



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE AGRONOMIA
CAMPUS II-AREIA-PB

DIVERSIDADE GENÉTICA EM FAMÍLIA DE MEIO-IRMÃOS DE *Passiflora morifolia* Mast. ACESSADA POR RAPD.

FRANCISCA WILCA DE FRANÇA SOUZA

AREIA, PB
DEZEMBRO, 2015

FRANCISCA WILCA DE FRANÇA SOUZA

DIVERSIDADE GENÉTICA EM FAMÍLIA DE MEIO-IRMÃOS DE *Passiflora morifolia* Mast. ACESSADA POR RAPD.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Campus II – Areia – PB, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de **Engenheira Agrônoma**.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Maílson Monteiro do Rêgo.

**AREIA, PB
DEZEMBRO, 2015**

FRANCISCA WILCA DE FRANÇA SOUZA

DIVERSIDADE GENÉTICA EM FAMÍLIA DE MEIO-IRMÃOS DE *Passiflora morifolia* Mast. ACESSADA POR RAPD.

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Comissão Examinadora em:
11/ 12/ 2015

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Maílson Monteiro do Rêgo.
Orientador- CCA,UFPB

MSc. Angela Maria dos Santos Pessoa
Examinadora

MSc. Karialane da Silva Belarmino
Examinadora

AREIA, PB
DEZEMBRO, 2015

Pensamentos valem e vivem pela observação exata ou nova, pela reflexão aguda ou profunda; não menos querem a originalidade, a simplicidade e a graça do dizer.

Machado de Assis

Sumário

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1 GERAL	2
2.2 ESPECÍFICOS	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1 Variabilidade genética do gênero Passiflora	3
3.2 Maracujazeiro	3
3.3 Uso ornamental das passifloras	4
3.4 Quantificação da diversidade genética por meio de RAPD	4
4. MATERIAL E MÉTODOS	5
4.1 Local do experimento	5
4.2 Extração e quantificação do DNA genômico de P. morifolia	6
4.3 Reação RAPD	8
4.4 Separação dos fragmentos amplificados por eletroforese em gel	9
4.5 Análise multivariada da diversidade genética	9
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
6. CONCLUSÕES	16
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<i>Figura. 1. Semeio de P. morifolia.....</i>	<i>5</i>
<i>Fig. 2. Semeio de P. morifolia.....</i>	<i>5</i>
<i>Fig. 3. a, b ,c e d- Transplântio de mudas de P. morifolia.....</i>	<i>6</i>
<i>Fig. 4. Perfil eletroforético de DNA genômico de 22 acessos de P. morifolia Mast. em gel de agarose (0,8%) colorido com brometo de etídio.....</i>	<i>11</i>
<i>Fig. 5. Perfil eletroforético dos 22 acessos de P. Morifolia Mast. após a reação de RAPD com o primer UB-07 (setas apontam polimorfismo).....</i>	<i>12</i>
<i>Fig. 6. Diversidade genética dentro da família de MI de P. morifolia. Dendrograma dos 22 acessos, obtido pelo método WARD baseado nos dados de dissimilaridade genética obtidos pelo complemento aritmético dos coeficientes de similaridade de Jaccard, utilizando-se 16 marcadores RAPD.....</i>	<i>14</i>
<i>TABELA 1. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizadas para a amplificação de DNA da Família de Meio-irmãos de P. morifolia por meio da técnica RAPD.....</i>	<i>8</i>
<i>TAB. 2. Número total de fragmentos amplificados, porcentagem de fragmentos polimórficos e monomórficos para cada primer.....</i>	<i>11</i>
<i>TAB. 3. Matriz de dissimilaridade genética, usada como base para geração de dendrograma dos acessos de P. morifolia Mast.....</i>	<i>13</i>
<i>TAB. 4. Correlação Cofenética baseado nos dados moleculares (RAPD) avaliados nos 22 acessos de P. morifolia.....</i>	<i>14</i>

DEDICATÓRIA

A Deus,

Por ter me concedido o dom da vida;

Aos meus pais Francisco Mauro de Souza e Maria de Lourdes de França Souza,

Aos meus irmãos Elizan, Jacó, Cícero, Maria Ilma, Chagas e Mauro Filho

Aos amigos e amigas que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as minhas conquistas, sem esquecer que a luta é uma parte importante em minha caminhada.

À Universidade Federal da Paraíba, em especial ao Centro de Ciências Agrárias, a Coordenação do Curso de Agronomia e todo o corpo de docentes, pelas experiências adquiridas ao longo do curso.

Aos meus pais Francisco Mauro de Souza e Maria de Lourdes de França pelo o amor, apoio e educação que me proporcionaram a realização dos meus objetivos.

Aos meus queridos (as) irmãos (ãs):Elizan, Jacó, Cícero, Maria Ilma ,Chagas e Mauro Filho, obrigada pelo carinho e paciência nos momentos que mais necessitei.

Aos meus adorados sobrinhos (as): Francisco Ednardo, Maria Edinéia, Antônio Édson, Eulália Aparecida, Antônio Jonas, Antônia Eduarda, Cícero Eduardo, Jhonata, Joanda, Thaynar, Cristopher Henzo, Maria Clara e meu sobrinho neto Ernades Neto.

A minha cunhada Maria da Conceição.

Ao meu querido cunhado José Ernandes Fernandes de Freitas (*in memorian*);

Enfim a todos os meus familiares;

Ao meu orientador: Dr. Maílson Monteiro do Rêgo e co-orientadora Dra. Elizanilda Ramalho do Rêgo pela confiança e valiosa orientação;

As minhas amigas-irmãs que o Curso de Agronomia me deu Luciana Gomes e Liliana Cardoso obrigada pela amizade, carinho e companheirismo de todos os dias.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal: Michelle, Cristine, Angela, Fernanda, Kaline, Maiara, Bruna, Laís, Lindamara, Priscila, Gláucia, Giovana, Aline, Márcia, Ana Paula,Manoel Júnior, David Kleberon,Ayron, Joelson, Klint, Marcelo, Laertty e Marcos.

Aos colegas da turma 2010.2: Geovana, Mirelly, Roberto, Alexandre, Michelle, Cristine, Dayane (Daya), Izabela, Immy, Kerollen, Raniérica, Haron, Renan, Wagner, Saymon, Édson, Adauto, Everton, Edcarlos, Alex, Otto e Eduardo.

As amigas de quarto da casinha: Cleide Panca e Kleitiane o meu eterno obrigado pelo apoio que me deram ao ingressar no CCA. Também a Ana Jaqueline (jaque), Cintya Ionária, Camila Ingrid, Natália Rodrigues.

As amigas de quarto alojamento G -3: Gilmara Rayssa (Gilmars), Franciane Araújo, Adailma Moura, Gabriella Cavalcante, Laíla Fionally, Rosivânia (Rosy).

As (os) amigas (os): Luana Magna (Luanes), Jucineide Figueiredo, Andreza Fernandes, Iolanda Costa, Bruna Laís, Rayana Oliveira, Renally D'Ângelis, Márcia Neves, Claudiana Pereira, Luane, Camila Alexandre, Maria Amália, Patrícia Abraão, Amanda Tomaz, Catarina Carvalho, Daniela Gomes, Lidiane Cordeiro, Jádison Carlos, Willian Guimarães, Daniel Júnior (Galetão), Antonio Honório, Ronaldo (Fernando), Uanderson, Pedro Neto, João Paulo, Felipe Sales.

Aos funcionários do Museu da Rapadura-Areia, Pb: José Carlos (Cabrinha), Sr. Sebastião (Seu Bastinho) e Maria José (D. Zezé). O meu sincero obrigado pelo carinho, atenção e amizade.

Aos pais das minhas amigas Liliana, Gilmara, Luciana, Michelle, Cristine, Geovana, e Adailma, obrigada pelo carinho, receptividade.

SOUZA, F. W. F. **DIVERSIDADE GENÉTICA DENTRO DE FAMÍLIA DE MEIO-IRMÃOS DE *Passiflora morifolia* Mast. ACESSADA POR RAPD.** UFPB, 29 p., 2015, Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba.

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo estudar a diversidade genética dentro de uma família de meio-irmãos (MI) de *Passiflora morifolia* Mast. utilizando-se marcador RAPD. O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Foram avaliadas 22 plantas da família de MI da espécie silvestre de *P. morifolia*. Foi realizada a coleta das folhas jovens do material genético, das quais foram extraído o DNA genômico, utilizando o método do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). As amostras foram quantificadas em gel de agarose a 0,8%. Após a purificação do DNA genômico com RNase e proteinase K, foram conduzidos os ensaios de RAPD utilizando-se 16 sequências de oligonucleotídeos. A presença da banda foi codificada como (1) e sua ausência (0), constituindo uma matriz de dados binários (0 e 1), a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre os acessos com base no coeficiente de similaridade de Jaccard e os agrupamentos para gerar o dendrograma foram construídos pelo método de Ward. A análise de dispersão gráfica foi realizada através do software Darwin. As reações de RAPD amplificaram 885 fragmentos (frag) destes, 504,45 foram polimórficos, o que corresponde respectivamente ao total de 57% de fragmentos polimórficos. Há variabilidade genética entre os 22 indivíduos da família de meio-irmãos de *P. Morifolia* e sugere-se o cruzamento entre os acessos 12 e 10, por serem os mais divergentes.

Palavras-chaves: Polimorfismo, *Primers*, Recursos Genéticos e *Passiflora*.

SOUZA, F. W. F. **GENETIC DIVERSITY WITHIN *Passiflora* HALF- BROTHERS FAMILY *Passiflora morifolia* Mast. ACCESSED BY RAPD.** UFPB, p 29, 2015 Monograph (Graduation in Agronomy) – Universidade Federal da Paraíba.

ABSTRACT

This study aimed to study the genetic diversity within a family of half-siblings (MI) *Passiflora morifolia* Mast. using RAPD marker. The experiment was conducted in a greenhouse belonging to the Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal da Paraíba (UFPB). We evaluated 22 MI Family plants of wild species *P. morifolia* Mast. collecting the genetic material of young leaves was conducted, from which genomic DNA was extracted using the method of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). The samples were quantified on agarose gel 0.8%. After purification of genomic DNA with RNase and proteinase K, RAPD tests using 16 oligonucleotide sequences were conducted. The presence of the band was coded as (1) and its absence (0), providing an array of binary data (0 and 1), from which they were estimated genetic distances between accessions based on Jaccard similarity coefficient and clusters to generate the dendrogram were built by Ward method. The graphic dispersion analysis was performed using the Darwin software. The RAPD reactions amplified fragments 885 (frag.) thereof, 504,45 were polymorphic, corresponding respectively to total 57 % of polymorphic fragments. There is genetic variability among 22 individuals of the family stepbrothers *P. morifolia* and suggested the crossing between accessions 12 and 10, being the most divergent.

Keywords: Polymorphism, *Primers*, Genetic Resources and *Passiflora*.

1. INTRODUÇÃO

Entre as espécies silvestres do gênero, encontra-se a *P. morifolia* Mast. também conhecida como maracujá-peludo (BERNACCI; VITTA, 1999), pertencente ao subgênero *Decaloba*, de ocorrência naturalmente na Guatemala, México, Venezuela, Bolívia, Colômbia, Brasil, Equador, Peru, Paraguai e Argentina (VANDERPLANK, 2000; MILWARD-DE-AZEVEDO; BAUMGRATZ, 2004).

Na região sudeste do Brasil ela é encontrada em áreas de cerrado e de floresta pluvial submontanhosa, não apresentando diferenciação quanto à morfologia foliar (MILWARD-DE-AZEVEDO; BAUMGRATZ, 2004). Apresenta belas flores brancas, de tamanho médio, com corona de coloração arroxeadada, o que confere à espécie, juntamente com seu porte intermediário, características favoráveis ao cultivo em vasos para ornamentação de interiores (VANDERPLANK, 2000; MILWARD-DE-AZEVEDO; BAUMGRATZ, 2004).

O estudo da diversidade genética é uma atividade de grande relevância para o melhoramento de plantas e também para a conservação de muitas espécies. Através desse conhecimento, torna-se possível identificar acessos contrastantes, com características de interesse, como fontes de resistência a doenças e alta produtividade, além de permitir a realização de cruzamentos promissores, para posteriormente, serem utilizados nos programas de melhoramento (CRUZ E CARNEIRO, 2006). Ainda segundo 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.

Dentro deste contexto, foi avaliada a diversidade genética de 22 acessos de uma família de meio-irmãos de *P. morifolia* Mast. usando marcador RAPD.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade genética dentro da família de meio-irmãos de *Passiflora morifolia* Mast. usando marcador RAPD.

2.2. ESPECÍFICOS

Plantar e conduzir 22 acessos de *P. morifolia* em casa de vegetação;

Isolar o DNA genômico de *P. morifolia* a partir de tecido foliar;

Fazer as reações em cadeia de polimerase usando *primers* RAPD e

Estimar diversidade genética da família de meio-irmãos de *P. morifolia*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Variabilidade genética do gênero passiflora

O Brasil é o centro de diversidade das passifloras, possuindo ampla variabilidade genética (GANGA et al., 2004), e, entre as espécies silvestres encontradas no país, algumas possuem características de interesse que podem ser introduzidas nas espécies comerciais, via melhoramento (JUNQUEIRA et al., 2007).

P. morifolia pertence ao gênero Passiflora e a família Passifloraceae, o mais importante e também o mais rico da família. Com um número de espécies que o compõe bastante expressivo variando de 521 (FEUILLET e MACDOUGAL, 2003) a 537 espécies (VANDERPLANK, 2007).

Segundo Vanderplank (2000), o gênero é formado por plantas trepadeiras herbáceas ou arbustivas e, em alguns casos, eretas. Possuindo o caule cilíndrico ou quadrangular, ramificado, anguloso, suberificado, glabro ou piloso. Possuem folhas de tamanho e formas variadas, alternadas, simples ou compostas, inteiras ou lobadas, frequentemente, com nectários no pecíolo, na lâmina da folha ou nas estípulas (FEUILLET e MACDOUGAL, 2007). As gavinhas são, geralmente, solitárias e se desenvolvem nas axilas das folhas, porém são ausentes em espécies lenhosas (CUNHA et al., 2002).

3.2. Maracujazeiro

O maracujá amarelo (*P. edulis* f. *edulis*) e o doce (*P. alata* Ait), geralmente são os únicos utilizados como atividade econômica. No entanto, há que atentar-se para o número de espécies existentes, sendo que um estudo acurado nas coleções poderá indicar outras opções, seja para introduzir outra espécie nos sistemas de produção, seja no uso de genes de espécies silvestres ou selvagens no melhoramento das espécies cultivadas.

A inserção de espécies silvestres em programas de melhoramento é uma das maneiras para solucionar problemas de resistência a doenças, pragas, dentre outros. Essas espécies podem conter genes de resistência a doenças e características agronômicas de interesse não encontradas no maracujazeiro cultivado (FALEIRO et al., 2004). Dessa forma, estudar a diversidade genética existente no gênero do maracujá com base em características agronômicas é de interesse para o melhoramento e possibilita a identificação de acessos superiores e contrastantes, indicando possíveis cruzamentos promissores.

3.3. Uso ornamental das passifloras

O uso das passifloras como planta ornamental é citado desde o século XIX, e hoje tem se destacado em muitos países no mercado de mudas híbridas (ULMER; MACDOUGAL, 2004; VANDERPLANK, 2000). No Brasil, o potencial das passifloras como planta ornamental é praticamente inexplorado, embora sejam plantas de clima essencialmente tropical, não exigindo, assim, nenhuma prática mais onerosa como a construção de estufas especiais, como é feito em países de clima não tropical, a exemplo dos Estados Unidos, que cultivam essas espécies em jardins, muros, cercas, pergolados e estufas (ABREU et al., 2008).

Muitas espécies também são apreciadas no mundo inteiro pelo seu valor ornamental, sendo suas sementes amplamente comercializadas, principalmente na América do Norte e continente Europeu (SOUZA; PEREIRA, 2003). As flores das Passifloras são consideradas exóticas e complexas, algumas de coloração forte e brilhante, outras de coloração suave e marcante, devido, principalmente, à presença da coroa, que caracteriza a família Passifloraceae. Igualmente fascinante é a ampla variedade de formatos de folhas dentro do gênero, tendo muitas espécies valor ornamental em função da sua folhagem (ABREU et al., 2008).

No Brasil o potencial ornamental das passifloras não é muito explorado, porém, em outros países do Hemisfério Norte foram registrados mais de 400 híbridos com fins ornamentais (Peixoto, 2005). As flores de passiflora são fascinantes devido à sua coloração forte e brilhante ou suave e marcante. Isso faz com que sejam consideradas exóticas e complexas. Outra característica importante à ornamentação é a ampla variedade de formatos de folhas (CRUZ et al., 2008) e muitas espécies possuem seu valor comercial baseado nas folhagens (SOUZA et al., 2003a).

3.4. Quantificação da diversidade genética por meio de RAPD

Para quantificar a diversidade genética são utilizados diversos métodos. Dentre estes, as técnicas de marcadores moleculares, particularmente o polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), combinado com métodos multivariados tem-se mostrado promissor nos estudos de diversidade genética. Este marcador apresenta como principais vantagens sua simplicidade na utilização, baixo custo e a rapidez nas gerações dos resultados (VIEIRA et al, 2010; RODRIGUES e COSTA, 2011). Sua principal desvantagem é baixa reprodutibilidade dos resultados, de um laboratório para outro.

Marcadores moleculares são utilizados frequentemente no estudo de diversidade da variabilidade genética do maracujazeiro, por meio da técnica de RAPD, tendo em vista que esta técnica apresenta uma grande capacidade de acessar as informações do genoma da espécie, pela facilidade e rapidez de execução, bem como sua eficiência e confiabilidade dos resultados obtidos (FALEIRO, 2007; VIANA et al., 2003; BELLON, 2008; VILELA, 2013). Teoricamente o número de marcadores genéticos é ilimitado e o genótipo de uma planta pode ser determinado em um estágio de desenvolvimento precoce, desde que, haja material suficiente para a extração do DNA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Foram semeadas 90 tubetes com sementes de *P. morifolia*, quando plântulas foram transferidas para vasos e em seguida levados à casa de vegetação.

Foram preenchidos a princípio 40 tubetes com substrato, em cada um deles foram semeadas 02 sementes no dia 27 de novembro de 2013 (figura 1) e no dia 27 de dezembro de 2013 foram preenchidos mais 50 tubetes com 03 sementes cada (fig. 2). No entanto, dessas sementes postas a germinar apenas 37 plantas germinaram, salientando que não foi realizado nenhum procedimento para induzir a quebra de dormência.



Semeio de *P. morifolia*.



Fig. 2- Semeio de *P. morifolia*.

No dia 24 de março de 2014 foi realizado o transplantio das mudas dos tubetes para os vasos pequenos, os quais foram completados com substrato. A sequência de figuras (Fig. 3) a seguir mostra como foi realizado o processo de transplantio. No dia 17 de março as plantas foram levadas à estufa com auxílio de tutoramento confeccionado

com fios de telefone e barbante. E no dia 7 de julho foi aplicada solução nutritiva nas plantas.

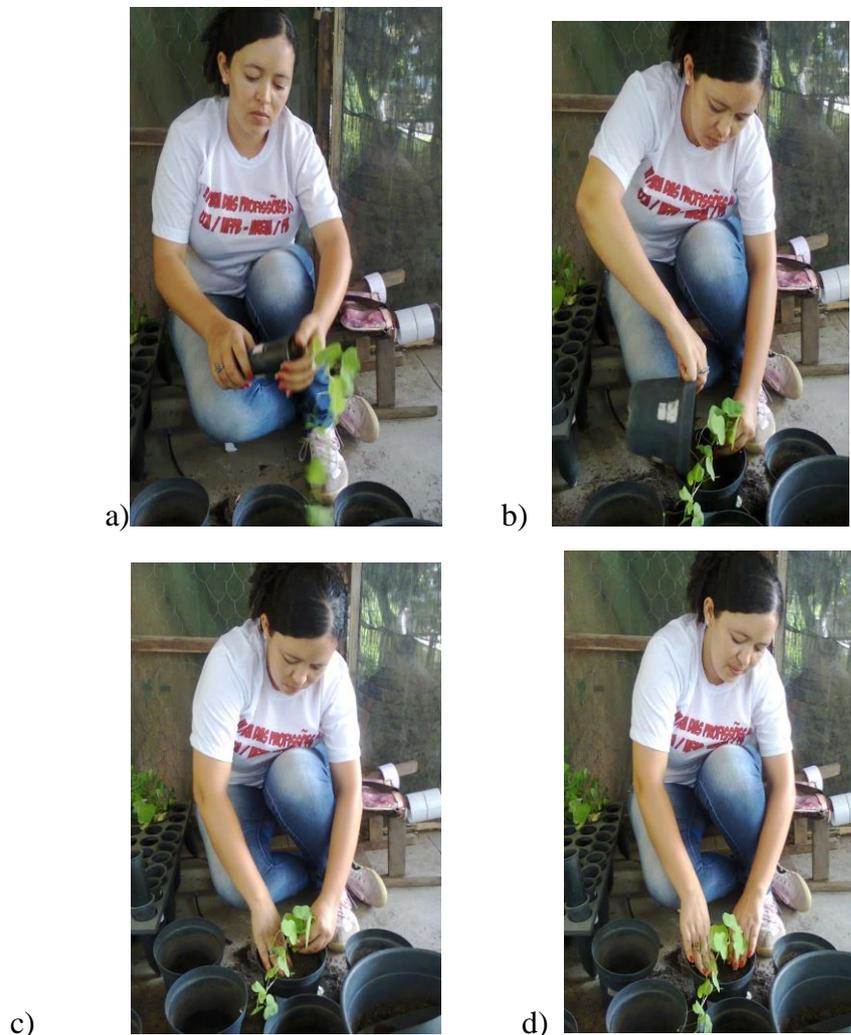


Fig. 3. a, b, c e d- Transplântio de mudas de *P. morifolia*.

4.2. Extração e quantificação do DNA genômico de *P. morifolia*

A análise da diversidade genética entre os acessos foi realizada com base na caracterização molecular, utilizando-se a técnica RAPD (do inglês, *Randomly Amplified Polymorphic DNA*). Foram avaliadas 22 plantas da família de meio-irmãos (MI) da espécie silvestre *P. morifolia* da coleção de Passifloras do Laboratório de Biotecnologia Vegetal.

O método utilizado foi de Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB), segundo protocolo descrito por (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998), e gel de agarose a 0,8% e visualizadas sobre luz ultravioleta.

Cerca de 200 mg de tecido vegetal de cada planta da família de MI, foi macerada em nitrogênio líquido usando almofariz e pistilo até formar um pó, que foi depositado em tubos de Eppendorf de 1,5 µL, os quais receberam identificação individual. Em cada tubo foi adicionado 700 µL do tampão de extração TBE 0,5x, agitados por 1 minuto. Este material foi levado ao banho-maria a 65°C por 30 minutos, homogeneizando-os manualmente a cada 10 minutos por aproximadamente 1 minuto.

Em seguida, o material foi retirado do banho-maria, permanecendo em temperatura ambiente, a fim de que ocorra o resfriamento do mesmo. Após o resfriamento, foi adicionado em cada tubo Eppendorf, 600 µL de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico). O conteúdo dos tubos foi homogeneizado manualmente, invertendo-se cuidadosamente por aproximadamente 1 minuto. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 13.400 rpm durante 10 minutos. Com cuidado, os tubos foram retirados da centrífuga, e transferidos 600µL do sobrenadante para um tubo novo, em cada tubo, foi adicionado 500 µL de CIA e depois homogeneizados novamente por inversão.

Em seguida, foram centrifugados a 13.400 rpm durante 5 minutos, e transferida a fase superior (\pm 400µL) para um novo tubo e foi adicionados 40µL do volume do tampão de lavagem [10g CTAB; NaCl 1,4 M 8,4g e 100ml destilada] e homogeneizado por inversão durante 5 minutos.

Após a homogeneização, foram adicionados 500 µL de CIA e centrifugado novamente a 13.400 rpm por 5 minutos. Transferindo-se 280µL do sobrenadante para um novo tubo e adicionando-se 185µL de isopropanol, misturando-se levemente. Em seguida, foi centrifugado a 13.400 rpm por 5 minutos para formação do pellet no fundo do tubo. Logo após foi descartado o sobrenadante e adicionado 1µL de etanol a 70%, deixando-se os tubos Eppendorf sobre a bancada por 10 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi descartado. Esta operação foi repetida por duas vezes. Em seguida, foram adicionados 1µL de etanol absoluto e centrifugado 13.400 rpm por 2 minutos.

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e deixado sobre a bancada para secagem completa do pellet. Para finalizar essa etapa da extração do DNA, foram adicionados 50 µL de tampão de extração (TE) para ressuspender o pellet e os tubos foram armazenados a -20°C até serem usados nas reações de RAPD. As amostras foram quantificadas em gel de agarose a 0,8% e visualizadas sobre luz ultravioleta.

4.3. Reação RAPD

Na obtenção dos marcadores RAPD, foram utilizados 16 *primers* (Tabela 1) para avaliar a diversidade genética da família de Meio-irmãos de *P. morifolia*.

Para as reações de amplificação do DNA foi conduzido com um volume final de 25µL, sendo 23 µL de Master Mix (Tampão TBE 0,5x 60µL+ MgCl 36µL+ dNTP12µL + primer 60µL + Taq DNA polimerase 4,8µL + H2O DDA 379,2µL) e 2 µL de DNA genômico da amostra, numa concentração de 5ng/µL.

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizadas para a amplificação de DNA da Família de Meio-irmãos de *P. morifolia* por meio da técnica RAPD.

Primer	Sequência de bases (5'-3')
UB- 01	AGACGGCTCC
UB- 02	GTTCGGAACC
UB- 03	GGGCGACTAC
UB- 04	GTGCGCAATG
UB- 05	TCGCATCCAG
UB- 06	CAGAAGCGGA
UB- 07	CACAGCGACA
UB- 08	CAAAGCGCTC
UB- 09	TCCCCATCAC
UB- 10	TGCGGGTCCT
UB- 11	CAGGATTCCC
UB- 12	GTGGAGTCAG
UB- 13	AAGTCCGCTC
UB- 14	CAGCACTGAC
UB- 15	GACAGGAGGT
UB- 16	GGCTGCAGAA

As amplificações foram feitas em um termociclador (Techne TC-Plus Bibby Scientific Ltd.), com 1º ciclo a 94°C por 5 minutos, com a seguinte programação: 30 ciclos, sendo: 94°C por 5 minutos; 94°C por um minuto; 36°C por 1 minuto; 72°C por 2 minutos) e, finalmente, o último ciclo com 72°C por 5 minutos. Logo após a amplificação as amostras foram armazenadas a -20°C até serem utilizadas.

4.4. Separação dos fragmentos amplificados por eletroforese em gel

Para a confecção do gel de eletroforese, foi utilizada uma alíquota de 10 µL dos produtos amplificados na reação de RAPD que foram transferidos para tubos Eppendorf e adicionados 2µL de tampão de carregamento (4g de glicose + 0,025g de azul bromofenol + 0,025g de xileno cianol + 10 µL de água destilada).

Em seguida foram aplicados com uma pipeta de 10 µL em cada poço do gel de agarose a 1,5% [ml tampão TBE 10x; 1,08g de agarose; 0,06µL de brometo de etídio (10 mg/mL). Foi utilizado como marcador de peso molecular de DNA, 5 µL de DNA Ladder – 1kb(Ludwig Biotec), o qual foi aplicado no primeiro poço à esquerda de cada gel, como o padrão de peso molecular(figura. 2). A condição de corrida da eletroforese foi a 70 volts por aproximadamente duas horas. O gel foi visualizado em transiluminador T26M UV 302nm e a imagem capturada em sistema de fotodocumentação Easy Doc 200.

4.5. Análise multivariada da diversidade genética

Foi definido como loco polimórfico aquele em que o alelo mais comum tenha frequência igual ou inferior a 0,95 (Nei, 1975). Partindo do pressuposto de que o marcador RAPD é um marcador dominante, os dados foram calculados como ausência (0) e presença (1) de bandas. Mediante a isso a diversidade genética entre os acessos foi determinada por meio da matriz de dissimilaridade genética, gerada pelo programa Genes (CRUZ, 2006), tendo-se utilizado o índice de Jaccard (1908).

$$S_j = a/(a + b + c),$$

onde;

a, presença da banda nos dois acessos

ie;

b, presença da banda no acesso *i* e ausente no acesso *j*; e

c, ausência no acesso *i* e presença no acesso *j*.

O ponto de corte do dendrograma e definição dos grupos foram gerados pelo método hierárquico descrito por Mojena (1977) que sugere procedimento baseado no tamanho relativo dos níveis de fusões (distâncias) no dendrograma. A proposta foi selecionar o número de grupos no passo *j* que, primeiramente, satisfizer a inequação:

$$a_j > q_k$$

onde:

a_j , valor de distância do nível de fusão correspondentes aos passo $j(j=1,2,\dots,g-1)$;

q_k , valor referencial de corte, dado por:

$$q_k = \bar{a} + k s_a$$

onde:

a , média;

S_a , desvio padrão dos valores de a ;

k , constante cujo valor a ser adotado como regra para definição dos grupos é igual a 1,25.

Assim, tem-se que:

$$\bar{a} = \frac{1}{g-1} \sum_{j=1}^{g-1} a_j \quad e \quad S_a = \sqrt{\frac{1}{g-1} \sum_{j=1}^{g-1} a_j^2 - \left(\frac{1}{g-1} \sum_{j=1}^{g-1} a_j \right)^2}$$

Com base na matriz de dissimilaridade foi construído um dendrograma usando o proposto por Ward. Este método leva em consideração os indivíduos que proporcionam a menor soma de quadrados do desvio. A análise de *bootstrap* foi realizada para verificar e dar suporte estatístico aos nós internos do dendrograma gerados por meio do método de agrupamento Ward. O ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (r), conforme SOKAL & ROHLF (1962), por meio do programa Genes (CRUZ, 2006).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método CTAB mostrou-se eficiente na extração de DNA genômico das 22 plantas da família de meio-irmãos, com boa qualidade e quantidade (Fig. 4) demonstrando a estimativa de DNA.

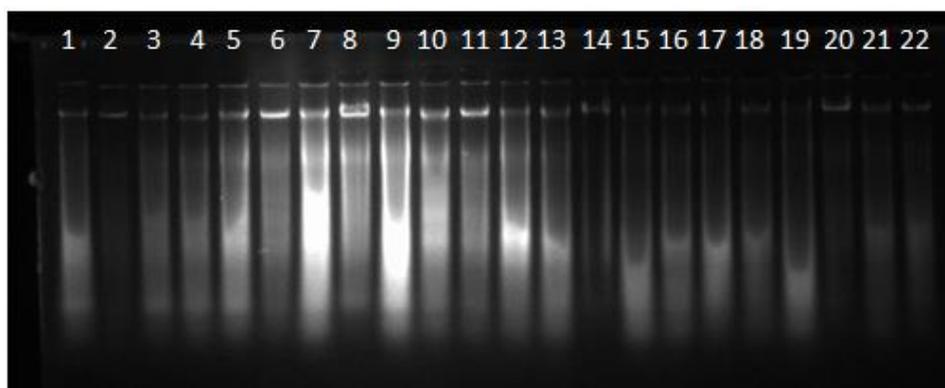


Fig. 4. Perfil eletroforético de DNA genômico de 22 acessos de *P. morifolia* Mast. em gel de agarose (0,8%) colorido com brometo de etídio.

As reações de RAPD amplificaram 885 fragmentos (frag) destes, 504,45 foram polimórficas e 380,55 foram monomórficas, o que corresponde respectivamente ao total 57% de fragmentos polimórficos e 43% monomórficas. Os primers que apresentaram maiores porcentagens de polimorfismo foram UB-05 (95%), UB-02 (83%), UB-11 (79%), UB-04 (75%), UB-07 (71%), UB-03 (68%) e UB-15 (66%). A porcentagem de polimorfismo variou de 95% (UB-05) a 0% (UB-9, UB-16), salientando que os primers nove e dezesseis não amplificaram nenhuma banda (Tabela 2).

Tab. 2. Número total de fragmentos amplificados, porcentagem de fragmentos polimórficos e monomórficos para cada primer.

Primer	Nº total de frag. amplificados	Frag. amplificados /primer	% de frag polimórficos/primer	% de frag.monomórficos
UB-01	88	36	40	60
UB-02	66	55	83	17
UB-03	132	90	68	32
UB-04	88	66	75	24
UB-05	22	21	95	5
UB-06	176	75	42	58
UB-07	132	95	71	29
UB-08	176	105	59	41
UB-09	0	0	0	0
UB-10	88	57	64	36
UB-11	110	87	79	21
UB-12	154	70	45	55
UB-13	66	9	13	87
UB-14	176	75	42	64
UB-15	66	44	66	34
UB-16	0	0	0	0

Total de polimorfismo	1540	885	57	43
-----------------------	-------------	------------	-----------	-----------

A seguir na fig. 5 teremos o perfil eletroforético dos 22 acessos da espécie *P. morifolia* Mast. Como o *primer* UB-07 mostrando o polimorfismo (apontados elas setas) utilizando-se marcador RAPD.

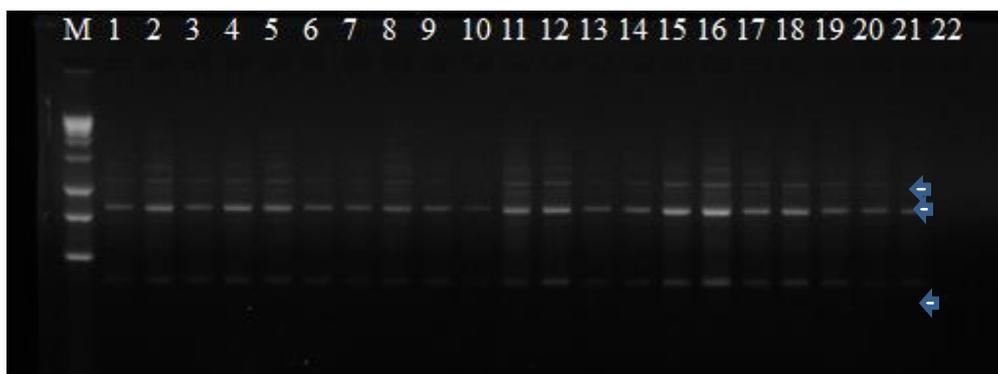


Fig. 5. Perfil eletroforético dos 22 acessos de *P. Morifolia* Mast. após a reação de RAPD com o *primer* UB-07 (setas apontam polimorfismo).

A matriz de dissimilaridade genética foi gerada a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard (S_j) (Tabela 3). A partir da qual foi realizada a análise de agrupamento usando WARD, gerando o dendrograma.

No qual comparando aos pares os valores da tabela citada anteriormente, pode-se observar os indivíduos mais dissimilares e os menos dissimilares. Destes destacam-se os indivíduos mais distantes, são eles 3 e 11 (0,621) e 6 e 22 (0,683).

Ganga et al, 2004, em ensaios com marcadores de AFLP em 36 acessos de maracujá no Brasil encontraram uma elevada diversidade (0,065-0,496) entre as amostras que foram analisadas, o qual foi comparado com o estudo de gulupa, levando em conta que são variedades pertencentes à mesma espécie.

Tab. 3. Matriz de dissimilaridade genética, usada como base para geração de dendrograma dos acessos de *P. morifolia* Mast.

3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
0,000																
0,585	0,000															
0,533	0,520	0,000														
0,412	0,558	0,409	0,000													
0,535	0,386	0,354	0,477	0,000												
0,580	0,420	0,260	0,438	0,353	0,000											
0,540	0,412	0,352	0,429	0,280	0,157	0,000										
0,541	0,450	0,478	0,474	0,366	0,438	0,429	0,000									
0,621	0,429	0,373	0,526	0,368	0,196	0,193	0,500	0,000								
0,586	0,421	0,393	0,517	0,443	0,193	0,220	0,517	0,164	0,000							
0,410	0,444	0,304	0,350	0,333	0,271	0,300	0,308	0,386	0,379	0,000						
0,472	0,500	0,489	0,525	0,419	0,449	0,471	0,405	0,482	0,525	0,282	0,000					
0,561	0,571	0,339	0,517	0,468	0,365	0,359	0,542	0,303	0,324	0,407	0,500	0,000				
0,590	0,459	0,431	0,525	0,453	0,274	0,297	0,548	0,159	0,127	0,419	0,508	0,239	0,000			
0,596	0,458	0,509	0,478	0,509	0,389	0,411	0,571	0,373	0,367	0,375	0,521	0,469	0,381	0,000		
0,595	0,405	0,438	0,463	0,326	0,367	0,423	0,425	0,466	0,431	0,310	0,359	0,483	0,492	0,370	0,000	
0,596	0,380	0,439	0,519	0,377	0,321	0,316	0,490	0,283	0,279	0,333	0,440	0,333	0,270	0,255	0,360	0,000
0,553	0,449	0,320	0,400	0,412	0,220	0,315	0,435	0,339	0,333	0,261	0,378	0,333	0,349	0,250	0,289	0,216
0,462	0,522	0,449	0,439	0,479	0,347	0,340	0,439	0,421	0,414	0,326	0,415	0,441	0,452	0,348	0,395	0,340
0,611	0,619	0,596	0,683	0,568	0,489	0,479	0,579	0,545	0,561	0,524	0,472	0,633	0,590	0,596	0,628	0,540

Análise de agrupamento de Ward permitiu a separação dos 22 acessos em quatro grupos principais, sendo os grupos I (acessos 5, 8 9, 11, 12, 15, 16) e IV (acessos 2, 4, 7, 10, 13, 14 e 18) os que englobaram maior número de indivíduos, 14 dos 22 avaliados (Fig. 3), os grupos II (1, 3 e 6) e o III (19, 17, 20, 21 e 22) englobaram os demais acessos. A maior distância genética foi de 0,68 entre acessos 12 e 10, os mais divergentes entre os meio-irmãos.

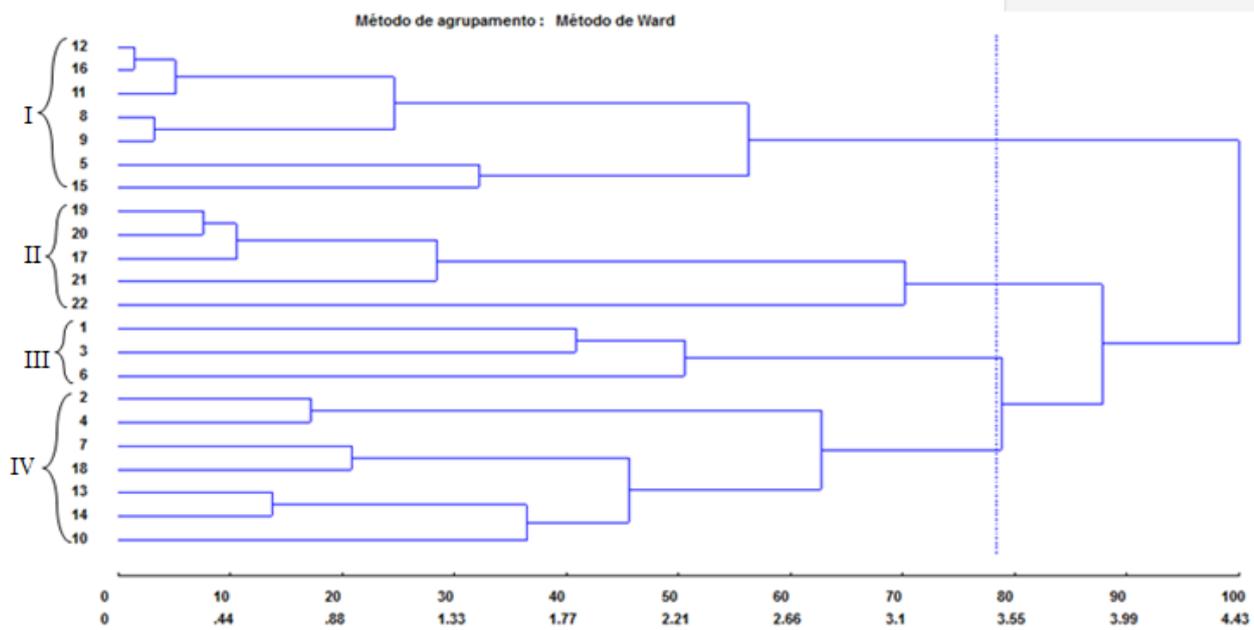


Fig. 6. Diversidade genética dentro da família de MI de *P. morifolia*. Dendrograma dos 22 acessos, obtido pelo método WARD baseado nos dados de dissimilaridade genética obtidos pelo complemento aritmético dos coeficientes de similaridade de Jaccard, utilizando-se 16 marcadores RAPD.

Os resultados obtidos demonstram haver uma grande variabilidade genética entre os 22 acessos avaliados. Esses resultados contrapõem aqueles reportados por Viana et al. (2003), que usando marcadores RAPD para estimar a diversidade de *Passiflora* spp., não encontraram variabilidade intraespecífica na análise dos acessos de *P. edulis*. Entretanto, ao avaliarem espécies silvestres deste gênero, verificou-se ampla base genética. Cerqueira-Silva et al. (2012) também encontraram larga variabilidade genética ao avaliar acessos de *P. setacea* ao utilizar o mesmo tipo de marcador molecular. Bellon et al. (2009) do mesmo modo utilizaram marcadores do tipo RAPD para estimar a variabilidade de acessos de *P. alata*, e constataram que os acessos silvestres foram os que mais contribuíram para a variabilidade genética.

Faleiro et al. (2004) ressaltam a importância do uso de espécies nativas de maracujá em programas de melhoramento genético visando à ampliação da variabilidade genética, principalmente para a resistência a doenças.

A correlação cofenética obtida foi de 0,98%, considerada alta e adequada. Segundo Vaz Patto et al. (2004), $r > 0,56$ é considerada ideal, uma vez que indica haver boa concordância entre a matriz de dissimilaridade e a de agrupamento.

Tab. 4. Correlação Cofenética baseado nos dados moleculares (RAPD) avaliados nos 22 acessos de *P. morifolia*.

Estatística	Valor
Correlação Cofenética (CCC)	0,9857
Graus de liberdade	229
Valor de t	19,22**
Distorção (%):	2.219
Estresse (%):	14.8961

6. CONCLUSÕES

O protocolo CTAB foi eficiente na extração de DNA dos 22 acessos da família de meio-irmãos de *P. morifolia*, em concentrações suficientes para ensaio RAPD.

Há variabilidade genética entre os 22 indivíduos da família de meio-irmãos de *P. Morifolia* Mast. e sugere-se o cruzamento entre os acessos 12 e 10, por serem os mais divergentes.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BELLON, G., FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, K. P., PAULA, M. S., BRAGA, M. S., JUNQUEIRA, N. T., et al. (2005). *Diversidade genética de acessos comerciais e silvestres de maracujazeiro-doce com base em marcadores RAPD*. Planaltina- Distrito Federal: Embrapa Cerrados.

BERNACCI, L. C., & VITTA, F. A. (1999). Fanerogâmica da Reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil). *Passifloraceae*. *Hoehnea* 26: 135-147.

- CASSIANO, A. P., LEMOS, E. G., & OLIVEIRA, J. C. (1998). Avaliação de espécies de *Passiflora* através de marcadores RAPD. *21* , 214.
- CERQUEIRA-SILVA, C. B., SANTOS, E. S., CONCEIÇÃO, L. D., 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): . p 731- 738.
- COSTA, A. M., & TUPINAMBÁ, D. D. (2005). 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*. 475-508. Planaltina: Embrapa Cerrados.
- Cruz, C. D., & Carneiro, P. C. (2003). *Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético*. Viçosa: UFV.
- CRUZ, T. V., SOUZA, M. M., ROZA, F. A., VIANA, A. J., BELO, G. O., & FONSECA, J. W. (2008). Germinação in vitro de grãos de pólen em *Passiflora suberosa* L. para sua utilização em hibridação interespecífica. *Revista Brasileira de Fruticultura* .
- CUNHA, M. A., BARBOSA, L. V., & JUNQUEIRA, N. T. (2002). Espécies Maracujazeiro. In: LIMA, A. A. (ed) *Maracujá Produção Aspectos Técnicos*. Embrapa Informação Tecnológica. (*Embrapa Informação Tecnológica. Frutas Brasil; 15*) , 104 p.
- FALEIRO, F. G. (2005). Programas e Perspectivas do Maracujá ornamental. In: JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.:(eds). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. *Embrapa Cerrados* , 456-464 p.
- FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N. T., BELLON, G., BORGES, T. A., ANJOS, R. N., PEIXOTO, J. R., et al. (2004). Diversidade genética de maracujazecom base em marcadores RAPDiro com resistência a múltiplas doenças. *Fitopatologia Brasileira* , 29, 325.
- FALEIRO, F. (2007). Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. . *Embrapa Cerrados* , p. 102.
- FERREIRA, M. E., & GRATTAPAGLIA, D. (1998). *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética* (3ª ed.). Brasília: EMBRAPA-CENARGEN.
- FEUILLET, C., & MacDougal, J. M. (2003). A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Passiflora*. 14(1), 34-38.
- FEUILLET, C., & MacDougal, J. M. (2007). Passifloraceae. In: KUBITZIKI, K (ed). *The families and genera of vascular plants*. *Springer, Berlin* .
- GANGA, R. M., LEMOS, E. G., GRILI, G. V., GONÇALVES, M. M., CHAGAS, E. A., WICKERT, et al. (2004). Diversidade genética em maracujazeiro amarelo utilizando marcadores AFLP. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 26 , 494-498.
- IBGE. (2012). *Produção brasileira de maracujá em 2010* . Acesso em 17 de 01 de 2014
- JUNQUEIRA, K. P., FALEIRO, F. G., JUNQUIERA, N. T., BELLON, G., RAMOS, J. D., SOUZA, L. S., et al. (2007). Obtenção de híbridos interespecíficos de *Passiflora laurifolia* L. e *Passiflora nítida* Kunth. *Anais 4º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas: UFLA. CD-ROM* .

- JUNQUEIRA, N. T., BRAGA, M. F., PEIXOTO, J. R., & BERNACCI, L. C. (2005). Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças .In: FALEIRO,FG;JUNQUEIRA,TNV;BRAGA,MF. (eds). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético* , pp. 81-108.
- JUNQUEIRA, N. T., LAGE, D. A., BRAGA, M. D., PEIXOTO, J. R., BORGES, T. A., & ANDRADE, S. R. (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 de Fruticultura* .
- MacDougal, J. M. (2001). Two new species of Passiflower (Passiflora, Passifloraceae) from southwestern. (11) , 69-75. México Novon.
- MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A., & BAUMGRATZ, J. F. (2004). Passiflora L. subgênero Decaloba (DC). Rchb. (Passifloraceae) na Região Sudeste do Brasil. Rodriguesia.
- MOJENA, R. (1977). Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. *The Computer Journal*. 20, p. 359-363.
- SOKAL, R. R., & ROMALF, F. J. (1962). *The comparasion of dendrograms by objective methods taxonomy* (Vol. 11).
- SOUZA, I., J. S., & MELLETT, L. M. (1997). *Maracujá: espécies, variedades, cultivo*. Piracicaba.
- ULMER, T., & MacDougal, J. M. (2004). *Passiflora: Passion flowers of the world*. *Timer Press* .
- VANDERPLANK, J. (2000). *Passion flowers*. *The MIT Press* , 224 p.
- VAZ PATTO, M. C. (2004). Assessing the genetic divesity of Portuguese maize germoplasm using microsatelite markers. *Euphytica* , 137, p. 63-67.
- VIANA, A. P., PERERIRA, T. N., PEREIRA, M. G., SOUZA, M. M., MALDONADO, J. F., & AMARAL, J. R. (2003). Genetic diversyte among yellow passion fruit comercial genotypes and among Passiflora species using RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura* , v. 25, p. 489-493.
- VILELA, M. S. (2013). Diversidade genética, produtividade e reação de prog~enies de maracujazeiro à doenças sob condições de campo. Faculdade de agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. 183 p.

1. INTRODUÇÃO

Entre as espécies silvestres do gênero, encontra-se a *P. morifolia* Mast. também conhecida como maracujá-peludo (BERNACCI; VITTA, 1999), pertencente ao subgênero *Decaloba*, de ocorrência naturalmente na Guatemala, México, Venezuela, Bolívia, Colômbia, Brasil, Equador, Peru, Paraguai e Argentina (VANDERPLANK, 2000; MILWARD-DE-AZEVEDO; BAUMGRATZ, 2004).

Na região sudeste do Brasil ela é encontrada em áreas de cerrado e de floresta pluvial submontanhosa, não apresentando diferenciação quanto à morfologia foliar (MILWARD-DE-AZEVEDO; BAUMGRATZ, 2004). Apresenta belas flores brancas, de tamanho médio, com corona de coloração arroxeadada, o que confere à espécie, juntamente com seu porte intermediário, características favoráveis ao cultivo em vasos para ornamentação de interiores (VANDERPLANK, 2000; MILWARD-DE-AZEVEDO; BAUMGRATZ, 2004).

O estudo da diversidade genética é uma atividade de grande relevância para o melhoramento de plantas e também para a conservação de muitas espécies. Através desse conhecimento, torna-se possível identificar acessos contrastantes, com características de interesse, como fontes de resistência a doenças e alta produtividade, além de permitir a realização de cruzamentos promissores, para posteriormente, serem utilizados nos programas de melhoramento (CRUZ E CARNEIRO, 2006). Ainda segundo 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.

Dentro deste contexto, foi avaliada a diversidade genética de 22 acessos de uma família de meio-irmãos de *P. morifolia* Mast. usando marcador RAPD.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade genética dentro da família de meio-irmãos de *Passiflora morifolia* Mast. usando marcador RAPD.

2.2. ESPECÍFICOS

Plantar e conduzir 22 acessos de *P. morifolia* em casa de vegetação;

Isolar o DNA genômico de *P. morifolia* a partir de tecido foliar;

Fazer as reações em cadeia de polimerase usando *primers* RAPD e

Estimar diversidade genética da família de meio-irmãos de *P. morifolia*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Variabilidade genética do gênero passiflora

O Brasil é o centro de diversidade das passifloras, possuindo ampla variabilidade genética (GANGA et al., 2004), e, entre as espécies silvestres encontradas no país, algumas possuem características de interesse que podem ser introduzidas nas espécies comerciais, via melhoramento (JUNQUEIRA et al., 2007).

P. morifolia pertence ao gênero Passiflora e a família Passifloraceae, o mais importante e também o mais rico da família. Com um número de espécies que o compõe bastante expressivo variando de 521 (FEUILLET e MACDOUGAL, 2003) a 537 espécies (VANDERPLANK, 2007).

Segundo Vanderplank (2000), o gênero é formado por plantas trepadeiras herbáceas ou arbustivas e, em alguns casos, eretas. Possuindo o caule cilíndrico ou quadrangular, ramificado, anguloso, suberificado, glabro ou piloso. Possuem folhas de tamanho e formas variadas, alternadas, simples ou compostas, inteiras ou lobadas, frequentemente, com nectários no pecíolo, na lâmina da folha ou nas estípulas (FEUILLET e MACDOUGAL, 2007). As gavinhas são, geralmente, solitárias e se desenvolvem nas axilas das folhas, porém são ausentes em espécies lenhosas (CUNHA et al., 2002).

3.2. Maracujazeiro

O maracujá amarelo (*P. edulis* f. *edulis*) e o doce (*P. alata* Ait), geralmente são os únicos utilizados como atividade econômica. No entanto, há que atentar-se para o número de espécies existentes, sendo que um estudo acurado nas coleções poderá indicar outras opções, seja para introduzir outra espécie nos sistemas de produção, seja no uso de genes de espécies silvestres ou selvagens no melhoramento das espécies cultivadas.

A inserção de espécies silvestres em programas de melhoramento é uma das maneiras para solucionar problemas de resistência a doenças, pragas, dentre outros. Essas espécies podem conter genes de resistência a doenças e características agrônômicas de interesse não encontradas no maracujazeiro cultivado (FALEIRO et al., 2004). Dessa forma, estudar a diversidade genética existente no gênero do maracujá com base em características agrônômicas é de interesse para o melhoramento e possibilita a identificação de acessos superiores e contrastantes, indicando possíveis cruzamentos promissores.

3.3. Uso ornamental das passifloras

O uso das passifloras como planta ornamental é citado desde o século XIX, e hoje tem se destacado em muitos países no mercado de mudas híbridas (ULMER; MACDOUGAL, 2004; VANDERPLANK, 2000). No Brasil, o potencial das passifloras como planta ornamental é praticamente inexplorado, embora sejam plantas de clima essencialmente tropical, não exigindo, assim, nenhuma prática mais onerosa como a construção de estufas especiais, como é feito em países de clima não tropical, a exemplo dos Estados Unidos, que cultivam essas espécies em jardins, muros, cercas, pergolados e estufas (ABREU et al., 2008).

Muitas espécies também são apreciadas no mundo inteiro pelo seu valor ornamental, sendo suas sementes amplamente comercializadas, principalmente na América do Norte e continente Europeu (SOUZA; PEREIRA, 2003). As flores das Passifloras são consideradas exóticas e complexas, algumas de coloração forte e brilhante, outras de coloração suave e marcante, devido, principalmente, à presença da coroa, que caracteriza a família Passifloraceae. Igualmente fascinante é a ampla variedade de formatos de folhas dentro do gênero, tendo muitas espécies valor ornamental em função da sua folhagem (ABREU et al., 2008).

No Brasil o potencial ornamental das passifloras não é muito explorado, porém, em outros países do Hemisfério Norte foram registrados mais de 400 híbridos com fins ornamentais (Peixoto, 2005). As flores de passiflora são fascinantes devido à sua coloração forte e brilhante ou suave e marcante. Isso faz com que sejam consideradas exóticas e complexas. Outra característica importante à ornamentação e a ampla variedade de formatos de folhas (CRUZ et al., 2008) e muitas espécies possuem seu valor comercial baseado nas folhagens (SOUZA et al., 2003a).

3.4. Quantificação da diversidade genética por meio de RAPD

Para quantificar a diversidade genética são utilizados diversos métodos. Dentre estes, as técnicas de marcadores moleculares, particularmente o polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), combinado com métodos multivariados tem-se mostrado promissor nos estudos de diversidade genética. Este marcador apresenta como principais vantagens sua simplicidade na utilização, baixo custo e a rapidez nas gerações dos resultados (VIEIRA et al, 2010; RODRIGUES e COSTA, 2011). Sua principal desvantagem é baixa reprodutibilidade dos resultados, de um laboratório para outro.

Marcadores moleculares são utilizados frequentemente no estudo de diversidade da variabilidade genética do maracujazeiro, por meio da técnica de RAPD, tendo em vista que esta técnica apresenta uma grande capacidade de acessar as informações do genoma da espécie, pela facilidade e rapidez de execução, bem como sua eficiência e confiabilidade dos resultados obtidos (FALEIRO, 2007; VIANA et al., 2003; BELLON, 2008; VILELA, 2013). Teoricamente o número de marcadores genéticos é ilimitado e o genótipo de uma planta pode ser determinado em um estágio de desenvolvimento precoce, desde que, haja material suficiente para a extração do DNA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Foram semeadas 90 tubetes com sementes de *P. morifolia*, quando plântulas foram transferidas para vasos e em seguida levados à casa de vegetação.

Foram preenchidos a princípio 40 tubetes com substrato, em cada um deles foram semeadas 02 sementes no dia 27 de novembro de 2013 (figura 1) e no dia 27 de dezembro de 2013 foram preenchidos mais 50 tubetes com 03 sementes cada (fig. 2). No entanto, dessas sementes postas a germinar apenas 37 plantas germinaram, salientando que não foi realizado nenhum procedimento para induzir a quebra de dormência.



Semeio de *P. morifolia*.



Fig. 2- Semeio de *P. morifolia*.

No dia 24 de março de 2014 foi realizado o transplantio das mudas dos tubetes para os vasos pequenos, os quais foram completados com substrato. A sequência de figuras (Fig. 3) a seguir mostra como foi realizado o processo de transplantio. No dia 17 de março as plantas foram levadas à estufa com auxílio de tutoramento confeccionado

com fios de telefone e barbante. E no dia 7 de julho foi aplicada solução nutritiva nas plantas.



Fig. 3. a, b, c e d- Transplântio de mudas de *P. morifolia*.

4.2. Extração e quantificação do DNA genômico de *P. morifolia*

A análise da diversidade genética entre os acessos foi realizada com base na caracterização molecular, utilizando-se a técnica RAPD (do inglês, *Randomly Amplified Polymorphic DNA*). Foram avaliadas 22 plantas da família de meio-irmãos (MI) da espécie silvestre *P. morifolia* da coleção de Passifloras do Laboratório de Biotecnologia Vegetal.

O método utilizado foi de Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB), segundo protocolo descrito por (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998), e gel de agarose a 0,8% e visualizadas sobre luz ultravioleta.

Cerca de 200 mg de tecido vegetal de cada planta da família de MI, foi macerada em nitrogênio líquido usando almofariz e pistilo até formar um pó, que foi depositado em tubos de Eppendorf de 1,5 µL, os quais receberam identificação individual. Em cada tubo foi adicionado 700 µL do tampão de extração TBE 0,5x, agitados por 1 minuto. Este material foi levado ao banho-maria a 65°C por 30 minutos, homogeneizando-os manualmente a cada 10 minutos por aproximadamente 1 minuto.

Em seguida, o material foi retirado do banho-maria, permanecendo em temperatura ambiente, a fim de que ocorra o resfriamento do mesmo. Após o resfriamento, foi adicionado em cada tubo Eppendorf, 600 µL de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico). O conteúdo dos tubos foi homogeneizado manualmente, invertendo-se cuidadosamente por aproximadamente 1 minuto. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 13.400 rpm durante 10 minutos. Com cuidado, os tubos foram retirados da centrífuga, e transferidos 600µL do sobrenadante para um tubo novo, em cada tubo, foi adicionado 500 µL de CIA e depois homogeneizados novamente por inversão.

Em seguida, foram centrifugados a 13.400 rpm durante 5 minutos, e transferida a fase superior (\pm 400µL) para um novo tubo e foi adicionados 40µL do volume do tampão de lavagem [10g CTAB; NaCl 1,4 M 8,4g e 100ml destilada] e homogeneizado por inversão durante 5 minutos.

Após a homogeneização, foram adicionados 500 µL de CIA e centrifugado novamente a 13.400 rpm por 5 minutos. Transferindo-se 280µL do sobrenadante para um novo tubo e adicionando-se 185µL de isopropanol, misturando-se levemente. Em seguida, foi centrifugado a 13.400 rpm por 5 minutos para formação do pellet no fundo do tubo. Logo após foi descartado o sobrenadante e adicionado 1µL de etanol a 70%, deixando-se os tubos Eppendorf sobre a bancada por 10 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi descartado. Esta operação foi repetida por duas vezes. Em seguida, foram adicionados 1µL de etanol absoluto e centrifugado 13.400 rpm por 2 minutos.

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e deixado sobre a bancada para secagem completa do pellet. Para finalizar essa etapa da extração do DNA, foram adicionados 50 µL de tampão de extração (TE) para ressuspender o pellet e os tubos foram armazenados a -20°C até serem usados nas reações de RAPD. As amostras foram quantificadas em gel de agarose a 0,8% e visualizadas sobre luz ultravioleta.

4.3. Reação RAPD

Na obtenção dos marcadores RAPD, foram utilizados 16 *primers* (Tabela 1) para avaliar a diversidade genética da família de Meio-irmãos de *P. morifolia*.

Para as reações de amplificação do DNA foi conduzido com um volume final de 25µL, sendo 23 µL de Master Mix (Tampão TBE 0,5x 60µL+ MgCl 36µL+ dNTP12µL + primer 60µL + Taq DNA polimerase 4,8µL + H2O DDA 379,2µL) e 2 µL de DNA genômico da amostra, numa concentração de 5ng/µL.

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizadas para a amplificação de DNA da Família de Meio-irmãos de *P. morifolia* por meio da técnica RAPD.

Primer	Sequência de bases (5'-3')
UB- 01	AGACGGCTCC
UB- 02	GTTCGGAACC
UB- 03	GGGCGACTAC
UB- 04	GTGCGCAATG
UB- 05	TCGCATCCAG
UB- 06	CAGAAGCGGA
UB- 07	CACAGCGACA
UB- 08	CAAAGCGCTC
UB- 09	TCCCCATCAC
UB- 10	TGCGGGTCCT
UB- 11	CAGGATTCCC
UB- 12	GTGGAGTCAG
UB- 13	AAGTCCGCTC
UB- 14	CAGCACTGAC
UB- 15	GACAGGAGGT
UB- 16	GGCTGCAGAA

As amplificações foram feitas em um termociclador (Techne TC-Plus Bibby Scientific Ltd.), com 1º ciclo a 94°C por 5 minutos, com a seguinte programação: 30 ciclos, sendo: 94°C por 5 minutos; 94°C por um minuto; 36°C por 1 minuto; 72°C por 2 minutos) e, finalmente, o último ciclo com 72°C por 5 minutos. Logo após a amplificação as amostras foram armazenadas a -20°C até serem utilizadas.

4.4. Separação dos fragmentos amplificados por eletroforese em gel

Para a confecção do gel de eletroforese, foi utilizada uma alíquota de 10 µL dos produtos amplificados na reação de RAPD que foram transferidos para tubos Eppendorf e adicionados 2µL de tampão de carregamento (4g de glicose + 0,025g de azul bromofenol + 0,025g de xileno cianol + 10 µL de água destilada).

Em seguida foram aplicados com uma pipeta de 10 µL em cada poço do gel de agarose a 1,5% [ml tampão TBE 10x; 1,08g de agarose; 0,06µL de brometo de etídio (10 mg/mL). Foi utilizado como marcador de peso molecular de DNA, 5 µL de DNA Ladder – 1kb(Ludwig Biotec), o qual foi aplicado no primeiro poço à esquerda de cada gel, como o padrão de peso molecular(figura. 2). A condição de corrida da eletroforese foi a 70 volts por aproximadamente duas horas. O gel foi visualizado em transiluminador T26M UV 302nm e a imagem capturada em sistema de fotodocumentação Easy Doc 200.

4.5. Análise multivariada da diversidade genética

Foi definido como loco polimórfico aquele em que o alelo mais comum tenha frequência igual ou inferior a 0,95 (Nei, 1975). Partindo do pressuposto de que o marcador RAPD é um marcador dominante, os dados foram calculados como ausência (0) e presença (1) de bandas. Mediante a isso a diversidade genética entre os acessos foi determinada por meio da matriz de dissimilaridade genética, gerada pelo programa Genes (CRUZ, 2006), tendo-se utilizado o índice de Jaccard (1908).

$$S_j = a/(a + b + c),$$

onde;

a, presença da banda nos dois acessos

ie;

b, presença da banda no acesso *i* e ausente no acesso *j*; e

c, ausência no acesso *i* e presença no acesso *j*.

O ponto de corte do dendrograma e definição dos grupos foram gerados pelo método hierárquico descrito por Mojena (1977) que sugere procedimento baseado no tamanho relativo dos níveis de fusões (distâncias) no dendrograma. A proposta foi selecionar o número de grupos no passo *j* que, primeiramente, satisfizer a inequação:

$$a_j > q_k$$

onde:

a_j , valor de distância do nível de fusão correspondentes aos passo j ($j=1,2,\dots,g-1$);

q_k , valor referencial de corte, dado por:

$$q_k = \bar{a} + k s_a$$

onde:

a , média;

S_a , desvio padrão dos valores de a ;

k , constante cujo valor a ser adotado como regra para definição dos grupos é igual a 1,25.

Assim, tem-se que:

$$\bar{a} = \frac{1}{g-1} \sum_{j=1}^{g-1} a_j \quad S_a = \sqrt{\frac{1}{g-1} \sum_{j=1}^{g-1} a_j^2 - \left(\frac{1}{g-1} \sum_{j=1}^{g-1} a_j \right)^2}$$

Com base na matriz de dissimilaridade foi construído um dendrograma usando o proposto por Ward. Este método leva em consideração os indivíduos que proporcionam a menor soma de quadrados do desvio. A análise de *bootstrap* foi realizada para verificar e dar suporte estatístico aos nós internos do dendrograma gerados por meio do método de agrupamento Ward. O ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (r), conforme SOKAL & ROHLF (1962), por meio do programa Genes (CRUZ, 2006).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método CTAB mostrou-se eficiente na extração de DNA genômico das 22 plantas da família de meio-irmãos, com boa qualidade e quantidade (Fig. 4) demonstrando a estimativa de DNA.

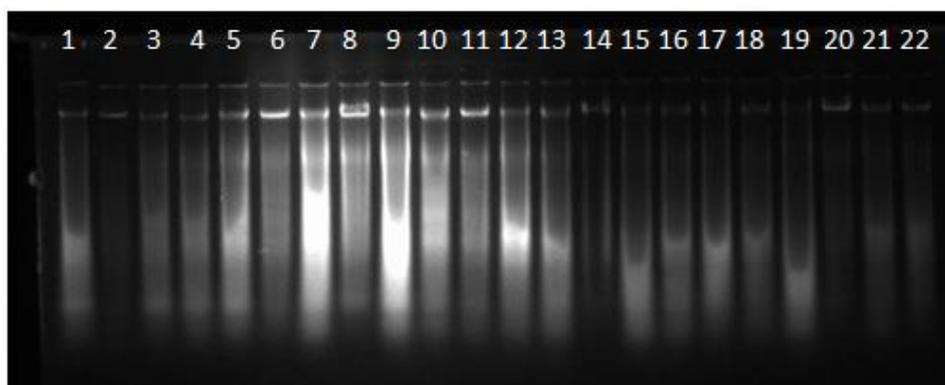


Fig. 4. Perfil eletroforético de DNA genômico de 22 acessos de *P. morifolia* Mast. em gel de agarose (0,8%) colorido com brometo de etídio.

As reações de RAPD amplificaram 885 fragmentos (frag) destes, 504,45 foram polimórficas e 380,55 foram monomórficas, o que corresponde respectivamente ao total 57% de fragmentos polimórficos e 43% monomórficas. Os primers que apresentaram maiores porcentagens de polimorfismo foram UB-05 (95%), UB-02 (83%), UB-11 (79%), UB-04 (75%), UB-07 (71%), UB-03 (68%) e UB-15 (66%). A porcentagem de polimorfismo variou de 95% (UB-05) a 0% (UB-9, UB-16), salientando que os primers nove e dezesseis não amplificaram nenhuma banda (Tabela 2).

Tab. 2. Número total de fragmentos amplificados, porcentagem de fragmentos polimórficos e monomórficos para cada primer.

Primer	Nº total de frag. amplificados	Frag. amplificados /primer	% de frag polimórficos/primer	% de frag. monomórficos
UB-01	88	36	40	60
UB-02	66	55	83	17
UB-03	132	90	68	32
UB-04	88	66	75	24
UB-05	22	21	95	5
UB-06	176	75	42	58
UB-07	132	95	71	29
UB-08	176	105	59	41
UB-09	0	0	0	0
UB-10	88	57	64	36
UB-11	110	87	79	21
UB-12	154	70	45	55
UB-13	66	9	13	87
UB-14	176	75	42	64
UB-15	66	44	66	34

UB-16	0	0	0	0
Total de polimorfi smo	1540	885	57	43

A seguir na fig. 5 teremos o perfil eletroforético dos 22 acessos da espécie *P. morifolia* Mast. Como o *primer* UB-07 mostrando o polimorfismo (apontados elas setas) utilizando-se marcador RAPD.

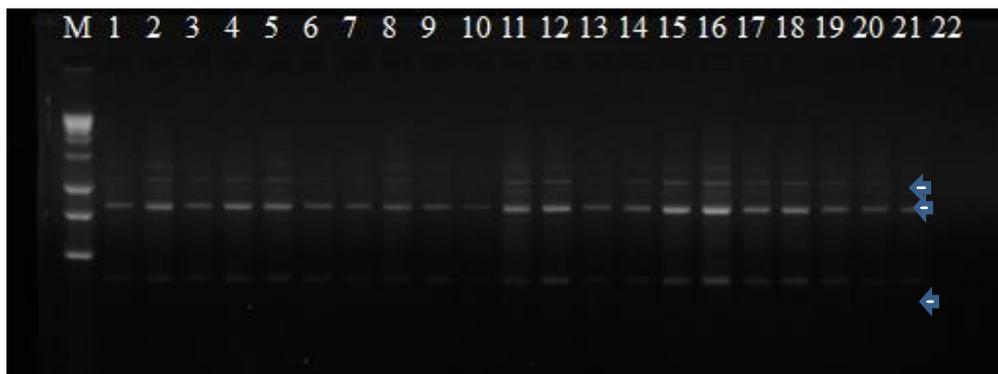


Fig. 5. Perfil eletroforético dos 22 acessos de *P. Morifolia* Mast. após a reação de RAPD com o *primer* UB-07 (setas apontam polimorfismo).

A matriz de dissimilaridade genética foi gerada a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard (S_j) (Tabela 3). A partir da qual foi realizada a análise de agrupamento usando WARD, gerando o dendrograma.

No qual comparando aos pares os valores da tabela citada anteriormente, pode-se observar os indivíduos mais dissimilares e os menos dissimilares. Destes destacam-se os indivíduos mais distantes, são eles 3 e 11 (0,621) e 6 e 22 (0,683).

Ganga et al, 2004, em ensaios com marcadores de AFLP em 36 acessos de maracujá no Brasil encontraram uma elevada diversidade (0,065-0,496) entre as amostras que foram analisadas, o qual foi comparado com o estudo de gulupa, levando em conta que são variedades pertencentes à mesma espécie.

Tab. 3. Matriz de dissimilaridade genética, usada como base para geração de dendrograma dos acessos de *P. morifolia* Mast.

3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
0,000																
0,585	0,000															
0,533	0,520	0,000														
0,412	0,558	0,409	0,000													
0,535	0,386	0,354	0,477	0,000												
0,580	0,420	0,260	0,438	0,353	0,000											
0,540	0,412	0,352	0,429	0,280	0,157	0,000										
0,541	0,450	0,478	0,474	0,366	0,438	0,429	0,000									
0,621	0,429	0,373	0,526	0,368	0,196	0,193	0,500	0,000								
0,586	0,421	0,393	0,517	0,443	0,193	0,220	0,517	0,164	0,000							
0,410	0,444	0,304	0,350	0,333	0,271	0,300	0,308	0,386	0,379	0,000						
0,472	0,500	0,489	0,525	0,419	0,449	0,471	0,405	0,482	0,525	0,282	0,000					
0,561	0,571	0,339	0,517	0,468	0,365	0,359	0,542	0,303	0,324	0,407	0,500	0,000				
0,590	0,459	0,431	0,525	0,453	0,274	0,297	0,548	0,159	0,127	0,419	0,508	0,239	0,000			
0,596	0,458	0,509	0,478	0,509	0,389	0,411	0,571	0,373	0,367	0,375	0,521	0,469	0,381	0,000		
0,595	0,405	0,438	0,463	0,326	0,367	0,423	0,425	0,466	0,431	0,310	0,359	0,483	0,492	0,370	0,000	
0,596	0,380	0,439	0,519	0,377	0,321	0,316	0,490	0,283	0,279	0,333	0,440	0,333	0,270	0,255	0,360	0,000
0,553	0,449	0,320	0,400	0,412	0,220	0,315	0,435	0,339	0,333	0,261	0,378	0,333	0,349	0,250	0,289	0,216
0,462	0,522	0,449	0,439	0,479	0,347	0,340	0,439	0,421	0,414	0,326	0,415	0,441	0,452	0,348	0,395	0,340
0,611	0,619	0,596	0,683	0,568	0,489	0,479	0,579	0,545	0,561	0,524	0,472	0,633	0,590	0,596	0,628	0,540

Análise de agrupamento de Ward permitiu a separação dos 22 acessos em quatro grupos principais, sendo os grupos I (acessos 5, 8 9, 11, 12, 15, 16) e IV (acessos 2, 4, 7, 10, 13, 14 e 18) os que englobaram maior número de indivíduos, 14 dos 22 avaliados (Fig. 3), os grupos II (1, 3 e 6) e o III (19, 17, 20, 21 e 22) englobaram os demais acessos. A maior distância genética foi de 0,68 entre acessos 12 e 10, os mais divergentes entre os meio-irmãos.

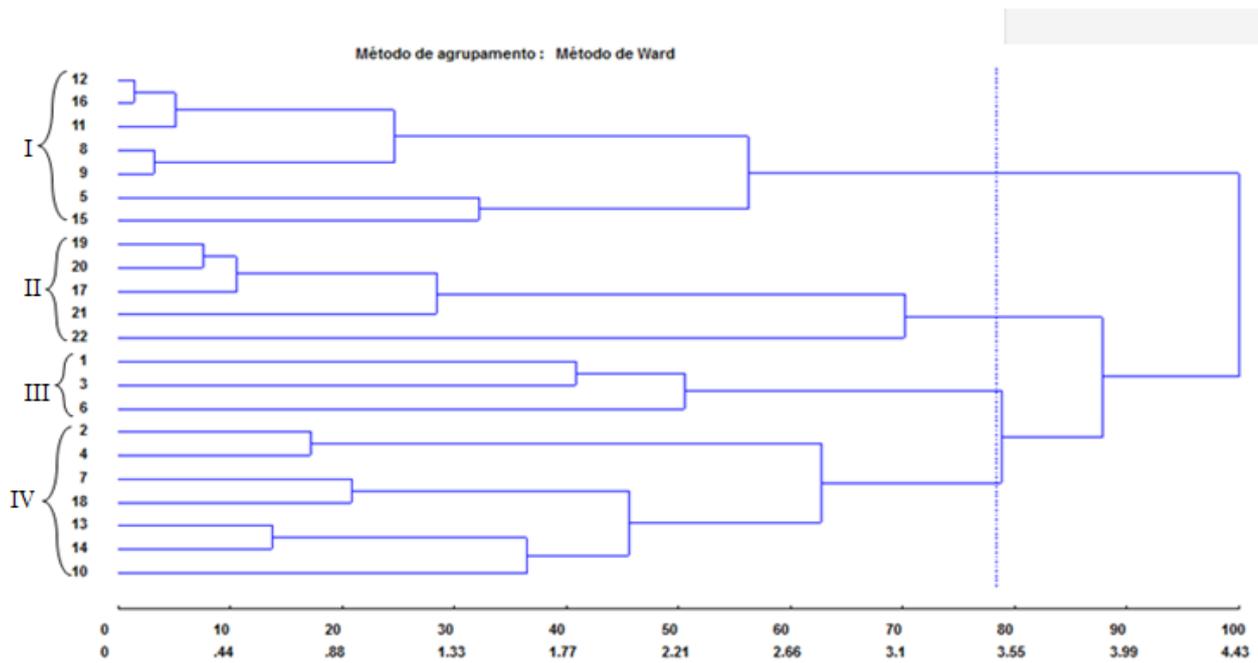


Fig. 6. Diversidade genética dentro da família de MI de *P. morifolia*. Dendrograma dos 22 acessos, obtido pelo método WARD baseado nos dados de dissimilaridade genética obtidos pelo complemento aritmético dos coeficientes de similaridade de Jaccard, utilizando-se 16 marcadores RAPD.

Os resultados obtidos demonstram haver uma grande variabilidade genética entre os 22 acessos avaliados. Esses resultados contrapõem aqueles reportados por Viana et al. (2003), que usando marcadores RAPD para estimar a diversidade de *Passiflora* spp., não encontraram variabilidade intraespecífica na análise dos acessos de *P. edulis*. Entretanto, ao avaliarem espécies silvestres deste gênero, verificou-se ampla base genética. Cerqueira-Silva et al. (2012) também encontraram larga variabilidade genética ao avaliar acessos de *P. setacea* ao utilizar o mesmo tipo de marcador molecular. Bellon et al. (2009) do mesmo modo utilizaram marcadores do tipo RAPD para estimar a variabilidade de acessos de *P. alata*, e constataram que os acessos silvestres foram os que mais contribuíram para a variabilidade genética.

Faleiro et al. (2004) ressaltam a importância do uso de espécies nativas de maracujá em programas de melhoramento genético visando à ampliação da variabilidade genética, principalmente para a resistência a doenças.

A correlação cofenética obtida foi de 0,98%, considerada alta e adequada. Segundo Vaz Patto et al. (2004), $r > 0,56$ é considerada ideal, uma vez que indica haver boa concordância entre a matriz de dissimilaridade e a de agrupamento.

Tab. 4. Correlação Cofenética baseado nos dados moleculares (RAPD) avaliados nos 22 acessos de *P. morifolia*.

Estatística	Valor
Correlação Cofenética (CCC)	0,9857
Graus de liberdade	229
Valor de t	19,22**
Distorção (%):	2.219
Estresse (%):	14.8961

6. CONCLUSÕES

O protocolo CTAB foi eficiente na extração de DNA dos 22 acessos da família de meio-irmãos de *P. morifolia*, em concentrações suficientes para ensaio RAPD.

Há variabilidade genética entre os 22 indivíduos da família de meio-irmãos de *P. Morifolia* Mast. e sugere-se o cruzamento entre os acessos 12 e 10, por serem os mais divergentes.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BELLON, G., FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, K. P., PAULA, M. S., BRAGA, M. S., JUNQUEIRA, N. T., et al. (2005). *Diversidade genética de acessos comerciais e silvestres de maracujazeiro-doce com base em marcadores RAPD*. Planaltina- Distrito Federal: Embrapa Cerrados.

BERNACCI, L. C., & VITTA, F. A. (1999). Fanerogâmica da Reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil). *Passifloraceae*. *Hoehnea* 26: 135-147.

- CASSIANO, A. P., LEMOS, E. G., & OLIVEIRA, J. C. (1998). Avaliação de espécies de *Passiflora* através de marcadores RAPD. *21* , 214.
- CERQUEIRA-SILVA, C. B., SANTOS, E. S., CONCEIÇÃO, L. D., 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): . p 731- 738.
- COSTA, A. M., & TUPINAMBÁ, D. D. (2005). 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*. 475-508. Planaltina: Embrapa Cerrados.
- Cruz, C. D., & Carneiro, P. C. (2003). *Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético*. Viçosa: UFV.
- CRUZ, T. V., SOUZA, M. M., ROZA, F. A., VIANA, A. J., BELO, G. O., & FONSECA, J. W. (2008). Germinação in vitro de grãos de pólen em *Passiflora suberosa* L. para sua utilização em hibridação interespecífica. *Revista Brasileira de Fruticultura* .
- CUNHA, M. A., BARBOSA, L. V., & JUNQUEIRA, N. T. (2002). Espécies Maracujazeiro. In: LIMA, A. A. (ed) *Maracujá Produção Aspectos Técnicos*. Embrapa Informação Tecnológica. (*Embrapa Informação Tecnológica. Frutas Brasil; 15*) , 104 p.
- FALEIRO, F. G. (2005). Programas e Perspectivas do Maracujá ornamental. In: JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.:(eds). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. *Embrapa Cerrados* , 456-464 p.
- FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N. T., BELLON, G., BORGES, T. A., ANJOS, R. N., PEIXOTO, J. R., et al. (2004). Diversidade genética de maracujazecom base em marcadores RAPDiro com resistência a múltiplas doenças. *Fitopatologia Brasileira* , 29, 325.
- FALEIRO, F. (2007). Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. . *Embrapa Cerrados* , p. 102.
- FERREIRA, M. E., & GRATTAPAGLIA, D. (1998). *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética* (3ª ed.). Brasília: EMBRAPA-CENARGEN.
- FEUILLET, C., & MacDougal, J. M. (2003). A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Passiflora*. 14(1), 34-38.
- FEUILLET, C., & MacDougal, J. M. (2007). Passifloraceae. In: KUBITZIKI, K (ed). *The families and genera of vascular plants*. *Springer, Berlin* .
- GANGA, R. M., LEMOS, E. G., GRILI, G. V., GONÇALVES, M. M., CHAGAS, E. A., WICKERT, et al. (2004). Diversidade genética em maracujazeiro amarelo utilizando marcadores AFLP. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 26 , 494-498.
- IBGE. (2012). *Produção brasileira de maracujá em 2010* . Acesso em 17 de 01 de 2014
- JUNQUEIRA, K. P., FALEIRO, F. G., JUNQUIERA, N. T., BELLON, G., RAMOS, J. D., SOUZA, L. S., et al. (2007). Obtenção de híbridos interespecíficos de *Passiflora laurifolia* L. e *Passiflora nítida* Kunth. *Anais 4º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas: UFLA. CD-ROM* .

- JUNQUEIRA, N. T., BRAGA, M. F., PEIXOTO, J. R., & BERNACCI, L. C. (2005). Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças .In: FALEIRO,FG;JUNQUEIRA,TNV;BRAGA,MF. (eds). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético* , pp. 81-108.
- JUNQUEIRA, N. T., LAGE, D. A., BRAGA, M. D., PEIXOTO, J. R., BORGES, T. A., & ANDRADE, S. R. (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 de Fruticultura* .
- MacDougal, J. M. (2001). Two new species of Passiflower (Passiflora, Passifloraceae) from southwestern. (11) , 69-75. México Novon.
- MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A., & BAUMGRATZ, J. F. (2004). Passiflora L. subgênero Decaloba (DC). Rchb. (Passifloraceae) na Região Sudeste do Brasil. Rodriguesia.
- MOJENA, R. (1977). Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. *The Computer Journal*. 20, p. 359-363.
- SOKAL, R. R., & ROMALF, F. J. (1962). *The comparasion of dendrograms by objective methods taxonomy* (Vol. 11).
- SOUZA, I., J. S., & MELLETT, L. M. (1997). *Maracujá: espécies, variedades, cultivo*. Piracicaba.
- ULMER, T., & MacDougal, J. M. (2004). *Passiflora: Passion flowers of the world*. *Timer Press* .
- VANDERPLANK, J. (2000). *Passion flowers*. *The MIT Press* , 224 p.
- VAZ PATTO, M. C. (2004). Assessing the genetic divesity of Portuguese maize germoplasm using microsatelite markers. *Euphytica* , 137, p. 63-67.
- VIANA, A. P., PERERIRA, T. N., PEREIRA, M. G., SOUZA, M. M., MALDONADO, J. F., & AMARAL, J. R. (2003). Genetic diversyte among yellow passion fruit comercial genotypes and among Passiflora species using RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura* , v. 25, p. 489-493.
- VILELA, M. S. (2013). Diversidade genética, produtividade e reação de prog~enies de maracujazeiro à doenças sob condições de campo. Faculdade de agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. 183 p.