

DESCRITORES MORFOLÓGICOS E MARCADORES  
MICROSSATÉLITES NA CARACTERIZAÇÃO DE GERMOPLASMA  
DE *PASSIFLORA* spp.

**CLAUDIA LOUGON PAIVA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
ABRIL – 2013

DESCRITORES MORFOLÓGICOS E MARCADORES  
MICROSSATÉLITES NA CARACTERIZAÇÃO DE GERMOPLASMA  
DE *PASSIFLORA* spp.

**CLAUDIA LOUGON PAIVA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador: Prof. Alexandre Pio Viana

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ  
ABRIL – 2013

DESCRITORES MORFOLÓGICOS E MARCADORES  
MICROSSATÉLITES NA CARACTERIZAÇÃO DE GERMOPLASMA  
DE *PASSIFLORA* spp.

**CLAUDIA LOUGON PAIVA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Aprovada em 02 de abril de 2013

Comissão Examinadora:

---

Prof. Adésio Ferreira (D.Sc. Genética e Melhoramento de Plantas) - UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Telma Nair Santana Pereira (Ph.D., Plant Breeding) - UENF

---

Prof.<sup>a</sup> Rosana Rodrigues (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF

---

Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF  
(Orientador)

*“A bênção do Senhor é que enriquece, e  
não acrescenta dores.” Pv 10:22*

*“Bem aventurado o homem que acha a sabedoria, e o  
homem que adquire o conhecimento.” Pv 3:13*

## DEDICATÓRIA

A meu Deus, que me guia e me concede sabedoria.

A minha mãe, pela dedicação e carinho.

A meu pai, pelo apoio e incentivo.

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me guiar pelo caminho do bem, pela sabedoria que me tem concedido para enfrentar todas as dificuldades e por ter-me ajudado até aqui;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realizar o curso;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa;

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, pelo auxílio financeiro durante o curso;

Ao Professor Alexandre Pio Viana, que aceitou me orientar, acreditou e confiou em mim e me encorajou nos momentos mais difíceis, dizendo sempre que "se fosse fácil, todos fariam". Sua descontração e animação tornaram o ambiente de trabalho prazeroso e saudável;

À Professora Rosana Rodrigues, pelos seus ensinamentos, carinho, incentivos, alertando-me sempre a fazer algo inovador, sendo um peixão seguido por muitos peixinhos;

À Professora Telma Nair Pereira, pelos conselhos e conhecimentos que pude adquirir;

Ao pesquisador Doutor Eder Jorge de Oliveira, da Embrapa Mandioca e Fruticultura, que, com muita atenção e carinho, respondeu todos os meus emails e me auxiliou na compreensão dos dados moleculares.

À técnica Vitória Régia Melo de Almeida Miranda, pelos seus preciosos ensinamentos e indicações na área molecular, tornando este trabalho menos árduo;

Ao técnico Antônio Carlos que muito ajudou na condução do experimento em casa de vegetação;

A José Daniel Valle de Almeida, secretário da PGMP, que me auxiliou sempre, com muita atenção;

Aos meus amigos-anjos que Deus colocou em minha vida nesta etapa: Eileen, que me adotou como filha, fez-me companhia quando estava só e me ensinou que as dificuldades são desafios durante a caminhada; e Raimundo Nonato que me deu força, ajudou efetivamente nos experimentos, encorajando-me sempre, dizendo que “as adversidades despertam em nós capacidades que em circunstâncias favoráveis, teriam ficado adormecidas”. E nos momentos de desânimo, ambos estavam ao meu lado, incentivando-me;

Aos amigos do laboratório que muito colaboraram com este trabalho: Jôsie, Rulfe, Daniele, Fernando Higino, Nayara, Silvana;

Aos amigos que fiz na UENF: Cintia Machado, Andréa Barros, Gislanne, Claudia Roberta, Bianca, Verônica, Ligia;

Em especial, à minha família, pelo apoio e compreensão ao longo dessa etapa, compreendendo a razão da minha ausência tantas vezes.

Ao meu pai, Luiz Claudio, pelo incentivo em todas as minhas decisões, pelos ensinamentos, enfatizando que a beleza da vida esta na simplicidade, e pelo exemplo de determinação;

À minha mãe, Marisa, pelo carinho, amor e cuidado, sempre ao meu lado; pelas longas conversas ao telefone, sempre presente, apesar da distância, pelas palavras de conforto todas as vezes que o *primer* não amplificava, mesmo não sabendo do que se tratava, dizendo: “vai dar tudo certo”;

Aos meus irmãos, Leda e Saulo, pela companhia, amizade, carinho e acolhida na volta pra casa;

A todos que sonharam junto comigo e acreditaram que esta realização seria possível.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	VIII
ABSTRACT .....	X
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1 GÊNERO <i>PASSIFLORA</i> : ORIGEM, TAXONOMIA E ASPECTOS BOTÂNICOS .....	4
3.2 IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO MARACUJÁ .....	6
3.3 MELHORAMENTO MARACUJAZEIRO .....	7
3.4 UTILIZAÇÃO DE ESPÉCIES SILVESTRE DE MARACUJÁ .....	9
3.5 DIVERSIDADE GENÉTICA EM <i>PASSIFLORA</i> SPP .....	12
3.5.1 Método Ward-MLM .....	13
3.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>PASSIFLORA</i> .....	14
3.7 UTILIZAÇÃO DE MICROSSATÉLITE EM <i>PASSIFLORAS</i> .....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
4.1 GERMOPLASMA .....	19
4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA .....	20
4.2.1 Análise Estatística .....	22
4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR .....	23
4.3.1 Extração de DNA genômico .....	23

4.3.2 Otimização da reação de PCR .....	24
4.3.3 Análise estatística .....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	28
5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA .....	28
5.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR .....	36
5.2.1 Genotipagem .....	36
5.2.2 Transferibilidade .....	37
5.2.3 Diversidade Genética .....	41
6. CONCLUSÕES .....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50

## RESUMO

PAIVA, Claudia Lougon; MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Abril, 2013; Descritores morfológicos e marcadores microssatélites na caracterização de germoplasma de *Passiflora* spp. Orientador: Alexandre Pio Viana; Conselheiros: Telma Nair Santana Pereira e Rosana Rodrigues.

O maracujazeiro possui grande relevância para o Brasil por apresentar importância social e econômica. Esta fruteira é cultivada em quase todo o território brasileiro, pelo fato de o país possuir condições edafoclimáticas favoráveis para o cultivo dessa fruta. Com isso, o Brasil se destaca na produção mundial de maracujá, tendo produção anual de aproximadamente 923.000 Mg. Para ampliar a base genética dessa cultura, é de fundamental importância que se realizem estudos que possibilitem quantificar a diversidade genética do gênero *Passiflora*. Dessa forma, o presente trabalho teve por finalidade caracterizar acessos de *Passiflora* utilizando marcadores morfológicos, quantitativos e qualitativos, e marcadores microssatélites. Ao realizar a caracterização de onze espécies do gênero *Passiflora* com base em descritores morfológicos, cinco grupos foram formados. Esses possibilitaram uma clara separação das espécies, sendo possível distinguir os subgêneros estudados. O grupo I alocou as espécies *P. suberosa*, *P. micropetala* e *P. pentagona*, pertencentes aos subgêneros *Decaloba* e *Astrophea*. O grupo II reuniu *P. setacea* e *P. mucronata*. Os grupos III e IV foram constituídos de apenas uma espécie, *P. cincinnata* e *P. gibertii*, respectivamente. Por sua vez, o grupo V agrupou as espécies *P. caerulea*, *P.*

*alata*, *P. edulis* e *P. coccinea*. Nesta análise, os descritores morfológicos relacionados à parte floral foram os que mais contribuíram para a quantificação da variabilidade total. Os descritores morfológicos demonstraram uma ampla diversidade genética e alta similaridade com a classificação botânica atualmente aceita para o gênero *Passiflora*, sendo possível também estimar a distância genética entre as espécies estudadas. A análise da diversidade também foi verificada por marcadores microssatélites. Para esta análise, foi verificada a amplificação cruzada dos microssatélites, sendo testados 28 iniciadores e apenas 12 foram transferidos para a maioria das espécies. Nesta análise, foi encontrado um baixo número de alelos, variando de dois a cinco alelos por loco. A média da heterozigosidade esperada foi de 0,57 e a heterozigosidade observada obteve média de 0,52, o que já era esperado para populações alógamas. Os marcadores microssatélites também encontraram ampla variabilidade genética entre os acessos de *Passiflora*. Este conhecimento possibilita ao melhorista explorar a diversidade, transferindo alelos favoráveis encontrados em espécies silvestres.

## ABSTRACT

PAIVA, Claudia Lougon; MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, in April, 2013; Morphological descriptors and microsatellite markers in germoplasm characterization of *Passiflora* spp. Advisor: Alexandre Pio Viana; Committee Members: Telma Nair Santana Pereira and Rosana Rodrigues.

The passion fruit has great relevance to Brazil for presenting social and economic importance. This crop is cultivated in almost all Brazilian territory, by the fact that country has edaphoclimatic conditions favorable for the cultivation of this fruit. With that Brazil stands out in world production of passion fruit, with annual production of approximately 923,000 Mg. To expand the genetic base of this crop is of critical importance to conduct studies that allow to quantify the genetic diversity of the genus *Passiflora*. Thus the present study aimed to characterize accessions of *Passiflora* using quantitative and qualitative morphological markers and microsatellite markers. By performing the characterization of eleven species of the genus *Passiflora* based on morphological descriptors five groups were formed. They allowed a clear separation of the species and can distinguish subgenres studied. The group I allocated the species *P. suberosa*, *P. micropetala* and *P. pentagona* belonging to the subgenus *Decaloba* and *Astrophea*. Group II brought together *P. setacea* and *P. mucronata*. The group III and IV consisted of only one species, *P. cincinnata* and *P. gibertii*, respectively. In turn, the group V grouped the species *P. caerulea*, *P. alata*, *P. edulis* and *P. coccinea*. In this analysis the morphological descriptors related to the floral part were the main contributors to

the quantification of the total variability. The morphological descriptors showed a wide genetic diversity and high similarity with the currently accepted botanical classification for the genus *Passiflora*, being also possible to estimate the genetic distance between the studied species. A diversity analysis was also verified by microsatellite markers. For this analysis, was verified cross-amplification of the microsatellite, were tested 28 primers and only 12 were transferred for most species. In this analysis were found a low number of alleles ranging from two to five alleles per locus. The mean of the expected heterozygosity was 0.57 and the observed heterozygosity obtained mean of 0.52, which was expected to allogamous populations. Microsatellite markers also found large genetic variability among accessions of *Passiflora*. This knowledge enables the breeder to explore the diversity transferring favorable alleles found in wild species.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* reúne as espécies conhecidas como maracujás. Este gênero, pertencente à família Passifloraceae, é o mais importante da família por possuir espécies que têm valor econômico e por conter o maior número de espécies (Milward-de-Azevedo e Baumgratz, 2004). Cerca de 530 espécies pertencem a este gênero; destas, aproximadamente 150 são originárias do Brasil, o que o torna um dos maiores centros de diversidade genética do gênero (Cervi, 2006). Isto coloca o país em uma posição privilegiada quanto aos recursos genéticos deste gênero que podem ser usados no melhoramento genético.

Embora o Brasil possua cerca de um terço das espécies deste gênero, apenas duas delas são exploradas comercialmente: *Passiflora edulis* (maracujá-azedo) e *P. alata* (maracujá-doce) (Bernacci et al., 2003), sendo cerca de 90% da produção constituída pelo maracujá-azedo (Meletti et al., 2005). Outras espécies também possuem importância econômica, porém são comercializadas apenas em regiões restritas. A América do Sul concentra os principais países produtores de maracujá, sendo o Brasil o maior produtor mundial dessa cultura (Meletti et al., 2011).

A cultura do maracujazeiro é utilizada na alimentação, como planta medicinal, uma vez que muitas espécies produzem compostos fitoterápicos, e ornamentais devido à exuberância que as flores desse gênero possuem. No entanto, apesar de sua importância, a quantificação e a exploração da variabilidade dessa cultura ainda são incipientes.

Estudar a diversidade genética é uma atividade de grande relevância para o melhoramento de plantas e para a conservação de muitas espécies. Por meio desse conhecimento, é possível identificar genótipos contrastantes, com características de interesse, como fontes de resistência a doenças e alta produtividade, a fim de realizar cruzamentos promissores, para serem utilizados em programas de melhoramento (Cruz e Carneiro, 2006).

A diversidade genética pode ser verificada pelo uso de diversos tipos de descritores, entre os quais, destacam-se os morfoagronômicos, citológicos, bioquímicos, fisiológicos e moleculares (Cruz e Carneiro, 2006). Os descritores morfológicos são baseados em caracteres de fácil detecção e mensuração, com pouca influência ambiental e alta herdabilidade. A caracterização morfológica da cultura do maracujazeiro tem por base a lista de descritores morfológicos e agronômicos, proposta pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para proteção de cultivares. (Mapa, 2008). Estudos de diversidade utilizando marcadores morfológicos têm sido realizados a fim de quantificar a variabilidade genética entre os acessos de espécies do gênero *Passiflora* (Crochemore et al., 2003; Tangarife et al., 2009).

Os marcadores moleculares muito têm contribuído para a caracterização de germoplasma, já que são capazes de localizar diferenças significativas em nível de DNA. Com os marcadores moleculares, a caracterização pode ser realizada em uma maior velocidade, qualidade e em larga escala (Varshney et al., 2005). Esses podem estimar a alteração na frequência alélica, a perda ou fixação de alelos e a variabilidade genética da população.

Dentre os tipos de marcadores moleculares, os microssatélites são os que mais se destacam no estudo da diversidade genética. Isto se deve ao fato de serem codominantes, multialélicos, polimórficos e reproduzíveis, sendo possível gerar um alto conteúdo informativo (Schlötterer, 2004). Essas propriedades tornam os microssatélites ideais para verificar as diferenças alélicas entre os genótipos e estimar a variabilidade genética. No entanto, estudos de diversidade genética utilizando marcadores microssatélites ainda são incipientes.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Caracterizar acessos de espécies do gênero *Passiflora* por meio de descritores morfológicos e por marcadores microssatélites, quantificar a variabilidade genética e conhecer as relações entre as espécies.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar a diversidade genética entre as espécies via descritores morfológicos quantitativos e qualitativos, com o uso da técnica de Ward-MLM;
- Analisar a amplificação cruzada de iniciadores heterólogos para as espécies do gênero *Passiflora*;
- Avaliar a variabilidade genética por meio de marcadores microssatélites;
- Estimar a distância genética, no âmbito molecular, entre as espécies estudadas.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Gênero *Passiflora*: Origem, taxonomia e aspectos botânicos

O gênero *Passiflora* pertence à família Passifloraceae que é constituída por 18 gêneros e cerca de 630 espécies (Milward-de-Azevedo e Baumgratz, 2004). Este é o que possui maior relevância na família, por alocar o maior número de espécies, cerca de 530 espécies, e por muitas dessas possuírem importância econômica.

De acordo com Muschner et al. (2012), a família Passifloraceae seguiu o cenário biogeográfico proposto para vários grupos de plantas, que tiveram origem na África, atravessando a Europa e Ásia, e chegaram ao Novo Mundo por meio de pontes de terra. Os resultados obtidos, nestes estudos, indicaram que as espécies do gênero *Passiflora*, ao chegarem à América Central, sofreram uma rápida diversificação. Dessas, cerca de 150 espécies se diversificaram no território brasileiro, sendo 87 endêmicas do Brasil, o que o torna centro de diversidade genética do gênero (Cervi et al., 2010).

O gênero *Passiflora* é constituído de plantas trepadeiras herbáceas ou arbustivas, raramente eretas. Em geral, possuem caule cilíndrico ou quadrangular, ramificado, anguloso, suberificado, glabro ou piloso (Vanderplank, 2000). As espécies do gênero *Passiflora* possuem uma enorme variação fenotípica, em especial nas folhas, sendo esta uma estratégia de escape contra o ataque de borboletas (Deginani, 2001; Pádua, 2004; Feuillet e Macdougall, 2007). Essas podem ser alternadas, simples ou compostas, inteiras ou lobadas e de

forma variável, de margem inteira ou serrilhada. É possível observar glândulas nectaríferas, no pecíolo, na margem da bráctea ou na parte dorsal da folha (Feuillet e Macdougall, 2007; Nunes e Queiroz, 2007; Cervi et al., 2010). A presença de brácteas é uma característica marcante na maioria das espécies, com exceção de algumas do subgênero *Decaloba*. A posição, tamanho e forma das brácteas são características importantes para a separação taxonômica de gêneros (Vanderplank, 2000).

As flores do gênero *Passiflora* são hermafroditas e possuem vários mecanismos que impedem a autofecundação, dentre estes, o sistema de autoincompatibilidade do tipo esporofítico (Suassuna et al. 2003). Existe uma grande variação tanto na forma como na coloração das flores do gênero *Passiflora*, que pode variar do vermelho intenso ao branco. Ainda em relação às flores, essas se caracterizam por possuírem cinco sépalas, na maioria das vezes verdes nas bordas e coloração intensa na porção central, e cinco pétalas membranáceas que surgem sobre a margem do tubo do cálice (Vanderplank, 2000; Ulmer e Macdougall, 2004). As pétalas se alternam com as sépalas sendo aquelas, geralmente, menores e mais finas do que as sépalas (Vanderplank, 2000; Cervi, 2006).

A presença de uma corona de filamentos é outra característica marcante nesta da família Passifloraceae. A corona possui cor e forma variáveis, e se encontra entre o androginóforo e o perianto. Esta é constituída de uma fina membrana que forma algumas séries de simples filamentos, habitualmente bandeados horizontalmente com diversas cores (Ulmer e Macdougall, 2004). Da parte central da flor, emerge o androginóforo, que tem por função elevar o gineceu e o androceu em relação ao anel nectarífero, e possui cinco estames e três estigmas (Deginani, 2001).

Os frutos do maracujazeiro têm forma ovoide ou globosa, raramente fusiforme, com polpa mucilaginosa, com coloração amarela, vermelha ou roxa. A casca é coriácea, quebradiça e lisa, protegendo o mesocarpo, no interior do qual estão as sementes (Bernacci et al., 2008). As sementes são ortodoxas ou ortodoxas intermediárias, comprimidas, reticuladas, pontuadas ou transversalmente alveoladas, envolvidas por um arilo mucilaginoso (Nunes e Queiroz, 2001).

A organização sistemática desta família se iniciou com o trabalho de Killip (1938) intitulado *The American Species of Passifloraceae*, em que propôs a subdivisão do gênero *Passiflora* em 22 subgêneros. MacDougal e Feuillet (2004), contestando esta classificação, propuseram uma reorganização taxonômica deste gênero, e agruparam as espécies em apenas quatro subgêneros: *Astrophea*, *Decaloba*, *Deidamioides* e *Passiflora*. Ambas as classificações foram baseadas exclusivamente em caracteres morfológicos, especialmente na avaliação da estrutura floral.

A classificação proposta por Killip (1938) é contestada também por análises filogenéticas baseadas em sequências gênicas. Muschner et al. (2003) realizaram o primeiro estudo taxonômico do gênero, em que genes nucleares, cloroplastidiais e mitocondriais foram utilizados no estudo. Neste trabalho, foram representados 11 subgêneros, de acordo com a classificação de Killip (1938), sendo estes agrupados em três clados bem definidos - *Astrophea*, *Decaloba* e *Passiflora*. Todavia, este trabalho não pôde elucidar a monofilia do gênero *Passiflora*, ficando a posição do subgênero *Deidamioides* indefinida.

Hansen et al. (2006) realizaram um trabalho utilizando 136 espécies do gênero *Passiflora*, sendo representados 17 dos 22 subgêneros (Killip, 1938) com a utilização de dois marcadores plastidiais. Este estudo também concordou com a nova organização taxonômica proposta por MacDougal e Feuillet (2004), no qual obtiveram quatro grandes clados correspondentes aos subgêneros *Astrophea*, *Decaloba*, *Deidamioides* e *Passiflora*. No entanto, a relação entre esses grupos não foi esclarecida, oscilando de acordo com o marcador utilizado.

Muschner et al. (2012), com o objetivo de avaliar a distribuição biogeográfica do gênero *Passiflora*, para melhor entendimento da sua história evolucionária, conseguiram confirmar a monofilia do gênero, analisaram 106 espécies silvestres, utilizando marcadores plastidiais e nucleares.

### **3.2 Importância da cultura do maracujá**

A cultura do maracujá possui grande importância no setor agrícola, devido à alta produtividade, aceitação no mercado mundial e à diversificada utilização. Este pode ser utilizado na indústria de cosméticos, para fins medicinais, ornamentais e alimentares (Meletti, 2011). As folhas, flores, raízes e

frutos são utilizados para fins medicinais a fim de combater várias doenças (Costa e Tupinanbá, 2005). O uso das passifloras para a ornamentação se deve ao fato de suas flores possuírem formas e cores peculiares que chamam atenção, sendo inseridas no cenário do agronegócio de plantas ornamentais (Abreu et al., 2009). No entanto, o cultivo do maracujá se destina principalmente para a alimentação, sendo utilizado como fruta fresca ou industrializado, como sucos, sorvete, doces, licores e geleias (Meletti, 2011).

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, com produção anual de aproximadamente 920.000 Mg e uma área colhida de cerca de 62.000 ha, possibilitando a geração de mais de 200 mil empregos diretos e indiretos. O Nordeste e o Sudeste são as regiões que apresentam a maior produção de maracujá, com 699.242 Mg e 127.413 Mg, respectivamente, destacando-se os Estados da Bahia, Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais (IBGE, 2011). O destaque do Brasil, no cenário mundial, para a cultura do maracujá, deve-se ao fato de o país possuir condições edafoclimáticas ideais para o cultivo do maracujazeiro, visto que este se desenvolve melhor em regiões tropicais e subtropicais. A alta umidade relativa do ar e a alta luminosidade, isto é, um fotoperíodo superior a 11 horas de luz são algumas das exigências para o plantio desta cultura (Costa, 2008), as quais são encontradas facilmente em países de clima tropical.

O maracujá-azedo (*Passiflora edulis*) e o maracujá-doce (*P. alata*) constituem as espécies de maior importância econômica no Brasil, com cerca de 90% da área plantada ocupada pelo primeiro (Meletti et al., 2005). Além dessas espécies, é possível citar outras espécies do gênero *Passiflora* que possuem importância econômica, como 'maracujá-melão' (*Passiflora quadrangularis* L.), 'maracujá-suspiro' (*Passiflora nítida* HBK), 'maracujá-azul' (*Passiflora caerulea*), 'maracujá-peroba' (*Passiflora laurifolia*), 'maracujá-do-mato' (*Passiflora cincinnata* Mast) e 'maracujá-do-sono' (*P. setácea* DC). Porém estas espécies são comercializadas apenas em algumas regiões (Meletti et al., 2005).

### **3.3 Melhoria do Maracujazeiro**

O melhoramento do maracujazeiro pode seguir várias vertentes em função da região e da parte da planta a ser considerada, como flor, folha e fruto.

As flores de *Passiflora* despertam interesse pela sua beleza exótica com formatos e cores impares (Abreu et al., 2009). Cruzamentos interespecíficos têm sido realizados a fim de obter flores com formato e cores peculiares, sendo destinada para a utilização na linha do agronegócio de plantas ornamentais (Santos et al., 2011a). Já as folhas, raízes e frutos possuem importância no uso medicinal, sendo utilizadas no tratamento de diferentes enfermidades, por exemplo, verminoses, tumores gástricos e estresse, fazendo parte do conhecimento tradicional associado à cultura de diferentes povos (Costa e Tupinambá, 2005; Gosmann et al., 2011). Neste sentido, outro enfoque, ainda incipiente, do melhoramento genético do maracujazeiro se aplica à seleção de plantas produtoras de folhas maiores, que possuam maior concentração de passiflorina para uso na indústria farmacêutica (Meletti et al., 2005).

No entanto, no Brasil, o melhoramento desta cultura está diretamente associado ao fruto, visando ao aumento da produtividade, qualidade do fruto e resistência a doenças (Viana et al., 2005; Meletti, 2011). Para um aumento da produtividade, características como peso e número de frutos são as mais importantes a serem melhoradas (Viana et al., 2004). Dessa forma, o melhoramento genético que visa à qualidade do fruto deve direcionar seus objetivos ao mercado ao qual o fruto se destina, seja o mercado *in natura* ou para a indústria de sucos (Bruckner et al., 2002). Para o mercado *in natura*, devem-se priorizar frutos grandes e ovais, a fim de se obter boa aceitação comercial. Por outro lado, a indústria de sucos visa ao maior rendimento da polpa, mais acidez, coloração constante e ao alto teor de sólidos solúveis (Gomes et al., 2006).

No maracujazeiro, é possível utilizar vários métodos de melhoramento, como introdução de plantas, seleção massal e seleção com teste de progênies (Bruckner, 2005). Outro método de melhoramento que pode ser utilizado no melhoramento do maracujazeiro é a seleção recorrente, que visa ao aumento de alelos favoráveis na população para a característica de interesse, com a manutenção da variabilidade e, conseqüentemente, ao aumento dos ganhos genéticos. Mesmo diante das vantagens da seleção recorrente como método de melhoramento intrapopulacional associado às ferramentas biométricas, seu uso tem sido limitado na cultura do maracujazeiro (Reis et al., 2011).

O programa de melhoramento do maracujazeiro da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) tem utilizado a seleção recorrente

intrapopulacional a fim concentrar características favoráveis. Este programa teve início com a coleta inicial de vários genótipos em três regiões produtoras do Rio de Janeiro e a caracterização por meio de descritores agrônômicos (Viana et al., 2004). Com base nesse estudo, verificaram-se, nesses genótipos, grande variabilidade e alta herdabilidade para as características como o número de frutos e o comprimento de fruto.

Gonçalves et al. (2007) verificaram que características importantes agronomicamente possuíam predominância de ação gênica aditiva, sendo sugerida a seleção recorrente para a população de maracujazeiro-azedo. Silva et al. (2009) conduziram o primeiro ciclo de seleção recorrente, com avaliação de 140 progênies de maracujá-azedo e seleção de 30 melhores progênies. O segundo ciclo de seleção recorrente foi iniciado por Silva e Viana (2012), no qual os indivíduos selecionados foram obtidos de cruzamentos dirigidos, envolvendo as 30 progênies selecionadas anteriormente. A nova população foi constituída por 108 progênies de irmãos completos, que estão sendo avaliadas em dois ambientes, Campos dos Goytacazes-RJ e Itaocara-RJ. No trabalho de Silva e Viana (2012), foram avaliadas 11 características agrônômicas, sendo possível encontrar, nas principais características de interesse, médias superiores às das testemunhas e um alto coeficiente de herdabilidade para peso médio do fruto, o que mostra que o método utilizado foi eficiente para a cultura. Reis et al. (2011) verificaram uma pequena perda de variabilidade genética nesses dois ciclos de seleção recorrente, sendo verificada via marcadores microssatélites. No entanto, esta oscilação pode ser considerada normal ao realizar a seleção, sendo possível dar continuidade ao programa.

### **3.4 Utilização de espécies silvestres de maracujá**

O Brasil, considerado centro de diversidade das passifloras, possui ampla variabilidade genética, sendo esta fundamental para o sucesso de qualquer programa de melhoramento genético de uma espécie (Ganga et al., 2004). Essa diversidade de espécies silvestres de maracujá no Brasil oferece um potencial a ser explorado, sendo um campo de pesquisa promissor em várias vertentes do melhoramento de plantas.

As espécies silvestres de *Passiflora* possuem características de interesse para a cultura do maracujá como longevidade, adaptação às condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, maior concentração de componentes químicos de interesse para indústria farmacêutica e cosmética e resistência a doenças. Esta última se constitui em um dos principais objetivos dos programas de melhoramento do maracujazeiro (Junqueira et al., 2006).

As doenças que atingem o maracujazeiro afetam diretamente a produtividade e a qualidade do fruto. A bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*) e a virose do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* – CABMV) são algumas das causas de perdas totais dessa cultura. Espécies como *P. cincinnata*, *P. caerulea*, *P. incarnata*, *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. nitida*, *P. quadrangularis* e *P. setacea* têm sido indicadas como potenciais fontes de resistência para o combate de muitas doenças que atingem o maracujazeiro (Junqueira et al., 2005).

Em relação à bacteriose, diversas espécies silvestres de *Passiflora* foram consideradas resistentes ou tolerantes, como *P. actinia*, *P. odontophylla*, *P. serrato-digitata*, *P. gibertii*, *P. caerulea*, *P. morifolia*, *P. mucronata*, *P. tenuifila* e alguns acessos de *P. edulis* e *P. nitida*, que apresentaram resistência aos isolados do Distrito Federal (Junqueira et al., 2005).

O vírus CABMV, um dos principais problemas na cultura do maracujá, foi estudado por Maciel et al. (2009), que realizaram um *screening* com 16 espécies de passifloras nativas. Este trabalho objetivou verificar a reação dessas espécies quanto à virose do endurecimento dos frutos, sendo possível verificar a resistência de *P. suberosa* aos quatro isolados brasileiros do CABMV avaliados, e *P. setacea* se mostrou resistente ao isolado encontrado no Estado do Rio de Janeiro e de São Paulo. Assim, hibridações interespecíficas dessas espécies com o maracujazeiro-azedo (*P. edulis*) podem vir a contornar o problema de resistência ao isolado, com a transferência de alelos resistentes.

O uso das espécies silvestres resistentes como o porta-enxerto é outra forma de controlar os problemas relacionados aos patógenos do solo. Estudos verificaram a resistência de *P. caerulea*, *P. nitida*, *P. laurifolia* e de alguns acessos de *P. suberosa*, *P. alata*, *P. coccinea*, *P. gibertii*, *P. actinia* quanto à morte precoce e à fusariose (*Fusarium solani*) (Junqueira et al., 2005; Chaves et al., 2004). A enxertia de *P. nitida* em clones de maracujazeiro-amarelo obteve maior

resistência à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), fusariose (*Fusarium solani*) e à virose do endurecimento dos frutos, o que mostra o potencial dessa espécie como porta-enxerto (Junqueira et al., 2006; Junqueira et al., 2007).

A identificação de genótipos que possuam genes de resistência a algum tipo de doença ou patógeno pode ser feita com a utilização de marcadores moleculares análogos a genes de resistência (RGAs - *Disease Resistance Gene Analogs*). Esses marcadores são constituídos de sequências conservadas, presentes na maioria dos genes de resistência (Leister et al., 1996). Paula et al. (2010) avaliaram espécies de *Passiflora* (*P. setacea*, *P. nitida*, *P. serratodigitata*, *P. caerulea*, *P. gibertii*, *P. odontophyla*, *P. edulis*, *P. coccínea* e *P. setacea x P. coccínea*), utilizando RGAs, a fim de verificar a similaridade entre as espécies estudadas e a existência de possíveis genes de resistência. Foi encontrado um grande repertório de marcadores do tipo RGA em *Passiflora*, sendo possível utilizá-los, para caracterização molecular de germoplasma, em programas de melhoramento genético visando à resistência a doenças nesta cultura.

Atender às exigências do mercado consumidor é outra vertente do melhoramento genético. Dessa forma, avaliar caracteres importantes em espécies silvestres, em especial os aspectos físico-químicos, é fundamental no que se refere à qualidade do fruto. Estudos nesse sentido estão sendo realizados com genótipos de *P. cincinnata* (Souza, 2012), *P. alata* (Martins, 2003; Alves, 2012) e *P. setacea* (Cerqueira-Silva et al., 2009).

Dessa forma, para que a variabilidade genética presente no gênero *Passiflora* seja utilizada da melhor maneira, é necessário que haja uma efetiva caracterização e avaliação, tanto morfológica quanto molecular. Ações que contribuam para a conservação e caracterização de alelos importantes, presentes nestas espécies, são de grande importância para o melhoramento genético. Nesse sentido, diversos trabalhos estão sendo registrados no que se refere à caracterização morfológica, reprodutiva, citogenética, fisiológica e molecular de espécies silvestres, contribuindo, assim, para sua conservação, (Meletti et al., 2003; Bellon et al., 2007; Junqueira et al., 2007; Tangarife et al., 2009; Bellon et al., 2009; Castro et al., 2012; Ortiz et al., 2012; Cerqueira-Silva et al., 2012a).

### 3.5 Diversidade genética em *Passiflora* spp.

A diversidade genética expressa a diferença entre as frequências alélicas das populações (Falconer, 1987) que pode ser estimada por intermédio de diversos marcadores, como os descritores morfoagronômicos, fisiológicos, bioquímicos e moleculares (Amaral Junior et al., 2010). O estudo da diversidade consiste em uma atividade importante tanto para o melhoramento de plantas quanto para a conservação de muitas espécies. Este permite descrever e diferenciar acessos, o que permite identificar genótipos contrastantes a fim de realizar cruzamentos promissores e encontrar fontes de resistências a doenças (Cruz e Carneiro, 2006).

A quantificação da variabilidade genética pode ser estimada por meio de análises multivariadas que se baseiam nas diferenças entre os acessos. Estas permitem analisar múltiplas informações de um conjunto de caracteres, extraídas das unidades experimentais (Fonseca et al., 2004). As análises multivariadas têm sido utilizadas para estimar a divergência genética, verificar os genótipos mais contrastantes e até mesmo identificar duplicatas em bancos de germoplasma (Cruz e Carneiro, 2006).

Para realizar essas análises, são utilizadas diversas distâncias genéticas, como a Distância Euclidiana, Distância de Mahalanobis, Coeficiente de Similaridade Nei e Li e a Distância de Gower (Cruz e Regazzi, 2004). A última é usada quando se estudam, em conjunto, características binárias, qualitativas e quantitativas. Pelos métodos de agrupamento, é possível classificar os genótipos em vários grupos, de acordo com o critério de similaridade ou de dissimilaridade, de forma que haja homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre os grupos. (Cruz e Carneiro, 2003). Os métodos de agrupamento podem ser subdivididos em hierárquicos (vizinho mais próximo, vizinho mais distante, Ward, UPGMA - *Unweighted Paired Group Method Using Averages*) e de otimização como o Método Tocher, por exemplo (Cruz e Regazzi, 2004).

As análises multivariadas têm sido empregadas em diversos estudos de diversidade em espécies do gênero *Passiflora*. Santos et al. (2011b) realizaram cruzamentos interespecíficos a fim de obter híbridos com potencial ornamental. Este trabalho utilizou a distância euclidiana e as análises de componentes principais, baseadas em caracteres morfológicos, para verificar a variabilidade e a

distância genética entre os genitores e os híbridos. Ao quantificar a variabilidade genética entre onze espécies do gênero *Passiflora*, por meio de caracteres morfoagronômicos, Crochemore et al. (2003a) também utilizaram a distância euclidiana e os componentes principais, sendo os acessos agrupados pelo método de UPGMA. Neste estudo, foi encontrada grande variabilidade genética entre as espécies, no entanto, foi pequena a divergência encontrada entre os acessos de *P. edulis*.

Araújo et al. (2008) utilizaram descritores morfológicos para delinear a variabilidade da coleção de germoplasma de *P. cincinnata* mantida pela Embrapa Semiárido. Para a análise dos dados, foi empregada a técnica de agrupamento de Tocher, tendo como medida de dissimilaridade as distâncias generalizadas de Mahalanobis. Foi encontrada uma grande variabilidade entre os acessos. Castro et al. (2012), para caracterizar genótipos de *P. edulis*, selecionaram descritores morfológicos mínimos para diferenciar variedades de maracujá. Este resultado foi obtido por meio da análise de componentes principais, com a qual foram indicados 22 dos 28 descritores analisados para a caracterização de *P. edulis*, com alta contribuição na variação total.

Assim, vários métodos multivariados podem ser aplicados, dependendo do objetivo do estudo e da experiência do pesquisador que poderá optar pela técnica mais adequada aos dados.

### **3.5.1 Método Ward-MLM**

Utilizar métodos estatísticos que sejam capazes de analisar caracteres quantitativos e qualitativos em conjunto, a fim de caracterizar o germoplasma, é de grande relevância, visto que, dessa forma, é possível utilizar toda a informação disponível dos acessos. O método Ward-MLM (*Modified Location Model*) é uma das técnicas que possibilita essa análise (Franco et al., 1998; Franco et al., 2001).

Tal técnica é realizada em duas etapas, em que, primeiramente, os grupos são definidos pelo método de agrupamento Ward (Ward Júnior, 1963), por meio da matriz de dissimilaridade de Gower (Gower, 1971) e, logo em seguida, a média do vetor da variável quantitativa para cada subpopulação, independente dos valores das variáveis multicategóricas, é estimada pelo procedimento MLM. A estratégia ainda permite a definição do número ótimo de grupos, com o cálculo da

melhor subdivisão com alta precisão. Assim, essa abordagem identifica, de forma fidedigna, a melhor probabilidade de cada acesso se alocar em grupos específicos (Gonçalves et al., 2009).

Mesmo com todas essas vantagens, poucos são os trabalhos que utilizam essa técnica. Padilla et al. (2007), para melhor caracterizar uma coleção de cultivares de couve, realizaram uma comparação de quatro métodos de agrupamento, sendo o Ward-MLM mais eficaz, por criar grupos distintos e identificar genótipos redundantes. Pereira et al. (2012) avaliaram a divergência entre diploides de bananeira, com base em dados morfológicos, agronômicos e moleculares, utilizando o método de Ward MLM. Cabral et al. (2010) analisaram a variabilidade genética entre acessos de feijoeiro, também usando a estratégia Ward-MLM. Sudré et al. (2010) quantificaram a variabilidade genética em *Capsicum* spp., por meio de dados morfológicos e agronômicos, sendo empregado o método Ward-MLM. No entanto, não há relatos de estudos que avaliem a diversidade genética no gênero *Passiflora* deste procedimento estatístico.

### **3.6 Caracterização molecular de *Passiflora***

A caracterização de germoplasma consiste na observação, mensuração e documentação de características herdáveis que se expressem em todos ambientes (Vicente et al., 2005). Esta caracterização, quando bem conduzida, é capaz de diferenciar acessos, identificar duplicatas, separar classes ou categorias, verificar a variabilidade existente e indicar genótipos mais divergentes (Valls, 2007). Descritores morfológicos (Castro et al., 2012), dados agronômicos e citológicos (Meletti et al., 2003) têm sido utilizados para caracterizar coleções de germoplasma de espécies do gênero *Passiflora*. O número de polimorfismos limitado, a influência ambiental em alguma característica e o tempo gasto, em especial em espécies perenes como o maracujá, são algumas das limitações dos marcadores morfoagronômicos e citológicos (Faleiro, 2007).

Os marcadores moleculares possuem número de polimorfismo ilimitado, não sofrem influência ambiental e podem ser utilizados em qualquer estágio da planta. A aplicação desses marcadores tem complementado a caracterização dos bancos de germoplasma, proporcionando acessar informações quanto ao DNA

(Faleiro, 2007). Os marcadores moleculares, em especial os baseados em PCR, têm sido utilizados em vários estudos envolvendo o gênero *Passiflora*.

Viana et al. (2003) utilizaram marcadores RAPD para estimar a diversidade de *Passiflora* spp., não sendo encontrada uma expressiva variabilidade intraespecífica na análise dos acessos de *P. edulis*. No entanto, ao avaliarem espécies silvestres deste gênero, foi verificada ampla base genética. Cerqueira-Silva et al. (2012a) encontraram vasta variabilidade genética ao avaliar genótipos de *P. setacea* utilizando marcadores RAPD. Bellon et al. (2009) também utilizaram marcadores do tipo RAPD para estimar a variabilidade de acessos de *P. alata*, e verificaram que os acessos silvestres foram os que mais contribuíram para a variabilidade genética.

Castro et al. (2011) avaliaram a divergência genética entre maracujá-azedo e maracujá-doce, por intermédio de marcadores RAPD. Este marcador foi eficiente para evidenciar que os materiais plantados no Distrito Federal possuem diferentes origens genéticas. A diversidade genética de maracujá-doce, azedo e roxo também foi analisada por marcador ISSR, sendo possível encontrar um alto número de polimorfismo entre os acessos e uma ampla variabilidade genética, sendo possível também relacionar os acessos com o local de origem (Santos et al., 2011).

Ganga et al. (2004) quantificaram a diversidade genética entre 36 acessos de maracujazeiro-azedo, provenientes de 18 estados brasileiros, utilizando marcadores AFLP, e verificaram uma vasta diversidade genética entre os acessos e uma não estruturação geográfica entre aqueles coletados de um mesmo estado ou região. Já Ortiz et al. (2012) encontraram baixa variabilidade genética de *P. edulis*, proveniente de plantações comerciais da Colômbia, utilizando marcadores AFLP. A variabilidade genética encontrada pelos marcadores moleculares permite estabelecer estratégias eficientes a serem utilizadas em programas de melhoramento de maracujá-azedo.

### **3.7 Utilização de Microssatélite em Passifloras**

Os marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats* ou Repetições de Sequências Simples) têm-se tornado o tipo de marcador mais utilizado devido às suas propriedades, em especial, ao alto conteúdo informativo

que este proporciona (Oliveira et al., 2006). Estes são reproduzíveis, altamente polimórficos e com uma distribuição frequente e aleatória, o que permite uma ampla cobertura do genoma. São constituídos por sequências repetidas, de um a seis nucleotídeos, encontradas abundantemente nos genomas eucariotos. Essas regiões são delimitadas por sequências conservadas de DNA, para as quais são desenvolvidos iniciadores específicos (Litt e Luty, 1989; Selkoe e Toonen, 2006).

É possível classificá-los em quatro classes: repetições perfeitas – sequências não interrompidas por uma base que não pertença ao motivo, por exemplo: TATATATATATATA; repetições imperfeitas – sequências que apresentam, entre os motivos, pares de bases diferentes do mesmo, por exemplo: TATATATA**C**TATATA; repetições simples – sequências que possuem apenas uma repetição como TGCTGCTGCTGCTGCTGCTGC; e compostos – quando contêm duas sequências repetidas distintas, por exemplo: TATATATAGTGTGTGTGTGT (Weber, 1990).

As sequências repetidas podem ser encontradas em sítios codantes e não-codantes do genoma. São geralmente caracterizadas pelo polimorfismo decorrente às altas taxas de mutação presente nesses locos (Schlötterer, 2000). A grande variabilidade de microssatélites pode ser explicada pelos erros que acontecem nos processos de recombinação, o *crossing-over* desigual, elementos de transposição e o processo de deslizamento da DNA polimerase na replicação ou reparo do DNA (Metais, 2002), sendo este último o processo mutacional responsável pelo aumento do número de repetição (Anmarkrud et al., 2008).

O *crossing-over* desigual, quando ocorre em uma região de microssatélite, pode gerar mudanças drásticas, como a perda ou o ganho de um grande número de repetição. Isto se deve ao fato de regiões repetitivas de microssatélites formarem um *hairpin* (Figura 1) durante a sinapse, sendo apenas partes, geralmente desiguais em comprimento, trocadas (Oliveira et al., 2006).

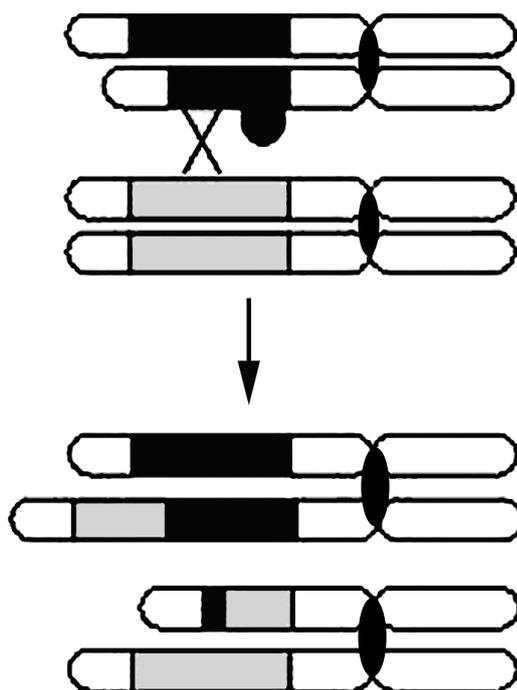


Figura 1: *Crossing-over* desigual entre cromossomos homólogos. Regiões de microsatélites estão representadas pelas partes escuras (Oliveira et al., 2006, com modificações).

Os diferentes números de repetições nas sequências simples, as alterações no elemento repetitivo por substituições, inserções ou deleções de nucleotídeo nas regiões que flanqueiam os microsatélites causam os polimorfismos nos microsatélites. (Borém e Caixeta, 2008).

Devido à sua natureza codominante e multialélica, esses marcadores são utilizados para uma série de estudos genéticos. Marcadores SSR têm sido utilizados com êxito para caracterização molecular em diversas fruteiras, como pêssigo (Bianchi et al, 2004), acerola (Salla et al., 2002) e maracujá (Reis et al., 2011; Cerqueira-Silva et al., 2012a).

Os estudos com marcadores microsatélites envolvendo espécies do gênero *Passiflora* ainda são incipientes, visto que há escassez desses marcadores específicos para estas espécies. Tendo em vista esta necessidade, foram desenvolvidos marcadores microsatélites para *P. edulis* (Oliveira, 2005), *P. alata* (Pádua et al., 2005; Penha, 2008), *P. cincinnata* (Cerqueira-Silva, 2012a) e *P. contracta* (Cazé et al., 2012). A obtenção desses iniciadores permitiu a realização de estudos em vários campos da genética, incluindo genética da conservação e teste de paternidade (Santos et al., 2011b; Castro, 2012).

Santos et al. (2011b) realizaram a confirmação de híbridos interespecíficos de *Passiflora* para uso ornamental, obtidos por meio de cruzamentos entre *P. sublanceolata* e *P. fetida*, com apenas um loco de microssatélite. Reis et al. (2011), com objetivo de estimar a diversidade genética em dois ciclos de seleção recorrente do maracujazeiro-amarelo, utilizaram marcadores microssatélites para realizar a genotipagem de 66 progênies de irmãos completos. Este estudo constatou uma pequena perda da variabilidade genética intrapopulacional, garantindo a continuidade do programa de seleção recorrente. A seleção combinada com base em caracteres morfológicos e moleculares foi verificada por Reis et al. (2012), em que identificaram genótipos com maior frequência de alelos favoráveis, tendo maiores médias de produtividade e maior número de frutos.

Os marcadores microssatélites são específicos para cada espécie, no entanto, pelo fato de as regiões flanqueadoras serem, na maioria das vezes, conservadas entre espécies ou gêneros próximos, é possível utilizar iniciadores desenvolvidos para espécies correlacionadas. Essa característica é denominada transferibilidade ou amplificação cruzada (Varshney, 2005; Bravo, 2006). Tal característica pode ser utilizada para minimizar os custos de implementação destes marcadores em espécies para as quais ainda não há iniciadores desenvolvidos.

Castro (2012) utilizou-se desta propriedade para avaliar as perdas e variação da frequência alélica entre espécies de *Passiflora*, devido à seleção aleatória de plantas para a conservação do germoplasma, usando locos SSR desenvolvidos para *P. edulis* e *P. alata*, e encontrou uma alteração na frequência alélica dos acessos estudados. Por outro lado, Ortiz et al. (2011), ao avaliarem a variabilidade genética de maracujá-azedo com locos SSR e maracujá-doce, não encontraram polimorfismos. A utilização desses marcadores pode gerar informações que auxiliem no melhoramento de plantas, como quantificar a variabilidade genética existente, promovendo uma melhor compreensão do seu genoma e auxiliar na escolha de genótipos promissores em um menor espaço de tempo.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Germoplasma

O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizada na Unidade de Apoio à Pesquisa da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Parte dos acessos foi doada pelo Banco de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, pelo Banco de Germoplasma da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) da coleção de passifloras da UENF. As sementes foram colocadas para germinar em bandejas de isopor com substrato comercial e transplantadas para sacos de polietileno quando surgiram as primeiras folhas verdadeiras. Ao atingirem cerca de 20 cm de altura, foram transplantadas para vasos de polietileno de 11,5 L contendo de terra vegetal, areia e esterco (3:1:1), alocando os vasos aleatoriamente na casa de vegetação.

Para a caracterização morfológica, foram utilizados 70 acessos de 11 espécies do gênero *Passiflora* (Tabela 1). Entretanto, devido à ausência de alguns acessos no período da análise molecular, apenas 56 acessos de dez espécies foram analisados.

Tabela 1: Espécies do gênero *Passiflora*, subgênero, número de cromossomo, procedência, acesso e número de plantas analisadas

<b>Espécies</b>	<b>Subgênero</b>	<b>2n</b>	<b>Procedência</b>	<b>Acesso</b>	<b>N° de planta</b>
<i>P. alata</i>	<i>Passiflora</i>	18	EMBRAPA	BGP 235	3
<i>P. cincinnata</i>	<i>Passiflora</i>	18	EMBRAPA	BGP 016	4
				BGP 268	4
				BGP 274	4
				BGP 275	4
				BGP 290	2
<i>P. gibertii</i>	<i>Passiflora</i>	18	EMBRAPA	BGP 008	4
				BGP 198	4
<i>P. setacea</i>	<i>Passiflora</i>	18	UENF	UENF	4
			EMBRAPA	BGP 237	12
			BGP 238	1	
<i>P. mucronata</i>	<i>Passiflora</i>	18	UENF	BGP 272	2
				UENF	UENF
<i>P. pentagona</i>	<i>Astrophea</i>	24	UENF	UENF-SF	3
<i>P. micropetala</i>	<i>Decaloba</i>	24	UENF	UENF	1
<i>P. caerulea</i>	<i>Passiflora</i>	18	UENF	UENF	2
<i>P. suberosa</i>	<i>Decaloba</i>	24	UENF	UENF	4
<i>P. coccínea</i>	<i>Passiflora</i>	18	UENF	UENF	3
<i>P. edulis</i>	<i>Passiflora</i>	18	UENF	UENF	4

#### 4.2 Caracterização Morfológica

Os acessos foram caracterizados mediante descritores morfológicos propostos pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), vinculado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2008). Tais descritores foram utilizados por serem os únicos disponíveis na literatura para o gênero em questão. Foram utilizados dez qualitativos (dois no estágio vegetativo e oito no estágio reprodutivo) e 14 caracteres quantitativos (cinco no estágio vegetativo e nove no estágio reprodutivo), totalizando 24 caracteres. Do ramo principal, foram utilizadas dez folhas e dez flores, sendo essas iniciadas na época de florescimento de cada genótipo.

Foram avaliadas as seguintes características quantitativas: diâmetro da flor (DF) a partir dos pontos extremos da flor; diâmetro da corona (DC), a partir dos pontos extremos dos filamentos da corona; tamanho dos filamentos longos da corona (TF), a partir da inserção no receptáculo da flor até o ápice; comprimento da pétala (CP), desde a inserção na flor até o ápice; largura da pétala (LP), na

maior dimensão; comprimento da sépala (CS), desde a inserção na flor até o ápice; largura da sépala (LS) na maior dimensão; comprimento do androginóforo (CA), toda a extensão que sustenta os órgãos sexuais; tamanho do pedúnculo floral (TP), a partir do receptáculo da flor até a sua inserção no caule; comprimento da bráctea (CB), desde a inserção no pedúnculo até o ápice (Figura 2); diâmetro do caule (DCA), na altura do segundo nó do eixo principal; comprimento da folha (CF), da base até o ápice; largura da folha (LF), na maior dimensão; comprimento do pecíolo foliar (CP), da inserção no caule até a inserção na folha. Todas as características quantitativas foram mensuradas em milímetros por intermédio de paquímetro digital.

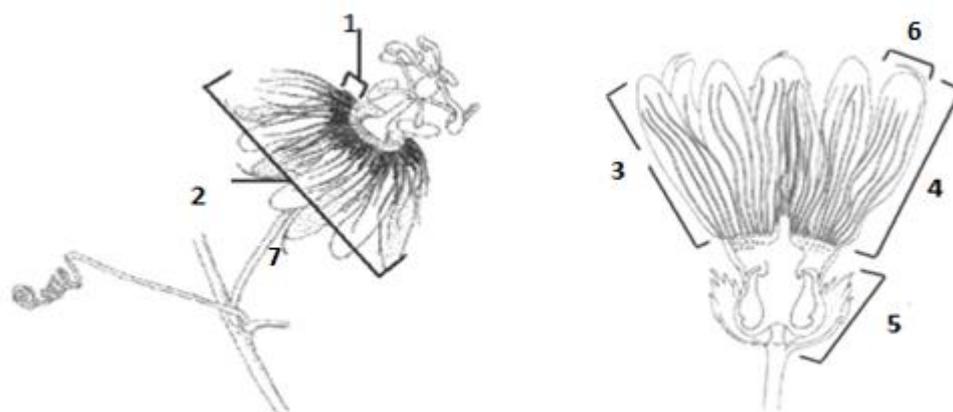


Figura 2: Características florais avaliadas: 1- bandejamento nos filamentos mais longos da coroa, 2- diâmetro da coroa, 3- comprimento da pétala, 4- comprimento da sépala, 5- comprimento da bráctea, 6- largura da sépala, 7- comprimento do pedúnculo.

Para os dados qualitativos, foram atribuídos códigos sequenciais numéricos de acordo com descritores para *Passiflora* (MAPA, 2008), observados os seguintes caracteres qualitativos: coloração predominante no perianto (CPP), período predominante de antese (ANT), coloração predominante da coroa (CPC), bandejamento nos filamentos mais longos da coroa (BFLC), presença de número de anéis coloridos nos filamentos longos da coroa (NACFLC), presença de glândula nectarífera nas brácteas (GB) forma dos filamentos da coroa (FFC), forma do hipanto (FH) (Figura 3).

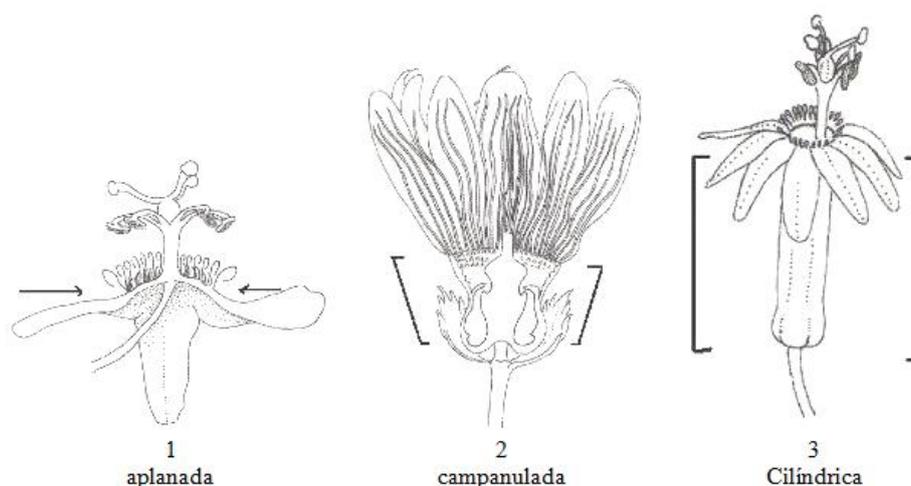


Figura 3: Diferentes formatos do hipanto (Mapa, 2008).

#### 4.2.1 Análise Estatística

O método estatístico Ward-MLM foi utilizado por possibilitar a análise de características quantitativas e qualitativas simultaneamente, indicando com precisão o número de grupos a serem formados pelos indivíduos. A análise foi realizada com auxílio do programa SAS (2003).

Primeiramente, foram estimadas a matriz de similaridade e as distâncias entre as observações, utilizando-se o algoritmo de Gower (1971). Logo após, realizou-se o primeiro agrupamento, utilizando-se o método de Ward (Ward Júnior, 1963), por meio das estatísticas pseudo F e pseudo  $t^2$ , obtendo-se a primeira aproximação do número de grupos ( $g'$ ). As distâncias entre os acessos foram observadas no arquivo denominado *distifile* gerado pelo SAS (2003). Em seguida, foi obtido o gráfico logaritmo da função da verossimilhança, maximizada, segundo o método MLM, para diferentes números prováveis de grupos. De acordo com os picos de verossimilhança para os diferentes números de grupos formados pelo gráfico, definiu-se o melhor número de grupos para a análise.

Por último, foi realizada a análise MLM completa para o número de grupos ( $g$ ) definidos, descrevendo os resultados da classificação, com uma tabela da descrição dos grupos formados e a análise canônica para as variáveis quantitativas, sendo utilizado, para estas últimas, o arquivo *canfile*, obtido pelo SAS (2003), contendo as coordenadas canônicas para as observações.

### 4.3 Caracterização Molecular

Para a caracterização molecular, foram utilizados 56 acessos de *Passiflora* spp. O estudo consistiu na caracterização de 16 acessos de *P. cincinnata*, 13 acessos de *P. setacea*, sete acessos *P. gibertii*, cinco acessos de *P. mucronata*, três acessos de *P. alata*, dois acessos de *P. coccinea*, quatro acessos de *P. edulis* e *P. suberosa*, e um acesso de *P. micropetala* e *P. caerulea*.

#### 4.3.1 Extração de DNA genômico

Folhas jovens foram coletadas e armazenadas em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para a extração, cerca de 50 mg de tecido macerado foram transferidos para tubos de 2 mL e imersos em  $\text{N}_2$  líquido para a extração de DNA, de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990), com modificações.

Foram adicionados aos tubos contendo as amostras 700  $\mu\text{l}$  do tampão de extração pré-aquecido, contendo 2% CTAB,  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  EDTA,  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8,0), 2% PVP e 2,0% - mercaptoetanol, estes dois últimos foram necessários para remoção dos compostos fenólicos. Este material foi incubado a  $65^{\circ}\text{C}$  por 47 minutos e homogeneizado suavemente a cada 10 minutos.

Após as amostras atingirem a temperatura ambiente, adicionaram-se 600  $\mu\text{l}$  clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), para efetuar a desproteínização. Este material sofreu suaves inversões durante aproximadamente 1 minuto até ficar turvo. A fase orgânica foi separada por centrifugação, a 13000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5 ml devidamente identificado. Os ácidos nucleicos foram precipitados pela adição de dois terços (500  $\mu\text{l}$ ) do volume de isopropanol gelado, e incubados por 30 minutos a  $20^{\circ}\text{C}$ . O precipitado foi sedimentado por centrifugação, a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 500  $\mu\text{l}$  etanol a 70%, para a retirada de sal presente (entre cada lavagem, o material foi centrifugado a 14000 rpm durante 10 minutos). Após o descarte do último sobrenadante, o material foi seco em condições naturais, até que o etanol fosse removido. Em seguida, o material foi ressuspendido em 200  $\mu\text{l}$  de solução TE (Tris-EDTA -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl,  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  EDTA, pH 8,0) com RNase em uma concentração final de

10 ug mL<sup>-1</sup> e incubado em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Logo após, o material foi armazenado a 20°C até o uso.

A integridade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 1%, e este foi quantificado por intermédio do espectrofotômetro NANODROP 2000c, com leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 260 nm. Com base neste resultado, todas as amostras foram diluídas para a concentração de trabalho de 5 ng $\mu$ L<sup>-1</sup>.

#### 4.3.2 Otimização da reação de PCR

Iniciadores desenvolvidos para *P. edulis* (Oliveira, 2006) e *P. alata*; (Pádua et al., 2005) foram utilizados para analisar a variabilidade no gênero *Passiflora* (Tabela 2). A reação de PCR foi realizada de acordo com Oliveira (2006), contendo 10 ng de DNA, 0,5  $\mu$ M dos iniciadores e 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase, 0,02 mM de dNTP e 1,5 mM de cloreto de magnésio e tampão de PCR (1X), sendo adicionado água ultrapura para completar o volume final da reação de 13  $\mu$ l por amostra. A temperatura ideal para cada iniciador foi testada, detectando a melhor temperatura de amplificação, variando de 56 a 61°C.

As reações de PCR foram conduzidas em Termociclador (Veriti 384-well *Thermal Cycler Applied Biosystems*) da seguinte forma: 4 minutos a 94°C para desnaturação inicial, seguindo-se os 35 ciclos, cada um consistiu de 94°C por 1 minuto, 56 - 61°C por 1 minuto (de acordo com o iniciador utilizado), 72°C por 3 minutos, e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Os fragmentos amplificados foram então separados em gel de agarose Metaphor 4%, corados com GelRed, e submetidos à luz UV para visualização dos resultados (Fotodocumentador Minibis Pro-Bio-imaging System). As imagens dos géis foram capturadas para posterior análise.

Tabela 2. Identificação dos locos utilizados na genotipagem das 56 amostras de *Passiflora*.

Loco	Iniciador "forward"	Iniciador "reverse"	Referência
PE03	gcagcgaggaagaaaa	tgagacatcgctgaa	Oliveira, 2006
PE04	atgctttgaaatccgtt	tgctcatgcaaagtcactgg	Oliveira, 2006
PE08	ccgataccacgcatta	tctaatgagcggaggaaagc	Oliveira, 2006
PE11	gcataagttgctggtcttg	cctcgaaccttatcatcca	Oliveira, 2006
PE12	cgtaaatattgttggcact	atcatggggaactcatt	Oliveira, 2006
PE13	aagcaccacaatcgttga	ccccctgccacctgagta	Oliveira, 2006
PE18	ccgtgaaccaaccatttctc	ccgtgaaccaaccatttctc	Oliveira, 2006
PE20	aggatcaccatagaaaacat	gttaggtggcattgctctt	Oliveira, 2006
PE23	caatccctgacctataga	cgctcatccttctctt	Oliveira, 2006
PE24	tcaaaactgaactcgtaaagg	gtgctgggagactgatgtt	Oliveira, 2006
PE27	ttgctcattgcactcatcct	gcagacatttctggagca	Oliveira, 2006
PE35	attatgcctaaaaacccaaa	tgatccagagggtgagagg	Oliveira, 2006
PE37	caaaaggatagcctgatgtc	tgcttggctatccactgaag	Oliveira, 2006
PE38	gatcggctcctcggttagac	agtcacacagcatgagaaatc	Oliveira, 2006
PE41	atcggggtcgttatttg	cgttcatccttagtgggcta	Oliveira, 2006
PE42	gtcacttcatttcttctcc	ttagccactcaaacacaa	Oliveira, 2006
PE58	gcaatttcaccatcttctgct	gcaatttcaccatcttctgct	Oliveira, 2006
PE66	ccatagtccaacaagcatc	gctgtggaccctaactcagtc	Oliveira, 2006
PE74	ccctctatcaatagcgttg	gcacgagcagagtattatt	Oliveira, 2006
PE90	tcaggaagattgcatgttagt	ctgggtttgttatgttc	Oliveira, 2006
A07FP1	ggaagtgaaggagaagaaga	ccctctggtgtctacctac	Pádua, 2005
A08FP1	cacattgccgtcactgg	cggcatacgataaatctcctg	Pádua, 2005
A06FP1	ggcggaagaaaagagaag	gaaacacacgatgcgaaaa	Pádua, 2005
A01FP3	agagtcgttaaccctcttg	tctgcttacgcgtggacta	Pádua, 2005
A01BP3	gcgggattctctgccttac	acaaaacacatcagccacca	Pádua, 2005
A08GP1	taaccgactcgcaccaca	gagcaggggaagaaaagga	Pádua, 2005
A09DP1	tggcaattgggtgttga	cctaaccggcgttga	Pádua, 2005
A03AP3	gccttagctgcaacttctg	ggaggcaaccggagtataaa	Pádua, 2005

### 4.3.3 Análise estatística

Os dados obtidos a partir da amplificação dos iniciadores SSR foram convertidos em código numérico por loco para cada alelo. Foram atribuídos valores de 1 até o número máximo de alelos encontrados por loco. Os acessos homocigotos foram descritos como 11, 22, 33 no loco com três alelos, representando as formas  $A_1A_1$ ,  $A_2A_2$ ,  $A_3A_3$ . Já os acessos heterocigotos foram designados como 12, 13 e 23, demonstrando as formas alélicas  $A_1A_2$ ,  $A_1A_3$  e  $A_2A_3$ . Com essa codificação, foi formada uma matriz numérica, que possibilitou o cálculo da distância genética entre os acessos estudados.

A diversidade genética foi estimada pelo número de alelos por loco polimórfico, pela heterozigosidade observada (porcentagem de indivíduos heterozigotos) e pela diversidade gênica (heterozigosidade esperada), que consiste na proporção esperada de indivíduos heterozigotos para as frequências alélicas observadas e pelo conteúdo de informação polimórfica (PIC). Todos os valores foram obtidos pelo programa *Powermarker* (Liu e Muse, 2005).

O número médio ( $Nm$ ) de alelos por loco foi obtido pela razão do número total de alelos ( $A$ ) pelos locos analisados ( $L$ ).

$$Nm = \frac{A}{L}$$

O loco foi tido como polimórfico quando o alelo mais comum nos acessos avaliados obteve frequência menor a 95%.

A heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), parâmetro que pode referir-se à diversidade genética, é definida como a probabilidade de dois gametas tomados ao acaso possuírem alelos distintos em um mesmo loco. Já heterozigosidade observada ( $H_o$ ) é a quantidade real de heterozigotos na população. Assim, tem-se:

$$H_e = 1 - \sum (p_i^2)$$

$$H_o = 1 - \sum P_{ii}$$

em que  $p_i$  = frequência alélica estimada do  $i$ -ésimo alelo;  $P_{ii}$  = frequência estimada de homozigotos na população. A média desses parâmetros é obtida por meio da média aritmética dos locos analisados.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC – *Polymorphism Information Content*) também foi calculado, em função do número de alelos detectados, da sua distribuição e frequência na população estudada. Esse parâmetro possibilita estimar o poder discriminatório de cada marcador, visto que são considerados o

número de alelos por loco e a frequência relativa desses alelos, sendo expresso por:

$$PIC = 1 - \sum p_i^2$$

em que  $p_i$  é a frequência do alelo  $i$  na população.

A distância genética foi obtida pela distância de *Shared Allele*, que se baseia no compartilhamento de alelos entre os genótipos avaliados e, para o agrupamento desses, foi utilizado o método hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average*). Com a média das distâncias para cada espécie, desenvolveu-se a Análise de Coordenadas Principais, sendo possível verificar a distribuição das espécies do gênero *Passiflora* no plano cartesiano bidimensional.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Caracterização Morfológica

O número ideal de grupos foi verificado onde ocorreu maior incremento na função logarítmica, sendo verificado o maior valor absoluto de 97,94 no quinto grupo (Figura 4).

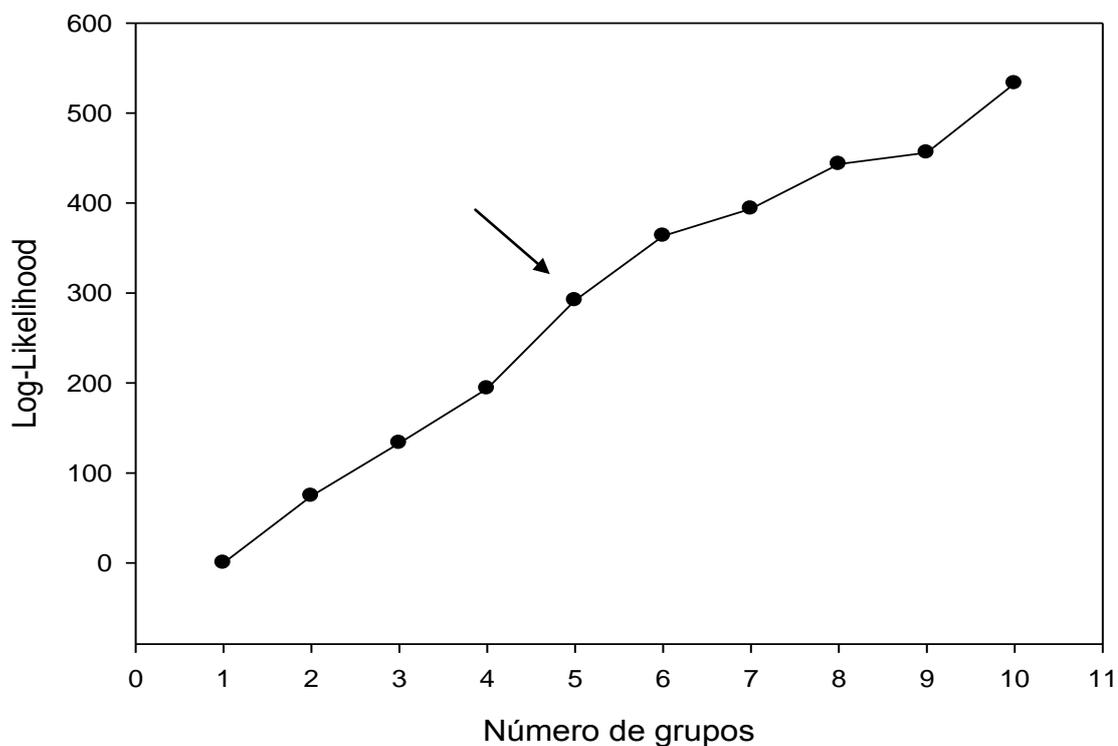


Figura 4. Função logarítmica de probabilidade (Log-Likelihood) com a formação de cinco grupos.

Campos (2012), ao estimar a divergência genética em uma população de goiabeira, com base em caracteres qualitativos e quantitativos, verificou um maior aumento da função de verossimilhança em sete grupos com incremento de 74,36. Pereira et al. (2012), ao avaliarem a variabilidade genética entre diploides melhorados de bananeira, observaram um maior aumento em apenas três grupos. Assim o número ótimo de grupos pode variar com a espécie, o número e tipo de descritores e a quantidade de acessos a serem analisados.

Com base nas características quantitativas e qualitativas, foi possível verificar ampla variabilidade genética entre as espécies de *Passiflora* estudadas (Figura 5).

O grupo I alocou as espécies *P. suberosa*, *P. micropetala* e *P. pentagona*. Este agrupamento corresponde à classificação taxonômica, sendo *P. suberosa*, *P. micropetala* pertencentes ao subgênero *Decaloba*, e *P. pentagona*, ao subgênero *Astrophea* (Macdougall e Feillet, 2004), os quais são subgêneros próximos filogeneticamente (Muschner et al., 2003). O grupo I se caracteriza por possuir acessos com flores de coloração branca na corona e no perianto, ausência de brácteas, ausência de bandeamento nos filamentos longos da corona e com período de antese pela manhã (Tabela 3). Além disso, este grupo foi constituído por acessos com as menores médias, para todas os descritores referentes à flor (Tabela 4). Características semelhantes foram encontradas por Krosnick e Freudenstein (2005), ao estudarem a monofilia e homologia de caracteres florais do subgênero *Decaloba*. Esses autores verificaram que flores brancas e pequenas são típicas desse subgênero.



Figura 5. Espécies do gênero *Passiflora* estudadas. A- *P. coccinea*, B- *P. micropetala*, C- *P. mucronata*, D- *P. cincinnata*, E- *P. alata*, F- *P. edulis*, G- *P. gibertii*, H- *P. suberosa*, I- *P. setacea*, J- *P. pentagona*, L- *P. caerulea*, M- *P. caerulea*

Tabela 3. Características qualitativas e número de acessos por grupo em cada grupo formado pela estratégia Ward-MLM pelos acessos de espécies do gênero *Passiflora*

	Grupo				
	GI (7)	GII(21)	GIII(18)	GIV(12)	GV(12)
<b>Formato do hipanto</b>					
Aplanada	6	-	-	12	-
Campanulada		21	18	-	12
Cilíndrica	1	-	-	-	-
<b>Coloração predominante no perianto</b>					
Branca	7	21	-	12	6
Rosada	-	-	-	-	-
Vermelha	-	-	-	-	6
Vermelha-arroxerada	-	-	-	-	-
Roxa	-	-	18	-	-
Azul-arroxeadada	-	-	-	-	-
Azul	-	-	-	-	-
<b>Coloração predominante na coroa</b>					
Branca	7	21	-	-	-
Rosada	-	-	-	12	-
Vermelha	-	-	-	-	-
Vermelha-arroxerada	-	-	-	-	6
Roxa	-	-	8	-	4
Azul-arroxeadada	-	-	10	-	-
Azul	-	-	-	-	2
<b>Forma dos filamentos longos da coroa</b>					
Liso	5	21	-	12	8
Ondulado	2	-	18	-	4
<b>Bandeamento nos filamentos longos da coroa</b>					
Ausente	7	21	-	-	3
Presente	-	-	18	12	9
<b>Anéis coloridos nos filamentos longos</b>					
Ausente	7	21	-	-	3
Presente	-	-	18	12	9
<b>Glândulas nas Brácteas</b>					
Ausente	7	21	-	12	-
Presente	-	-	18	-	12
<b>Período de antese</b>					
Matutino	7	-	18	-	8
Vespertino	-	-	-	12	4
Noturno	-	21	-	-	-

Tabela 4. Médias das variáveis quantitativas para cada um dos cinco grupos formados pelo método Ward-MLM e as duas primeiras variáveis canônicas

Variáveis	GRUPOS					CAN	
	G1	G2	G3	G4	G5	CAN1	CAN2
Comprimento da bráctea	0,94	17,76	26,68	21,94	28,39	0,67	0,53
Comprimento da sépala	15,18	37,25	41,54	34,89	42,50	0,51	0,41
Largura da sépala	6,04	8,55	17,39	11,32	15,45	0,74	0,25
Comprimento da pétala	8,12	32,32	41,26	27,60	42,28	0,60	0,41
Largura da pétala	2,56	7,05	12,30	11,43	13,16	0,63	0,49
Diâmetro da flor	31,94	80,45	89,54	72,40	93,26	0,51	0,43
Diâmetro da corona	24,36	45,31	102,71	58,67	57,49	0,88	-0,10
Tamanho do pedúnculo	9,44	88,50	54,04	65,51	44,64	-0,10	0,00
Tamanho do androginóforo	7,71	13,93	11,45	12,78	15,69	-0,02	0,53
Tamanho do filamento	10,02	19,34	47,00	23,92	30,16	0,88	0,01
Comprimento da folha	106,33	107,82	89,90	82,10	133,89	-0,26	0,44
Largura da folha	119,53	101,83	117,12	124,53	123,29	0,14	0,15
Comprimento do pecíolo	21,92	41,59	45,74	37,60	34,80	0,36	-0,07
Diâmetro do caule	10,10	9,65	21,96	14,73	14,33	0,94	-0,08

O grupo II foi formado pelas espécies *P. mucronata* e *P. setacea*, ambas pertencentes ao subgênero *Passiflora*. Antese noturna, flores brancas, filamentos longos da corona lisos e a forma do hipanto campanulada são algumas das características que este grupo compartilha (Tabela 3). Dos grupos analisados, este grupo foi o que apresentou as maiores médias ao serem analisados o tamanho do pedúnculo (88,5 mm) e o menor diâmetro do caule (9,65 mm). Estudos revelam que *P. mucronata* é resistente à fusariose e *P. setacea* possui um bom nível de tolerância a doenças foliares, em especial ao vírus do endurecimento do fruto - *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) - e a morte precoce (Fisher et al., 2005; Ataíde et al., 2012). Tendo em vista o potencial uso como fonte de resistência a doenças que acometem o maracujazeiro (*P. edulis*), é de grande importância a inserção dessas espécies em programas de melhoramento do maracujazeiro, por meio de cruzamentos interespecíficos.

O grupo III reuniu todos os acessos de *P. cincinnata*. Este grupo se caracterizou por possuir flores com coloração roxa, corona com coloração azul-arroxeadas e formato ondulado dos filamentos longos da corona (Tabela 3). Neste grupo, foi encontrada a maior média para o diâmetro da corona (102,71 mm) e, conseqüentemente, o maior tamanho de filamento (47,00 mm). O comprimento do

pecíolo (45,74 mm) e o diâmetro do caule também obtiveram maiores médias (21,96mm) se comparadas às dos outros grupos (Tabela 4). Uma característica marcante de *P. cincinnata* foi a presença de androginóforo mais curto (11,45 mm) em relação ao das outras espécies do subgênero *Passiflora* analisadas, sendo reduzida a distância entre o estigma e a corona, possibilitando a polinização por insetos menores (Junqueira et al., 2006).

O grupo IV foi constituído apenas por *P. gibertii*. Este grupo se caracterizou por possuir flor branca, corona rosada, filamentos longos da corona lisos, formato aplanado do hipanto e antese no período vespertino (Tabela 1). O tamanho do androginóforo (12,78 mm) neste grupo foi relativamente pequeno (Tabela 4). Foi constatado também que as médias do diâmetro do caule (14,73 mm) do grupo IV e do grupo V (14,33 mm), onde o maracujazeiro-azedo está alocado, possuem valores próximos. Considerando que *P. gibertii* é resistente, tanto em relação à morte prematura quanto à fusariose (Roncato et al., 2004), estudos devem ser realizados a fim de verificar o potencial dessa espécie como porta-enxerto em espécies comerciais, visto que ambas possuem o caule com diâmetro com valores próximos, auxiliando, assim, no controle das doenças que muito acometem o maracujazeiro-azedo.

O grupo V foi representado pelas espécies *P. edulis*, *P. caerulea*, *P. alata* e *P. coccínea*. A presença de glândulas na bráctea e o formato campanulado foram características compartilhadas neste grupo (Tabela 3). A corona com coloração acentuada foi outra característica encontrada neste grupo. Este grupo se caracterizou por possuir a maior média das seguintes variáveis: diâmetro da flor (93,23 mm), comprimento da pétala (42,28 mm), sépala (42,50 mm) e bráctea (28,39 mm). Além disso, este grupo se destacou por ter maior média no tamanho do androginóforo (15,69 mm). O fato de *P. coccínea* ter sido alocada neste grupo favoreceu o aumento da média desta característica. Crochemore et al. (2003), ao caracterizarem 11 espécies do gênero *Passiflora*, também verificaram que as espécies *P. edulis*, *P. caerulea* e *P. coccínea* alocaram-se em um mesmo grupo. As características quantitativas que melhor explicaram a diversidade genética existente entre as espécies, com base na primeira variável canônica, foram: diâmetro do caule (0,94); diâmetro da corona, (0,88); tamanho do filamento (0,88) e largura da sépala (0,74) (Tabela 4). Santos et al. (2011b), ao quantificarem a diversidade genética entre *P. foetida*, *P. subanceolada* e o híbrido

correspondente, com base em caracteres morfológicos, verificaram que as variáveis que tiveram maior contribuição, de acordo o método de Singh, foram o diâmetro da flor e o comprimento do pedúnculo.

As duas primeiras variáveis canônicas obtidas pelo método Ward-MLM explicaram 91,16% da variação total. Conforme Cruz et al. (2004), caso as duas primeiras variáveis canônicas permitam estimativas acima de 80% da variação total, pode-se obter uma interpretação satisfatória da variabilidade entre os acessos, tal como ocorreu neste estudo, sendo possível a representação gráfica bidimensional (Figura 6). Sudré et al. (2010), utilizando o mesmo método estatístico para estimar a variabilidade genética entre os acessos de *Capsicum* spp., obtiveram 90,5% da variação total também explicada pelas duas primeiras variáveis canônicas.

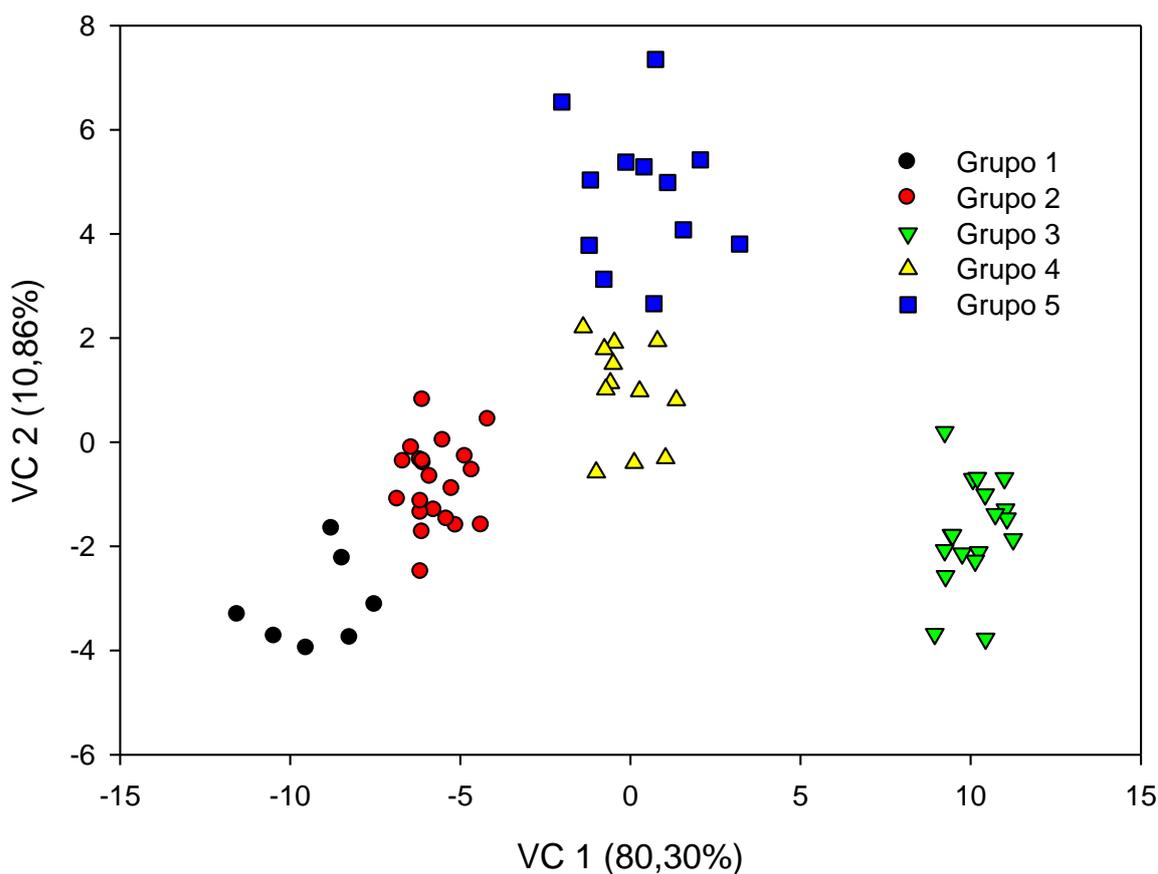


Figura 6. Dispersão gráfica das duas primeiras variáveis canônicas representando a formação de cinco grupos de espécies de *Passiflora* spp.

As distâncias entre os grupos, pela estratégia Ward-MLM, demonstraram uma amplitude de variação no valor de 366,16. A menor distância entre os grupos foi observada entre o grupo IV e o grupo V, com valor estimado de 27,84, mostrando alta similaridade entre as espécies. A maior dissimilaridade, com magnitude de 394,0 (Tabela 5), ocorreu entre o grupo I e o grupo III. Essa diferença corrobora os estudos de filogenia molecular que os aloca em subgêneros distintos (Muschner et al., 2003).

Tabela 5. Distância entre os grupos formados pelo método Ward-MLM para variáveis quantitativas e qualitativas

GRUPOS	1	2	3	4	5
1	0	62,05	394,00	129,50	165,19
2		0	256,14	44,95	79,73
3			0	120,27	138,78
4				0	27,84
5					0

A proximidade de *P. gibertii* (grupo IV) com as espécies do grupo V também foi encontrada, quando foi quantificada a variabilidade genética de 11 espécies do gênero *Passiflora* por caracteres morfoagronômicos (Crochemore et al., 2003a). O fato de ambas as espécies pertencerem ao mesmo subgênero, possuírem o mesmo número de cromossomos ( $2n=18$ ) (Souza et al., 2008) e compartilharem algumas características fenotípicas pode estar associado a essa alta similaridade.

Várias são as diferenças entre o grupo I e o grupo III que contribuíram para maior dissimilaridade entre esses grupos. O tamanho e a coloração das flores são as características que mais diferenciam estes grupos: flores brancas e pequenas são características do grupo I; e flores roxas e grandes, características do grupo III. Além disso, o número de cromossomos das espécies do grupo I ( $2n=24$ ) difere dos demais grupos ( $2n=18$ ) (Souza et al., 2008).

Os descritores morfológicos utilizados foram capazes de diferenciar os subgêneros *Decaloba* e *Passiflora*, bem como separar de forma clara as espécies mais próximas. Resultado semelhante foi obtido por Tangarife et al. (2009), ao realizarem a caracterização morfológica de 21 espécies do gênero *Passiflora*, incluindo três subgêneros. Este estudo permitiu distinguir os subgêneros de forma semelhante à da classificação taxonômica, sendo as variáveis relacionadas com a

flor que mais contribuiu para a separação das espécies. Viana et al. (2010) utilizaram 11 descritores para avaliar seis espécies do gênero *Passiflora* e verificaram uma ampla variação morfológica inter e intraespecífica, obtendo uma clara separação das espécies.

As análises geradas pelos descritores morfológicos demonstraram uma alta similaridade com a classificação botânica atualmente aceita para o gênero *Passiflora* (Macdougall e Feuillet, 2004). Este fato mostra a consistência do método utilizado, podendo revelar o grau de parentesco entre as espécies. Isso pode estar relacionado ao fato de a maioria das características avaliadas estar relacionada com a morfologia floral e estas características possuem alta herdabilidade (Kobayashi et al., 2007).

A caracterização morfológica é uma etapa fundamental em programas de melhoramento de plantas, visto que permite estimar a variabilidade genética e indicar os melhores genótipos a serem utilizados (Marin et al., 2009). Este conhecimento possibilita ao melhorista explorar a diversidade, transferindo alelos favoráveis encontrados em espécies silvestres, como resistência a doenças, autocompatibilidade e redução do androginóforo, por intermédio de cruzamento interespecífico. Neste caso, deve-se ressaltar que, para que haja sucesso nos cruzamentos envolvendo espécies distintas, o melhorista deve buscar acessos que estejam mais próximo filogeneticamente da espécie a ser melhorada e, conseqüentemente, compatíveis. Assim, as informações obtidas neste estudo poderão auxiliar na escolha de genitores, em programas de melhoramento do maracujazeiro, que utilizem a hibridação interespecífica.

## **5. 2 Caracterização Molecular**

### **5.2.1 Genotipagem**

Foram testados 28 iniciadores, em que a temperatura de anelamento ótima para cada iniciador variou de 56 a 61°C (Tabela 6). A separação dos fragmentos foi realizada em gel de agarose de alta resolução Metaphor. Esta estratégia é eficiente para análises de marcadores SSR, já que possibilita a separação de alelos de 20 a 800 pb (Asif et al., 2008). Além de ser eficiente, é de fácil execução e econômica.

Estudos comparativos de *Passiflora* têm obtido grande sucesso ao utilizar marcadores moleculares do tipo RAPD (Viana et al., 2003; Perez et al., 2010, Viana et al., 2010), ISSR (Santos et al., 2011) e genes cloroplastídios (Yockteng e Nadot, 2004). No entanto, estudos com marcadores microssatélites, para a caracterização de germoplasma de *Passiflora* envolvendo várias espécies, ainda são incipientes.

Tabela 6. Identificação dos locos utilizados na genotipagem. Código do loco, motivo, temperatura de anelamento e tamanho esperado para o alelo

Loco	Motivo	TA (°C)	Tamanho esperado (pb)
PE03	(GA) <sub>10</sub>	60	156
PE04	(TG) <sub>9</sub>	60	235
PE08	(GTTGTG) <sub>4</sub>	56	282
PE11	(GT) <sub>11</sub>	58	178
PE12	(TG) <sub>8</sub>	60	150
PE13	(GT) <sub>6</sub>	60	172
PE18	(TG) <sub>9</sub>	60	220
PE20	(AAAC) <sub>4</sub>	56	242
PE23	(GA) <sub>19</sub>	56	206
PE24	(CA) <sub>15</sub>	60	244
PE27	(GT) <sub>7</sub>	58	139
PE35	(CA) <sub>9</sub>	58	225
PE37	(TG) <sub>8</sub>	60	232
PE38	(TG) <sub>8</sub>	58	215
PE41	(TTAA) <sub>5</sub>	60	220
PE42	(GT) <sub>8</sub>	60	216
PE58	(AC) <sub>11</sub>	60	243
PE66	(AC) <sub>9</sub>	60	165
PE74	(ATCACA) <sub>5</sub>	58	215
PE90	(AGC) <sub>5</sub>	60	245
A07FP1	(AAG) <sub>9</sub>	58	155
A08FP1	(TG) <sub>9</sub>	58	105
A06FP1	(GAA) <sub>28</sub>	56	226
A01FP3	(TTG) <sub>5</sub>	58	153
A01BP3	(GA) <sub>11</sub>	58	161
A08GP1	(CT) <sub>50</sub>	58	109
A09DP1	(TG) <sub>9</sub>	62	?
A03AP3	(CT) <sub>28</sub>	61	204

### 5.2.2 Transferibilidade

Ao avaliar a amplificação cruzada de 28 iniciadores microssatélites, para dez espécies do gênero *Passiflora*, apenas 12 iniciadores foram transferidos para a maioria das espécies. Dos oito iniciadores desenvolvidos para *P. alata*; dois

produziram padrão de amplificação típica dos marcadores microssatélites, para a maioria das espécies avaliadas; dois não amplificaram (A01FP3, A01BP3); e dois amplificaram apenas em *P. alata*; e um amplificou em *P. alata* e *P. setacea* (Tabela 7).

Tabela 7. Amplificação cruzada de dez espécies de *Passiflora* utilizando iniciadores desenvolvidos *P.edulis* e *P.alata*

Locos	<i>P. edulis</i>	<i>P. alata</i>	<i>P. setacea</i>	<i>P. mucronata</i>	<i>P. gibertii</i>	<i>P. cincinnata</i>	<i>P. coccínea</i>	<i>P. caerulea</i>	<i>P. suberosa</i>	<i>P. micropetala</i>
PE03	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-
PE04	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-
PE08	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1
PE11	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
PE12	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-
PE13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PE18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
PE20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
PE23	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-
PE24	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PE27	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-
PE35	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-
PE37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PE38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
PE41	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PE42	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PE58	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PE66	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PE74	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PE90	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T (%)	100	55	60	55	55	80	50	45	50	35
A07FP1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	-
A08FP1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A06FP1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
A01FP3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A01BP3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A08GP1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
A09DP1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
A03AP3	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
T (%)	12,5	75	37,5	25	25	25	25	25	25	12,5

T(%)- taxa de transferibilidade: 1 - Amplificação observada, - não amplificação.

Para os iniciadores desenvolvidos para *P. edulis*, a espécie *P. cincinnata* foi a que mostrou maior taxa de amplificação cruzada (80%). As espécies *P. alata*, *P. mucronata* e *P. gibertii* obtiveram a mesma taxa de transferibilidade (55%). No entanto, estas não compartilharam os mesmos iniciadores. Já a espécie *P. micropetala* obteve a menor taxa de amplificação (35%).

A porcentagem de amplificação para todas as espécies analisadas foi obtida para cada loco amplificado (Tabela 8). A maior taxa foi encontrada nos locos PE13, PE37, PE41, PE66, PE74, PE90, A08FP1, sendo estes capazes de amplificar todas as espécies analisadas.

Tabela 8. Taxa de transferibilidade observada para cada loco.

Loco	Transferibilidade (%)
PE13; PE37; PE41; PE66; PE74; PE90; A08FP1	100
PE08; PE18; PE20; PE38	90
A07FP1	80
PE04; PE12; PE23; PE27; PE35	30
PE03; PE11; A08GP1	20
PE24; PE42; PE58; A06FP1; A09DP1; A03AP3	10

As taxas de transferibilidade foram satisfatórias para a maior parte das espécies analisadas. Doze dos iniciadores testados obtiveram uma taxa de transferibilidade igual ou superior a 80%. De maneira geral, os iniciadores desenvolvidos para *P. edulis* foram mais efetivos, obtendo as maiores taxas de transferibilidade. Resultado semelhante foi encontrado por Castro (2012), ao avaliar a variação na frequência alélica de *P. edulis*. *P. setacea*, *P. cincinnata* e *P. alata*. Silva (2010), ao verificar a amplificação cruzada nas espécies *P. alata*, *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. mucronata*, *P. cacaoensis*, e *P. glandulosa*, utilizando os mesmo iniciadores, detectou uma taxa de amplificação de 37,5% para as quatro primeiras, e 62,5% e 29,1% para as duas últimas, respectivamente.

Pádua (2004), ao analisar a transferibilidade dos iniciadores oriundos de fragmentos genômicos de *P. alata* para espécies do gênero *Passiflora*, encontrou uma maior taxa de amplificação cruzada (78,25%) no iniciador A08FP1, sendo amplificado para 61 espécies. Este mesmo iniciador foi utilizado para a confirmação de híbridos entre o cruzamento de *P. sublanceolata* e *P. foetida*, sendo polimórfico para os genitores, em cuja progênie foram encontradas bandas pertencentes aos dois genitores (Santos et al., 2011a). Neste trabalho, ao ser

utilizado este iniciador, foi possível verificar a amplificação em todas as espécies. Isto mostra que o iniciador em questão é altamente polimórfico e pode ser usado em estudos com espécies do gênero *Passiflora*.

Em plantas, a transferência de microssatélite entre as espécies do mesmo gênero, na maioria das vezes, é bem sucedida, com sucesso em 60% das eucotiledôneas e 40% das monocotiledôneas (Barbara et al., 2007). Em relação ao gênero *Passiflora*, em que há marcadores microssatélites desenvolvidos para poucas espécies, essa propriedade é de grande relevância, visto que possibilita que estudos genéticos sejam realizados com espécies relacionadas.

### 5.2.3 Diversidade Genética

Em relação à diversidade genética entre as espécies avaliadas, verificou-se um baixo número de alelos em todos os locos polimórficos. O número de alelos por loco variou de 2 (PE37 e PE38) a 5 (PE66), com média igual a 3,42, obtendo-se um total de 41 alelos para os 12 locos avaliados (Figura 7).

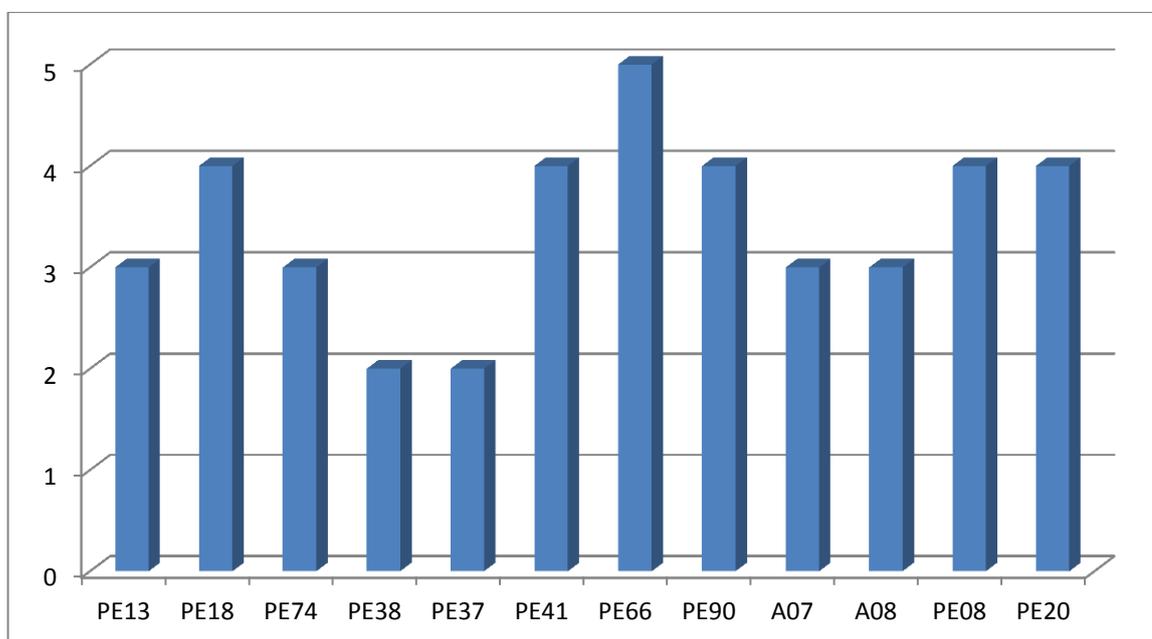


Figura 7. Número de alelos por loco para cada um dos 12 locos analisados, encontrado nas espécies de *Passiflora* estudadas

Variação alélica semelhante foi encontrada por Cazé et al. (2012), ao caracterizarem locos de SSR desenvolvidos para *P. contracta* em que o número

de alelo por loco variou de 2 a 9, com média igual a 5. Cerqueira-Silva et al. (2012b) também verificaram poucos alelos por locos, variando de 2 a 9 alelos. Oliveira et al. (2005) obtiveram até 20 alelos em um loco e média de 5,3 alelos por locos em uma amostra de 43 indivíduos. Isto mostra que um baixo número de alelos por loco e poucos marcadores microssatélites polimórficos têm sido característicos do gênero (Cerqueira-Silva et al., 2012b), o que pode sugerir que estes locos se concentram em regiões conservadas, com pequena taxa de mutação.

Em relação à estimativa da diversidade genética, o loco PE66 foi o que obteve maior número de alelos, com um total de cinco alelos; no loco PE18, verificaram-se quatro alelos, sendo ambos microssatélites dinucleotídeos, com nove repetições. De acordo com Sibov et al. (2003), essa classe de microssatélite é mais abundante no genoma, apresentando maior número de alelos. Além disso, segundo Weber (1990), a quantidade de alelos por loco está relacionada com o número de repetições no microssatélite, o que explica o polimorfismo encontrado no loco PE66.

Quanto à frequência dos alelos encontrados, apenas quatro foram maiores que 50%, o que revela ampla diversidade genética entre os acessos avaliados.

Os valores de heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), ou diversidade gênica, variaram de 0,33 (PE37) a 0,69 (PE08), com média de 0,57 (Tabela 9). Esses valores demonstram a ampla variabilidade genética encontrada no gênero *Passiflora*. Valores semelhantes foram encontrados por Cerqueira-Silva et al. (2012b), ao avaliarem acessos de *P. cincinnata*, obtendo  $H_e=0,51$ ; e por Pádua et al. (2005) que obtiveram  $H_e=0,52$ , utilizando acessos de *P. alata*.

Tabela 9. Caracterização dos 12 locos utilizados na caracterização molecular

Loco	A	N° de alelos	He	Ho	PIC
PE13	0,4909	3	0,6094	0,3091	0,5313
PE18	0,5943	4	0,5829	0,6415	0,5359
PE74	0,5096	3	0,5497	0,9808	0,4495
PE38	0,7245	2	0,3992	0,0612	0,3195
PE37	0,7857	2	0,3367	0,0000	0,2800
PE41	0,5192	4	0,5627	0,9423	0,4707
PE66	0,3889	5	0,6799	0,9815	0,6213
PE90	0,5568	4	0,6010	0,7273	0,5429
A07	0,6000	3	0,5588	0,4500	0,5071
A08	0,4615	3	0,6354	0,7115	0,5612
PE08	0,4022	4	0,6999	0,1522	0,6453
PE20	0,4688	4	0,6274	0,2917	0,5567
Média	0,5419	3,42	0,5702	0,5208	0,5010

A – Frequência do alelo de maior frequência, He – heterozigiosidade esperada; Ho – heterozigiosidade observada; PIC - conteúdo de informação polimórfica

A heterozigiosidade observada (Ho) variou de 0,00 (PE37) a 0,981 (PE66), com média de 0,52. Dos locos analisados, a heterozigiosidade observada foi maior que a esperada em seis locos. Oliveira et al. (2005), ao avaliarem acessos de *P. edulis*, encontraram resultados semelhante, em relação à Ho, variando de 0,0 a 1,0. Cazé et al. (2012), ao estudarem a estrutura genética de *P. contracta*, utilizando sete locos de microssatélite, obtiveram Ho=0,50.

Os altos valores de heterozigiosidade observada já eram esperados nos estudos envolvendo o gênero *Passiflora*, visto que a maioria das espécies desse gênero possui o sistema de autoincompatibilidade, sendo predominantemente alógamas. Espécies de maracujazeiro, por se comportarem sempre como geração segregante ( $F_2$ ), possuem uma grande quantidade de locos heterozigotos.

Reis et al. (2011), ao estudarem populações de dois ciclos de seleção recorrente de *P.edulis*, obtiveram He=0,20 e Ho=0,15. A baixa variabilidade molecular neste estudo pode ser atribuída à perda e fixação de alelos pela seleção de genótipos favoráveis agronomicamente.

O conteúdo médio de informação polimórfica (PIC), calculado para estimar o quanto cada iniciador foi informativo entre os acessos avaliados, variou de 0,28 (PE 37) e 0,64 (PE08). Botstein et al. (1980) definiram a PIC como um indicador de qualidade do iniciador do marcador estudado. Segundo tais autores, os

marcadores serão considerados altamente informativos, quando apresentarem PIC superior a 0,5; razoavelmente informativos, quando possuírem valores entre 0,25 e 0,50; e, levemente informativos, os que obtiverem valores inferiores a 0,24.

De acordo com esta classificação, os locos PE08 e PE66 mostraram-se altamente informativos com valores de PIC, 0,64 e 0,62, respectivamente; e os locos PE37 (0,28) e PE38 (0,31), com menores valores de PIC, foram razoavelmente informativos. O menor conteúdo informativo, observado para esses dois locos, deve-se ao fato de as frequências alélicas não terem sido distribuídas de forma equitativa, com poucos alelos concentrando grande parte das frequências alélicas. Esta concentração das frequências gênicas levou a um desvio da condição de máximo conteúdo informativo de um loco, que ocorre quando todos os alelos apresentam frequências semelhantes (Sefc et al., 1999).

Em relação ao loco PE37, 78,6% da frequência alélica foram concentrados em apenas um dos alelos. O mesmo ocorreu no loco PE38, em que 72,4% da frequência alélica se concentraram em apenas um alelo. Tais frequências explicam os menores valores de PIC, o que indica que, no presente trabalho, esses locos geram o menor conteúdo informativo sobre os acessos analisados.

A diversidade genética do gênero *Passiflora* foi observada por meio da análise de coordenadas principais, em que duas coordenadas explicaram 70% da variação total, sendo possível visualizar em gráfico de dispersão (Figura 8).

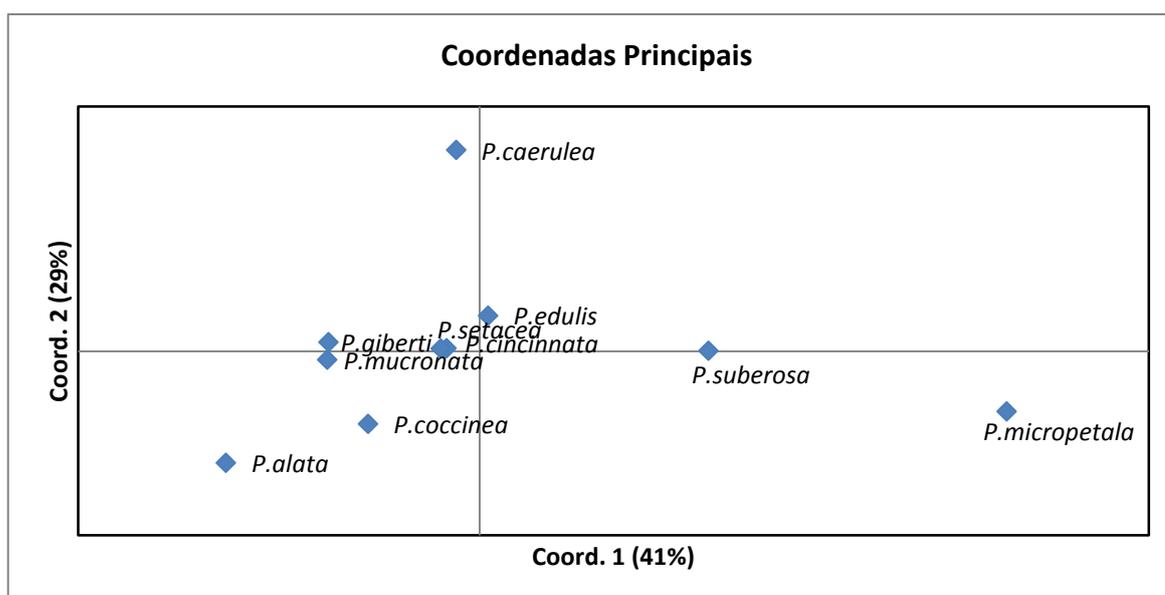


Figura 8. Distância Genética entre espécies do gênero *Passiflora*

De acordo com o gráfico de dispersão, foi possível observar a distância entre a *P. suberosa* e *P. micropetala* das demais espécies, o que era esperado, visto que essas duas espécies pertencem ao subgênero *Decaloba*, diferentemente das demais espécies estudadas, as quais estão alocadas no subgênero *Passiflora*. A diversidade genética também foi observada dentro deste subgênero. A proximidade das espécies, como *P. edulis*, *P. setacea*, *P. cincinnata* e também *P. gibertii* e *P. mucronata*, é sustentada pelo estudo de filogenia molecular, em que foram utilizadas sequências conservadas plastidiais (Muschner et al., 2003).

Na análise de agrupamento (Figura 9), gerada com base na distância de *Shared Allele*, em que prioriza o compartilhamento de alelos entre os acessos, foi possível verificar a formação de três grupos. Esse agrupamento possibilitou uma clara distinção de dois subgêneros, *Decaloba* e *Passiflora*, sendo este último subdividido em dois grupos.

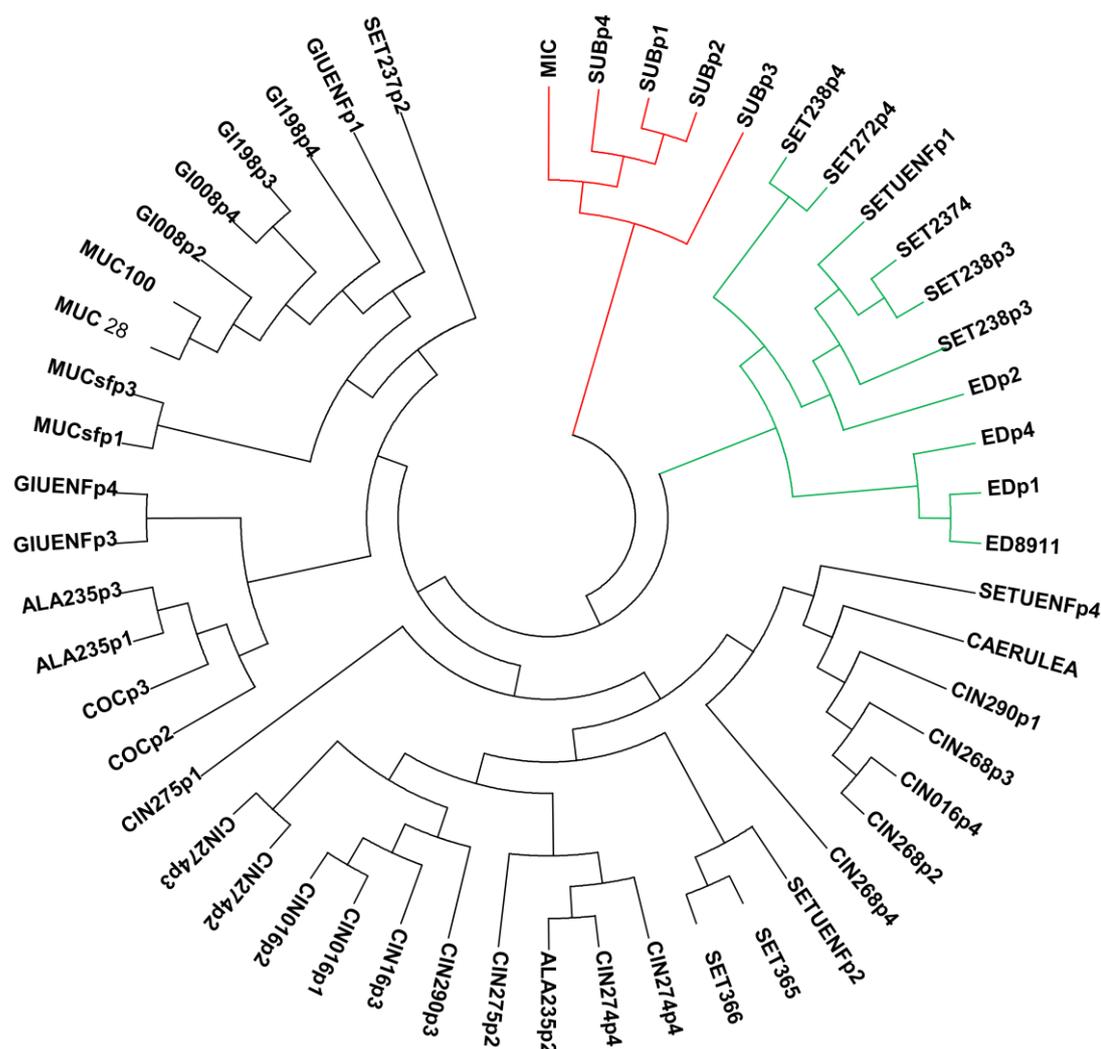


Figura 9. Dendrograma obtido pela análise de agrupamento, utilizando a distância genética de Shared allele entre acessos de dez espécies de *Passiflora* e o método de agrupamento UPGMA.

A distância genética entre os acessos variou de 0,05 a 0,8. Essa variação caracteriza a expressiva diversidade entre os acessos analisados. A menor distância foi observada entre ALA235p1 e ALA235p3 (0,05), ambas pertencentes à espécie *P. alata*. Já a maior dissimilaridade foi observada entre as espécies *P. suberosa* e *P. edulis* (0,80). A alta divergência entre *P. edulis* e *P. suberosa* também foi encontrada nos estudos de Crochemore et al. (2003b). Essa elevada dissimilaridade molecular pode ter contribuído para as diferenças morfológicas, como diferentes modos de reprodução, tamanho de flor e número de cromossomos, alocando-as em subgêneros distintos. O fato de essas espécies estarem alocadas em subgêneros distintos e se diferenciarem em vários

aspectos, como modo de reprodução, tamanho de flor e número de cromossomos, pode ter contribuído para a elevada distância genética entre essas duas espécies.

O grupo I alocou as espécies *P. suberosa* e *P. micropetala*, sendo possível observar uma maior distância desse grupo em relação aos demais. Muschner et al. (2012) também encontraram relativa distância entre o subgênero *Decaloba*, o qual *P. suberosa* e *P. micropetala* fazem parte, e o subgênero *Passiflora*. Esta dissimilaridade possibilita a utilização dessas espécies como grupo externo no estudo de espécies do subgênero *Passiflora*.

O grupo II foi constituído de acessos de *P. setacea* e *P. edulis*, o que mostra a proximidade entre as duas espécies, indicando o potencial uso de cruzamentos interespecíficos. Cerqueira-Silva et al. (2009) quantificaram a diversidade genética entre *P. edulis* e *P. setacea* por meio de descritores físico-químicos do fruto. Esses autores observaram que a variabilidade existente entre essas espécies pode ser explorada por meio de cruzamentos interespecíficos a fim de aumentar o teor de sólidos solúveis e a produção de polpa. Além de melhorar características físico-químicas do fruto, o cruzamento interespecífico entre *P. edulis* e *P. setacea* é capaz de gerar híbridos que possuam genes de resistência à virose do endurecimento do fruto, a que *P. setacea* é resistente. Fonseca et al. (2009) realizaram cruzamentos interespecíficos *P. edulis* e *P. setacea* e obtiveram híbridos resistentes a essa doença.

Por sua vez, o terceiro grupo reuniu *P. cincinnata*, *P. caerulea*, acessos de *P. setacea*, *P. alata*, *P. coccinea*, *P. gibertii*, *P. mucronata*. A proximidade dessas espécies também foi constatada no estudo Muschner et al. (2003), ao utilizarem sequências conservadas a fim de realizar o primeiro estudo de filogenia molecular do gênero. O compartilhamento de alelos entre essas espécies e a utilização de locos em regiões conservadas pode ter contribuído para este agrupamento.

O fato de *P. setacea* ser encontrada tanto no grupo II quanto no grupo III mostra a variabilidade intraespecífica contida nesta espécie. A proximidade de *P. setacea* de *P. edulis* e de *P. cincinnata* neste estudo também foi encontrada no trabalho de Pádua (2004) ao estudar a filogenia do gênero *Passiflora*.

Relações entre espécies de *Passiflora* foram estudadas por Croquemore et al. (2003b) que analisaram 11 espécies e, entre estas, duas formas botânicas de

*P. edulis*, com uso de marcadores RAPD. Viana et al. (2010) verificaram uma ampla variabilidade ao analisarem seis espécies deste gênero, no entanto, ao utilizarem marcadores RAPD e descritores morfológicos, a relação entre as espécies não se manteve. Santos et al. (2011) utilizaram marcadores ISSR para acessar a variabilidade de *P. edulis* de diferentes origens.

A ampla diversidade observada é uma característica do gênero *Passiflora*, devido a fatores como a polinização cruzada e ao sistema de autoincompatibilidade (Viana et al., 2007). O conhecimento da diversidade genética é de fundamental importância para a conservação e manutenção de recursos genéticos em programas de melhoramento (Costa et al., 2012), permitindo entender a relação de parentesco entre os genótipos e identificar os melhores genitores, para a obtenção de maiores ganhos genéticos em populações segregantes (Viana et al., 2003; Ganga et al., 2004). Este estudo encontrou uma grande variabilidade genética entre as espécies avaliadas por meio de microssatélites. Com o conhecimento da variabilidade genética no gênero *Passiflora*, é possível indicar cruzamentos interespecíficos com o objetivo de transferir alelos favoráveis, como o de resistência a doenças, para as espécies cultivadas.

## 6. CONCLUSÕES

A caracterização morfológica e molecular foi eficiente para estimar a diversidade existente entre os acessos.

Os descritores morfológicos e os marcadores microsatélites conseguiram discriminar os subgêneros *Decaloba* e *Passiflora*.

Os descritores morfológicos foram capazes de separar com clareza as espécies em diferentes grupos. O mesmo não foi constatado nas análises moleculares com SSR, em que a mesma espécie pode ser encontrada em vários grupos.

As características florais as que mais contribuíram para a variabilidade genética.

Os iniciadores heterólogos amplificaram-se na maioria das espécies analisadas, sendo possível utilizá-los em diversos estudos moleculares com espécies do gênero *Passiflora*.

Os marcadores SSR possibilitaram estimar a distância genética entre as espécies.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, P.P., Sousa, M.M., Santos, E.A., Pires M.V., Pires M.M., Almeida A.A.F. (2009) Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brasil. *Euphytica*, 166: 307–315.
- Alves, R.R., Carlos, L.C.C., Salomão, C., Siqueira, D.L., Cecon, P.R., Silva, D.F.P. (2012) Relações entre características físicas e químicas de frutos de maracujazeiro-doce *sweet passion fruit cultivated* in Viçosa, *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34: 619–623.
- Amaral Júnior, A.T., Viana, A.P., Gonçalves, L.S.A., Barbosa, C.D. (2010) Procedimentos Multivariados em Recursos genéticos vegetais. In: Pereira, T.N.S.(ed.). *Germoplasma: Conservação, Manejo e Uso no Melhoramento de Plantas*. Viçosa, MG, 205- 254.
- Anmarkrud, J.A., Kleven, O., Bachmann, L., Lifjeld, J.T. (2008) Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. *Bmc Evolutionary Biology*. 8: 1471-2148.
- Araújo, F.P., Silva, N., Queiroz, M.A. (2008) Genetic divergence among *Passiflora cincinnata* Mast accessions based on morphoagronomic descriptors. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30: 723–730.
- Asif, M., Mirza, J.I., Zafar, Y. (2008) High resolution metaphor agarose gel electrophoresis for genotyping with microsatellite markers, *Pak. J. Agri. Sci.* 45(1): 75–79.
- Ataíde, E.M., Oliveira, J.C., Ruggiero, C. (2012) Florescimento e frutificação do maracujazeiro silvestre *Passiflora setacea* DC., *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, 34: 377–381.

- Barbará, T., Palma-Silva, C., Paggi, G. M., Bered, F., Michael F., Lexer, C. (2007) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*. 16: 3759–3767.
- Bellon G., Faleiro, F.G., Peixoto, J.R., Junqueira, K.P., Junqueira, N.T.V., Fonseca, K.G., Braga, M.F. (2009) Variabilidade genética de acessos obtidos de populações cultivadas e silvestres de maracujazeiro-doce com base em marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal. 31(1): 197-202.
- Bellon, G., Faleiro, F.G., Junqueira, K.P., Junqueira, N.T.V. (2007) Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 29: 124-127.
- Bernacci, L.C., Soares-scott, M.D., Junqueira, N.T.V., Passos, I.R.S., Meletti, L.M.M. (2008) Revisão *Passiflora edulis* Sims : the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors), *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30: 566–576.
- Bernacci, L.C., Meletti, L.M.M. ,Soares-Scott, M.D. (2003) Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae) *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal. 25 (2): 102-105.
- Bianchi, V.J., Fachinello, J. C., Schuch, M.W., Sansavini, S. (2004) Caracterização molecular de cultivares de pessegueiro e nectarineira com microssatélites. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*, 26(3): 490-493.
- Borém, A., Caixeta, E.T. (2008) *Marcadores Moleculares*. 2ª ed. v. 1. 532 p.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3): 314–31.
- Bravo, J.P., Hoshino, A.A., Angelici, C.M.L.C.D., Lopes, C.R., Gimenes, M.A. (2006) Transferability and use of microsatellite markers for the genetic analysis of the germplasm of some *Arachis* section species of the genus *Arachis*. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 516-524.
- Bruckner, C.H., Meletti, L.M., Otoni, W.C., Junior, F.M.Z. (2002) Maracujazeiro. In: Bruckner, C.H. *Melhoramento de fruteiras tropicais*, Viçosa: UFV, 373-410.
- Bruckner, C.H., Suassuna, T.M.F., Rego, M.M., Nunes, E.S. (2005) Auto-incompatibilidade do maracujá implicações no melhoramento genético. In: Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F.. *Maracuja: germoplasma e melhoramento genético*. Embrapa Cerrados, Planaltina, 315 - 338.
- Cabral, P.D.S., Soares, T.C.B., Gonçalves, L.S.A., Amaral Júnior, A.T., Lima, A.B.P., Rodrigues, R., Matta, F.P. (2010) Quantification of the diversity among common bean accessions using Ward-MLM strategy. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45: 1124-1132.

- Campos, B.M. (2012) *Redes neurais artificiais e ward-mlm aplicados à análise da divergência genética em goiaba (Psidium guajava L.)*. Tese Mestrado. Campos dos Goytacazes, RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, UENF, 99p.
- Castro, J.A. (2012) *Conservação dos recursos genéticos de Passiflora e seleção de descritores mínimos para caracterização de maracujazeiro*. Tese Mestrado. Cruz das Almas, BA, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, UFRB, 84p.
- Castro, J.A., Neves, C.G., De Jesus, O.N., Oliveira, E.J. (2012) Definition of morpho-agronomic descriptors for the characterization of yellow passion fruit. *Scientia Horticulturae*, 145:17–22.
- Castro, J.A. (2012) *Conservação dos recursos genéticos de Passiflora e seleção de descritores mínimos para caracterização de maracujazeiro*. Tese de mestrado. Cruz das Almas, Universidade Federal do Recôncavo Bahiano, UFRB, 87p.
- Castro, A.P.G., Faleiro, F.G., Carvalho, D.D.C., Fonseca, K.G., Vilela, M.F., Junqueira, N.T.V., Cares, J. E. (2011) Genetic variability of *Passiflora* spp . from commercial fields in the Federal District , Brazil, *Ciência Rural*, Santa Maria, 41(6): 996-1002.
- Cazé A.L.R., Kriedt, R.A., Beheregaray, L.B., Bonatto S.L., Freitas, L.B. (2012) Isolation and characterization of microsatellite markers for *Passiflora contracta*. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 11343-11348.
- Cerqueira-Silva, C.B.M., Cardoso-Silva, C.B., Nonato, J.V.A., Corrêa, R.X., Oliveira, A.C. (2009) Genetic dissimilarity of “yellow ” and “sleep ” passion fruit accessions based on the fruits physical-chemical characteristics. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 9: 210–218.
- Cerqueira-Silva, C.B.M., Santos, E.S.L., Conceição, L.D.H.C.S., Cardoso-Silva, C.B., Pereira, A.S., Oliveira, A.C., Corrêa, R. X. (2012a) Genetic variation in a wild population of the “sleep” passion fruit (*Passiflora setacea*) based on molecular markers. *Genetics and molecular research*. 11(1): 731–738.
- Cerqueira-Silva, C.B.M., Santos, E.S.L., Souza, A.M., Mori, G.M., Oliveira, E.J., Corrêa, R.X., Souza, A.P. (2012b) Development and characterization of microsatellite markers for the wild South American *Passiflora cincinnata* (Passifloraceae). *American journal of botany*, 99(4): 170-172.
- Cervi, A.C. (2006). *O gênero Passiflora L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950*. Adumbrationes ad Summae Editionem 16: 1-5.
- Cervi, A.C., Milward-de-Azevedo, M.A., Bernacci, C. (2010) Passifloraceae. In: Forzza, R.C. et al. (eds.). Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000182>>. Acesso 20 Out 2012.

- Chaves, R.C., Junqueira, N.T.V., Manica, I., Peixoto, J.R., Pereira, A.V., Fialho, J.F. (2004) Enxertia de maracujazeiro-azedo em estacas herbáceas enraizadas de espécies de passifloras nativas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal. 26(1): 120 – 123.
- Costa, A.M., Tupinambá, D.D. (2005) O maracujá e suas propriedades medicinais - estado da arte. In: Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F. (Eds). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 474-501.
- Costa, A.F.S. (2008) *Recomendações técnicas para o cultivo do maracujazeiro*. Vitória: Incaper, 56p. (Documentos, 162).
- Costa, J.L., Jesus, O.N. De, Alvarenga, G., Oliveira, F., Oliveira, E.J. (2012) Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 12: 253–260.
- Crochemore, M.L., Molinari, H.B., Stenzel, N.M.C. (2003a) Caracterização agromorfológica do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 25(1): 5–10.
- Crochemore, M.L., Molinari, H.B.C., Vieira, L.G.E. (2003b) Genetic diversity in passion fruit (*Passiflora* spp.) evaluated by RAPD markers. *Braz. arch. biol. technol.*, 46: 521-527.
- Cruz, C.D., Carneiro, P.C.S. (2006) *Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético*. 2ª ed. Viçosa: UFV, 585p
- Cruz, C.D., Regazzi, A.J. (2004) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: UFV. 2ª edição revisada, 390p.
- Deginani, N.B. (2001) Las especies argentinas del género *passiflora* (*Passifloraceae*), *Darwiniana*, 39: 43–129.
- Doyle, J.J, Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12(1): 13-15.
- Falconer, D.S. (1987) *Introdução à genética quantitativa*. Trad. Martinho Almeida Silva, José Carlos da Silva. Viçosa: UFV, 279p.
- Faleiro, F.G. (2007) *Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 102p.
- Feuillet, C., Macdougall, J.M. (2007) *Passifloraceae*. In: Kubitzki, K. *The Families and Genera of Vascular Plants*. Springer, v. IX. Berlin, 270-281.
- Fischer, I.H., Rezende, J.A.M., Filho, N.N., & Silva, J.R. (2005) Ocorrência de *Nectria haematococca* em Maracujazais no Estado do Rio de Janeiro e Resistência de *Passiflora mucronata* ao Patógeno, *Fitopatologia brasileira* 30: 671-671

- Fonseca, A.F.A., Sediya, T., Cruz, C.D., Sakiyama, N.S., Ferrão, R.G., Ferrão, M.A.G., Bragança, S.M. (2004) Discriminant analysis for the classification and clustering of robusta coffee genotypes. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 4(3): 285-288.
- Fonseca, K.G., Faleiro, F.G., Peixoto, J.R., Junqueira, N.T.V., Silva, M.S., Bellon, G., Junqueira, K.P., Vaz, C.F. (2009) Análise da recuperação do genitor recorrente em maracujazeiro-azedo por meio de marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 31(1): 145-153.
- Franco J., Crossa J., Ribaut J.M., Betran J., et al. (2001) A method for combining molecular markers and phenotypic attributes for classifying plant genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 103: 944-952.
- Franco J, Crossa J, Villasenõr J, Taba S, et al. (1998) Classifying genetic resources by categorical and continuous variables. *Crop Sci*. 38: 1688-1696.
- Ganga, R.M.D., Ruggiero, C., Lemos, E.G.M., Grili, G.V.G., Gonçalves, M.M., Chagas, E.A., Wickert, E. (2004) Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares Aflp. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26(3): 494-498.
- Gomes, T.S., Chiba, H.T., Simionato, E.M.R.S., Sampaio, A.C. (2006) Seleção afruec, em função das condições de armazenamento dos frutos, *Alim.Nutri*. Araraquara, 17: 401–405.
- Gonçalves, M.G., Viana, A.P., Bezerra Neto, F.V., Pereira, M.G., Pereira, T.N.S. (2007) Seleção e herdabilidade na predição de ganhos genéticos em maracujá-amarelo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 42(2): 193-198.
- Gosmann, G., Provensi, G., Nardi, L., Maris, S., Rates, K. (2011) Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L (Passifloraceae), *Revista Brasileira de Biociências*, 9: 88–99.
- Gower, J.C. (1971) A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics*, 27: 623-637.
- Hansen, A.K., Gilbert, L.E., Simpson, B.B., Downie, S.R., Cervi, A.C., Jansen, R.K. (2006) Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. *Syst Bot*. 31: 138-150.
- IBGE (2011) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro, 2009. <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1181&z=t&o=11&i=P>. Acesso em 28/01/ 2013.
- Junqueira, K.P., Faleiro, F.G., Ramos, J.D., Bellon, G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F.(2007) Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares. *Revista Brasileira Fruticultura*, Jaboticabal, 29(3): 571-575.

- Junqueira, N.T.V., Braga, M.F., Faleiro, F.G., Peixoto, J.R., Bernacci, L.C. (2005) Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: Faleiro F.G., Junqueira N.T.V., Braga M.F. (Eds.), *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 81-108.
- Junqueira, N.T.V., Lage, D.A.C., Braga, M.D., Peixoto, J.R., Borges, T.A., Andrade, S.R.M. (2006) Reação a doenças e produtividade de um clone de maracujazeiro-azedo propagado por estaquia e enxertia em estacas herbáceas de passiflora silvestre. *Revista Brasileira Fruticultura*, Jaboticabal. 28(1): 97-100.
- Killip, E.P. (1938) *The American species of Passifloraceae*. Publ. /Field Mus. Nat. Hist., Bot. ser., 613p.
- Kobayashi, K., Horisaki, A., Niikura, S., Ohsawa, R. (2007) Diallel analysis of floral morphology in radish (*Raphanus sativus* L.). *Euphytica*. 158: 153-165.
- Krosnick, S.E., Freudenstein, J.V. (2005) Monophyly and Floral Character Homology of Old World Passiflora (Subgenus Decaloba : Supersection Disemma ) Monophyly and Floral Character Homology of Old World Passiflora (Subgenus Decaloba : Supersection Disemma ). 30(1): 139–152.
- Litt, M., Luty, L.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, Chicago, 44: 398-401.
- Liu K., Muse S.V. (2005) PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21: 2128-2129.
- MacDougal, J.M., Feuillet, C. (2004) Systematics. In: Ulmer, T. & MacDougal, J.M. (eds). *Passiflora: passionflowers of the world*. Portland, Timber Press. 27-31.
- Maciel, S.C., Nakano, D. H., Rezende, J.A.M., Vieira, M.L.C. (2009) Screening of passiflora species for reaction to cowpea aphid-borne mosaic virus reveals an immune wild species, *Sci. Agric.* 66(3):414–418.
- Mapa - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2008) *Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de Passiflora*. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 jan. 2013.
- Marim, B G., José, D., Crescêncio, P., Carneiro, S. (2003) Variabilidade genética e importância relativa de caracteres em acessos de germoplasma de tomateiro. *Pesq. agropec. bras., Brasília*, 44(1): 1283–1290.
- Martins, M.R., Oliveira, J.C., Orlando, A.O.M., Silva, P.C. (2003) Avaliação de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata*). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 25: 111–114.

- Meletti, L.M.M., Bernacci, L.C. Soares-Scott, M.D., Azevedo Filho, J.A., Martins, A.L.M. (2003) Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agronômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 25(2): 275-278.
- Meletti, L.M.M. (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira Fruticultura*, Jaboticabal. 33: 83-91.
- Meletti, L.M.M., Soares-Scott, M.D., Bernacci, L.C., Passos, I.R.S (2005) Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F. (Eds.) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. 55-78 p.
- Metais, I., Hamon, B., Jalouzot, R., Peltier, D. (2002) Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 1346-1352.
- Milward-de-Azevedo, M.A., Baumgratz, J.F.A. (2004) *Passiflora* L. subgênero Decaloba (DC.) Rchb. (Passifloraceae) na Região Sudeste do Brasil. *Rodriguésia*, 55(85): 17-54.
- Muschner, R.I.A.C., Lorenz, A.L.P., Cervi, A.R.C., Bonatto, S.A.L., Souza-Chies, T.T., Salzano, F.R.M., Freitas, L.O.B. (2003) First molecular phylogenetic analysis of passiflora (Passifloraceae). *American Journal of Botany*, 1229–1238.
- Muschner, V. C., Zamberlan, P. M., Bonatto, S. L., Freitas, L. B. (2012) Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology*. 35: 1036–1043.
- Nunes, T.S., Queiroz, L.P. (2001) A família Passifloraceae na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Sitientibus*. 1(1): 33-46.
- Nunes, T.S., Queiroz, L.P. (2007) Uma nova espécie de *Passiflora* L. (Passifloraceae) para o Brasil. *Acta bot. bras.* 21(2): 499-502.
- Oliveira, E.J., Vieira, M.L., Garcia, A.A.F., Munhoz, C.F., Margarido, G.R.A., Consoli, L., Matta, F.P., Moraes, M.C. (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.
- Oliveira, E.J., Pádua, J.G., Zucchi, M.I., Camargo, L.E.A., Fungaro, M.H.P., Vieira, M.L.C. (2005) Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Molecular Ecology Notes*, 5(2): 331–333.
- Oliveira, E.J., Pádua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R., Vieira, M.L.C. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites, *Genetics and Molecular Biology*. 29: 294–307.

- Oliveira, E.J. (2006) *Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para a construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg)*. Tese (Doutorado em Agronomia. Piracicaba São Paulo. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 153 p, 2006.
- Ortiz, D.C., Bohórquez, A., Duque, M.C., Tohme, J., Cuéllar, D., Vásquez, T.M. (2011) Evaluating purple passion fruit (*Passiflora edulis Sims f. edulis*) genetic variability in individuals from commercial plantations in Colombia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(6): 1089–1099.
- Padilla, G., Cartea, M.E., Ordaz, A. (2007) Comparison of Several Clustering Methods in Grouping Kale Landraces. *J. Amer.Soc.Hort.Sci.* 132(3): 387–395.
- Pádua, J.G. (2004) *Análises Genéticas de Espécies do Gênero Passiflora L. com base em Abordagens Filogenéticas, Morfométricas e em Marcadores Microssatélites*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz- Piracicaba - SP. 120p.
- Pádua, J.G., Oliveira, E.J., Zucchi, M.I., Oliveira, G.C.X., Camargo, L.E.A., Vieira, M.L.C. (2005) Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: Passifloraceae). *Molecular Ecology Notes*. 5: 863-865.
- Paula, M.S, Fonseca, M.E.N, Boiteux, L.S., Peixoto, J. R. (2010) Caracterização genética de espécies de *Passiflora* por marcadores moleculares análogos a genes de resistência. *Rev. Bras. Frutic.* 32(1): 222-229.
- Pereira, V.M., Borges, C.V., Brandão, L.P., Oliveira, L.S. (2012) Genetic diversity between improved banana diploids using canonical variables and the Ward - MLM method, *Pesq. Agropec. Bras.* 47(10): 1480–1488.
- Perez J.O., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Restepo, M., Jarvis, A., Solazar, M., Caetano, C. (2007) Diversity of Colombian Passifloraceae biogeography and an updated list for conservation. *Biota Colomb*, 8(1): 1-45.
- Pérez-Almeida, I., Vásquez, S., Pérez, D., & Salazar, E. (2010) Genetic diversity in six species of *Passiflora* spp. using RAPD. *Introducción. Rev. Fac. Agron. (LUZ)*.27: 347–359.
- Primmer, C.R., Painter, J.N., Koskinen, M.T., Palo, J.U., Merila, J. (2005) Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal Avian Biology*. 36: 348–360.
- Reis, R.V., Viana, A.P., Oliveira, E.J., Silva, M.G.M. (2012) Phenotypic and molecular selection of yellow passion fruit progenies in the second cycle of recurrent selection. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 12: 17-24.
- Reis, R.V., Oliveira, E.J., Viana, A.P., Pereira, T.N.S. (2011) Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro-amarelo detectada por marcadores microssatélites, *Revista Brasileira de Fruticultura*, 46: 51–57.

- Roncatto, G., Oliveira, J.C.D.E., Ruggiero, C., Nogueira, G.C., Aparecida, M., Da, P., Centurion, C. et al. (2004) Comportamento de maracujazeiros (*Passiflora* spp.) quanto à morte. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*.26: 552–554.
- Salla, M.F.S., Ruas, C.F., Ruas, P.M., Carpentieri-Pipolo, V. (2002) Uso demarcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.), *Revista Brasileira de Fruticultura*. 24(1): 15-22.
- Santos, E.A., Souza, M.M., Abreu, P. P., Da Conceição, L.D.H.C.S., Araújo, I.S., Viana, A.P., Almeida, A.-A.F. (2011a) Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) for ornamental use. *Euphytica*, 184(3): 389–399.
- Santos, E.A, Souza, M.M., Viana, A.P., Almeida, A.A.F., Freitas, J.C.O., Lawinsky, P.R. (2011b) Multivariate analysis of morphological characteristics of two species of passion flower with ornamental potential and of hybrids between them. *Genetics and molecular research*. 10: 2457–2471.
- Santos, L.F., Oliveira, E.J., Silva, A.S., Carvalho, F.M., Costa, J.L., Pádua, J.G. (2011) ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. *Biochemical genetics*, v.49: 540–554.
- SAS Institute (2003) SAS language and procedures: Usage. *Version SAS 9.1.3* SAS Institute, CD-ROM. Cary.
- Schlötterer, C. (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, Berlin, 109: 365-371.
- Schlötterer, C. (2004) The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nat. Rev. Genet.* 5: 63-69.
- Sefc, K.M., Guggenberger, S., Regner, F., Lexer, C., Glossl, J., Steinkellner, H. (1998) Genetic analysis of grape berries and raisins using microsatellite markers. *Vitis*. 37: 123-125.
- Selkoe, K.A, Toonen, R.J. (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters*. 9(5): 615–29.
- Sibov, S.T., Souza Jr, C.L., Garcia, A.A.F., Garcia, A.F., Silva, A.R., Mangolin, C.A., Benchimol, L.L., et al. (2003) Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers . Map construction and localization of loci. *Hereditas*, 106: 96–106.
- Silva, M.G.M., Viana, A.P., Gonçalves, G.M., Amaral Júnior, A.T., Pereira, M.G. (2009) Seleção recorrente intrapopulacional no maracujazeiro amarelo: alternativa de capitalização de ganhos genéticos. *Ciência e Agrotecnologia*. 33: 170-176.

- Silva, M.G.M. Viana, A.P., Amaral Júnior, A.T., Gonçalves, L.S.A., Reis, R.V. (2012) Biometria aplicada ao melhoramento intrapopulacional do maracujazeiro amarelo. *Rev. Ciênc. Agron.* 43(3): 493-499.
- Sousa, L.B.D.E., Silva, E.M., Lucia, R., Gomes, F., Celis, A., Lopes, D.E.A., Cristina, I. (2012) Caracterização e divergência genética de acessos de *Passiflora edulis* e *P. cincinnata* com base em características físicas e químicas de frutos. *Revista Brasileira de Fruticultura.* 34: 832–839.
- Souza, M.M., Pereira, T.N.S., Carneiro, M.L. (2008) Cytogenetic Studies in Some Species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): A Review Emphasizing *Brazilian Species*, 51: 247–258.
- Suassuna, T.M.F., Bruckner, C.H., Carvalho, C.R., Borém, A. (2003) Self-incompatibility in passion fruit: evidence of gametophytic-sporophytic control. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 298-302.
- Sudré, C.P., Gonçalves, L.S.A., Rodrigues R., Amaral Júnior, A.T. (2010) Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. *Genet. Mol. Res.* 9: 283-294.
- Tangarife, M.M.M., Caetano, C.M., Tique, C.A.P (2009). Caracterización morfológica de especies del género *Passiflora* de Colombia. *Acta Agron.* 58 (3): 117-125.
- Ulmer, T., McDougal, J.M. (2004) *Passiflora*: Passionflowers of the World. 276p.
- Valls, J.F.M.(2007) Caracterização de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L.L. (Ed.). *Recursos genéticos vegetais*. Brasília: Embrapa. 281-305.
- Vanderplank, J. (2000) *Passion flowers*. 3ª ed. Cambridge: The MIT Press. 224p.
- Varshney, R.K., Graner, A., Sorrells, M.E. (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnology.* v. 23: 48-55.
- Viana, A.J.C., Souza, M.M., Araújo, I.S., Corrêa, R.X. (2010) Genetic diversity in *Passiflora* species determined by morphological and molecular characteristics. *Biol. Plant.* 54: 535-538.
- Viana, A.P., Detmann, E., Pereira, M.G., Nair, T., & Pereira, S. (2007) Polinização seletiva em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) monitorada por vetores canônicos. *Ciência Rural.* 37: 1627–1633.
- Viana, A.P., Gonçalves, G.M. (2005) Genética quantitativa aplicada ao melhoramento genético do maracujazeiro. In: Fábio Gelape Faleiros, Nilton Tadeu Vilela Junqueira, Marcelo Fidelis Braga, (Org.). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. 1 ed. Brasília: EMBRAPA. 1: 277-294.
- Viana, A.P., Pereira, T.N.S., Pereira, M.G., Amaral Júnior, A.T., Souza, M.M. e Maldonado, J.F.M. (2004) Parâmetros genéticos em populações de maracujazeiro-amarelo. *Revista Ceres, Viçosa,* 51: 545-555.

- Viana, A.P., Pereira, T.N.S., Pereira, M.G., Souza, M.M., Aldonado, J.F.M., Amaral Jr, A.T. (2003) Genetic diversity among yellow passion fruit commercial genotypes and among *Passiflora* species using RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25(3): 489-493.
- Vicente, M.C., Guzmán, F.A., Engels, J., Ramanatha, R.V. (2005) Genetic characterization and its use in decision making for the conservation of crop germplasm. In: The role of biotechnology. *Proceedings*, 121-128.
- Ward Junior, J.H. (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 58: 236-244.
- Weber, J.L. (1990) Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, San Diego, 7: 524-530.
- Yockteng, R., Nadot, S. (2004) Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (ncpGS). *Mol Phylogenet Evol.* 31: 379–396
- Zamberlan, P.M. (2007) Filogenia de *Passiflora* L. (Passifloraceae): questões infra-subgenéricas. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 105p.