with the smaller genome, contains an unusually large number of different satDNA. This wide diversity in satDNA has not been previously observed in plants, only in *Luzula* (Heckman et al. 2013), a species with holocentric chromosomes. Hence, to know if these satDNA were present in the other two species, we used bioinformatics tools, to search for all those satDNA in the other two species. Only one of these satDNA clusters (PorSat25-3100) was also detected in both species of the *Passiflora* subgenus (although in very low proportions) and PorSat23-970 was also found only in *P. quadrangularis*. This could be due to the fact that, in these “fat” genomes, the satDNAs present in low or very low abundance failed to be detected using RepeatExplorer pipeline. Using satMiner, the search for satDNA

was more efficient, although satDNA in very low abundance, such as PorSat25-3100 and PorSat23-970, were only possible to find using the Map to reference tool in Geneious. Thus, for large genomes, it is difficult to find satellites in very low abundance, then, we suggest the use of the three combined approaches (Repeat explorer and Tarean; and Satminer; and finally “Map to reference” using Geneious). Thus, the comparative analyses with species with smaller genomes may be a good option for finding satDNA using this approach. The fact that species with smaller genome size, in this case *P. organensis*, has a greater variability in satDNA

Different satDNA families may be present in one species. For example, there are up to 15 families in *Pisum sativum* (Macas et al. 2007), 62 families in *Locusta migratoria* (Ruiz-Ruano et al. 2016), or 9 satDNA families within the human genome (Levy et al. 2007; Miga 2015). However, there are usually one or a few predominant satDNA families in each species (Macas et al. 2007; Ruiz-Ruano et al. 2016; Levy et al. 2007; Miga 2015). In *Passiflora* genus, we have observed only one subtelomeric superfamily (SF1) of satDNA present in all three species studied here and in *P. edulis* (Pamponet et al. 2019). This low degree of sharing of most satDNA and TE families (Figure 6) confirm the long divergence time between subgenus *Passiflora* and *Decaloba* genomes (Sader et al. 2019a).

Conclusions

This is the first comparative study of the repetitive fraction in the *Passiflora* genus, expanding the extremes of genomic sizes, and including two subgenus (*Passiflora* and *Decaloba*) and including two cultivated species (*P. cincinnata* and *P. quadrangularis*). Our results showed that *Passiflora quadrangularis* presents a higher accumulation of repetitive DNA sequences, but less divergence in relation to *P. organensis*. *Passiflora cincinnata* showed similarity with *P. quadrangularis* regarding the families of repetitive DNA sequences, although in different proportions, probably reflecting phylogenetic relationships. *Passiflora organensis* presented greater diversity and the highest proportion of satDNA. Together, our data pointed out that the

satellitome is not the fraction responsible for the increase in genome size in *Passiflora*. This increase was originated by the expansion, of two main retroelement lineages (Gypsy/Tekay and Copia/Angela retrotransposons).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Author contribution statement

MAS design of experiments, bioinformatic analysis, amplifications, probe labeling, FISH, data analysis and writing the manuscript. MV bioinformatic analysis, data analysis and writing the manuscript; LAC, MLC, NFM and MCD provided plant material, library preparation and whole-genome sequencing. APH design of experiments, data analysis and writing the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Acknowledgements: We are grateful to Dr. Francisco Ruiz-Ruano for bioinformatics support and for critical reading of the manuscript. This study was partially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) through scholarships awarded to M. A. Sader (IBPG-1086-2.03/15 and FACEPE AMD-0128-2.00/17) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) through fellowship awarded to A. Pedrosa-Harand. This study was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES, Finance Code 001); EMBRAPA () and FAPESP (2019/07838-6).

References

- Adams KL, Wendel JF (2005) Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion on Plant Biology* 8: 135-141.
- Ammiraju JS, Luo M, Goicoechea JL, Wang W, Kudrna D, Mueller C & Fang E (2006) The *Oryza* bacterial artificial chromosome library resource: construction and analysis of 12 deep-coverage large-insert BAC libraries that represent the 10 genome types of the genus

Oryza. Genome Research 16:140-147.

Araya S, Martins AM, Junqueira NT, Costa AM, Faleiro FG & Ferreira ME (2017) Microsatellite marker development by partial sequencing of the sour passion fruit genome (*Passiflora edulis* Sims). BMC Genomics 18:549.

Aversano R, Contaldi F, Ercolano MR, Grosso V, Iorizzo M, Tatino F & Delledonne M (2015) The *Solanum commersonii* genome sequence provides insights into adaptation to stress conditions and genome evolution of wild potato relatives. The Plant Cell 27:954-968.

Bennetzen JL, Ma J, Devos KM (2005) Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. Annals of Botany 95:127-132.

Biscotti MA, Olmo E & Heslop-Harrison JP (2015) Repetitive DNA in eukaryotic genomes. 415-420.

Bowen NJ, and McDonald JF (1999) Genomic analysis of *Caenorhabditis elegans* reveals ancient families of retroviral-like elements. Genome Res. 9:924–935.

Bowen NJ, and McDonald JF (2001) *Drosophila* euchromatic LTR retrotransposons are much younger than the host species in which they reside. Genome Res. 11:1527–1540.

Carvalho CR, & Saraiva LS (1993) An air-drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. Biotechnic & Histochemistry 68:142-145.

Cheng ZJ & Murata M (2003) A centromeric tandem repeat family originating from a part of Ty3/gypsy-retroelement in wheat and its relatives. Genetics 164:665-672.

Costa ZP, Cauz-Santos LA, Ragagnin GT, Van Sluys MA, Dornelas MC, Berges H & Vieira MLC (2019) Transposable element discovery and characterization of LTR-retrotransposon evolutionary lineages in the tropical fruit species *Passiflora edulis*. Molecular Biology Reports 46: 6117-6133.

Cruz GMQ, Metcalfe CJ, De Setta N et al (2014) Virus-like attachment sites and plastic CpG Islands: landmarks of diversity in plant Del retrotransposons. PLoS ONE 9:1–14.

De Koning APJ, Gu W, Castoe TA, Batzer MA, Pollock DD (2011) Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS Genetics*. 7:e1002384.

Derks MF, Smit S, Salis L, Schijlen E, Bossers A, Mateman C & Megens HJ (2015) The genome of winter moth (*Operophtera brumata*) provides a genomic perspective on sexual dimorphism and phenology. *Genome Biology and Evolution* 7:2321-2332.

Devos KM, Brown JK & Bennetzen JL (2002) Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in *Arabidopsis*. *Genome research* 12:1075-1079.

Dierckxsens N, Mardulyn P & Smits G (2016) NOVOPlasty: de novo assembly of organelle genomes from whole genome data. *Nucleic Acids Research* 45:e18-e18.

Fleischmann A, Michael TP, Rivadavia F, Sousa A, Wang W, Temsch EM & Heubl G (2014) Evolution of genome size and chromosome number in the carnivorous plant genus *Genlisea* (Lentibulariaceae), with a new estimate of the minimum genome size in angiosperms. *Annals of botany* 114:1651-1663.

Fonsêca A, Ferreira J, Dos Santos TRB, Mosiolek M, Bellucci E, Kami J & Pedrosa-Harand A (2010) Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Chromosome Research* 18:487-502.

Garrido-Ramos MA (2015) Satellite DNA in plants: More than Just Rubbish. *Genomics and Informatics* 12:87.

Garrido-Ramos MA (2017) Satellite DNA: An evolving topic. *Genes* 9 p. 230.

Gerlach WL, & Bedbrook JR (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research* 7:1869-1885.

Gorinsek B, Gubensek F & Kordis D (2004) Evolutionary genomics of chromoviruses in eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 21:781-798.

Goubert C, Modolo L, Vieira C, Valiente Moro C, Mavingui P & Boulesteix M (2015)

De novo assembly and annotation of the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) repeatome with dnaPipeTE from raw genomic reads and comparative analysis with the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *Genome Biology and Evolution* 7:1192-1205.

Hannan AJ (2018) Tandem Repeats and Repeatomes: Delving Deeper into the ‘Dark Matter’ of Genomes. *EBioMedicine* 31:3-4.

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

Hawkins JS, Proulx SR, Rapp RA, Wendel JF (2009) Rapid DNA loss as a counterbalance to genome expansion through retrotransposon proliferation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106:17811-17816.

Hemleben V, Kovarik A, Torres-Ruiz RA, Volkov RA, & Beridze T (2007) Plant highly repeated satellite DNA: molecular evolution, distribution and use for identification of hybrids. *Systematics and Biodiversity* 5:277-289.

Hendrix B, & Stewart JM (2005) Estimation of the nuclear DNA content of *Gossypium* species. *Annals of Botany* 95:789-797.

Heslop-Harrison JSP, Schwarzacher T (2011) Organisation of the plant genome in chromosomes. *The Plant Journal* 66:18–33.

Ibarra-Laclette E, Lyons E, Hernández-Guzmán G, Pérez-Torres CA, Carretero-Paulet L, Chang TH, Lan T, Welch AJ, Juárez MJA, Simpson J, Fernández-Cortés A, Arteaga-Vázquez M, Góngora-Castillo E, Acevedo-Hernández G, Schuster SC, Himmelbauer H, Minoche AE, Xu S, Lynch M, Oropeza-Aburto A, Cervantes-Pérez SA, Ortega-Estrada MJ, Cervantes-Luevano JI, Michael TP, Mockler T, Bryant D, Herrera-Esterlla A, Albert VA & Herrera-Esterella L (2013) Architecture and evolution of a minute plant genome. *Nature* 498: 94–98.

Jordan IK, and McDonald JF (1999) Tempo and mode of Ty element evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 151:1341–1351.

Jouffroy O, Saha S, Mueller L, Quesneville H & Maumus F (2016) Comprehensive repeatome annotation reveals strong potential impact of repetitive elements on tomato ripening. *BMC Genomics* 17:624.

Judd WS, Campbell CC, Kellogg EA, Stevens PF & Donoghue MJ (2015) *Plant systematics: A phylogenetic approach* 3rd ed. Sinauer Associates Inc. Sunderland Massachusetts

Katoh K & Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30:772-780.

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S & Thierer T (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28:1647-1649.

Kidwell Margaret G. (2002) Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115:49-63.

King K, Jobst J & Hemleben V (1995) Differential homogenization and amplification of two satellite DNAs in the genus *Cucurbita* (Cucurbitaceae). *Journal of Molecular Evolution* 41:996-1005.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921.

Levin HL & Moran JV (2011) Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nature Reviews Genetics* 12:615.

Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP, Axelrod N, Huang J, Kirkness EF, Denisov G, et al. (2007) The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol.* 5: e254.

López-Flores I & Garrido-Ramos MA (2012) The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. In Repetitive DNA. 7:1-28. Karger Publishers.

Ma J, Devos KM, Bennetzen JL (2004) Analyses of LTR-retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice. *Genome Research* 14:860–869.

Macas J, Neumann P & Navrátilová A (2007) Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* 8:427.

Macas J, Kejnovský E, Neumann P, Novák P, Koblížková A, Vyskot B (2011) Next generation sequencing-based analysis of repetitive DNA in the model Dioecious plant *Silene latifolia*. *PLoS One* 6:11

Macas J, Novak P, Pellicer J, Čížková J, Koblížková A, Neumann P & Leitch IJ (2015) In depth characterization of repetitive DNA in 23 plant genomes reveals sources of genome size variation in the legume tribe Fabaeae. *PLoS One* 10:11.

Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA & Dewell SB (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437:376.

Maumus F, Quesneville H (2016) Impact and insights from ancient repetitive elements in plant genomes. *Curr Opin Plant Biol* 30:41–6.

McCarthy EM, Liu J, Lizhi G, McDonald JF (2002) Long terminal repeat retrotransposons of *Oryza sativa*. *Genome Biology*. 3: 10.

Melo NF, Guerra FMS (2003) Variability of the 5S and 45SrDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Annals of Botany* 92:309–316

Metzlaff M, Troebner W, Baldauf F, Schlegel R & Cullum J (1986) Wheat specific repetitive DNA sequences—construction and characterization of four different genomic clones. *Theoretical and Applied Genetics* 72:207-210.

Miga KH (2015) Completing the human genome: The progress and challenge of satellite

DNA assembly. *Chromosome Research*. 23:421–426.

Mikkelsen TS, Wakefield MJ Aken B, Amemiya CT Chang JL, Duke S, Garber M, Gentles AJ, Goodstadt L, Heger A et al (2007) Genome of the marsupial *Monodelphis domestica* reveals innovation in non-coding sequences. *Nature* 447:167–178.

Miller JT, Dong F, Jackson SA, Song J & Jiang J (1998) Retrotransposon-related DNA sequences in the centromeres of grass chromosomes. *Genetics* 150:1615-1623.

Mravinac B, Plohl M, Ugarković D (2005) Preservation and high sequence conservation of satellite DNAs suggest functional constraints. *J. Mol. Evol.* 61:542–550.

Nagaki K et al (2004) Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. *Nature genetics* 36:138.

Neumann P et al (2019) Systematic survey of plant LTR-retrotransposons elucidates phylogenetic relationships of their polyprotein domains and provides a reference for element classification. *Mobile DNA* 10:1.

Neumann P, Navrátilová A, Koblížková A, Kejnovský E, Hřibová E, Hobza R & Macas J (2011) Plant centromeric retrotransposons: a structural and cytogenetic perspective. *Mobile DNA* 2:4.

Novák P, Neumann P & Macas J (2010) Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics* 11:378.

Novák P, Neumann P, Pech J, Steinhaisl J & Macas J (2013) RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics* 29:792-793.

Novák P, Ávila LR, Koblížková A, Vrbová I, Neumann P, Macas J (2017) TAREAN: a computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled shortreads. *Nucleic Acids Res* 45:e111.

Pamponét VCC et al (2019) Correction to: low coverage sequencing for repetitive DNA

analysis in *Passiflora edulis* Sims: citogenomic characterization of transposable elements and satellite DNA. BMC Genomics 20:303.

Pellicer J, Fay MF, Leitch IJ (2010) The largest eukaryotic genome of them all? Botanical Journal of the Linnean Society 164:10–15.

Pita S, Panzera F, Mora P, Vela J, Cuadrado Á, Sánchez A & Lorite P (2017) Comparative repeatome analysis on *Triatoma infestans* Andean and Non-Andean lineages, main vector of Chagas disease. PLoS One 12: e0181635.

Plohl M, Meštrović N, Mravinac B (2012) Satellite DNA evolution. In Repetitive DNA 7:126-152. Karger Publishers.

Pritham EJ (2009) Transposable elements and factors influencing their success in eukaryotes. Journal of Heredity 100:648-655.

Ribeiro T, Vasconcelos E, Dos Santos KG, Vaio M, Brasileiro-Vidal AC & Pedrosa-Harand A (2019) Diversity of repetitive sequences within compact genomes of *Phaseolus* L. beans and allied genera *Cajanus* L. and *Vigna* Savi. Chromosome Research 1-15.

Ribeiro T, Dos Santos KG, Richard MM, Sévignac M, Thareau V, Geffroy V & Pedrosa-Harand A (2017) Evolutionary dynamics of satellite DNA repeats from *Phaseolus* beans. Protoplasma 254:791-801.

Ruiz-Ruano FJ, López-León MD, Cabrero J & Camacho JPM (2016) High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. Scientific Reports 6:28333.

Sader MA, Amorim BS, Costa L, Souza G & Pedrosa-Harand A (2019a) The role of chromosome changes in the diversification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). Systematics and Biodiversity 17:7-21.

Sader MA, Dias Y, Costa ZP, Munhoz C, Penha H, Bergès H & Pedrosa-Harand A (2019b) Identification of passion fruit (*Passiflora edulis*) chromosomes using BAC-FISH. Chromosome Research 1-13.

SanMiguel P, Gaut BS, Tikhonov A, Nakajima Y, Bennetzen JL (1998) The paleontology of intergene retrotrans-posons of maize. *Nat. Genet.* 20:43–45.

Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves TA et al (2009) The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326:1112–1115.

Siefert, J. L. (2009). Defining the mobilome. In *Horizontal gene transfer* (pp. 13-27). Humana Press.

Souza MM, Palomino G, Pereira MG, Viana AP (2004) Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species. *Hereditas* 141:31–38

Stack SM, Royer SM, Shearer LA, Chang SB, Giovannoni JJ, Westfall DH & Anderson LK (2009) Role of fluorescence *in situ* hybridization in sequencing the tomato genome. *Cytogenetic and Genome Research* 124:339-350.

Ulmer T & Macdougall JM (2004) *Passiflora*: Passion flowers of the World. Timber Press, Portland.

Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M & Rozen SG (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*.

Vaio M, Nascimento J, Mendes S, Ibiapino A, Felix LP, Gardner A & Guerra M (2018) Multiple karyotype changes distinguish two closely related species of *Oxalis* (*O. psoraleoides* and *O. rhombo-ovata*) and suggest an artificial grouping of section Polymorphae (Oxalidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 188:269-280.

Weising K, Nybom H, Pfenninger M, Wolff K & Kahl G (2005) DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. CRC press.

Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B & Paux E (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics* 8:973-982.

Wolf PG, Sessa EB, Marchant DB, Li FW, Rothfels CJ, Sigel EM & Soltis PS (2015) An exploration into fern genome space. *Genome Biology and Evolution* 7:2533-2544.

Yotoko KSC, Dornelas MC, Togni PD, Fonsêca TC, Salzano FM, Bonatto SL, Freitas LB (2011) Does variation in genome sizes reflect adaptive or neutral processes? New clues from *Passiflora*. *Plos One* 6:127–131

Zhong CX, Marshall JB, Topo C, Mroczek R, Kato A, Nagaki K & Dawe RK (2002) Centromeric retroelements and satDNA interact with maize kinetochore protein CENH3. *The Plant Cell* 14:2825-2836.

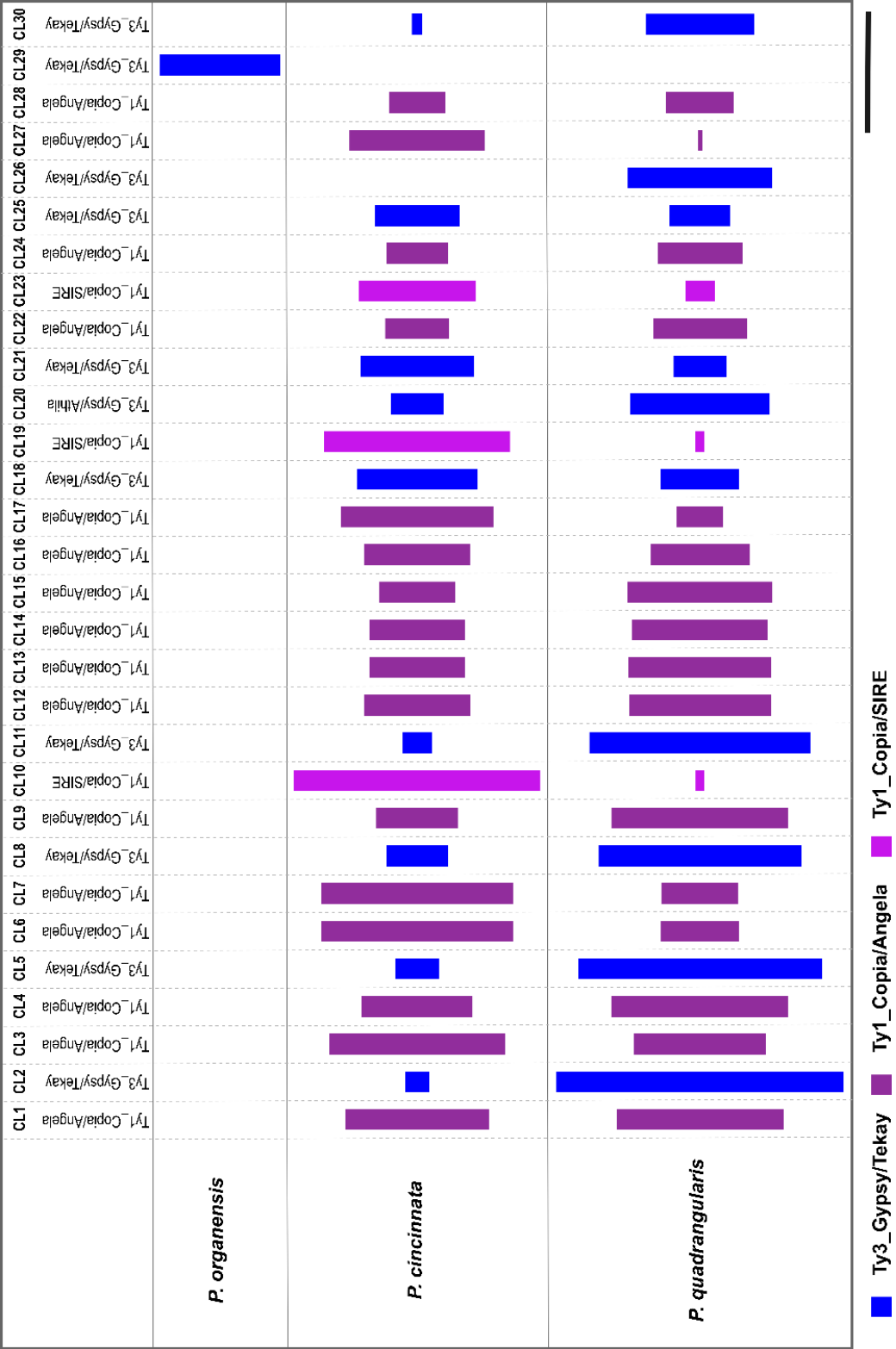


Figure 1. Comparative clustering in the three *Passiflora* species.

Figure 2. Phylogenetic relationship of Ty3/gypsy elements of *Passiflora* based on the integrase domain (INT) aminoacids. Sequences used for comparison were retrieved from RexDB, Neumann et al. (2019).

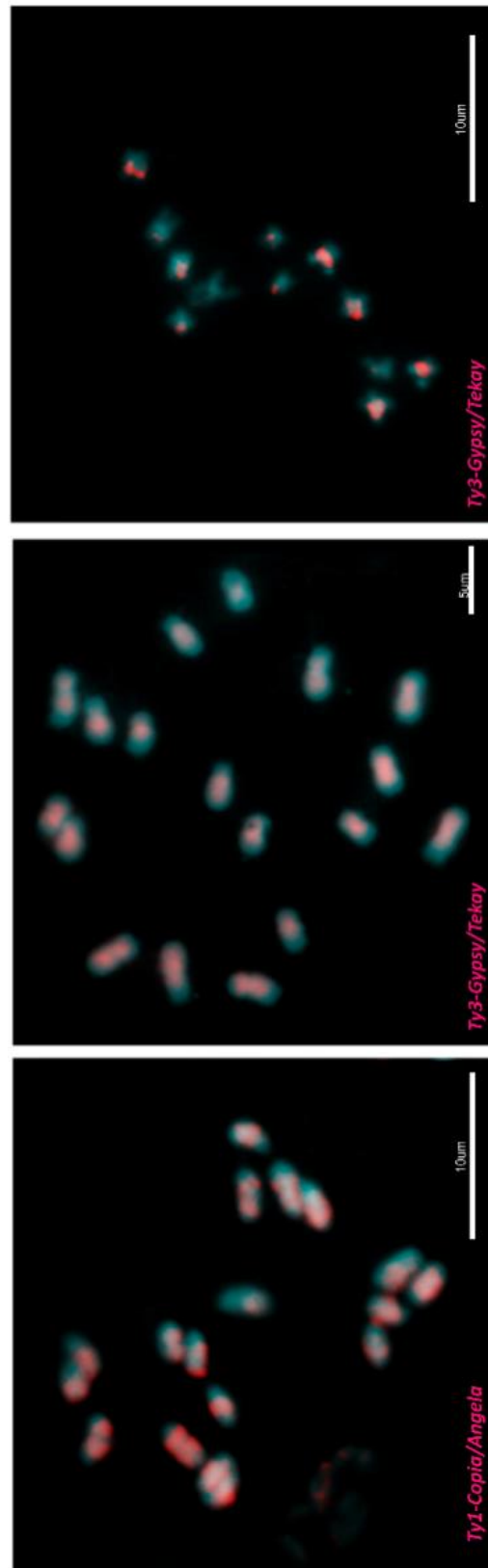


Figure 3. Chromosomal distribution of the two most abundant TEs in *Passiflora* genomes. **(a)** *Copia*/*Angela* element in *P. quadrangularis*; **(b-c)** *Gypsy*/*Tekay* element in *P. quadrangularis* **(b)** and *P. organensis* **(c)**

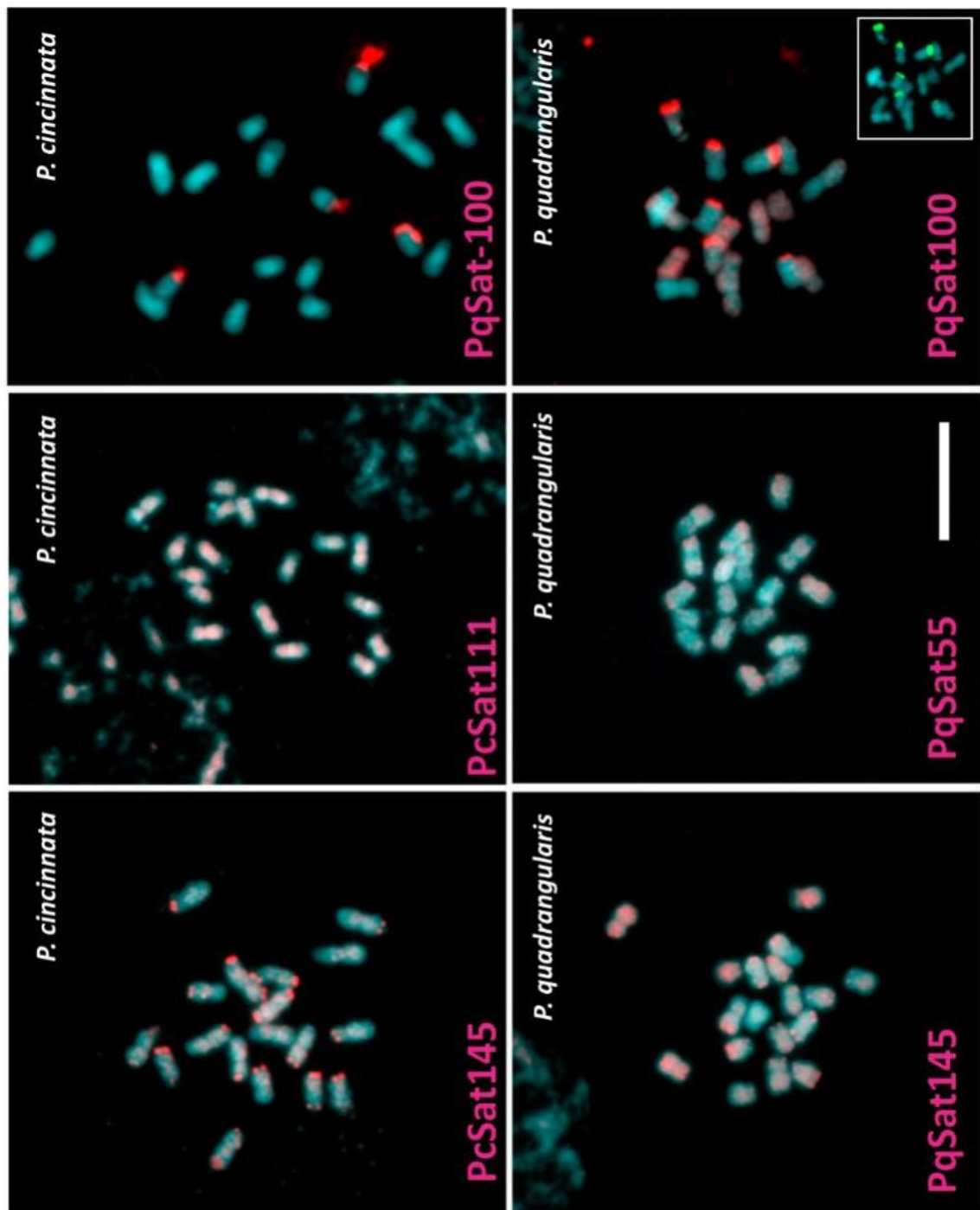


Figure 4. FISH detection of satellite repeats on mitotic chromosomes of *Passiflora cincinnata* and *P. quadrangularis* (*Passiflora* subgenus species).

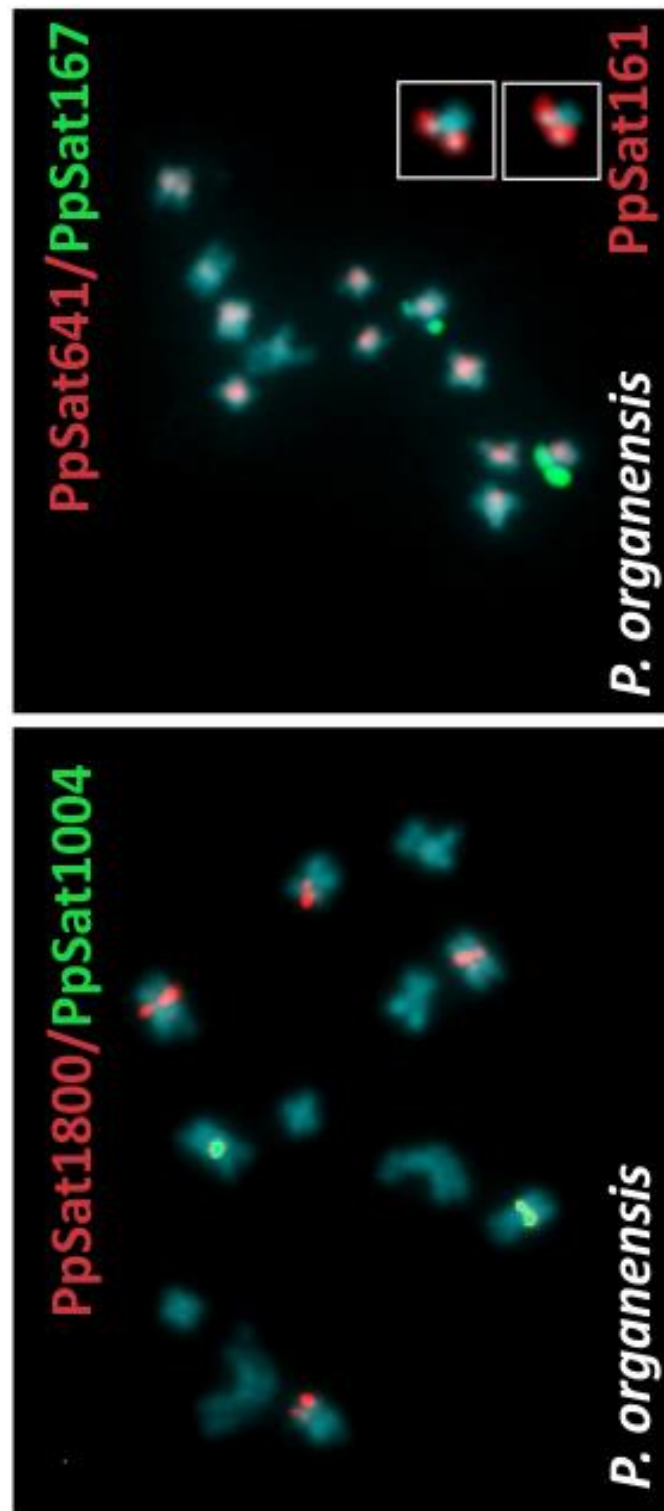


Figure 5. FISH of five satellite repeats on mitotic chromosomes of *Passiflora organensis* (*Decaloba* subgenus)

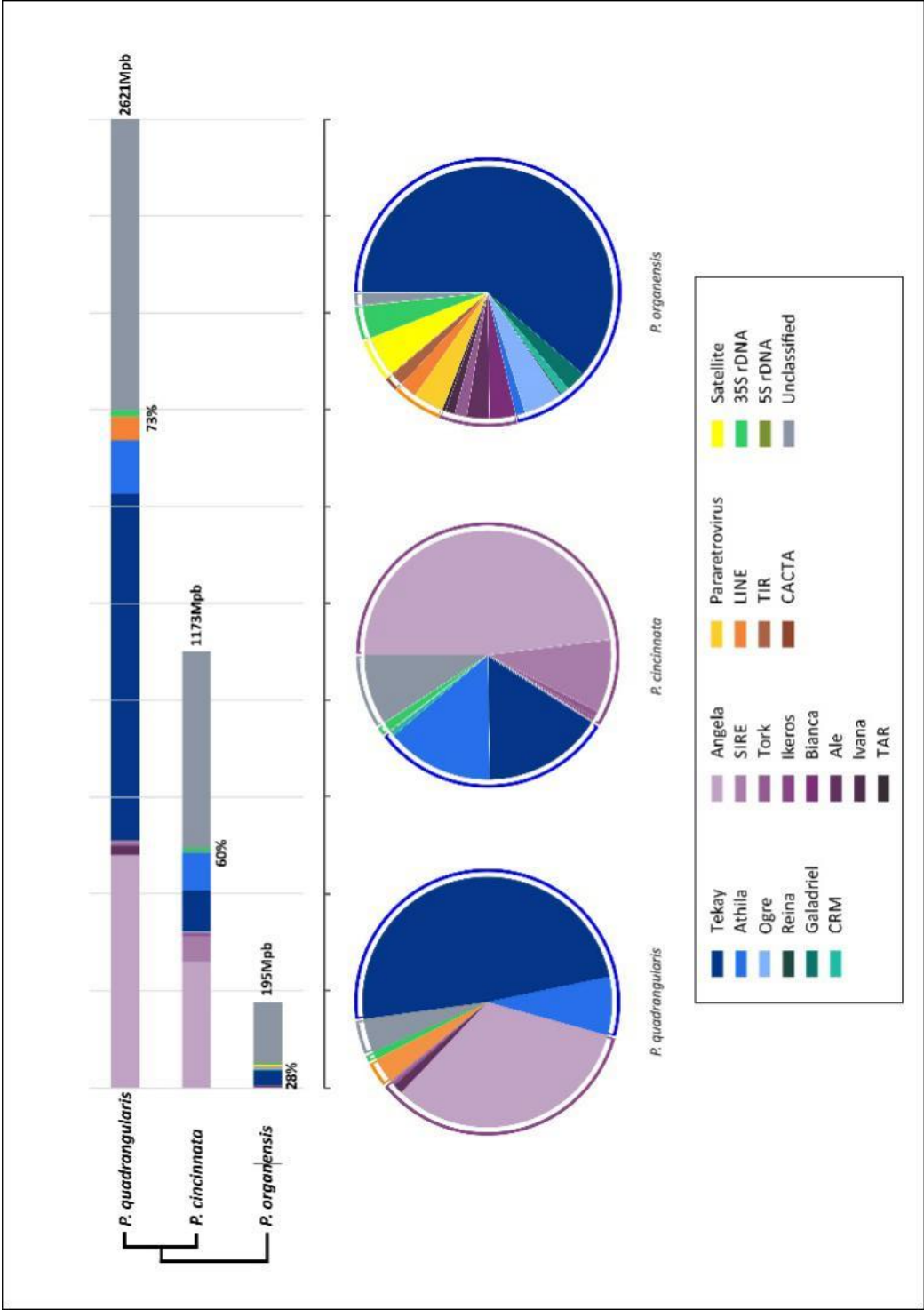


Figure 6. Summary of the composition of the repetitive fraction in the genomes studied and their evolutionary relationship.

Table 1. Genome proportion (%) of repetitive sequences identified in individual analyses of three *Passiflora* genomes.

Repeat	Genome proportion (%)		
	<i>P. organensis</i>	<i>P. cincinnata</i>	<i>P. quadrangularis</i>
Class I			
Ty3/Gypsy			
<i>Chromovirus</i>			
CRM	0.31	0.37	
Galadriel	0.75	0.05	
Reina	0.06	0.01	
Tekay	17.37	9.54	35.71
<i>Non-chromovirus</i>			
Athila	0.35	8.48	5.51
Ogre	1.42		
Ty1/Copia			
Ale	0.82	0.04	0.92
Angela		29.05	24.00
Bianca	0.96	0.09	0.01
Ikeros		0.16	
Ivana	0.34	0.03	
SIRE		5.74	0.21
TAR	0.13	0.01	
Tork	0.45	0.54	0.30
LINE	0.63	0.04	2.38
Pararetrovirus	1.11		0.04
Class II			
TIR	0.48		
CACTA	0.03		
SatDNA	1.50		
rDNA			
5S	0.02	0.02	
35S	1.19	0.72	0.74
Unclassified repeats	0.45	5.54	3.17
Total	28.38	60.49	73.05

Table 2. SatDNAs identified using the RepeatExplorer and satMiner pipelines for *Passiflora quadrangularis*, *P. cincinnata* and *P. organensis* showing length (nt), A + T content (%), abundance (%), and Genbank accession number

Family	Round	pb	A + T (%)	Abundance (%)	Genbank Accession	Total (%)/Total (Mpb)
<i>P. cincinnata</i>						0.1085/0.978 Mpb
PciSat01-145	R1 (CL6)	145	43.4	0.1061		
PciSat02-111	R1(CL358)	111	65.8	0.0024		
<i>P. organensis</i>						4.0908/9.78 Mpb
PorSat01-161	Tarean (CL7)	161	38.6	3.3970		
PorSat02-1800	Tarean (CL80)	1800	53.2	0.1060		
PorSat03-665	Tarean (CL92)	665	58.9	0.0670		
PorSat04-1004	Tarean (CL95)	1004	54.6	0.0620		
PorSat05-510	Tarean (CL81)	510	46.8	0.0960		
PorSat06-1200	Tarean (CL166)	1200	69.3	0.0170		
PorSat07-641	Tarean (CL188)	641	54.8	0.0150		
PorSat08-1557	Tarean (CL84)	1557	70.9	0.1160		
PorSat09-52	Tarean (CL273)	52	63.2	0.0130		
PorSat10-104	Tarean (CL246)	104	53.9	0.0140		
PorSat11-371	R0 (CL89)	371	42.9	0.1200		
PorSat12-167	R1 (CL128)	167	70.1	0.0300		
PorSat13-398	R1 (CL62)	398	62.3	0.0027		
PorSat14-861	R1 (CL77)	861	65.7	0.0087		
PorSat15-320	R1 (CL187)	320	76.2	0.0039		
PorSat16-1562	R2 (CL27)	1562	65.6	0.0098		
PorSat17-965	R2 (CL65)	965	60	0.000027		
PorSat18-871	R2 (CL179)	871	63.3	0.0072		
PorSat19-162	R2 (CL182)	162	64.2	0.0016		
PorSat20-719	R3 (CL34)	719	65.4	0.0036		
PorSat21-81	R3 (CL132)	81	62	0.0000096		

PorSat22-703	R4 (CL71)	703	65.4	0.00004	
PorSat23-970	R4 (CL87)	970	62	0.00006	
PorSat24-502	R4 (CL104)	502	71.7	0.000011	
PorSat25-3100	R4 (CL173)	3100	62.3	0.000035	
PorSat26-1176	R5 (CL93)	1176	63	0.000033	
PorSat27-1839	R6 (CL29)	1839	61.2	0.000023	
PorSat28-426	R6 (CL54)	426	61.7	0.000007	
PorSat29-576	R6 (CL60)	576	74.7	0.000014	
PorSat30-506	R7 (CL68)	506	59.3	0.000026	
PorSat31-1003	R7 (CL61)	1003	58.6	0.000011	
PorSat32-1142	R7 (CL121)	1142	65.6	0.000012	
PorSat33-2013	R8 (CL181)	2013	64.8	0.000016	
PorSat34-3341	R8 (CL863)	3341	61.2	0.000017	
PorSat35-2125	R8 (CL699)	2125	60	0.000008	
PorSat36-3998	R8 (CL301)	3998	64.3	0.000017	
PorSat37-3415	R8 (CL461)	3415	59.1	0.000012	
<i>P. quadrangularis</i>					0.2213/4.89 Mpb
PquSat01-145	Tarean (CL92)	145	65.3	0.0540	
PquSat02-408	R0 (CL81)	408	55.6	0.0190	
PquSat03-55	R1(CL39)	55	38.2	0.0110	
PquSat04-457	R1(CL181)	457	48.3	0.0065	
PquSat05-100	R1(CL526)	100	39.8	0.1300	
PquSat06-1083	R2 (CL143)	1083	66.6	0.0008	

Table S1 Genome size in pg and Mbp of the analysed *Passiflora* species. Coverage was calculated as follow: $cov = (r \times l)/g$, whereas r corresponds to number of reads used in our analysis, l to read length and g to haploid genome size in bp.

	<i>P. organensis</i>	<i>P. cincinnata</i>	<i>P. quadrangularis</i>
2n =	12	18	18
Genome size (1C)	0.212pg 207.3Mbp	1.420pg 1,388.7 Mbp	2.680pg 2,621.1 Mbp
Individual clustering	600,000	494,343	1,044,658
Cov	0.72×	0.09×	0.1×
Comparative clustering	41,542	235,288	285,022
Cov	0.05×	0.04×	0.03×

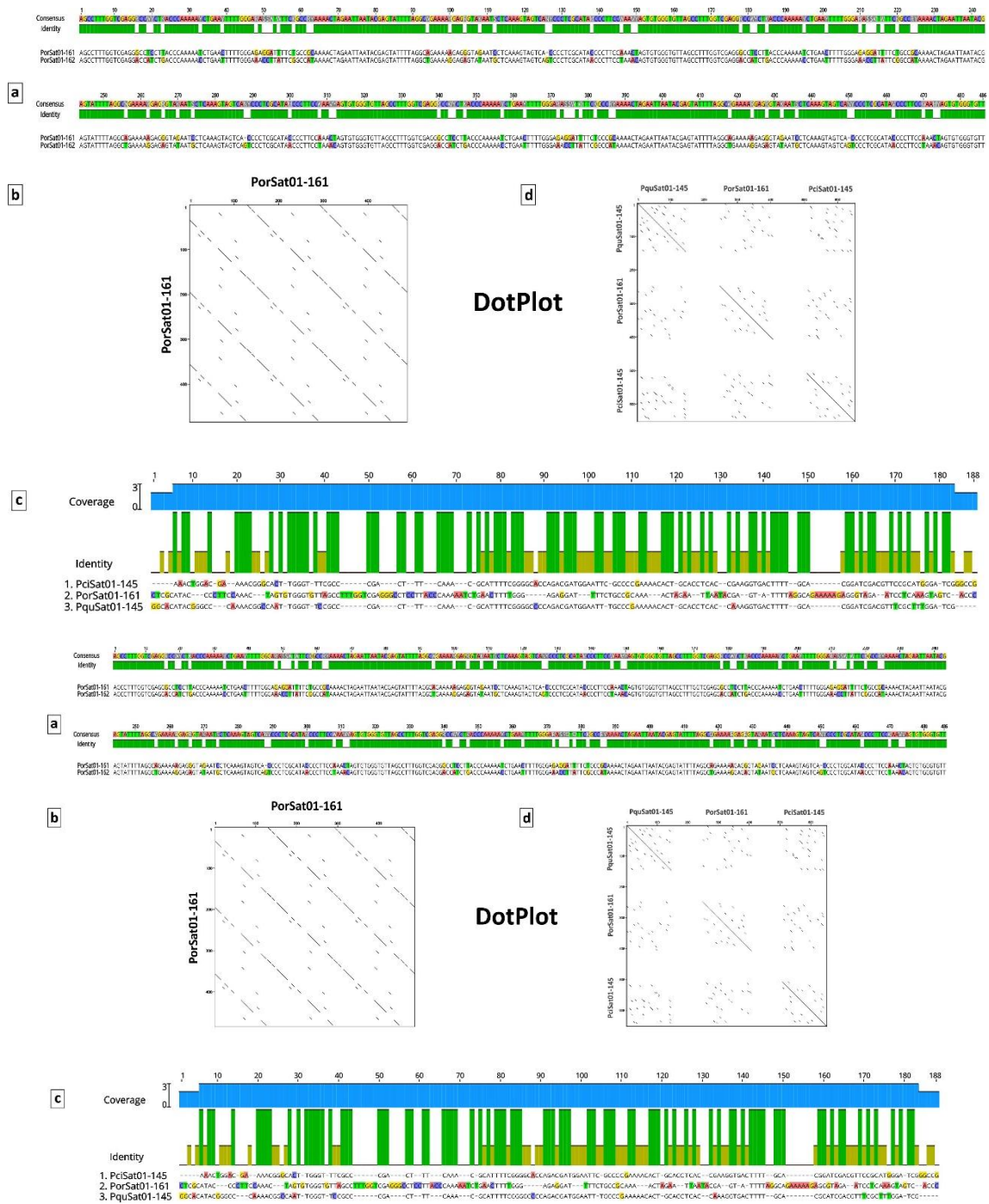


Figure S1. a) Alignment and **b)** DotPlot of satDNA PorSat01-161 and PorSat01-162 sequences showing the high similarity (>87%) between them. **c)** Alignment and **d)** DotPlot of satDNA PorSat01-161, Pqsat01-145 and PciSat01-145 sequences showing the similarity (54%) between them.

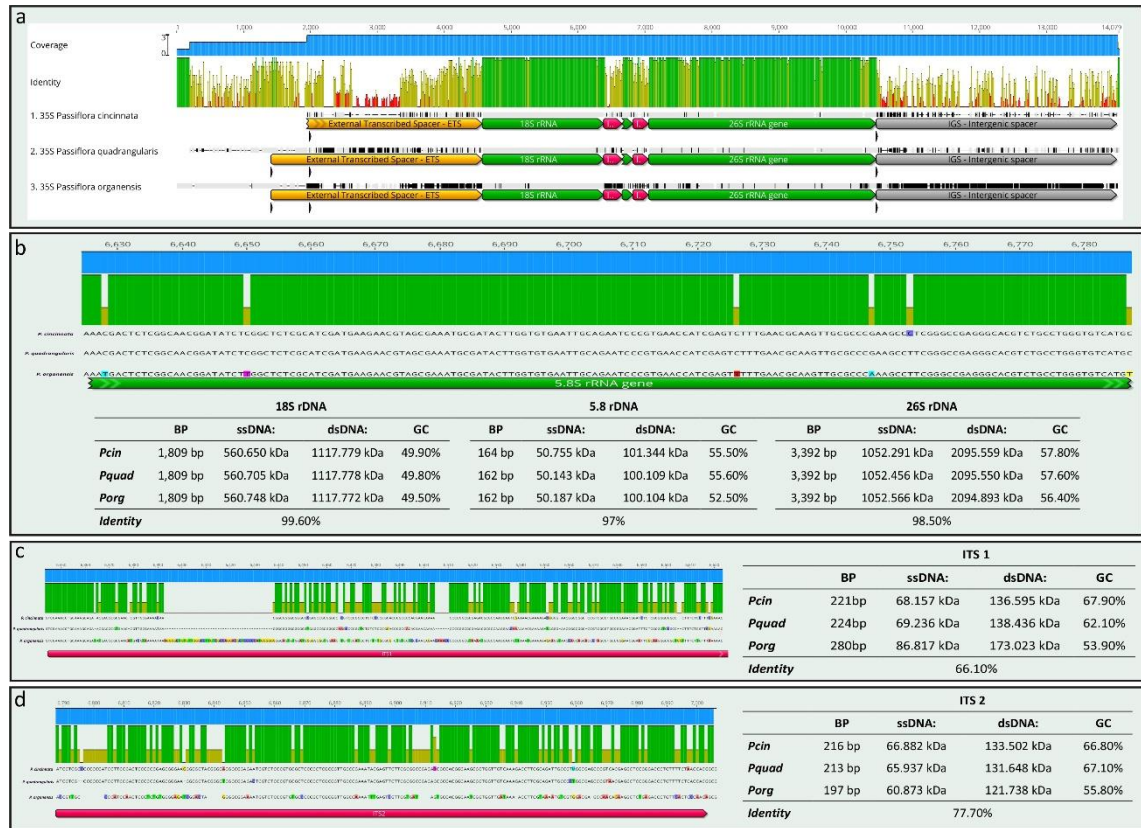


Figure S2. Alignment of 35S rDNA between *P. organensis*, *P. cinnata* and *P. quadrangularis*. Details from b) 5.8S rDNA gene c) ITS 1 and d) ITS 2 and tables with different comparative parameters: size (bp), molecular weight (ssDNA) and dsDNA, and GC content.

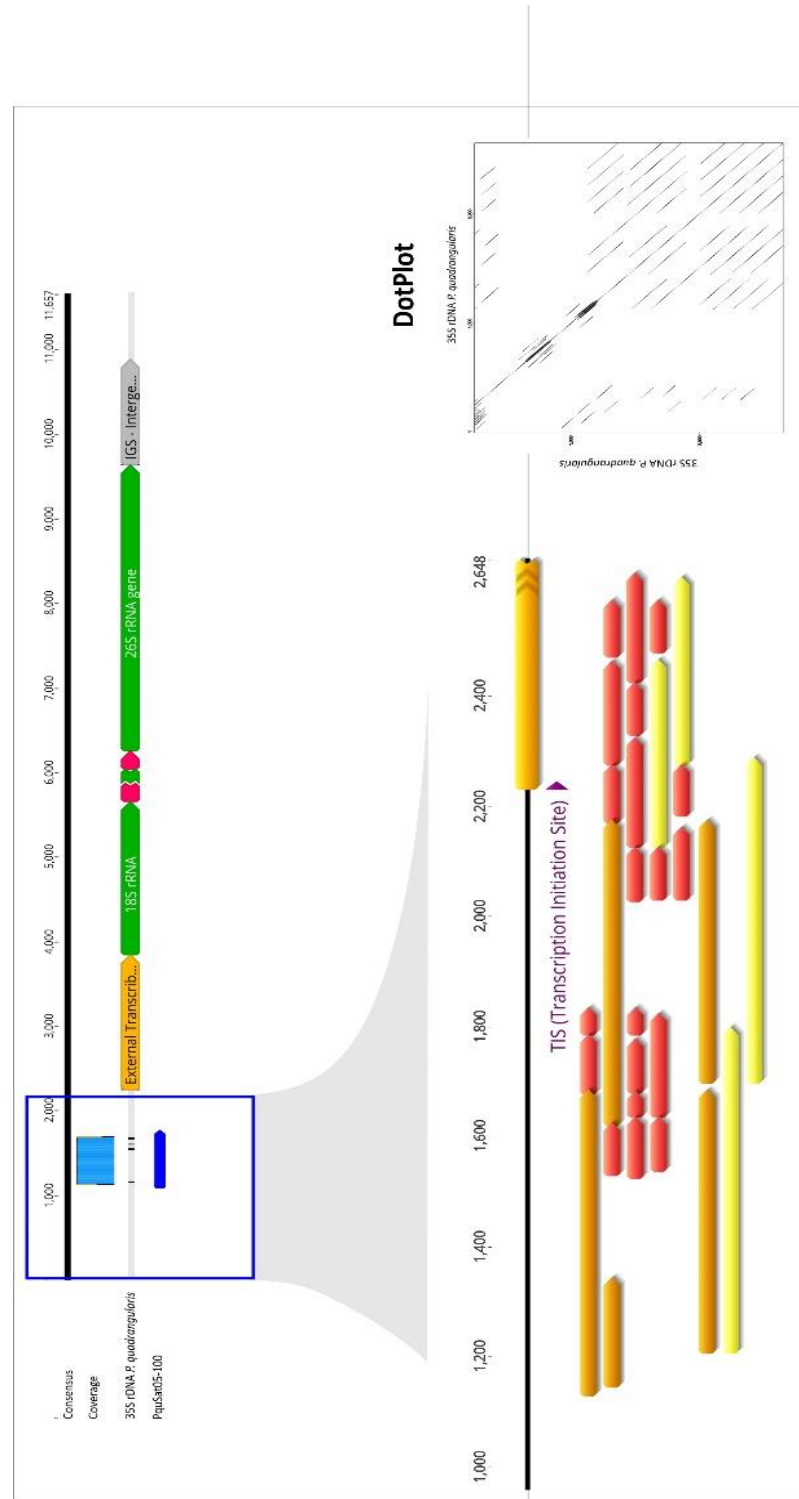


Figure S3. satDNA PquSat05-100 detail of the repeats and subrepeats and region of the 35S rDNA where it was found.

4 CONCLUSÕES

- A filogenia datada para *Passiflora*, incluindo 102 espécies com números cromossômicos disponíveis, suporta $x = 6$ como número básico do gênero.
- A poliploidia foi restrita a poucas linhagens e não estava associada à diversificação de espécies.
- Uma diversificação recente foi observada no subgênero *Passiflora* (Mioceno) relacionada à mudança no número cromossômico de $n = 6$ para $n = 9$ e a um aumento no tamanho genômico.
- Disploïdia ascendente, juntamente com o aumento do tamanho do genoma, foram as principais forças evolutivas em *Passiflora*.
- O estudo comparativo da fração repetitiva de uma espécie de *Passiflora* selvagem (*P. organensis*) e duas espécies cultivadas (*P. cincinnata* e *P. quadrangularis*) mostraram que *P. quadrangularis* apresenta maior acúmulo de sequências repetitivas de DNA, mas menor divergência em relação a *P. organensis*.
- *P. cincinnata* mostrou similaridade a *P. quadrangularis* em relação às famílias de sequências repetitivas de DNA, embora em proporções diferentes, provavelmente refletindo suas relações filogenéticas.
- *P. organensis* apresentou maior diversidade e a maior proporção de satDNA.
- O aumento do tamanho do genoma em *Passiflora* subgênero *Passiflora* foi originado pela expansão de dois principais retroelementos (retrotransposons Gypsy/Tekay e Copia/Angela), não por DNAs satélites.

REFERÊNCIAS

- ADAMS K.L, WENDEL J.F. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion on Plant Biology** 8: 135-141. 2005.
- AMBROŽOVÁ K., MANDÁKOVÁ T., BUREŠ P., NEUMANN P., LEITCH I.J., KOBLÍŽOVÁ A., MACAS J., LYSÁK M.A. Diverse retrotransposon families and an AT-rich satellite DNA revealed in giant genomes of *Fritillaria* lilies. **Annals of Botany** 107:255–268. 2011.
- ARAYA S., MARTINS A.M., JUNQUEIRA N.T., COSTA A.M., FALEIRO F.G., and FERREIRA M.E. Microsatellite marker development by partial sequencing of the sour passion fruit genome (*Passiflora edulis* Sims). **BMC Genomics** 18:549. 2017.
- BAKKER F.T., CULHAM A., PANKHURST C.E., GIBBY M. Mitochondrial and chloroplast DNA-based phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae). **American Journal of Botany** 87:727-734. 2000.
- BARBOSA L.V. and VIEIRA, M.L.C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener + *P. amethystine* Mikan. **Euphytica** 98:121-127. 1997a.
- BARBOSA L.V. AND VIEIRA M.L.C. Análise do comportamento meiótico de híbridos somáticos *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener + *P. cincinnata* Mast. **Revista Brasileira de Genética** 20:88 (Suplemento). 1997b.
- BARKER M.S., VOGEL H., SCHRANZ M.E. Paleopolyploidy in the Brassicales: Analyses of the Cleome Transcriptome Elucidate the History of Genome Duplications in *Arabidopsis* and Other Brassicales. **Genome Biology and Evolution** 1:391-399. 2009.
- BAUCOM R.S., ESTILL J.C., CHAPARRO C., UPSHAW N., JOGI A., DERAGON J.M., WESTERMAN R.P., SANMIGUEL P.J., BENNETZEN J.L. Exceptional diversity, non-random distribution, and rapid evolution of retroelements in the B73 maize genome. **PLoS Genetics** 5:e1000732. 2009.
- BEAL P.R. Cytology of the native Australian and several exotic *Passiflora* species. Chromosome morphology. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences** 30:17-18. 1973a.
- BEAL P.R. Cytology of the native Australian and several exotic *Passiflora* species. Morphology of satellite chromosomes. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences** 36:19-24. 1973b.

- BEEST M.T., LE ROUX J.J., RICHARDSON D.M., BRYSTING A.K., SUDA J., KUBESOVA M., PYSEK P. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. **Annals of Botany** 109:19-45. 2012.
- BENNETT M.D., LEITCH I.J. Nuclear DNA amounts in Angiosperms: progress, problems and prospects. **Annals of Botany** 95:45-90. 2005.
- BENNETT M.D., LEITCH I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. **Annals of Botany** 107:467-590. 2011.
- BENNETT M.D. Plant genome values: How much do we know? **Proceedings of the National Academy of Science USA** 95:2011-2016. 1998.
- BENNETZEN J.L., KELLOGG K.A. Do plants have a one-way ticket to genomic obesity? **The Plant Cell** 9:1509–1514. 1997.
- BENNETZEN J.L., MA. J., DEVOS K.M. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. **Annals of Botany** 95:127-132. 2005.
- BENNETZEN J.L. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. **Plant Molecular Biology** 42:251–269. 2000.
- BERNACCI L.C., CERVI A.C., MILWARD-DE-AZEVEDO M.A., NUNES T.S., IMIG D.C., MEZZONATO A.C. Passifloraceae In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013.
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128567>. 2013
- BISCOTTI M.A., OLMO E., and HESLOP-HARRISON J.P. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. 415-420. 2015.
- BLANC G., and WOLFE K.H. Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during *Arabidopsis* evolution. **The Plant Cell** 16:1679-1691. 2004.
- BLÖCH C., WEISS-SCHNEEWEISS H., SCHNEEWEISS G.M., BARFUSS M.H.J., REBERNIG C.A., VILLASEÑOR J.L., STUESSY T.F. Molecular phylogenetic analyses of nuclear and plastid DNA sequences support dysploid and polyploid chromosome number changes and reticulate evolution in the diversification of *Melampodium* (Millerieae, Asteraceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 53:220-33. 2009.
- BOURQUE G., BURNS K.H., GEHRING M., GORBUNOVA V., SELUANOV A., HAMMELL M., MAGER D.L. Ten things you should know about transposable elements. **Genome Biology** 19:199. 2018.
- BOUTIN T.S., LE ROUZIC A., CAPY P. How does selfing affect the dynamics of selfish transposable elements? **Mobile DNA Journal** 3:5. 2012.

- BUITRAGO M.A., MACDOUGAL J.M., COCA L.F. *Passiflora kumandayi* (Passifloraceae), a new species from the Colombian Andes in a new section within subgenus Decaloba. **Phytotaxa** 344:13. 2018.
- CARNEIRO M.S., CAMARGO L.E.A., COELHO A.S.G., VENCovsky R., JÚNIOR R.P.L., STENZEL N.M.C., e VIEIRA M.L.C. RAPD-based genetic linkage maps of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **Genome** 45:670-678. 2002.
- CARPUTO D., FRUSCIANTE L., PELOQUIN S.J. The Role of $2n$ Gametes and Endosperm Balance Number in the Origin and Evolution of Polyploids in the Tuber-Bearing *Solanums*. **Genetics** 163:287-294. 2003.
- CHEN Z.J., NI Z. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. **Bioessays** 28:240-252. 2006.
- CIFUENTES M., GRANDONT L., MOORE G., CHEVRE A.M., JENCZEWSKI E. Genetic regulation of meiosis in polyploid species: new insights into an old question. **New Phytologist** 186:39-36. 2010.
- COMAI L. The advantages and disadvantages of being a polyploidy. **Nature Review Genetics** 6:836-846. 2005.
- COSTA, L. OLIVEIRA Á., CARVALHO-SOBRINHO J., SOUZA G. Comparative cytomolecular analyses reveal karyotype variability related to biogeographic and species richness patterns in Bombacoideae (Malvaceae). **Plant Systematics and Evolution** 303:1131–1144. 2017.
- CUCO S.M., VIEIRA M.L.C. and AGUIAR-PERECIN M.L.R. Localização de sítios de DNAr 45S em híbridos somáticos e espécies parentais de *Passiflora*. Resumos do Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, SP: **Sociedade Brasileira de Genética** 2001.
- 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** 58:220–228. 2005.
- CUI L., WALL K., LEEBENS-MACK J.H., LINDSAY B.G., SOLTIS D.E., DOYLE J.J., SOLTIS P.S., CARLSON J.E., ARUMUGANATHAN K., BARAKAT A., ALBERT V.A., MA H., DEPAMPHILIS C.W. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. **Genome Research** 16:738-749. 2006.
- CUSIMANO N., RENNER S.S. Ultrametric trees or phylograms for ancestral state reconstruction: Does it matter? **Taxon** 63:721-726. 2014.

- CUSIMANO N., SOUSA A., RENNER S.S. Maximum likelihood inference implies a high, not low, ancestral haploid chromosome number in Araceae, with a critique of the bias introduced by "x". **Annals of Botany** 109:681-692. 2012.
- DARLINGTON C.D., WYLIE A.P. Chromosome atlas of flowering plants. Chromosome atlas of flowering plants. 2nd Ed. 1956.
- DEVOS K.M., BROWN J.K.M., BENNETZEN J.L. Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in *Arabidopsis*. **Genome Research** 12:1075-1079. 2002.
- DOBIGNY G., DUCROZ J., ROBINSON T., VOLOBOUEV V. Cytogenetics and cladistics. **Systematic Biology** 53:470-484. 2004.
- DORNELAS M.C., TAVARES F.C.A., OLIVEIRA J.C., VIEIRA M.L.C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* spp. **Plant Cell Report**. 15:106-110. 1995.
- DOYLE J.J., FLAGEL L.E., PATERSON A.H., RAPP R.A., SOLTIS D.E., SOLTIS P.S., WENDEL J.F. Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. **Annual Review Genetics** 42:443-461. 2008.
- EICHLER E.E. Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. **Science** 301:793–797. 2003.
- ESCUADERO M., MARTÍN-BRAVO S., MAYROSE I., FERNÁNDEZ-MAZUECOS M., FIZ-PALACIOS O., HIPPEL A.L., ... , LUCEÑO M. Karyotypic changes through dysploidy persist longer over evolutionary time than polyploid changes. **PloS One** 9:1. 2014.
- ENKE N., GEMEINHOLZER B. Babcock revisited: New insights into generic delimitation and character evolution in *Crepis* L. (Compositae: Cichorieae) from ITS and *matK* sequence data. **Taxon** 57:1-12. 2008.
- ESTEP M.C., DEBARRY J.D., BENNETZEN J.L. The dynamics of LTR eukaryotic genomes. **Chromosome Research** 23:415–420. 2015.
- FAWCETT J.A., MAERE S., VAN DE PEER Y. Plants with doubled genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. **Proceedings of the National Academy of Science USA** 106:5737-5742. 2009.
- FELDMAN M. The origin of cultivated wheat. in The World Wheat Book:58. 2001.
- FELINER G.N., ROSSELLÓ J.A. Concerted evolution of multigene families and homoeologous recombination. **Plant Genome Diversity** 1:171–193. 2012.
- FERREIRA F.R. Germoplasma de *Passiflora* no Brasil. Maracujá: produção e mercado.

- UESB, Vitória da Conquista, BA. 24- 26. 1994.
- FEUILLET C., MACDOUGAL J.M. Checklist of recognized species names of passion flowers. **Passiflora** 12:41–43. 2003.
- FONSÊCA A., PEDROSA-HARAND A. Karyotype stability in the genus *Phaseolus* evidenced by the comparative mapping of the wild species *Phaseolus microcarpus*. **Genome** 56: 335-343. 2013.
- GAETA R.T, PIRES J.C. Homoeologous recombination in allopolyploids: the polyploid ratchet. **New Phytologist** 186:18-28. 2010.
- GARRIDO-RAMOS M.A. Satellite DNA in plants: More than Just Rubbish. **Genomics and Informatics** 12:87. 2015.
- GLICK L., MAYROSE I. ChromEvol: Assessing the pattern of chromosome number evolution and the inference of polyploidy along a phylogeny. **Molecular Biology and Evolution** 31:1914–1922. 2014.
- GRANDBASTIEN M.A. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. **Trends in Plant Science** 3:181-187. 1998.
- GRAY Y.H.M. It takes two transposons to tango: transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. **Trends in Genetics** 16:461–468. 2000.
- GREILHUBER J., BORSCH T., MULLER K., WORBERG A., POREMBSKI S., BARTHLOTT W. Smallest Angiosperm Genomes Found in Lentibulariaceae, with Chromosomes of Bacterial Size. **Plant Biology** 8:770-777. 2006.
- GREILHUBER J. Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. **Annals of Botany** 95:91–98. 2005.
- GREILHUBER J. Intraspecific variation in genome size: a critical reassessment. **Annals of Botany** 82:27-35. 1998.
- GREWAL S.I.S., JIA S. Heterochromatin revisited. **Nature Reviews Genetics** 8:35–46. 2007.
- GROVER C.E., WENDEL J.F. Recent insights into the mechanisms of genome size change in plants. **Journal of Botany**. 2010.
- GUERRA M. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. **Revista Brasileira de Genética** IX 4:741-743. 1986.
- GUERRA M. Chromosome number variation and evolution in monocots. **Monocots: Systematics and Evolution**. CSIRO, Melbourne 127-136. 2000.
- GUERRA M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research** 120:339-350. 2008.

- GUERRA M. Cytotaxonomy: The end of childhood. **Plant Biosystems**. 146:703-710. 2012.
- HANSEN A.K., GILBERT L.E., SIMPSON B.B., DOWNIE S.R., CERVI A.C., JANSEN R.K. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany** 31:138-150. 2006.
- HAWKINS J.S., GROVER C.E., WENDEL J.F. Repeated big bangs and the expanding universe: Directionality in plant genome size evolution. **Plant Science** 174:557-562. 2008.
- HAWKINS J.S., PROULX S.R., RAPP R.A., WENDEL J.F. Rapid DNA loss as a counterbalance to genome expansion through retrotransposon proliferation in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 106:17811-17816. 2009.
- HESLOP-HARRISON J.S.P., SCHWARZACHER T. Organisation of the plant genome in chromosomes. **The Plant Journal** 66:18–33. 2011.
- HUFTON A.L., PANOPOULOU G. Polyploidy and genome restructuring: a variety of outcomes. **Current Opinion in Genetics and Development** 19:600-606. 2009.
- IDZIAK D., HAZUKA I., POLIWCAZAK B., WISZYNSKA A., WOLNY E., HASTEROK R. Insight into the karyotype evolution of *Brachypodium* species using comparative chromosome barcoding. **PLoS One** 9(3). 2014.
- 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** 180:1307-1317. 2008.
- JIANG J., GILL B.S. Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. **Genome** 49:1057–1068. 2006.
- JUDD W.S., CAMPBELL C.C., KELLOGG E.A., STEVENS P.F., DONOGHUE M.J. **Plant systematics: A phylogenetic approach**, 3rd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. 2015.
- KASHKUSH K., FELDMAN M., LEVY A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. **Nature Genetics** 33:102–106. 2003.
- KELLY L.J., LEITCH I.J. Exploring giant plant genomes with next-generation sequencing technology. **Chromosome Research** 19:939-953. 2011.
- KILLIP E.P. The American species of Passifloraceae. Field Museum of Natural History. **Botanical Series** 19:1–613. 1938.

- KNIGHT R.J. Development of tetraploid hybrid passion fruit clones with potential for the north temperate zone. **HortScience** 26:1541-1543. 1991.
- KROSNICK S.E., PORTER-UTLEY K.E., MACDOUGAL J.M., JØRGENSEN P.M., MCDADE L.A. New insights into the evolution of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae): phylogenetic relationships and morphological synapomorphies. **Systematic Botany** 38:692-713. 2013.
- KROSNICK S.E., FORD A.J., FREUDENSTEIN J.V. Taxonomic revision of *Passiflora* subgenus *Tetrapathea* including the monotypic genera *Hollrungia* and *Tetrapathea* (Passifloraceae), and a new species of *Passiflora*. **Systematic Botany** 34:375-385. 2009.
- LAI Z., NAKAZATO T., SALMASO M., BURKE J.M., TANG S., KNAPP S.J., RIESBERG L.H. Extensive chromosomal repatterning and the evolution of sterility barriers in hybrid sunflower species. **Genetics** 171:291-303. 2005.
- LEE S.I, KIM N.S. Transposable elements and genome size variations in plants. **Genomics and Informatics** 12:87. 2014.
- LEITCH A.R., LEITCH I.J. Genomic plasticity and the diversity of polyploidy plants. **Science** 320:481-483. 2008.
- LEITCH I.J., BEAULIEU J.M., CHASE M.W., LEITCH A.R., BENNETT M.D. Genome size dynamics and evolution in monocots. **Journal of Botany**. 2010.
- LEITCH I.J., BEAULIEU J.M., CHEUNG K., HANSON L., LYSAK M.A., FAY M.F. Punctuated genome size evolution in Liliaceae. **Journal of Evolutionary Biology**. 20:2296-2308. 2007.
- LEITCH I.J., SOLTIS D.E., SOLTIS P.S., BENNETT M.D. Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta). **Annals of Botany** 95:207-217. 2005.
- LEVIN D.A. The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford series in **Ecology and Evolution**. Ed. PH Harvey and RM May. New York. 228 p. 2002.
- LEVY A.A., FELDMAN M. Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization. **Biological Journal of the Linnean Society** 82: 607-613. 2004.
- LIM K.Y., SOLTIS D.E., SOLTIS P.S., TATE J., MATYASEK R., SRUBAROVA H., KOVARIK A., PIRES J.C., XIONG Z., LEITCH A.R. Rapid chromosome evolution in recently formed polyploids in *Tragopogon* (Asteraceae). **PLoS ONE** 3:e3353. 2008.
- LIU B., WENDEL J.F. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids.

- Molecular Phylogenetics and Evolution** 29:365-379. 2003.
- LIU B., XU C., ZHAO N., QI B., KIMATU J.N., PANG J., HAN F. Rapid genomic changes in polyploid wheat and related species: implications for genome evolution and genetic improvement. **Journal of Genetics and Genomics** 36:519-528. 2009.
- LOPES R., LOPES M.T.G., CARNEIRO M. de PINA MATTA F., CAMARGO L.E.A., VIEIRA M.L.C. Linkage and mapping of resistance genes to *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae* in yellow passion fruit. **Genome** 49:17–29. 2006.
- LOVE R.M. Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian Wheats. **Agronomy Journal** 43:72-76. 1951.
- LUO M.C. DEAL K.R., AKHUNOV E.D., AKHUNOVA A.R., ANDERSON O.D., ANDERSON J.A., ... , CROSSMAN C.C. Genome comparisons reveal a dominant mechanism of chromosome number reduction in grasses and accelerated genome evolution in Triticeae. **Proceedings of the Academy of Science USA** 106:15780-15785. 2009.
- LYSAK M.A., BERR A., PECINKA A., SCHMIDT R., MCBREEN K., SCHUBERT I. Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. **Proceedings in the National Academy of Science** 103:5224-5229. 2006.
- LYSAK M.A., KOCH M., PECINKA A., SCHUBERT I. Chromosome triplication found across the tribe Brassiceae. **Genome Research** 15:516–525. 2005.
- LYSAK M.A., MANDAKOVA T., LACOMBE E. Reciprocal and multi-species chromosome BAC painting in crucifers (Brassicaceae). **Cytogenetic and Genome Research** 129:184-189. 2010.
- MA J., DEVOS K.M., BENNETZEN J.L. Analyses of LTR-retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice. **Genome Research** 14:860–869. 2004.
- MADDISON W.P., MADDISON D.R. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. **Evolution** 62:1103-1118. 2008.
- MADLUNG A., COMAI L. The effect of stress on genome regulation and structure. **Annals of Botany** 94:481-495. 2004.
- MADLUNG A., TYAGI A.P., WATSON B., JIANG H., KAGOCHI T., DOERGE R.W., COMAI L. Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids. **The Plant Journal** 41: 221-230. 2005.
- MANDÁKOVÁ T., LYSACK M.A. Chromosomal Phylogeny and Karyotype Evolution in

- $x = 7$ Crucifer Species (Brassicaceae). **The Plant Cell** 20:2559-2570. 2008.
- MARQUES A., Ribeiro T., Neumann P., Macas J., Novák P., Schubert V., ... , Brandt R. Holocentromeres in *Rhynchospora* are associated with genome- wide centromere-specific repeat arrays interspersed among euchromatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 112: 13633–13638. 2015.
- MARTEL E., PONCET V., LAMY F., SILJAK-YAKOLEV S., LEJEUNE B., SARR A. Chromosome evolution of *Pennisetum* species (Poaceae): implications of ITS phylogeny. **Plant Systematics and Evolution** 249:139-149. 2004.
- MASTERSON J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. **Science** 264:421–423. 1994.
- MAYEDA L.Y. Estudo citogenético em dez taxons do gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 89p. 1997.
- MAYROSE I., BARKER M.S., OTTO S.P. Probabilistic Models of Chromosome number evolution and the inference of polyploidy. **Systematic Biology** 59:132-144. 2010.
- MEHETRE S.S, DAHAT D.V. Cytogenetics of some important fruit crops: a review. **Journal of Maharashtra Agricultural Universities**, 25:139-148. 2000.
- MELO N.F., CERVI A.C., GUERRA M. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Plant Systematics and Evolution** 226:69–84. 2001.
- MELO N.F., GUERRA F.M.S. Variability of the 5S and 45SDNAr sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany** 92:309–316. 2003.
- MESSING J., BHARTI A.K., KARLOWSKI W.M., GUNDLACH H., KIM H.R., YU Y., ..., Wing R.A. Sequence composition and genome organization of maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 101:14349-14354. 2004.
- MING R, Hou S., Feng Y., Yu Q., Dionne-Laporte A., Saw J.H., ... , Salzberg S.L. (The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). **Nature** 42:993-997. 2008.
- MORAES AP. SOUZA-CHIES T.T., STIEHL-ALVES E.M., BURCHARDT P., EGGERS L., SILJAK-YAKOVLEV S., ... & VICCINI L.F. Evolutionary trends in Iridaceae: new cytogenetic findings from the New World: Evolutionary trends in Iridoideae. **Botanical Journal of the Linnean Society** 177:27–49. 2015.
- MUNHOZ C.F., COSTA Z.P., CAUZ-SANTOS L.A., REÁTEGUI A.C.E., RODDE N.,

- CAUET S., VIEIRA M.L.C. A gene-rich fraction analysis of the *Passiflora edulis* genome reveals highly conserved microsyntenic regions with two related Malpighiales species. **Scientific Reports** 8:13024. 2018.
- MURAT F., XU J.H., TANNIER E., ABROUK M., GUILHOT N., PONT C., SALSE J. Ancestral grass karyotype reconstruction unravels new mechanisms of genome shuffling as a source of plant evolution. **Genome Research** 20:1545-1557. 2010.
- MURRAY B.G. Trees, maps and FISH: the application of genome-based technologies to the analysis of chromosome evolution. **Current Genomics** 3:539-550. 2002.
- MUSCHNER V.C., LORENZ A.P., CERVI A.C., BONATTO S.L., SOUZA-CHIES T., SALZANO F.M., FREITAS L.B. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany** 90:1229–1238. 2003.
- MUSCHNER V.C., ZAMBERLAN P.M., BONATTO S.L., FREITAS L.B. Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology** 35:1036–1043. 2012.
- NAGAKI, K. et al. Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. **Nature Genetics** 36:138. 2004.
- NARAYAN R.K.J. The role of Genomic Constraints upon Evolutionary Changes in Genome Size and Chromosome Organization. **Annals of Botany** 82(suppA): 57-66. 1998.
- NEUMANN P., NOVÁK P., HOŠTÁKOVÁ N., MACAS J. Systematic survey of plant LTR-retrotransposons elucidates phylogenetic relationships of their polyprotein domains and provides a reference for element classification. **Mobile DNA** 10:1. 2019.
- NOVAK P., NEUMANN P., PECH J., STEINHAISL J., MACAS J. RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics** 29:792–793. 2013.
- OBERMAYER R., LEITCH I.J., HANSON L., BENNETT M.D. Nuclear DNA C-values in 30 species double the familia representation in pteridophytes. **Annals of Botany** 90:209-217. 2002.
- OCAMPO G., COLUMBUS J.T. Molecular phylogenetics, historical biogeography, and chromosome number evolution of *Portulaca* (Portulacaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 63:97-112. 2012.
- OHRI D. Genome size variation and plant systematic. **Annals of Botany** 82 (supp. A): 75-83. 1998.

- OLIVEIRA A.M.A., COLEMAN J.R. Estudos citogenéticos de espécies do gênero *Passiflora* (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Genética** 19 (Suplemento), 134. 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 passionfruit based on simultaneous maximum-likelihood estimation of linkage and linkage phases. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 133:35–41. 2008.
- OLIVEIRA A.M. Reprodução e citogenética de espécies de *Passiflora*. Tese, Universidade Estadual Paulista São José do Rio Preto. 1996.
- 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, *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener. and *P. incarnata* L. **Journal of Experimental Botany** 46: 777-785. 1995.
- PAMPONÉT V.C.C., SOUZA M.M., SILVA G.S., MICHELI F., de MELO C.A.F., de OLIVEIRA S.G., ..., CORRÊA R.X. Correction to: low coverage sequencing for repetitive DNA analysis in *Passiflora edulis* Sims: citogenomic characterization of transposable elements and satellite DNA. **BMC Genomics** 20:303. 2019.
- PARDUE M.L., DEBARYSHE P.G. Retrotransposons that maintain chromosome ends. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 108:20317–20324. 2011.
- PARISOD C., HOLDEREGGER R., BROCHMANN C. Evolutionary consequences of autopolyploidy. **New Phytology** 186:5-17. 2010.
- PARK M., PARK J., KIM S., KWON J.K., PARK H.M., BAE I.H., CHOI D. Evolution of the large genome in *Capsicum annuum* occurred through accumulation of single-type long terminal repeat retrotransposons and their derivatives. **The Plant Journal** 69: 1018-1029. 2012.
- PATERSON A.H., BOWERS J.E., PETERSON D.G., ESTILL J.C., CHAPMAN B.A. Structure and evolution of cereal genomes. **Current Opinion of Genetics Development** 13:644-650. 2003.
- PAUN O., GREILHUBER J., TEMSH E.M., HORANDL E. Patterns, sources and ecological implications of clonal diversity in apomictic *Ranunculus carpaticola* (*Ranunculus auricomus* complex, Ranunculaceae). **Molecular Ecology** 15:897-910. 2006.
- PAYÁN F.R., MARTIN F.W. Barriers to the hybridization of *Passiflora* species.

- Euphytica** 24:709-716. 1975.
- PRAÇA M.M., CARVALHO C.R., FRANCISMAR C.M., CORREA M.M.A. Morphological aspects of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* chromosomes using acridine orange banding and DNAr-FISH tools. **Caryologia** 61:154–159. 2008.
- PEDROSA A., SANDAL N., STOUGAARD J., SCHWEIZER D., BACHMAIR A. Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. **Genetics** 161:1661–1672. 2002.
- PELLICER J., FAY M.F., LEITCH I.J. The largest eukaryotic genome of them all? **Botanical Journal of the Linnean Society** 164:10–15. 2010.
- PÉREZ-ESCOBAR O.A., CHOMICKI G., CONDAMINE F.L., KARREMANS A.P., BOGARÍN D., MATZKE N.J., ..., ANTONELLI A. Recent origin and rapid speciation of Neotropical orchids in the world's richest plant biodiversity hotspot. **New Phytologist** 215:891-905. 2017.
- PÉREZ J.O., D'EECKENBRUGGE G.C. Morphological characterization in the genus *Passiflora* L.: an approach to understanding its complex variability. **Plant Systematics and Evolution** 303:531-558. 2017.
- PIEGU B., GUYOT R., PICAULT N., ROULIN A., SANIYAL A., KIM H., COLLURA K., BRAR D.S., JACKSON S., WING R.A., PANAUD O. Doubling genome size without polyploidization: Dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice **Genome Research** 16:1262-1269. 2006.
- PLOHL M., MEŠTROVIĆ N., MRAVINAC B. Satellite DNA evolution. In **Repetitive DNA** 7:126-152. Karger Publishers. 2012.
- QI B., ZHONG X., ZHU B., ZHAO N., XU L., ZHANG L., ZHANG H., YU X., LIU B. Generality and characteristics of genetic and epigenetic changes in newly synthesized allotetraploid wheat lines. **Journal of Genetics and Genomics** 37:737-748. 2010.
- RABINOWICZ P.D., PALMER L.E., MAY B.P., HEMANN M.T., LOWE S.W., MCCOMBIE R., MARTIENSSEN R.A. Genes and Transposons Are Differentially Methylated in Plants, but Not in Mammals. **Genome Research** 13:2658-2664. 2003.
- RAMSEY J., SCHEMSKE D.W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploidy formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology Systems** 29:467-501. 1998.

- RAMSEY J., SCHEMSKE D.W. Neopolyploidy in flowering plants. **Annual Review of Ecology System.** 33:589-639. 2002.
- RÊGO M.D., RÊGO E.R., BRUCKNER C.H., FINGER F.L., OTONI W.C. In vitro induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)** 107:451-459. 2011.
- RIBEIRO T., MARQUES A., NOVÁK P., SCHUBERT V., VANZELA A.L., MACAS J., ..., PEDROSA-HARAND A. Centromeric and non-centromeric satellite DNA organisation differs in holocentric *Rhynchospora* species. **Chromosoma** 126:325–335. 2017b.
- RIBEIRO T. dos SANTOS K.G., RICHARD M.M., SÉVIGNAC M., THAREAU V., GEFFROY V., PEDROSA-HARAND A. Evolutionary dynamics of satellite DNA repeats from *Phaseolus* beans. **Protoplasma** 254:791–801. 2017a.
- RIESBERG L.H. Chromosomal rearrangements and speciation. **TRENDS in Ecology and Evolution** 16:351-357. 2001.
- RUBERTÉ-TORRES R., MARTIN F.W. First-generation hybrids of edible passion fruit species. **Euphytica** 23:61-70. 1974.
- SADER M.A. DIAS Y., COSTA Z.P.D., MUNHOZ C., PENHA H., BERGÈS H., ..., PEDROSA-HARAND A. Identification of passion fruit (*Passiflora edulis*) chromosomes using BAC-FISH. **Chromosome Research** 1-13. 2019.
- SALMON A., AINOUCHE M.L., WENDEL J.F. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). **Molecular Ecology** 14:1163-1175. 2005.
- SANMIGUEL P., GAUT B.S., TIKHONOV A., NAKAJIMA Y., BENNETZEN J.L. The paleontology of intergene retrotransposons of maize. **Nature Genetics** 20:43-5. 1998.
- SANTOS A.A. DOS, PENHA H.A., BELLEC A., FREITAS M.C. DE, PEDROSA-HARAND A., BERGÈS H., CARNEIRO VIEIRA M.L. Begin at the beginning: A BAC-end view of the passion fruit (*Passiflora*) genome. **BMC Genomics** 15:816. 2014.
- SCHUBERT I., LYSACK M.A. Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. **Trends in Genetics** 27:207-216. 2011.
- SCHUBERT I., RIEGER R. A new mechanism for altering chromosome number during karyotype evolution. **Theoretical and Applied Genetics** 70:213-221. 1985.

- SCHUBERT I. Chromosome evolution. **Current Opinion in Plant Biology** 10:109-115. 2007.
- SCHUBERT I., LYSACK M.A. Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. **Trends in Genetics** 27:207–216. 2011.
- SCHWARZACHER H.G., MIKELSAAR A.V., SCHNEDL W. The nature of Ag-staining of nucleolus organizer regions. **Cytogenetics and Cell Genetics** 20:24-39.1980.
- SNOW N., MACDOUGAL J.M. New chromosome reports in *Passiflora* (Passifloraceae). **Systematic Botany** 18:261-273. 1993.
- SOARES-SCOTT, M.D. Caracterização citogenética de algumas espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* Dissertação, Universidade Estadual de Campinas. 1998.
Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/317970>>.
- SOARES-SCOTT M.D., MAGNOLIN C.A., RECCO-PIMENTEL S.M. Análise citogenética e padronização de métodos de isolamento de DNA genômico de espécies e híbridos de *Passiflora*. **Genetics and Molecular Biology** 22:381. 1999.
- SOARES-SCOTT M.D., MELETTI L.M.M., RECCO-PIMENTEL S.H. Meiotic behavior and pollen fertility in sexual and somatic hybrids of *Passiflora* species. **Caryologia** 56:129-138. 2003.
- 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. and Braga, M. F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Embrapa Cerrados, Planaltina. pp. 213-240. 2005.
- SOLTIS D.E., ALBERT V.A., LEEBENS-MACK J., BELL C.D., PATERSON A.H., ZHENG C., SANKOFF D., DEPAMPHILIS C.W., WALL P.K., SOLTIS P.S. Polyploidy and angiosperm diversification. **American Journal of Botany** 96:336-348. 2009.
- SOLTIS D.E., BURLEIGH J.G. Surviving the K-T mass extinction: New perspectives of polyploidization in angiosperms. **Proceedings of the National Academy of Science USA** 106:5455-5456. 2009.
- SOLTIS D.E., SOLTIS P.S., SCHEMSKE D.W., HANCOCK J.F., THOMPSON J.N., HUSBAND B.C., JUDD W.S. Autopoliploidy in angiosperms: Have we grossly underestimated the number of species? **Taxon** 56:13-30. 2007.
- SOLTIS D.E., SOLTIS P.S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. **TREE** 14:348-352. 2009.

- SOLTIS P.S., SOLTIS D.E. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. 97:7051-7057. 2000b.
- SONG K.M., LU P., TANG K.L., OSBORN T.C. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 92:7719–7723. 1995.
- SOUZA M.M., PALOMINO G., PEREIRA M.G., VIANA A.P. Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species. **Hereditas** 141:31–38. 2004.
- SOUZA M.M. Estudos genômico e reprodutivo em espécies de *Passiflora*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 162p. 2002.
- SOUZA M.M., PEREIRA T.N.S., VIANA A.P., PEREIRA M.G., BERNACCI L.C., SUDRÉ C.P. SILVA L.C. Meiotic irregularities and pollen viability in *Passiflora edmundoi* Sacco (Passifloraceae). **Caryologia** 56:157-165. 2003a.
- SOUZA M.M., PEREIRA T.N.S., LAM-SANCHEZ A. Meiotic behavior of *Passiflora setaceae* (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Genética** 19:137. 1996.
- SOUZA M.M., PEREIRA T.N.S., SILVA L.C., REIS D.S.S, SUDRÉ C.P. Karyotype of six *Passiflora* species collected in the state of Rio de Janeiro. **Cytologia** 68:165-171. 2003c.
- STEBBINS G.L. Chromosomal evolution in higher plants. Reading: Addison-Wesley 216 p. 1971.
- STOREY, W.B. Chromosome numbers of some species of *Passiflora* occurring in Hawaii. 1950.
- STUESSY T.F., BLÖCH C., VILLASEÑOR J.L., REBERNIG C.A., WEISS-SCHNEEWEISS H. Phylogenetic analyses of DNA sequences with chromosomal and morphological data confirm and refine sectional and series classification within *Melampodium* (Asteraceae, Millerieae). **Taxon** 60:436-449. 2011.
- STUESSY T.F. Plant taxonomy: the systematic evaluation of comparative data, 2nd edn. New York: Columbia University Press. **Systematic Biology** 53:470-484. 2009.
- SWIFT H.H. The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington 36: 643–654. 1950.
- TANG H., WANG X., BOWERS J.E., MING R., ALAM M., PATERSON A.H. Unraveling ancient hexaploidy through multiply-aligned angiosperm gene maps. **Genome Research** 18:1944-1954. 2008.

- TATE J.A., NI Z., SCHEEN A.C., KOH J., GILBERT C.A., LEFKOWITZ D., CHEN Z.J., SOLTIS P.S., SOLTIS D.E. Evolution and expression of homeologous loci in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae), a recent and reciprocally formed allopolyploid. **Genetics** 173:1599-1611. 2006.
- TENAILLON M.I., HOLLISTER J.D., GAUT B.S. A triptych of the evolution of plant transposable elements. **Trends in Plant Science** 15:471–478. 2010.
- TORRELL M., VALLÉS J. Genome size in 21 *Artemisia* L. species (Asteraceae, Anthemideae): Systematic, evolutionary, and ecological implications. **Genome** 44:231-238. 2001.
- TOKUOKA, T. Molecular phylogenetic analysis of Passifloraceae sensu lato (Malpighiales) based on plastid and nuclear DNA sequences. **Journal of Plant Research**, 125:489-497. 2012.
- TREANGEN T.J., SALZBERG S.L. Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. **Nature Reviews Genetics** 13:36–46. 2012.
- TSUKAHARA S., KOBAYASHI A., KAWABE A., MATHIEU O., MIURA A., KAKUTANI T. Burst of retrotransposition reproduced in *Arabidopsis*. **Nature** 461:423-427. 2009.
- ULMER T., MACDOUGAL J.M. *Passiflora*: Passion flowers of the World. Timber Press, Portland. 2004.
- UTSUNOMIA R., RUIZ-RUANO F.J., SILVA D.M., SERRANO É.A., ROSA I.F., SCUDELER P.E., ..., FORESTI F.A Glimpse into the satellite DNA library in Characidae fish (Teleostei, Characiformes). **Frontiers in Genetics** 8:103. 2017.
- VAIO M., GARDNER A., EMSHWILLER E., GUERRA M. Molecular phylogeny and chromosome evolution among the creeping herbaceous *Oxalis* species of sections Corniculatae and Ripariae (Oxalidaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 68:199–211. 2013.
- VANDERPLANK, J. Passion flowers and passion fruit. **Cassell Publishers Limited**. 1991.
- VAN-LUME B., ESPOSITO T., DINIZ-FILHO J.A.F., GAGNON E., LEWIS G.P., SOUZA G. Heterochromatic and cytomolecular diversification in the *Caesalpinia* group (Leguminosae): Relationships between phylogenetic and cytogeographical data. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics** 29:51–63. 2017.
- VEILLEUZ R. Diploid and polyploidy gametes in crop plants: mechanisms of formation

- and utilization in plant breeding. **Plant Breeding Review** 3:253-288. 1985.
- VENTER J.C., ADAMS M.D., SUTTON G.G., KERLAVAGE A.R., SMITH H.O., HUNKAPILLER M. Shotgun sequencing of the human genome. **Science** 280:1540-1542. 1998.
- VIANA A.J.C., SOUZA M.M. Comparative cytogenetics between the species *Passiflora edulis* and *Passiflora cacaoensis*. **Plant Biology** 14:820-827. 2012.
- VIEIRA M.L.C., BARBOSA L.V., MAYEDA L.Y. Citogenética dos maracujazeiros (*Passiflora* spp.). In: Lima, A.A., Cunha, M.A.P. (Org.). *Maracujá: produção e qualidade na passicultura*. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas. pp. 45-65. 2004.
- VIEIRA M.L.C., OLIVEIRA C.A., MAYEDA L.Y., DORNELAS M.C. FUNGARO M.H.P. Estudo do cariótipo e da variabilidade genética detectada por RAPD em espécies de maracujazeiros (*Passiflora* L.). **Revista Brasileira de Genética** 20:88. 1997.
- WEISS-SCHNEEWEISS H., LEITCH A.R., MCCANN J., JANG T.S., MACAS J. Employing next generation sequencing to explore the repeat landscape of the plant genome. **Next Generation Sequencing in Plant Systematics**. 157:155-179. 2015.
- WEISS-SCHNEEWEISS H., SCHNEEWEISS G.M. Karyotype diversity and evolutionary trends in Angiosperms. **Plant Genome Diversity** 2:209-230. 2013.
- WENDEL J.F. Genome evolution in polyploids. **Plant Molecular Biology** 42:225-249. 2000.
- WICKER T., GUNDLACH H., SPANNAGL M., UAUY C., BORRILL P., RAMIREZ-GONZALEZ R.H., CHOULET F. Impact of transposable elements on genome structure and evolution in bread wheat. **Genome Biology** 19:1-18. 2018.
- YAAKOV B., KASHKUSH K. Methylation, transcription, and rearrangements of transposable elements in synthetic allopolyploids. **International Journal of Plant Genomics** 2011.
- YOCKTENG R., NADOT S. Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (ncpGS). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 31:379-396. 2004a.
- YOCKTENG R., NADOT S. Infrageneric phylogenies: A comparison of chloroplast-expressed glutamine synthetase, cytosol-expressed glutamine synthetase and cpDNA maturase K in *Passiflora*. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 31:397-402. 2004b.

- YOTOKO K.S.C., DORNELAS M.C., TOGNI P.D., FONSÊCA 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** 6:127–131. 2011.
- ZHANG Y., FAN C., LI S., CHEN Y., WANG R.R. C., ZHANG X., ..., HU Z. The Diversity of sequence and chromosomal distribution of new transposable element-related Segments in the Rye genome revealed by FISH and lineage annotation. **Frontiers in Plant Science** 8:1706. 2017.
- ZONNEVELD B.J.M. Nuclear DNA contents of all species of *Helleborus* (Ranunculaceae) discriminate between species and sectional divisions. **Plant Systematics and Evolution** 229:125–130. 2001.
- ZONNEVELD B.J.M. The systematic value of nuclear DNA content for all species of *Narcissus* L. (Amaryllidaceae). **Plant Systematics and Evolution** 275:109. 2008.

**APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA SYSTEMATICS AND
BIODIVERSITY (A2)**

The role of chromosome changes in the diversification of *Passiflora* L. (Passifloraceae)

Sader, MA¹; Amorim, BS^{2, 3}; Costa, L¹; Souza, G¹; Pedrosa-Harand, A^{1*}

Original Article

**The role of chromosome changes in the diversification of *Passiflora* L.
(Passifloraceae)**

Sader, MA¹; Amorim, BS^{2,3}; Costa, L¹; Souza, G¹; Pedrosa-Harand, A^{1*}

¹Laboratory of Plant Cytogenetics and Evolution, Department of Botany, Federal University of Pernambuco, 50670-901, Recife, PE (Brazil).

²Museu da Amazônia, MUSA, 69099-415, Manaus, Amazonas, Brazil.

³Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais, Universidade do Estado do Amazonas, 69058-807, Manaus, Amazonas, Brazil.

*For correspondence: andrea.pedrosaharand@pq.cnpq.br

Corresponding author:

Andrea Pedrosa-Harand

Tel. + 55 81 2126 8846

Fax + 55 81 2126 8348

Abstract

Passiflora L. has more than 575 species distributed especially in the Neotropics. The chromosome number variation in the genus is highly congruent with its main subgenera, but its basic chromosome number (x) and the underlying events responsible for this variation have remained controversial. Here, we provide a robust and well-resolved time-calibrated phylogeny that includes 102 taxa, and by means of phylogenetic comparative methods (PCM) we tested the relative importance of polyploidy and dysploidy events to *Passiflora* karyotype evolution and diversification. *Passiflora* arose 42.9 Mya, with subgenus diversification at the end of the Paleogene (Eocene-Oligocene). The basic chromosome number of the genus is proposed as $x = 6$, and a strong recent diversification found in the *Passiflora* subgenus (Miocene) correlated to genome size increase and a chromosome change from $n = 6$ to $n = 9$ by ascending dysploidy. Polyploidy, conversely, appeared restricted to few lineages, such as *Astrophea* and *Deidamioides* subgenera, and did not lead to diversification increases. Our findings suggest that ascending dysploidy provided a great advantage for generating long-term persistent lineages and promoting species diversification. Thus, chromosome numbers/genome size changes may have contributed to morphological/ecological traits that explain the pattern of diversification observed in the genus *Passiflora*.

Keywords: ancestral state reconstruction. chromosome number. diversification rates. Dysploidy. phylogenetic comparative methods. polyploidy.

Introduction

Variation in genome size and chromosome number is widespread among plants, but its role in species diversification and evolution has long been debated (Mayrose et al., 2011; Soltis et al., 2009; Soltis e Soltis, 2000; Stebbins, 1971). Polyploidization (whole genome duplication-WGD) is frequent in angiosperms and has often been associated with speciation and the origin of novel adaptations (Bennett e Leitch, 2005; Lynch e Conery, 2000; Lynch e Force, 2000; Soltis e Soltis, 1999; Wendel et al., 2002; Werth e Windham, 1991). Polyploidy may contribute, for example, to higher tolerance to nutrient-poor soils and resistance to drought, cold, pests and pathogens (Levin, 2002, 1983). As well, polyploid lineages have shown higher rates of diversification than diploid groups, due either to increased rates of speciation, decreased rates of extinction, or both (Soltis et al., 2009).

It is known that chromosome numbers are repeatedly modified not only by polyploidy, but also by the gain (e.g. ascending dysploidy via chromosome fission), or loss (e.g. descending dysploidy via chromosome fusion) of chromosomes (Mayrose et al., 2010; Schubert e Lysak, 2011). However, the role of dysploidy in plant diversification have received quite less attention so far. Even though it was proposed that karyotype changes resulting from dysploidy processes endure longer than polyploidy changes over evolutionary time, dysploidy itself has been considered as neutral with respect to long-term diversification processes (Blösch et al., 2009; Escudero et al., 2014; Jang et al., 2013; Mas de Xaxars et al., 2016). The strategy of discussing and interpreting karyotype changes (polyploidy / dysploidy) and their influence on plant evolution has profoundly been impacted by the advances in molecular phylogeny. More recently, cytogenetic data, such as chromosome number and nuclear DNA content, has started to be examined in the light of phylogenetic trees in order to better comprehend the karyotypic changes involved in the diversification of species (Costa et al., 2017; Ribeiro et al., 2018). Phylogenetic comparative methods (PCMs) have an important place in evolutionary biology nowadays and represent a reliable tool for the study of karyotype evolution and for testing the relative importance of polyploidy and dysploidy events to plant diversification (Clarkson et al., 2017; Costa et al., 2017; Escudero et al., 2014; Marinho et al., 2014; Ribeiro et al., 2018).

Passifloraceae s.s. (Tokuoka, 2012) is an ancient plant family, dating back 65.5 Mya (Paleocene). It seems to fit into a biogeographic scenario already proposed for several plant groups, originating in Africa, crossing to Europe/Asia and reaching the New World by way of land bridges (Muschner et al., 2012). *Passiflora* L. is the largest genus of the family, and encompasses more than 575 species distributed especially in the Neotropics (Ulmer e MacDougal, 2004). Passionflowers are herbaceous or woody vines usually climbing with tendrils, but a few are trees or shrubs (Killip, 1938). The genus is monophyletic (Feuillet e MacDougal, 2003; Hansen et al., 2006; Krosnick et al., 2013; Yockteng e Nadot, 2004a, 2004b) and supported by three diagnostic characters: the series of corona filaments, axillary tendrils, and specialized flowers (Judd et al., 2015). Their wide morphological variation seems to be the result of their habitat diversity, as well as their coevolutionary relationships with many organisms, including a wide range of pollinators as small and large insects, birds, and bats (OCampo e Coppens, 2017).

In the infrageneric classification of *Passiflora*, Feuillet e MacDougal (2003) recognized four subgenera: *Passiflora*, *Deidamioides*, *Astropheia* and *Decaloba*. The subgenus *Passiflora*

includes ca. 250 species and characteristically exhibits large flowers with multiple series of coronal filaments. It is most diverse in South America and is the largest and best known of the subgenera, partly because some species have economic importance (Ulmer e MacDougal, 2004). The subgenus *Decaloba*, with ca. 230 species, has characteristically small flowers and it is the only subgenus to have both New World and Old World species. The subgenus *Deidamioides* s.s. is a group of 14 species found in Central and South America. Lastly, subgenus *Astrophea* consists of ca. 60 species of lianas and small to medium-sized trees that are most diverse in the lowlands of northern South America (Krosnick et al., 2013). Subsequent revisions have proposed a larger number of subgenera, adding the subgenus *Tryphostemmatoides* (Muschner et al., 2012) or *Tetrapathea* (Krosnick et al., 2009; Buitrago et al., 2018).

The chromosome number variation in *Passiflora* is highly congruent with its main subgenera. The two largest lineages (*Decaloba* and *Passiflora*) present mostly $n = 6$ and $n = 9$, respectively. On the other hand, the three smaller subgenera (*Tetrapathea*, *Astrophea* and *Deidamioides*) present $n = 12$. The basic chromosome number (x) of the genus has been a matter of controversy, and $x = 3, 6, 9$ and 12 have been already proposed (Hansen et al., 2006; Melo et al., 2001; Melo e Guerra, 2003; Morawetz, 1986; Raven, 1975; Snow e MacDougal, 1993; Storey, 1950). The lower number of DNAr sites in species with $2n = 12$ suggested an ancestral $x = 6$ for the genus, with increase of DNAr sites in polyploid lineages (Melo e Guerra, 2003). On the other hand, Hansen et al. (2006) employed a maximum parsimony (MP) approach (giving all transition types equal weights) to reconstruct ancestral chromosome numbers in the genus. The authors hypothesized $x = 12$ as the basic chromosome number of the genus. This placement implied descending dysploidy (from $n = 12$ to $n = 9$ and $n = 6$) without events of polyploidy.

Although there have been several studies concerning chromosome number reconstruction in *Passiflora* conducted to date (Cusimano e Renner, 2014; Escudero et al., 2014; Mayrose et al., 2010), they all were based on Hansen et al. (2006) dataset, which contained only 57 species (~10% of the total) and low support values for some clades along the phylogeny. Those studies were thus not conclusive about the ancestral chromosome number of the group, with either $x = 6$ or 12 proposed depending on the methods used, and therefore not arrived to the underlying mechanisms. Therefore, here we analyse the chromosomal evolution of the genus with a substantially larger sample than previous studies and different, more accurate PCM approaches. We aimed to: a) re-examine the phylogenetic relationships of *Passiflora*, gathering

for analysis all available nuclear and plastid loci for species with available chromosome number, to reconstruct the ancestral chromosome numbers with a more broadly sampled, and better resolved phylogenetic hypothesis for the genus; b) investigate the correlation between chromosome number and genome size change through evolutionary time; and (c) evaluate the correlation of diversification rates and chromosome variation, aiming to better understand the role of chromosome changes in its evolutionary history.

Material and Methods

Taxon sampling

We sampled 102 taxa of the family Passifloraceae s.s., including 97 *Passiflora* L., with available DNA sequence and chromosome number (Table S1). The genera *Adenia* Forssk. and *Turnera* L. were used as outgroup, represented by five taxa in total. The internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2) of ribosomal nuclear region and the plastid markers *psbA-trnH*, *trnL* intron, *trnL-trnF* and *trnL-trnT* were used, totalizing 359 sequences (Table S2). All sequences were obtained following Benson et al. (2013) through the GenBank database. DNA sequences were aligned using MUSCLE (Edgar, 2004) as a plugin in Geneious v.7.1.9 (Kearse et al., 2012) with subsequent manual adjustments.

Phylogenetic analyses

We used jModelTest v.2.1.6 to assess the best model of DNA substitution for each individual marker (Darriba et al., 2012) through the Akaike Information Criterion (Akaike, 1974). The best fitting models were GTR+I+G (ITS and *psbA-trnH*) and GTR+G (*trnL* intron, *trnL-trnF* and *trnL-trnT*) (Table S2). Phylogenetic relationships were inferred using the Bayesian Inference (BI) approach implemented in MrBayes v.3.2.6. (Ronquist et al., 2012). All analyses were performed for each region both separately and combined. Four independent runs with four Markov Chain Monte Carlo (MCMC) runs were conducted, sampling every 1,000 generations for 12,000,000 generations. Each run was evaluated in TRACER v.1.6 (Rambaut et al., 2014) to determine that the estimated sample size (ESS) for each relevant parameter was higher than 200 and a burn-in of 25% was applied. The majority-rule consensus tree and posterior probability (PP) were visualized and edited in FigTree v.1.4.2. (Rambaut, 2014). All BI and jModelTest analyses were performed in the CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010).

Molecular clock

Divergence time estimates were performed in BEAST v.1.8.3. (Drummond et al., 2012; Drummond e Rambaut, 2007) fixing the tree topology of the Bayesian analyses. Uncorrelated relaxed lognormal clock (Drummond e Rambaut, 2007) and Birth-Death speciation model (Gernhard, 2008) were applied. Two independent runs of 100,000,000 generations each were performed, sampling every 10,000 generations. In order to verify the effective sampling of all parameters and assess convergence of independent chains, we examined their posterior distributions in TRACER v.1.6. (Rambaut et al., 2014). The MCMC sampling was considered sufficient at effective sampling sizes (ESS) higher than 200. After removing 25% of samples as burn-in, the independent runs were combined and a maximum clade-credibility (MCC) tree was constructed using TreeAnnotator v.1.8.2. (Drummond et al., 2012). The BEAST analysis was performed in CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010).

Calibrations were performed using the secondary calibrations of Bell et al. (2010) for the crown node of Passifloraceae s.s. (71.31 Million years ago-Mya), by applying a standard deviation of 4.0. The calibrations for the crown nodes of *Passiflora* (38.09 Mya) and *Adenia* (26.86 Mya) followed Hearn (2006), in which standard deviation of 3.0 and 2.0 were applied, respectively.

Phylogenetic Comparative Methods (PCM)

Previously published chromosome numbers for *Passiflora* were collected from the Chromosome Counts Database (CCDB, Rice et al., 2015) and from Cusimano e Renner (2014); and genome size data from Royal Botanic Gardens Plant DNA C-values database (Bennett e Leitch, 2012) (Table S1). Accepted species names were updated using The Plant List (2017).

The chronogram obtained from MrBayes was used to infer evolution of haploid chromosome numbers in *Passiflora*. Outgroups were pruned for the ancestral chromosome number analyses according to McCann et al. (2016). Haploid chromosome numbers were used to reconstruct the ancestral basic chromosome number across the phylogenetic tree using Mesquite v.2.75 (Maddison e Maddison, 2014), RASP v. 3.2 (Yu et al., 2015) and ChromEvol (Glick e Mayrose, 2014). The data was plotted as categorical data under Maximum Likelihood (ML) [Markov k-state one- parameter (Mk1) model] and Maximum Parsimony (MP) in Mesquite v.2.75. The Bayesian Binary MCMC (BBM) tool implemented in RASP v.3.2. was also used to infer the ancestral chromosome number reconstruction under a Bayesian Inference (BI) approach. This software has been widely used to reconstruct characters of all sorts, from

discrete to continuous and morphological, genetic, population genetics, and to perform non-phylogenetic multivariate analysis, among others. They operate based on different models: Maximum likelihood (Mesquite) and Bayesian (RASP). Although both algorithms have been used for the reconstruction of ancestral chromosome numbers (Hennequin et al., 2010; Vaio et al., 2013), they are not specific to chromosome data assessment. Indeed, these algorithms are likely to consider a change from $x = 10$ to $x = 20$ as a result of 10 successive alterations. Instead, ChromEvol attributes this change to a single polyploidy event as the most likely hypothesis.

ChromEvol uses a Maximum Likelihood Estimation (MLE) approach and assumes chromosome number variation over time as a result of a combination of polyploidy (duplication events) and dysploidy (chromosome loss or gain events) along the branches of a phylogeny. Therefore, to understand the events that led to the karyotypic diversity across *Passiflora* phylogeny, we employed ChromEvol v.2.0, allowing us to test whether karyotypes evolved by polyploidy or dysploidy (Glick e Mayrose, 2014). The best-fitted model accounting for that variation in extant species was assessed under the Akaike information criterion (AIC) (Mayrose et al., 2010) (Table S3). All models that included demi-duplication (crossing of gametes of different ploidy levels; Mayrose et al., 2010) events were excluded from the analysis because they suggested that $2n = 18$ could be a triploid from $x = 6$ (Figure S1). If so, this would imply that the karyotype $2n = 18$ results by the union of a reduced gamete $x = 6$ with an unreduced gamete $x = 12$. Triploidy, however, is generally considered as an obstacle to the origin of fertile species due to the high order of meiotic irregularity it induces (Storey, 1950). Therefore, it seems unlikely that the $2n = 18$ species, all fertile, have originated through triploidy. If the genome of $2n = 18$ were triploid, it should also be expected three copies of each homologue and, therefore, using specific markers, three chromosomes would be identified with each single-copy BAC, which was not observed in *Passiflora edulis* (Santos et al., 2014). Besides, the species with $2n = 18$ present a regular meiosis (Barbosa e Vieira, 1997; Melo et al., 2001; Souza et al., 2003) and a disomic segregation of genetic markers (Oliveira et al., 2008), indicating a non-triploid origin.

The correlation between chromosome number and genome size in *Passiflora* was evaluated using Phylogenetic Generalized Least Squares (PGLS) implemented in the package caper v. 0.5.2 (Orme, 2013) in the R software v. 3.0.1. The phylogenetic signal on genome size (1C-value) was assessed using Pagel's lambda (Pagel, 1999) as implemented in the package phytools v. 5.30 (Revell, 2012) also in R. To calculate lambda on chromosome number we used

the `fitDiscrete` function implemented in the package *Geiger* v 2.0 (Pennell et al., 2014; Rabosky et al., 2014), also in R.

Diversification rate analysis

Shifts in diversification rates were calculated using speciation/extinction model type analysis in BAMM (Rabosky et al., 2014). For this analysis, outgroup taxa were removed and the tree was pruned to exclude *Adenia* and *Turnera* using the *ape* package (Paradis et al., 2017) implemented in R software. As BAMM works with incomplete phylogenetic datasets, it allows a certain degree of phylogenetic uncertainty. The missing taxa per tip (subgenus) in the phylogenetic tree was estimated according to the total number of species reported for each subgenus by Hansen et al. (2006). Priors for the BAMM control file were generated using the dated phylogenetic tree input into the function `set BAMM priors` in the package *BAMM tools* v. 2.5.0 implemented in R, estimating 530 species in *Passiflora*, in which 57 species in *Astrophea* subgenus, 220 in *Decaloba* subgenus, 13 in *Deidamioides* subgenus, and 240 in *Passiflora* subgenus. The control file was set for 10,000,000 generations and the analysis was run twice as recommended, returning similar results. Resulting MCMC Log likelihoods were tested against generation number using the CODA package (Plummer et al., 2006) implemented in R. All remaining outputs contained in the event data file were analysed using *BAMMtools* in R. The ‘Diversification rate’ value presented in Fig. 2 was obtained by dividing the number of species of a clade by the time of origin in millions of years (My).

Results

Phylogenetic relationships and diversification rate shifts in Passiflora

A total of 97 species of *Passiflora* with available DNA sequence and karyotype data were sampled (Table S1), representing ~20% of all accepted species (575). The genus *Passiflora* is monophyletic (PP 0.95) and emerged sister to *Adenia* (PP 1.00) (Fig.1). Within *Passiflora*, the *Astrophea* clade (PP 1.00) appears sister to the other species of the genus. Within the major clade (PP 0.98), two main lineages can be recognized: *Decaloba* clade (PP 0.95) and *Passiflora* clade (PP 0.98) + *Deidamioides* (represented here by *P. deidamioides*) + *Tetrapathea* (*P. tetrandra*). Some of the clades within *Decaloba* and *Passiflora* are also strongly supported (Fig. 1).

The diversification of genus *Passiflora* occurred in the Eocene (42.9 Mya- 95% CI 37.7–48.19). The subgenus *Decaloba* emerged as the oldest clade within the genus having diversified in the Oligocene/early Eocene (37.04 Mya- 95% CI 30.79–42.47). On the other hand, the subgenus *Passiflora* (25.94 Mya -95% CI 18.87–33.55) and *Astrophea* (20.59 Mya -95% CI 11.5–31.16) showed more recent diversifications on early Miocene/Oligocene (Fig. 1). The 95% credible set of rate shift configurations sampled with BAMM included six distinct shift configurations, of which the highest probability included two to three shifts. The best configuration is represented in Figure 2 and includes two core shifts detected within *Passiflora* genus: (1) a moderate increase of diversification in the *Decaloba* clade (~30 Mya; Oligocene), and (2) a strong recent diversification in the *Passiflora* clade (~20 Mya; Miocene).

Evolution of chromosome number and genome size in Passiflora

The reconstruction using Mesquite based on different methods (MP and ML) revealed $x = 12$ as ancestral chromosome number (Fig. S2), as well as the reconstruction using RASP (BI) (Fig. S3). However, the reconstructions performed with ChromEvol indicated $x = 6$ as the basic chromosome number in all models (Fig. 3). The selected model was M1 (CONSTANT_RATE) (Log-likelihood = -60.87 and AIC = 127.7, best model excluding demi-duplication) (Table S3) that considers three parameters: chromosome gain, chromosome loss, and chromosome duplication rates. Based on this model, variations in chromosome number of *Passiflora* were related to ascending dysploidy ($f = 10.7$) and duplications ($f = 6.8$), and, with lower frequency, to descending dysploidy ($f = 1$) (Fig. 3).

Based on the model M1, we found four independent genome duplication events occurring deeper in the phylogeny: three inferred from $x = 12$ (expectation of 1.00) at the base of the clade *Astrophea*, *P. deidamioides* and *P. tetrandra*, and one at the origin of $n = 11$ (*P. hahnii* + *P. guatemalensis*) from a duplication ($n = 6 \rightarrow n = 12$) followed by a chromosome loss ($n = 11$). Recent events of polyploidy were mainly inferred towards the terminals of the tree, but were not abundant (Fig. 3).

Ascending dysploidy was inferred at the base of the *Passiflora* clade from $n = 6$ to $n = 8$ and to $n = 9$ (expectation of 2.3 and 0.7, respectively). Similar events were observed at the origin of *P. foetida* $n = 10$ (from an ancestor with $n = 9$; 1.0), at the origin of *Passiflora holosericea* ($n = 6 \rightarrow n = 7$; 0.9), *P. microstispula* ($n = 6 \rightarrow n = 9$; 3), and *P. lancetillensis* ($n = 6 \rightarrow n = 9$; 0.7).

Average genome size (1C) of the genus is 1.073 pg. Subgenus: *Decaloba* shows 0.413 pg; *Deidamioides*, 0.815 pg and *Passiflora*, 1.311 pg (Yotoko et al., 2011). The ratio between the largest and smallest genomes is about 10:1 (about ten-fold change): from 0.212 pg in *P. organensis* (Yotoko et al., 2011) to 2.68 pg in *P. quadrangularis*, subgenus *Passiflora* (Souza et al., 2004). The PGLS analysis showed no significant correlation between chromosome number and genome size in *Passiflora* ($p = 0.1$). Nevertheless, both genome size and chromosome number showed strong phylogenetic signals ($\lambda = 0.96/p < 0.05$ and $\lambda = 1.00/p < 0.05$ respectively).

Discussion

Phylogenetic relationships and diversification time in Passiflora

In the present work, we reconstructed the phylogenetic relationship of *Passiflora* species with available chromosome number to estimate the ancestral basic chromosome number and to test the role of chromosome changes in the diversification of the genus. Remaining consistent with the previous phylogenetic hypothesis of the genus (Hansen et al., 2006; Muschner et al., 2003, 2012), our phylogeny revealed high branch support for most clades as result of the number of species and loci used. *Passiflora* is highly supported as monophyletic, but few species appeared in different clades in respect to previously studies, mostly weakly supported. The *Deidamioides* subgenus s.s. (represented in our sampling only by *P. deidamioides*) was recovered as sister to the *Passiflora* clade, yet weakly supported. Although it differed from previous studies that placed it as sister of the subgenus *Decaloba* (Hansen et al., 2006; Muschner et al., 2012), its position was consistent with more recent results from Krosnick et al. (2013) where *Deidamioides* appeared related, yet in polyphyletic way, sister of the subgenera *Passiflora*, *Astropheia* and *Decaloba*. *Passiflora lancetillensis* and *P. microstipula*, previously from subgenus *Deidamioides* (*sensu* Feuillet e MacDougal, 1999), were later repositioned in *Decaloba* (Hansen et al. 2006; Krosnick et al., 2013; Muschner et al. 2003). While *P. microstipula* appeared strongly supported at the base of the *Decaloba* clade, *P. lancetillensis*, also with $x = 9$, was sister to the *Passiflora* clade (Fig. 1). Krosnick et al. (2009) recognized the subgenus *Tetrapathea* (DC.) P. S. Green, including *P. kuranda* Krosnick e A. J. Ford, *P. aurantioides* (K. Schum.) Krosnick and *P. tetrandra* Banks ex DC, and raising the number of *Passiflora* subgenera to five. Subgenus *Tetrapathea* was sister to subgenus *Decaloba* (Krosnick et al., 2013), but our data recovered *P. tetrandra* as sister of *P. deidamioides* and *Passiflora* clade, weakly supported.

Our dated phylogeny showed diversification periods for the genus *Passiflora* L. (42.9 Mya), and subgenus *Decaloba* (37.04 Mya), *Passiflora* (25.94 Mya), and *Astropheia* (20.59 Mya) slightly different from those obtained from previous studies (Muschner et al., 2012; 40.5, 29.0, 16.8 and 13.8 Mya, respectively). Differences may be due to the calibration points and the sampled species included here in comparison to the previous phylogeny (Hearn, 2006; Muschner et al., 2012). Nevertheless, both results are congruent and match the same confidence intervals.

Evolution of chromosome number and genome size in Passiflora

The basic number $x = 6$ was retrieved in the ChromEvol analyses as the ancestral number of *Passiflora*, whereas MP, ML and BI analyses recovered $x = 12$. Several algorithms can reconstruct ancestral chromosome numbers (McCann et al., 2016). However, these pure mathematical algorithms are unable to attribute a putative change from $n = 6$ to $n = 12$ to a polyploidy event, which is highly frequent in plants (Cui et al., 2006; Soltis et al., 2009; Soltis e Burleigh, 2009; Weiss-Schneeweiss et al., 2013; Wood et al., 2009). ChromEvol uses instead a probabilistic approach including a dedicated evolutionary model that deals with changes in chromosome number over time understanding them as the result of a combination of polyploidy and dysploidy events along branches of a phylogeny. The likelihood approach permits to determine not only the probability of a given chromosome number at any internal node but also to gain insight into the evolutionary process itself (Glick e Mayrose, 2014; Mayrose et al., 2010).

Several authors have performed chromosome number reconstructions in *Passiflora* using ChromEvol. Mayrose et al. (2010) reported both $x = 12$ and $x = 6$, predicted by M0 and M2, respectively as best-supported. Cusimano e Renner (2014) obtained different outputs whether they used an ultrametric or non-ultrametric tree, and differences between both the ancestral basic number ($x = 6$ or $x = 12$) and the models predicted by the program to reconstruct the evolution of the genus. At the same time, Escudero et al. (2014) also reported $x = 6$ with M2 as the best-supported predicting model. Such discrepancies between reconstructed ancestral basic numbers in *Passiflora*, all resulting of the same input data, led to the conclusion that a broader sampling of chromosome numbers was required for a better resolution (Cusimano e Renner, 2014; Mayrose et al., 2010). Indeed, using a larger dataset and a better-supported phylogeny, we did not find differences between ultrametric and non-ultrametric trees in the

reconstruction, in contrast to Cusimano e Renner (2014), confirming $x = 6$ as the basic number of the genus.

Our results proposed ancient polyploidy events each at the origin of $n = 12$ in *Astrophea* (20.59 Mya), *Tetrapathea* (represented by *P. tetrandra* only) and *Deidamioides* (represented by *P. deidamioides* only). As observed in different polyploid lineages, evidence of genome duplication may disappear in the course of speciation and stabilization, since some duplicated genes are lost or subjected to sub- and/or neofunctionalization, despite the conservation of chromosome number (Mandáková et al., 2010; Otto, 2007; Schnable et al., 2012; Sémon e Wolfe, 2007). Melo e Guerra (2003) had formerly described this in *Passiflora haematostigma* (*Astrophea*) reporting $n = 12$ for a partially diploidized karyotype with two pairs of 35S DNAr sites but only one pair of 5S DNAr site.

The basic chromosome number $x = 9$, at the origin of *Passiflora* subgenus, on the other hand, originated by ascending dysploidy; therefore, the presence of two or three pairs of 35S DNAr sites in the *Passiflora* subgenus (Melo e Guerra, 2003) may represent DNAr duplication events, rather than the result of whole-genome duplication. Although both genome size and chromosome number showed strong phylogenetic signal ($\lambda = 0.96$ and 1.00 respectively), indicating that closely related taxa shared more similar values for these traits against distantly related species (see Kamilar e Cooper, 2013, for details), the PGLS analysis did not show significant correlation between increases in chromosome number and increases in genome size. It means that the genome size increment in *Passiflora* lineages is not the result of polyploidization. In fact, neopolyploids (recent polyploids) are uncommon within the genus (only *P. misera*, *P. suberosa*, *P. tenuiloba*, *P. lutea* and *P. exsudans*, from the *Decaloba* clade) (Melo e Guerra, 2003).

Ascending dysploidy is presumably rarer than descending dysploidy events (Goldblatt e Takei, 1997; Grant, 1981; Guerra, 2000), but it has been hypothesized for different plant groups (Escudero et al., 2014; Souza et al., 2016). It has been pointed out that dysploidy transitions incur no disadvantage in terms of generating long-term persisting lineages (Escudero et al., 2014; Fawcett et al., 2009; Wood et al., 2009). Typically, dysploidy do not necessarily entail changes in DNA content but only genome structural rearrangements, which have been considered so far of neutral effect with respect to long-term diversification processes (Escudero et al., 2014). However, we observed a recent diversification of the *Passiflora* subgenus (Miocene), occurring together with the chromosome change from $n = 6$ to $n = 9$ and with a

genome size increase (Fig. 4). The increase of genome size within the subgenus *Passiflora*, if compared with other subgenera, can be at least in part explained by ascending dysploidy (Pellicer et al., 2017). Further increase within the subgenus may be associated with amplification of non-coding repetitive DNA, such as transposable elements, which are present in high frequencies in plant genomes (Bennetzen e Wang, 2014).

The diversification rate increased through the genus *Passiflora*, although not uniformly. In subgenus *Decaloba* it was higher than average, but lower than in *Passiflora* subgenus, and was not associated with a chromosome number change. Despite the lack of information about ecological factors that may be involved in this process, *Decaloba* species all have shorter generation times than *Passiflora* species (Benson et al., 1975), what could be a factor accelerating the evolutionary rate of *Decaloba*. On the other hand, both mean genome size and mean flower diameter were significantly smaller in *Decaloba* (average 0.413 pg; 2.92 cm) and *Deidamioides* (0.815 pg; 4.69 cm) when compared to *Passiflora* (average 1.311 pg; 7.28 cm) (Yotoko et al., 2011). Genome size and flower diameter correlated positively, suggesting that variations in genome size should be considered as an adaptive process (Yotoko et al., 2011). Thus, our results revealed a correlation between chromosome number/genome size changes and diversification in *Passiflora*, probably through association to morphological/ecological changes.

In contrast, polyploidy did not result in an increase in diversification or number of species in the genus *Passiflora*. The lineages that have experienced polyploidy before their diversification, such as *Astropheia* or *Deidamioides*, are much less species-rich than other lineages in which polyploidy was not inferred, such as *Passiflora* and *Decaloba*. Two long-standing opposite views regard polyploidy either as an evolutionary dead-end (Stebbins, 1950) or as a road towards evolutionary success (Levin, 1983). Neopolyploids often undergo meiotic abnormalities by the improper pairing of both subgenomes during cell division, leading to genomic instability and subsequent negative effects on plant fertility and fitness (Madlung et al., 2004). They also need to outcompete the minority cytotype disadvantage, which leads to less fit and infertile triploid hybrids due to ineffective mating of unreduced ($2n$) gametes with reduced (n) gametes from the diploid progenitor majority cytotype (Levin, 1975). Consequently, even new, stable polyploids could face severe barriers to propagation due to the very low probability of finding enough proper partners for mating and establish a viable population. This is especially true in self-incompatible genotypes or when vegetative

propagation forms, such as apomixis, are not available. Indeed, it has been observed that in polyploid plants lineages the speciation rates are lower and the extinction rates are higher than those registered for diploid species, resulting in a lower net diversification rate. This is possibly related to the genotypic and phenotypic instability, and the disadvantage of the minority cytotype (Mayrose et al., 2011). Therefore, this scenario of “evolutionary dead-end” seems to better account for what we observed in the diversification history of *Passiflora* polyploids.

To summarize, we established a time-calibrated, highly supported phylogeny for *Passiflora*, including species with available chromosome number, that supported $x = 6$ as the basic chromosome number of the genus. In addition, a recent diversification in the subgenus *Passiflora* (Miocene) related to the chromosomal change from $n = 6$ to $n = 9$ and an increase in genome size was confirmed. Polyploidy was restricted to few lineages and was not associated with species diversification. Thus, our results support the hypothesis that ascending dysploidy together with genome size increase acted as the main drivers in the evolution of *Passiflora*.

Acknowledgements

We are grateful to FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) for a scholarship to M. Sader (IBPG-1086-2.03/15), to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for a postdoctoral scholarship to B.S. Amorim, and to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for supporting A. Pedrosa-Harand. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. We would also like to thank Pablo Ariel Martinez for the useful comments, and Marcus Braun and Pablo Rodriguez for the careful review of the manuscript. We also thank reviewers whose valuable and helpful suggestions improved the quality of the manuscript.

References

- Akaike, H. (1974). A New Look at the Statistical Model Identification. In *Selected Papers of Hirotugu Akaike* (pp. 215–222). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1694-0_16
- Barbosa, L. V., e Vieira, M.-L. (1997). Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener + *P. amethystina* Mikan. *Euphytica*, 98, 121–127. <https://doi.org/10.1023/A:1003099709021>

- Bell, C. D., Soltis, D. E., e Soltis, P. S. (2010). The age and diversification of the angiosperms re-revisited. *American Journal of Botany*, 97, 1296–1303. <https://doi.org/10.3732/ajb.0900346>
- Bennett, M. D., e Leitch, I. J. (2005). Nuclear DNA Amounts in Angiosperms: Progress, Problems and Prospects. *Annals of Botany*, 95, 45–90. <https://doi.org/10.1093/aob/mci003>
- Bennett, M. D., e Leitch, I. J. (2012). Angiosperm DNA C-values database (release 8.0, Dec. 2012). Retrieved from <http://data.kew.org/cvalues/> (Accessed 27 September, 2017).
- Bennetzen, J. L., e Wang, H. (2014). The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 505–530. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035811>
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., e Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41, D36–D42. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> (Accessed 02 June, 2017).
- Benson, W. W., Brown, K. S., e Gilbert, L. E. (1975). Coevolution of Plants and Herbivores: Passion Flower Butterflies. *Evolution*, 29, 659–680. <https://doi.org/10.2307/2407076>
- Blösch, C., Weiss-Schneeweiss, H., Schneeweiss, G. M., Barfuss, M. H. J., Rebernig, C. A., Villaseñor, J. L., e Stuessy, T. F. (2009). Molecular phylogenetic analyses of nuclear and plastid DNA sequences support dysploid and polyploid chromosome number changes and reticulate evolution in the diversification of *Melampodium* (Millerieae, Asteraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53, 220–233. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.02.021>
- Buitrago A., M. A., Macdougall, J. M., e Coca, L. F. (2018). *Passiflora kumandayi* (Passifloraceae), a new species from the Colombian Andes in a new section within subgenus *Decaloba*. *Phytotaxa*, 344, 13. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.344.1.2>
- Clarkson, J. J., Dodsworth, S., e Chase, M. W. (2017). Time-calibrated phylogenetic trees establish a lag between polyploidisation and diversification in *Nicotiana* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 303, 1001–1012. <https://doi.org/10.1007/s00606-017-1416-9>
- Costa, L., Oliveira, Á., Carvalho-Sobrinho, J., e Souza, G. (2017). Comparative cytomolecular analyses reveal karyotype variability related to biogeographic and species richness patterns in Bombacoideae (Malvaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 303, 1131–1144. <https://doi.org/10.1007/s00606-017-1427-6>

- Cui, L., Wall, P. K., Leebens-Mack, J. H., Lindsay, B. G., Soltis, D. E., Doyle, J. J., ... dePamphilis, C. W. (2006). Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research*, 16, 738–749. <https://doi.org/10.1101/gr.4825606>
- Cusimano, N., e Renner, S. (2014). Ultrametric Trees or Phylograms for Ancestral State Reconstruction - Does it matter? *Taxon*, 63, 721-726. <https://doi.org/10.12705/634.14>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., e Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. *Nature Methods*, 9, 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Drummond, A. J., e Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-214>
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., e Rambaut, A. (2012). Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1969–1973. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Escudero, M., Martín-Bravo, S., Mayrose, I., Fernández-Mazuecos, M., Fiz-Palacios, O., Hipp, A. L., . Luceño, M. (2014). Karyotypic Changes through Dysploidy Persist Longer over Evolutionary Time than Polyploid Changes. *PLoS ONE*, 9, e85266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085266>
- Fawcett, J. A., Maere, S., e Van de Peer, Y. (2009). Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous–Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 5737–5742. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900906106>
- Feuillet, C., e MacDougal, J. M. (1999). Infrageneric classification of *Passiflora*. In *XVI International Botanical Congress, St. Louis, Mo.* p. 173.
- Feuillet, C., e MacDougal, J. M. (2003). A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Passiflora*, 13, 34–38.
- Gernhard, T. (2008). The conditioned reconstructed process. *Journal of Theoretical Biology*, 253, 769–778. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.04.005>

- Glick, L., e Mayrose, I. (2014). ChromEvol: Assessing the Pattern of Chromosome Number Evolution and the Inference of Polyploidy along a Phylogeny. *Molecular Biology and Evolution*, 31, 1914–1922. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu122>
- Goldblatt, P., e Takei, M. (1997). Chromosome Cytology of Iridaceae-Patterns of Variation, Determination of Ancestral Base Numbers, and Modes of Karyotype Change. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 84, 285–304. <https://doi.org/10.2307/2400005>
- Grant, V. (1981). *Plant Speciation* (2nd ed.). New York: Columbia University Press.
- Guerra, M. (2000). Chromosome number variation and evolution in monocots. In K. L. Wilson e D. A. Morrison (Eds.), *Monocots II: Systematics and Evolution* (pp. 127–136). Melbourne: CSIRO Publ.
- Hansen, A. K., Gilbert, L. E., Simpson, B. B., Downie, S. R., Cervi, A. C., e Jansen, R. K. (2006). Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. *Systematic Botany*, 31, 138–150. <https://doi.org/10.1600/036364406775971769>
- Hearn, D. (2006). *Adenia* (Passifloraceae) and its adaptive radiation: phylogeny and growth form diversification. *Systematic Botany*, 31, 805–821. <https://doi.org/10.1600/036364406779695933>
- Hennequin, S., Ebihara, A., Dubuisson, J.-Y., e Schneider, H. (2010). Chromosome number evolution in *Hymenophyllum* (Hymenophyllaceae), with special reference to the subgenus *Hymenophyllum*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.01.001>
- Jang, T.-S., Emadzade, K., Parker, J., Temsch, E. M., Leitch, A. R., Speta, F., e Weiss-Schneeweiss, H. (2013). Chromosomal diversification and karyotype evolution of diploids in the cytologically diverse genus *Prospero* (Hyacinthaceae). *BMC Evolutionary Biology*, 13, 136. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-136>
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., e Donoghue, M. J. (2015). *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach* (Fourth Edition). Oxford, New York: Oxford University Press.

- Kamilar, J. M., e Cooper, N. (2013). Phylogenetic signal in primate behaviour, ecology and life history. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368, 20120341–20120341. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0341>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Killip, E. P. (1938). *The American species of Passifloraceae*. Chicago. Retrieved from <http://archive.org/details/americanspeciesofikill>
- Krosnick, S. E., Porter-Utley, K. E., MacDougal, J. M., Jørgensen, P. M., e Mcdade, L. A. (2013). New insights into the evolution of *Passiflora* subgenus Decaloba (Passifloraceae): Phylogenetic relationships and morphological synapomorphies, 38, 692–713. <https://doi.org/10.1600/036364413X670359>
- Krosnick, S., Ford, A., e V. Freudenstein, J. (2009). Taxonomic revision of *Passiflora* subgenus Tetrapathea including the monotypic genera *Hollrungia* and *Tetrapathea* (Passifloraceae), and a new species of *Passiflora*. *Systematic Botany*, 34, 375–385. <https://doi.org/10.1600/036364409788606343>
- Levin, D. A. (1975). Genetic correlates of translocation heterozygosity in plants. *BioScience*, 25, 724–728. <https://doi.org/10.2307/1297452>
- Levin, D. A. (1983). Polyploidy and novelty in flowering plants. *The American Naturalist*, 122, 1–25. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2461003>
- Levin, D. A. (2002). *The role of chromosomal change in plant evolution*. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Lynch, M., e Conery, J. S. (2000). The Evolutionary Fate and Consequences of Duplicate Genes. *Science*, 290, 1151–1155. <https://doi.org/10.1126/science.290.5494.1151>
- Lynch, M., e Force, A. G. (2000). The origin of interspecific genomic incompatibility via gene duplication. *The American Naturalist*, 156, 590–605. <https://doi.org/10.1086/316992>
- Maddison, W. P., e Maddison, M. D. R. (2014). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.01. Retrieved from <http://mesquiteproject.org> (Accessed November 1, 2014)

- Madlung, A., Tyagi, A. P., Watson, B., Jiang, H., Kagochi, T., Doerge, R. W., ... Comai, L. (2004). Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids: Genomic changes in *Arabidopsis* polyploids. *The Plant Journal*, 41, 221–230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02297.x>
- Mandáková, T., Joly, S., Krzywinski, M., Mummenhoff, K., e Lysak, M. A. (2010). Fast diploidization in close mesopolyploid relatives of *Arabidopsis*. *The plant cell*, 22, 2277–2290. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074526>
- Marinho, R. C., Mendes-Rodrigues, C., Balao, F., Ortiz, P. L., Yamagishi-Costa, J., Bonetti, A. M., e Oliveira, P. E. (2014). Do chromosome numbers reflect phylogeny? New counts for Bombacoideae and a review of Malvaceae s.l. *American Journal of Botany*, 101, 1456–1465. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400248>
- Mas de Xaxars, G., Garnatje, T., Pellicer, J., Siljak-Yakovlev, S., Vallès, J., e Garcia, S. (2016). Impact of dysploidy and polyploidy on the diversification of high mountain *Artemisia* (Asteraceae) and allies. *Alpine Botany*, 126, 35–48. <https://doi.org/10.1007/s00035-015-0159-X>
- Mayrose, I., Barker, M. S., e Otto, S. P. (2010). Probabilistic models of chromosome number evolution and the inference of polyploidy. *Systematic Biology*, 59, 132–144. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp083>
- Mayrose, I., Zhan, S. H., Rothfels, C. J., Magnuson-Ford, K., Barker, M. S., Rieseberg, L. H., e Otto, S. P. (2011). Recently formed polyploid plants diversify at lower rates. *Science*, 333, 1257–1257. <https://doi.org/10.1126/science.1207205>
- McCann, J., Schneeweiss, G. M., Stuessy, T. F., Villaseñor, J. L., e Weiss-Schneeweiss, H. (2016). The impact of reconstruction methods, phylogenetic uncertainty and branch lengths on inference of chromosome number evolution in American daisies (*Melampodium*, Asteraceae). *PLoS ONE*, 11, e0162299. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162299>
- Melo, N. F. (2003). Variability of the 5S and 45S DNAr Sites in *Passiflora* L. Species with Distinct Base Chromosome Numbers. *Annals of Botany*, 92, 309–316. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg138>
- Melo, N. F. D., Cervi, A. C., e Guerra, M. (2001). Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae), *Plant Systematics and Evolution*, 226, 69-84.

Miller, M. A., Pfeiffer, W., e Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 2010* (pp. 1–8). IEEE. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>. Available at: <http://www.phylo.org/index.php/> (Accessed April 21, 2017).

Morawetz, W. (1986). Remarks on karyological differentiation patterns in tropical woody plants. *Plant Systematics and Evolution*, 152, 49–100. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/23673699>

Muschner, V. C., Lorenz, A. P., Cervi, A. C., Bonatto, S. L., Souza-Chies, T. T., Salzano, F. M., e Freitas, L. B. (2003). A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). *American Journal of Botany*, 90, 1229–1238. <https://doi.org/10.3732/ajb.90.8.1229>

Muschner, V. C., Zamberlan, P. M., Bonatto, S. L., e Freitas, L. B. (2012). Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology*, 35, 1036–1043. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3571420/>

Ocampo Pérez, J., e Coppens d'Eeckenbrugge, G. (2017). Morphological characterization in the genus *Passiflora* L.: an approach to understanding its complex variability. *Plant Systematics and Evolution*, 303, 531–558. <https://doi.org/10.1007/s00606-017-1390-2>

Oliveira, E. J., Vierira, M. L. C., Garcia, A. A. F., Munhoz, C. F., Margarido, G. R. A., Consoli, L., ... Fungaro, M. H. P. (2008). An integrated molecular map of yellow passion fruit based on simultaneous maximum-likelihood estimation of linkage and linkage phases. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133, 35–41. Retrieved from <http://journal.ashspublications.org/content/133/1/35.full.pdf>

Orme, D. (2013). The caper package: comparative analysis of phylogenetics and evolution in R. *R package version*, 5, 1-36.

Otto, S. P. (2007). The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell*, 131, 452–462. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.022>

Pagel, M. (1999). Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature*, 401, 877–884.

- Paradis, E., Blomberg, S., Bolker, B., Claude, J., Cuong, H. S., Desper, R., ... de Vienne, D. (2017, February 14). Package 'ape': Analyses of Phylogenetics and Evolution. Retrieved September 30, 2017, from <https://cran.r-project.org/web/packages/ape/ape.pdf>
- Pellicer, J., Hidalgo, O., Walker, J., Chase, M. W., Christenhusz, M. J., Shackelford, G., ... Fay, M. F. (2017). Genome size dynamics in tribe Gilliesieae (Amaryllidaceae, subfamily Allioideae) in the context of polyploidy and unusual incidence of Robertsonian translocations. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 184, 16–31.
- Pennell, M. W., Eastman, J. M., Slater, G. J., Brown, J. W., Uyeda, J. C., FitzJohn, R. G., ... Harmon, L. J. (2014). geiger v2.0: an expanded suite of methods for fitting macroevolutionary models to phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 30, 2216–2218. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu181>
- Plummer, M., Best, N., Cowles, K., e Vines, K. (2006). CODA: Convergence diagnosis and output analysis for MCMC. *R Package Version*, 6, 7–11. Retrieved from <https://www.r-project.org/doc/Rnews/>
- R Core Team. (2017). R: A language and environment for statistical computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <http://www.R-project.org/>
- Rabosky, D. L., Grundler, M., Anderson, C., Title, P., Shi, J. J., Brown, J. W., ... Larson, J. G. (2014). BAMMtools: an R package for the analysis of evolutionary dynamics on phylogenetic trees. *Methods in Ecology and Evolution*, 5, 701–707. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12199>
- Rambaut, A. (2014). *FigTree v1.4.2*. Retrieved from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie, W., e Drummond, A. J. (2014). *TRACER v1.6*. Retrieved from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>
- Raven, P. H. (1975). The bases of angiosperm phylogeny: Cytology. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 62, 724–764. <https://doi.org/10.2307/2395272>
- Revell, L. J. (2012). phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 217–223. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00169.x>

- Ribeiro, T., Buddenhagen, C. E., Thomas, W. W., Souza, G., e Pedrosa-Harand, A. (2018). Are holocentrics doomed to change? Limited chromosome number variation in *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae). *Protoplasma*, 255, 263–272. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1154-4>
- Rice, A., Glick, L., Abadi, S., Einhorn, M., Kopelman, N. M., Salman-Minkov, A., ... Mayrose, I. (2015). The chromosome counts database (CCDB) – a community resource of plant chromosome numbers. *New Phytologist*, 206, 19–26. <https://doi.org/10.1111/nph.13191>. Retrieved from <http://ccdb.tau.ac.il/home/> (Accessed 28 March 2017).
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61, 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Santos, A. A., Penha, H. A., Bellec, A., Munhoz, C. de F., Pedrosa-Harand, A., Bergès, H., e Vieira, M. L. C. (2014). Begin at the beginning: A BAC-end view of the passion fruit (*Passiflora*) genome. *BMC Genomics*, 15, 816. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-816>
- Schnable, J. C., Wang, X., Pires, J. C., e Freeling, M. (2012). Escape from preferential retention following repeated whole genome duplications in plants. *Frontiers in Plant Science*, 3, 94. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00094>
- Schubert, Ingo, e Lysak, M. A. (2011). Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics*, 27, 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.03.004>
- Sémon, M., e Wolfe, K. H. (2007). Consequences of genome duplication. *Current Opinion in Genetics e Development*, 17, 505–512. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.09.007>
- Snow, N., e MacDougal, J. M. (1993). New chromosome reports in *Passiflora* (Passifloraceae). *Systematic Botany*, 18, 261. <https://doi.org/10.2307/2419402>
- Soltis, D. E., e Burleigh, J. G. (2009). Surviving the K-T mass extinction: New perspectives of polyploidization in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 5455–5456. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901994106>
- Soltis, D. E., e Soltis, P. S. (1999). Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology e Evolution*, 14, 348–352.

Soltis, D. E., Albert, V. A., Leebens-Mack, J., Bell, C. D., Paterson, A. H., Zheng, C., ... Soltis, P. S. (2009). Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany*, 96, 336–348. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800079>

Soltis, P. S., e Soltis, D. E. (2000). The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 7051–7057. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.13.7051>

Souza, G., Crosa, O., Speranza, P., e Guerra, M. (2016). Phylogenetic relations in tribe Leucocoryneae (Amaryllidaceae, Allioideae) and the validation of *Zoellnerallium* based on DNA sequences and cytomolecular data. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 182, 811–824.

Souza, M. M. D., Pereira, T. N. S., Viana, A. P., Pereira, M. G., Bernacci, L. C., Sudré, C. P., e Silva, L. D. C. (2003). Meiotic irregularities and pollen viability in *Passiflora edmundoi* Sacco (Passifloraceae). *Caryologia*, 56, 161–169. <https://doi.org/10.1080/00087114.2003.1010589320>

Souza, M. M., Palomino, G., Pereira, T. N. S., Pereira, M. G., e Viana, A. P. (2004). Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species. *Hereditas*, 141, 31–38. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2004.01739.x>

Stebbins, G. L. (1971). *Chromosomal evolution in higher plants*. London: Arnold. 87-89. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19711606614>

Stebbins, George Ledyard. (1950). *Variation and Evolution in Plants*. New York: Columbia University Press.

Storey, W. B. (1950). Chromosome numbers of some species of *Passiflora* occurring in Hawaii. Retrieved from <http://scholarspace.manoa.hawaii.edu/handle/10125/8988>

Tokuoka, T. (2012). Molecular phylogenetic analysis of Passifloraceae sensu lato (Malpighiales) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Journal of Plant Research*, 125, 489–497. <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0472-4>

Ulmer, T., e MacDougal, J. M. (2004). *Passiflora: Passionflowers of the World*. Timber Press: Portland, OR, USA. ISBN 881926485.

- Vaio, M., Gardner, A., Emshwiller, E., e Guerra, M. (2013). Molecular phylogeny and chromosome evolution among the creeping herbaceous *Oxalis* species of sections Corniculatae and Ripariae (Oxalidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68, 199–211. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.03.019>
- Weiss-Schneeweiss, H., Emadzade, K., Jang, T.-S., e Schneeweiss, G. M. (2013). Evolutionary consequences, constraints and potential of polyploidy in plants. *Cytogenetic and Genome Research*, 140, 137–150. <https://doi.org/10.1159/000351727>
- Wendel, J. F., Cronn, R. C., Johnston, J. S., e Price, H. J. (2002). Feast and famine in plant genomes. *Genetica*, 115, 37–47.
- Werth, C. R., e Windham, M. D. (1991). A model for divergent, allopatric speciation of polyploid pteridophytes resulting from silencing of duplicate-gene expression. *The American Naturalist*, 137, 515–526. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2462378>
- Wood, T. E., Takebayashi, N., Barker, M. S., Mayrose, I., Greenspoon, P. B., e Rieseberg, L. H. (2009). The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 13875–13879. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811575106>
- Yockteng, R., e Nadot, S. (2004a). Infrageneric phylogenies: a comparison of chloroplast-expressed glutamine synthetase, cytosol-expressed glutamine synthetase and cpDNA maturase K in *Passiflora*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31, 397–402. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00276-8](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00276-8)
- Yockteng, R., e Nadot, S. (2004b). Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (*ncpGS*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31, 379–396. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00277-X](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00277-X)
- Yotoko, K. S. C., Dornelas, M. C., Togni, P. D., Fonseca, T. C., Salzano, F. M., Bonatto, S. L., e Freitas, L. B. (2011). Does variation in genome sizes reflect adaptive or neutral processes? New clues from *Passiflora*. *PLoS ONE*, 6, e18212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018212>
- Yu, Y., Harris, A. J., Blair, C., e He, X. (2015). RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): A tool for historical biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 87, 46–49. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.03.008>

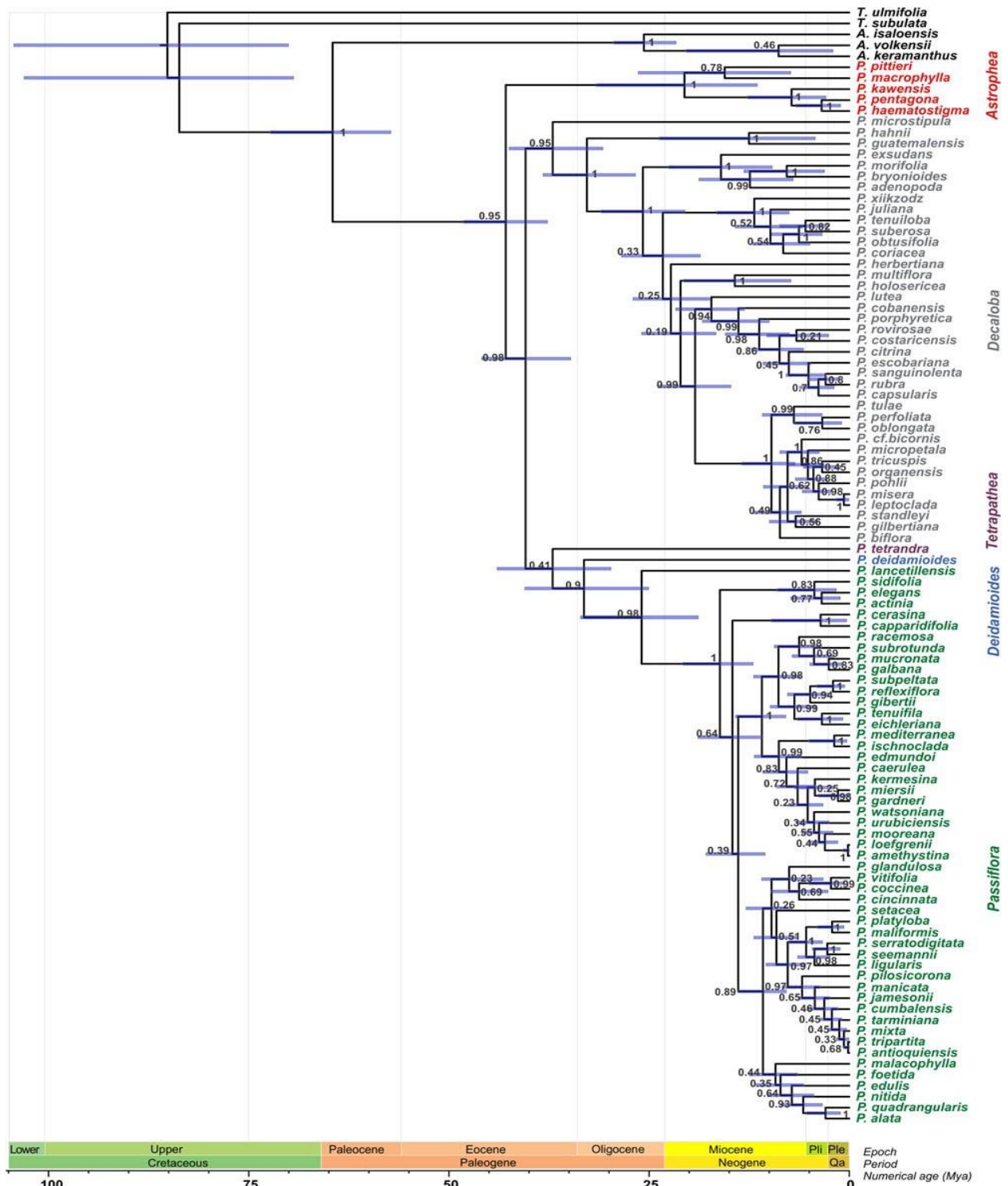


Fig. 1. Chronogram of *Passiflora* based on the nuclear internal transcribed spacer (ITS) and the plastid *psbA-trnH*, *trnL* intron, *trnL-trnF*, and *trnL-trnT* sequences. Numbers in front of the nodes are posterior probabilities. Horizontal bars indicate 95% credibility intervals for divergence times.

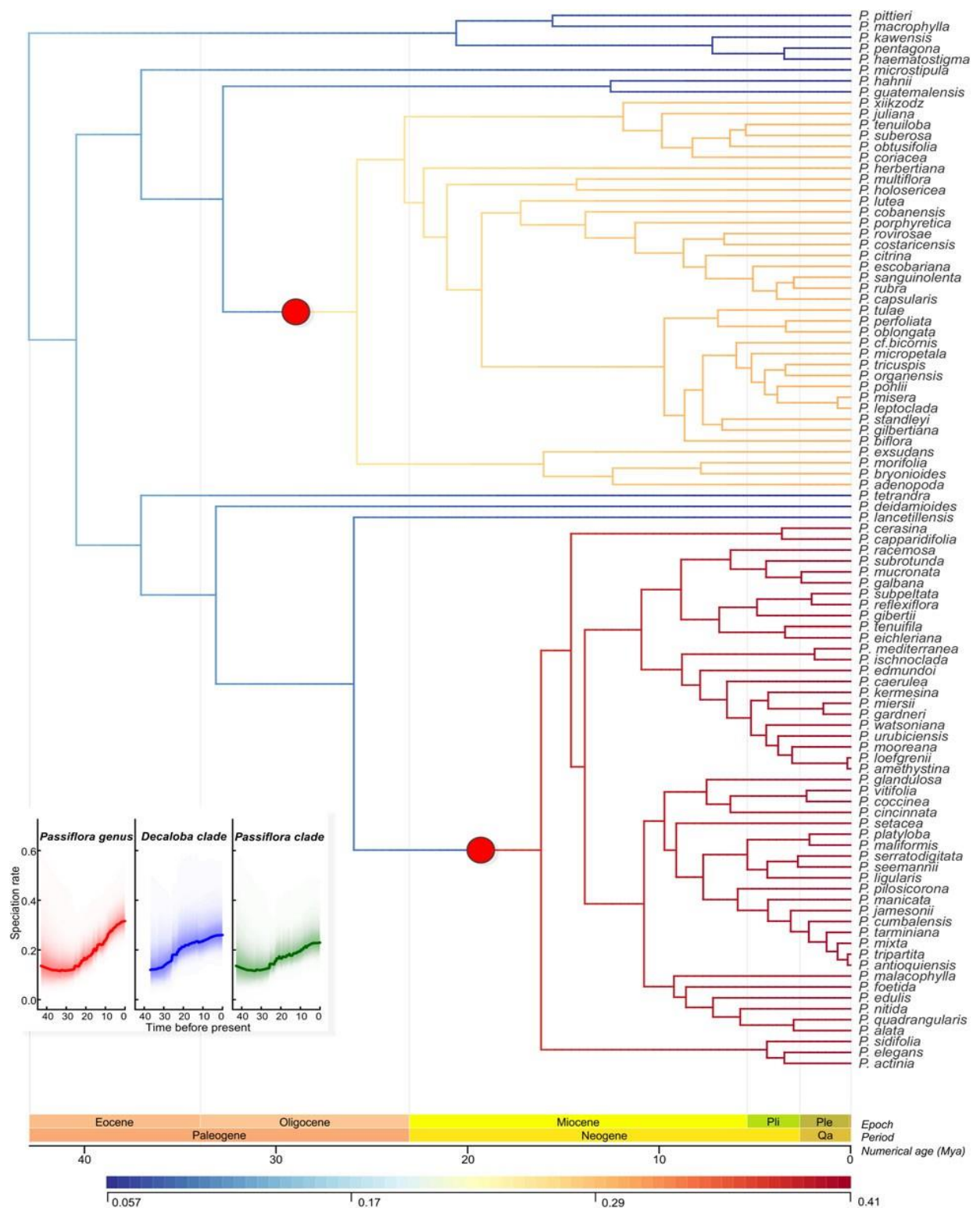


Fig. 2. Diversigram for *Passiflora* showing two significant shifts of net diversification rate, inferred from BAMM analysis. Warmer branch colours represent faster rates of net diversification for each lineage (see time scale).

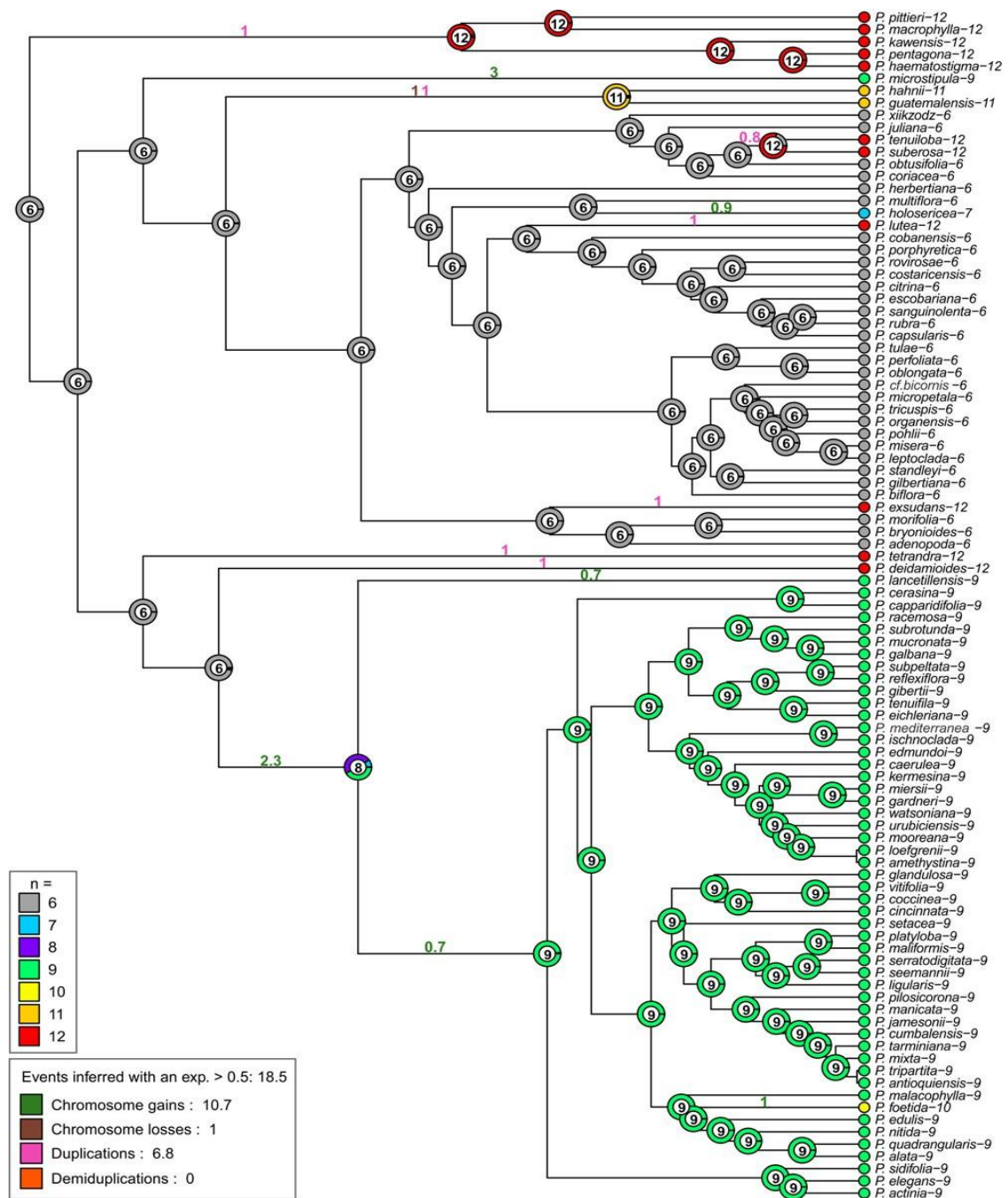


Fig. 3. Reconstruction of chromosome number evolution in *Passiflora* with the Constant_Rate model. Pie charts at nodes represent the probability of inferred chromosome numbers (as indicated on reference box); numbers at nodes are those with the highest probability; numbers along branches represent the inferred number of the four different types of events (gains, losses, duplications, and demiduplications) from maximum likelihood estimation by simulation. The colour-coding is explained in the insets.

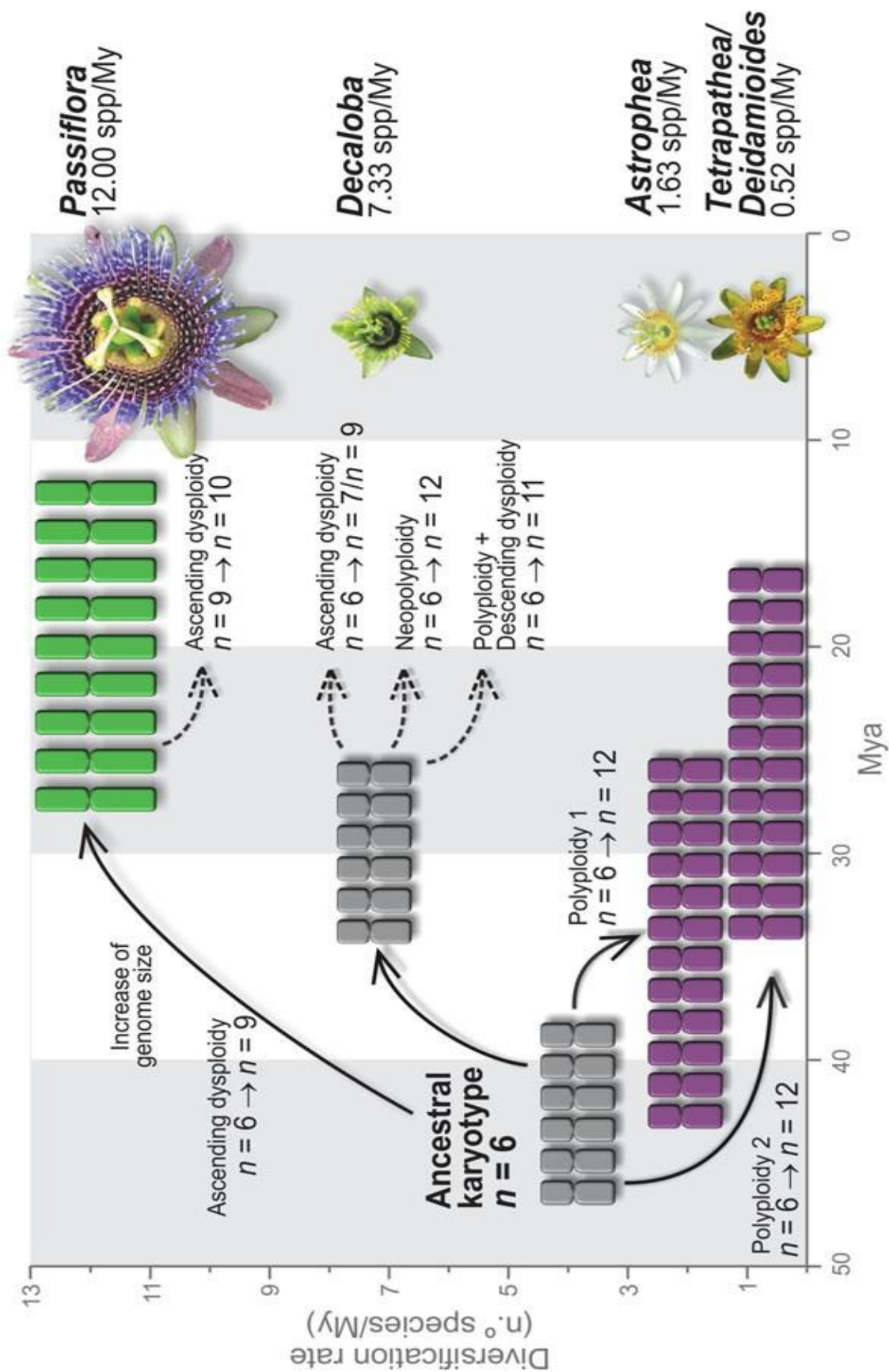


Fig. 4. Model of karyotype evolution in *Passiflora* indicating changes in chromosome number and genome size in relation to its diversification rates.

Table S1. Species of *Passiflora* showing chromosome numbers (*n*), 1C genome size (pg) and DNA regions used for phylogenetic reconstruction (GenBank accession numbers, also for outgroups *Adenia* and *Turnera*)

Species	<i>n</i>	1C	Accession numbers				
			<i>ITS</i>	<i>psbA-trnH</i>	<i>trnL</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnL-trnT</i>
<i>Astrophea</i> (DC.) Mast							
<i>P. haematostigma</i> Mart. exMast.	12		AY032794	AY032819	DQ123022	AY032773	
<i>P. kawensis</i> Feuillet	12		KP769919		DQ123023	DQ123489	DQ096769
<i>P. macrophylla</i> Spruce ex Mast.	12		EU907229		DQ123025	AY210965	
<i>P. pentagona</i> Mast.	12		KM518287	KM652335	KM652239	KM652239	
<i>P. pittieri</i> Mast.	12		DQ995476		DQ995475	DQ123491	DQ096768
<i>Decaloba</i> (DC.) Rchb.							
<i>P. adenopoda</i> DC.	6		AY632702		AY632727	AY632727	
<i>P. cf. bicornis</i> Mill. (published as <i>P. pulchella</i> Kunth)	6		KT699018		KT730704	KT730704	
<i>P. biflora</i> Lam.	6		AF454805	GU135451	AF454781	JX470867	DQ096787
<i>P. bryonioides</i> Kunth	6		JX470796		JX470869	JX470869	
<i>P. capsularis</i> L.	6	0.319	EU907235	KP223457	HQ900955	HQ901007	
<i>P. citrina</i> J.M. MacDougal	6		JX463165	KM652333	DQ458101	DQ458101	
<i>P. cobanensis</i> Killip	6		JX470807		JX470873	JX470873	
<i>P. coriacea</i> Juss.	6		DQ238787	DQ238763	DQ238789	DQ238754	
<i>P. costaricensis</i> Killip	6		KT698995		KT730689	KT730689	
<i>P. escobariana</i> J.M. MacDougal	6		JX470808		JX470879	JX470879	
<i>P. exsudans</i> Zucc.	12		JX470799		JX470880	JX470880	
<i>P. gilbertiana</i> J.M. MacDougal	6		JX470824		JX470881	JX470881	
<i>P. guatemalensis</i> Wats.	11		DQ087419		DQ087428	DQ087428	DQ096762
<i>P. hahnii</i> (E. Fourn.) Mast.	11 - 12		JX470777		JX470884	JX470884	
<i>P. herbertiana</i> Ker Gawl.	6		AY632711		AY632736	AY632736	DQ096783
<i>P. holosericea</i> L.	7		JX470781		DQ087426	DQ087426	DQ096759
<i>P. juliana</i> J.M. MacDougal	6		JX470791		JX470924	JX470924	
<i>P. lancetillensis</i> J.M. MacDougal	9		KT698999		DQ123050	AY210963	DQ096760
<i>P. leptoclada</i> Harms	6	0.261	JX470846		JX470889	JX470889	
<i>P. lutea</i> L.	12		KT699003		KT730729	KT730729	
<i>P. micropetala</i> Mast.	6	0.250	JX470847		HQ900976	DQ445933	
<i>P. microstipula</i> Gilbert & MacDougal	9		DQ458066		DQ123051	AY210966	DQ096782
<i>P. misera</i> Kunth	6	0.253	KP223368	KP223476	DQ123034	AY032777	
<i>P. morifolia</i> Mast.	6	0.505	EU258324	AY032805	DQ123035	AY032780	
<i>P. multiflora</i> Mast.	6		AY632715		DQ123014	AY210967	DQ096793
<i>P. oblongata</i> Sw.	6		JX470818		JX470895	JX470895	DQ096772
<i>P. obtusifolia</i> Sessé & Moc.	6		JX470793		JX470896	JX470896	
<i>P. organensis</i> Gardn.	6	0.212	EU258414	AY032803	DQ123036	AY032779	
<i>P. perfoliata</i> L.	6		JX470821		JX470899	JX470899	DQ096761

<i>P. pohlii</i> Mast. In Mart.	6	0.299	EU258325	AY032802	DQ123038	AY032778	
<i>P. porphyretica</i> Mast.	6				JX470939	JX470939	
<i>P. rovirosae</i> Killip	6		JX470810		DQ123040	JX470931	
<i>P. rubra</i> L.	6		JX470811	AY032821	AY632741	AY032776	
<i>P. sanguinolenta</i> Mast.	6		KT699022	KM652334	DQ123104	DQ123515	
<i>P. standleyi</i> Killip	6		KT699029	KT721893	KT730711	KT730711	
<i>P. suberosa</i> L.	12	0.684	AY632718	AY032820	HQ900992	HQ901044	
<i>P. xiikzodz</i> J.M. MacDougal	6		DQ238786	DQ238762	DQ123049	DQ238753	
<i>Deidamioides</i> (Harms) Killip							
<i>P. deidamioides</i> Harms	12	0.815	EU907265		DQ445920	HQ901011	
<i>Passiflora</i> L.							
<i>P. actinia</i> Hook	9	1.057	AY219240	KM652319	DQ123065	HQ901001	DQ096792
<i>P. alata</i> Curtis	9	2.208	AF454800	AY032808	AF454778	AY032765	DQ096733
<i>P. amethystina</i> J.C. Mikan	9		AY102347	KM652311	DQ123069	AY102397	
<i>P. antioquiensis</i> H. Karst.	9				DQ123060	DQ123498	DQ096779
<i>P. caerulea</i> L.	9	1.386	AF454802	AY220135	AF454784	AY032772	
<i>P. capparidifolia</i> Killip	9	2.051			HQ900954	HQ901006	
<i>P. cerasina</i> Annonay & Feuillet	9	1.319	KP769887		HQ900956	HQ901008	
<i>P. cincinnata</i> Mast.	9		DQ344629	KM652321	DQ123071	AY102400	
<i>P. coccinea</i> Aubl.	9	1.337	KP769936	KM652318	HQ900958	KM01443	DQ096777
						2	
<i>P. cumbalensis</i> (H. Karst.) Harms	9		KM01436		KM014433	KM01443	DQ096773
			0			3	
<i>P. edmundoi</i> Sacco	9	0.760	EU258371	KM652340	DQ123072	AY102399	
<i>P. edulis</i> Sims	9	1.258		AY032811	DQ123073	AY032769	DQ096743
<i>P. eichleriana</i> Mast.	9	1.212	EU258317		DQ123074	AY102388	
<i>P. elegans</i> Mast.	9		AY542678	KM652316	DQ123075	AY032766	
<i>P. foetida</i> L.	10	0.481	DQ238783		DQ238796	DQ238747	
<i>P. galbana</i> Mast.	9	1.386	AY032784	AY220137	DQ123078	AY032770	
<i>P. gardneri</i> Mast.	9	1.918		KM652323	HQ900965	DQ445935	
<i>P. gibertii</i> N. E. Br.	9	1.710	KT698998		HQ900966	HQ901018	
<i>P. glandulosa</i> Cav.	9		KP769907				DQ096791
<i>P. ischnoclada</i> Harms	9	0.901	KP769890		DQ123081	DQ123505	
<i>P. jamesonii</i> (Mast.) Bailey	9				KM014436	KM01443	
						6	
<i>P. kermesina</i> Link & Otto	9	1.237	AY032783	AY032815	DQ123083	AY032762	
<i>P. ligularis</i> Juss.	9	1.414	KR350662		HQ900974	HQ901026	DQ096736
<i>P. loefgrenii</i> Vitta	9	1.310	KP769893		HQ900975	HQ901027	
<i>P. maliformis</i> L.	9		AY210937	KM652347	DQ123084	AY210964	DQ096774
<i>P. manicata</i> (Juss.) Pers.	9		KM01437		DQ123062	DQ123500	DQ096778
			4				
<i>P. mediterranea</i> Velloso (published as <i>P. jilekii</i>)	9	0.933	AY102380	AY220138	DQ123082	AY102387	

Wawra)

<i>P. miersii</i> Mast.	9	1.452	EU258322		DQ123085 AY102395	DQ096766
<i>P. mixta</i> L.	9		KM01437 5		KM014448 KM01444 8	
<i>P. mooreana</i> Hook. f.	9		KT699010		KT730696 KT730696	
<i>P. mucronata</i> Lam.	9	1.512	AY210932	KM652314	DQ123086 DQ123506	
<i>P. nitida</i> Kunth	9	1.849	KP769946	KM652345	DQ123087 HQ901034	DQ096739
<i>P. pilosicorona</i> Sacco	9	1.400	KM01437 8		KM014451 KM01445 1	
<i>P. platyloba</i> Killip	9	1.643	KT699017		AF454790 KT730703	DQ096738
<i>P. quadrangularis</i> L.	9	2.680	EF590793	AY032809	AF454791 AY032764	
<i>P. racemosa</i> Brot.	9	1.076	KT699021		DQ123028 DQ123492	DQ096746
<i>P. reflexiflora</i> Cav.	9		AY210928		DQ123111 AY210970	DQ096750
<i>P. seemannii</i> Griseb.	9		KT699023		KT730734 KT730734	DQ096744
<i>P. serratodigitata</i> L.	9	1.387	AY636108	KM652338	DQ123093 AY636109	DQ096742
<i>P. setacea</i> DC.	9		AY102356		DQ123094 AY102398	
<i>P. sidiifolia</i> M. Roem.	9	0.928	EU258435	AY220139	DQ123095 AY102394	
<i>P. subpeltata</i> Ortega	9		KT699030		KT730713 KT730713	
<i>P. subrotunda</i> Mast.	9	1.318		KM652341	HQ900993 HQ901045	
<i>P. tarminiana</i> Coppens & V. E. Barney	9		KT699031		KT730737 KT730737	
<i>P. tenuifila</i> Killip	9		EU258446	AY220140	DQ123097 AY032771	
<i>P. tenuiloba</i> Englem.	12		AY632719		AY632744 AY632744	
<i>P. tricuspidata</i> Mast.	6	0.287	EU258455		DQ123045 JX470935	
<i>P. tripartita</i> (Juss.) Poir.	9		KM01438 6		DQ123107 DQ123518	
<i>P. tulae</i> Urban	6	0.277	AY102352		DQ123064 AY102392	
<i>P. urubicensis</i> Cervi	9	1.582	EU258326		HQ900997 AY102393	
<i>P. vitifolia</i> Kunth	9	1.414	AF454796	KM652313	DQ123053 AY210977	
<i>P. watsoniana</i> Mast.	9	1.305			DQ123100 DQ123511	
<i>Tetrapathea</i> (DC.) P. S. Green						
<i>P. tetrandra</i> Banks ex DC.	12		DQ499118		AY632746 AY632746	DQ096754
Outgroup						
<i>Adenia isaloensis</i> (Perr.) W.J.de Wilde	-				DQ123115	
<i>Adenia keramanthus</i> Harms	-		AY102364		DQ123114 AY102405	
<i>Adenia volkensii</i> Harms	-		KR734074	KR735689		
<i>Turnera subulata</i> Sm.	-		JQ723371		DQ123124 DQ123530	
<i>Turnera ulmifolia</i> L.	-		AY973366		JQ723405 JQ771871	

Table S2. Statistics of the markers employed for analyses. For each marker the number of accessions analyzed, the number of aligned characters (bp), the percentage of variable and conserved characters, and substitution model of evolution are presented.

	ITS	<i>psbA-trnH</i>	<i>trnL</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnL-trnT</i>	All data combined
No. of taxa	93	38	100	98	29	102
Aligned length (bp)	423	574	689	336	603	2,625
Conserved characters	85 (20.0%)	276 (48.0%)	397 (57.6%)	147 (43.7%)	377 (62.5%)	1,309 (49.8%)
Variable characters	321 (75.8%)	199 (34.6%)	233 (33.8%)	146 (43.4%)	134 (22.2%)	1,004 (38.2%)
Substitution model	GTR+I+G	GTR+I+G	GTR+G	GTR+G	GTR+G	

Sequences obtained from previous studies through GenBank (Abbott, J.R. et al.; Abrahamczyk et al., 2014; Barros, M.J.F. et al., Unpublished; Clifford, M.R. et al., Unpublished; Hansen et al., 2006; Inglis, P.W. et al., Unpublished; Kartzinel et al., 2015; Krosnick et al., 2013; Krosnick and Freudenstein, 2005; Lorenz, A.P. et al., Unpublished; Mäder et al., 2010; Muschner et al., 2012, 2006, 2003, Muschner, V.C. et al., Unpublished, Unpublished; Ossowski, 2002; Souza et al., 2004; Thulin et al., 2012; Truyens et al., 2005; Yotoko et al., 2011)

Table S3. Summary of chromosome number evolutionary models and their respective AIC scores.

MODEL	Log-likelihood	AIC
M1- CONST_RATE	-60.87	127.7
M2- CONST_RATE_DEMI	-49.25	104.5
M3- CONST_RATE_DEMI_EST	-262.2	532.5
M4- CONST_RATE_NO_DUPL	-100.9	205.7
M5- LINEAR_RATE	-227.9	465.9
M6- LINEAR_RATE_DEMI	-231.9	473.9
M7- LINEAR_RATE_DEMI_EST	-230.2	472.3
M8- LINEAR_RATE_NO_DUPL	-201.7	411.4

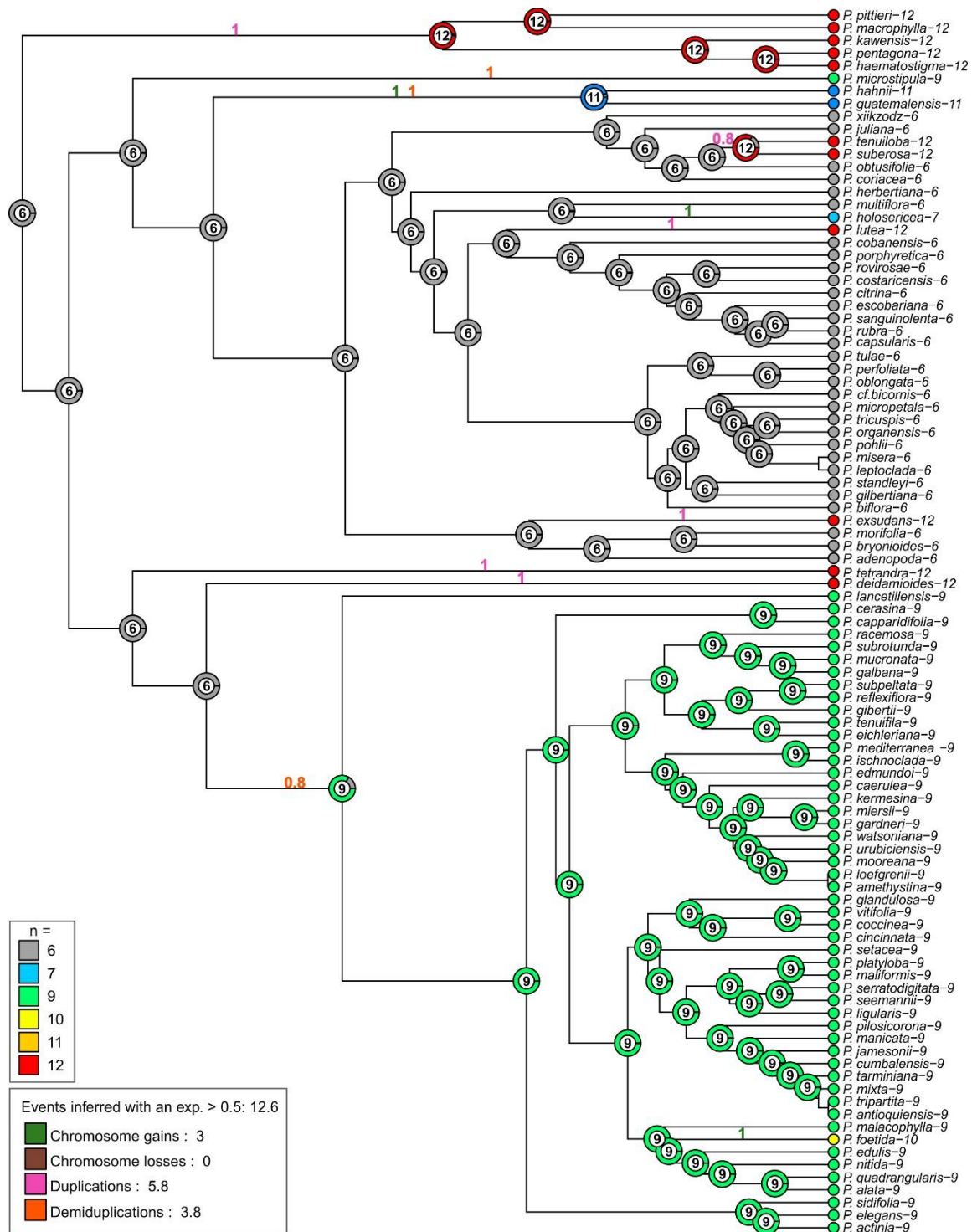


Fig. S1. Reconstruction of chromosome number evolution in *Passiflora* with the Constant_Rate_Demiduplication model. Pie charts at nodes represent the probability of inferred chromosome numbers (as indicated on references box); numbers at nodes are those with the highest probability; numbers along branches represent the inferred number of the four different types of events (gains, losses, duplications, and demiduplication) from maximum likelihood estimation by simulation. The color-coding is explained in the insets.

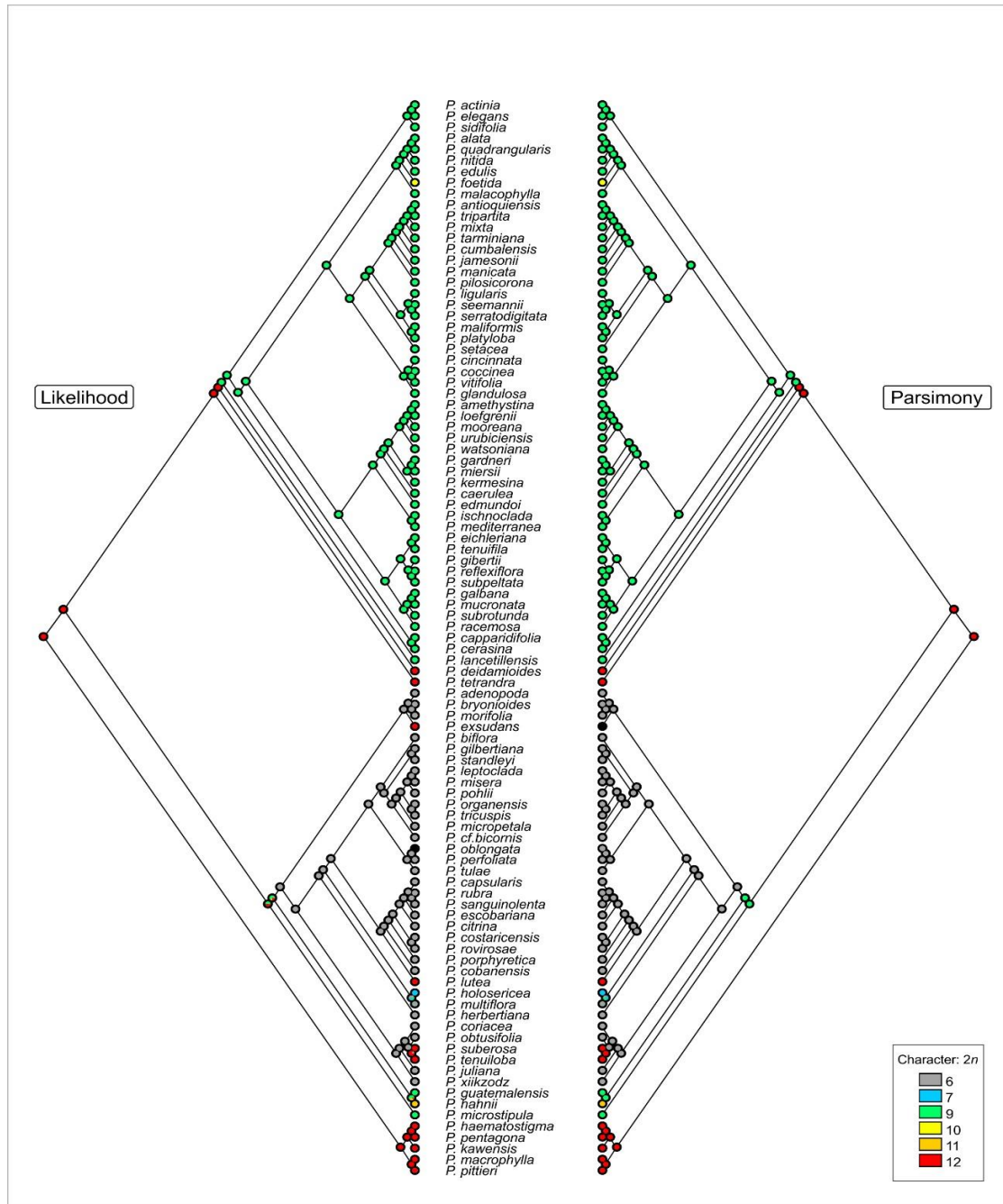


Fig. S2. Ancestral character reconstruction of chromosome number for *Passiflora*. Ancestral state reconstructions were performed using ML or MP optimization as implemented in Mesquite. Pie charts represent the probabilities of inferred chromosome numbers (colour coded).

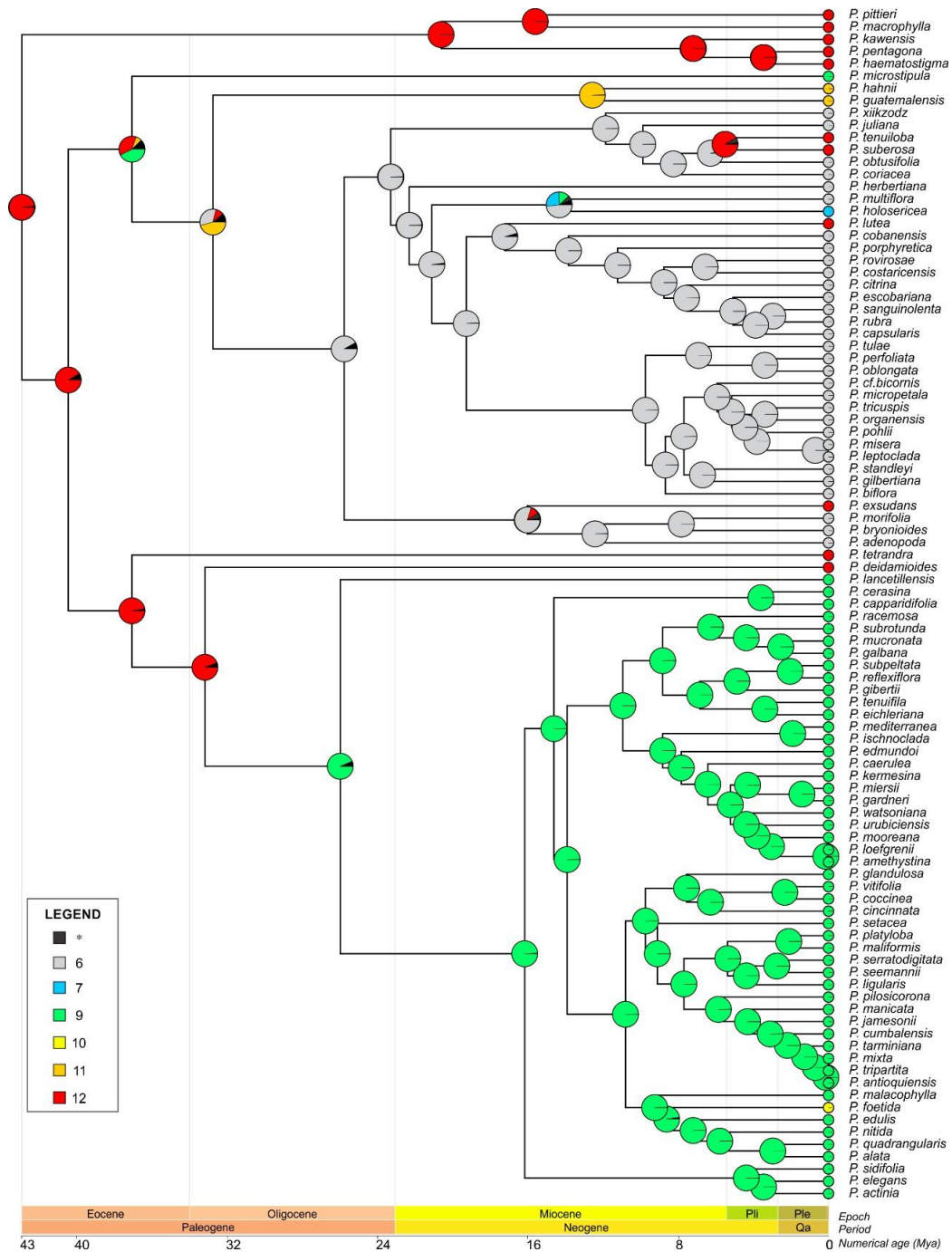


Fig. S3. Ancestral character reconstruction of chromosome number for *Passiflora*. Ancestral state reconstruction was performed using BI optimization as implemented in RASP. Pie charts represent the probabilities of inferred chromosome numbers. (*) Indicates the alternative reconstruction with probability lower than 5%.

ANEXO A - NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA PLANTA

Planta

An International Journal of Plant Biology

ISSN: 0032-0935 (Print) 1432-2048 (Online)

Description

Continuous Article Publishing

As of 2020, *Planta* will change its publication structure from paginated issues to a consecutive publishing model: Continuous Article Publishing.

This means that papers are published in a volume/issue immediately after acceptance. As a further aspect of the new system, articles are no longer paginated sequentially by issue. Therefore, every article starts with page number 1. Page numbers are not used for article citation but every article has a citation ID number, called the *ArticleCitationID*. The ArticleCitationID is replacing the page numbers in the citation line.

Example: *Planta* (2020) 251: 123

This method of citation is accepted by the Web of Science/Journal Citation Reports (ISI).

As a result, all articles will have their full and final citation information available as soon as the production process is complete. This change will not affect the production time from acceptance to online publication of an article, but since the articles will be published online immediately in their final form, the overall publication time for articles will become shorter.



Impact Factor	Available
3.06	1925 - 2020
Volumes	Issues
251	1,136
Articles	Open Access
15,100	243 Articles

Manuscript Submission

Manuscript Submission

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

Permissions

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

Online Submission

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

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

Important notes:

- In case authors are encouraged to resubmit a **revised version of their manuscript**, they are required to mark all changes (e.g. using the track changes functionality of their word processing program or by colored text) and the revised version must be accompanied by a cover letter including an itemized response to the reviewer's comments.