

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIENCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM MARACUJÁ AMARELO
UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES fAFLP**

Rita Maria Devós Ganga

Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM MARACUJÁ AMARELO
UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES fAFLP**

Rita Maria Devós Ganga

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ruggiero

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Novembro – 2003

G197d Ganga, Rita Maria Devós
Diversidade genética em maracujá amarelo utilizando marcadores
moleculares fAFLP / Rita Maria Devós Ganga. -- Jaboticabal, 2003
vii, 48 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2003

Orientador: Carlos Ruggiero

Banca examinadora: Lúcia Maria Carareto Alves, Cristina
Petrarrolha Silva

Bibliografia

1. Maracujá. 2. Melhoramento genético. 3. Variabilidade genética.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 634.77:575

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Rita Maria Devós Ganga - nascida aos 27 de agosto de 1977, na cidade de Jaboticabal-SP. Formou-se em Engenharia Agrônômica pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –UNESP, em janeiro de 2001.

Dedico

A Deus, pois sem a Sua presença, eu nada conseguiria.

Ofereço

A meus avós, Carmino (In Memoriam), Justina (In Memoriam), Antônio e Alzira, por sempre me servirem de exemplos de bondade, honestidade e bravura... Pelo orgulho que sinto em ser sua neta.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Ruggiero, por toda orientação, no trabalho e na vida, e pela inestimável amizade.

A Prof^a. Dr^a Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, pela disponibilidade do laboratório, orientação e sugestões no trabalho.

A Banca Examinadora, pelas valiosas contribuições sugeridas.

Ao Fundo Passiflora, na pessoa de seu presidente, Dr. Ângelo Domingos Rossi, pela contribuição financeira sem a qual o trabalho não teria se realizado.

A Vitória, Gisele, Edvan, Michele e Ester, por toda ajuda, mas principalmente pela amizade e palavras de conforto e estímulo nos momentos de desespero.

A Célia, pela tradução do resumo e principalmente por toda sua amizade, inestimável e incondicional. Por estar sempre presente e pelas tantas risadas nos momentos de desespero.

Ao João, Rê, Lu, André, Fernanda, Lili, Emanuel, Tiago e Rodrigo pela ajuda e esclarecimentos no laboratório ou computador, e aos demais colegas do laboratório, pela amizade.

A tia Isabel, pela ajuda com a transferência dos recursos financeiros, a Dri e ao Ermínio, pelo auxílio na impressão do trabalho.

Ao Gideoni, pela ajuda com a impressão e pelas preciosas orações.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a obtenção das sementes de maracujá: Maria das Graças Rodrigues Ferreira (RO), Tadário Kamel de Oliveira (AC), Tarcísio Marcos de Souza Gondim, Ricardo Elesbão Alves, Suzy Anne e Antônio Augusto Pereira de Souza (CE), Francisco Laranjeira e Jorge Luis Loyola Dantas (BA), Francisco Joaci de Freitas Luz (RR), José Edimar Urano de Carvalho (PA), José Rafael da Silva (MG), Laura Maria Molina Meletti e Gisleine Galvão Bosquê (SP), Nilton "Paraca" (PR), Ademar Brancher e Rafael Borges (SC), Marcos Antônio da Silva Camacho, Bernardino Bezerra, Clarice Zanoni Fontes e José Ubirajara G. Fontoura (MS), Nilton Tadeu Vilela Junqueira (DF), Ana Luiza Viegas (RS), Lourival Ferreira

Cavalcante e Gilmara Mabel Santos (PB), Luis Mário da Silva e João Quintino de Moura Filho (SE), Antônio Carlos Benassi (ES), Haroldo Badin (MT), Geraldo Costa Nogueira Filho, Vilma M. Ferreira (AL) e Acsa Elizabeth Marques.

A Ana Sílvia, pela correção das referências bibliográficas.

A Simone, Ricardo, Raquel, Gilmara, Gabi, Étore, Du, Natanael, Benassi, Juninho, Éder, Geraldo, Elma, Magê, Rosilene, Dan, George, Basílio, Gabriel, Patrícia, Denise, Marcelo, Ju, Paulinho, Bianca, Paola, Franco, Givanildo e Mônica, pela amizade, e convívio durante o mestrado.

Aos Professores Orlando, Maria Inês, Rinaldo e Dilermando, e à Ivana, pelo apoio e consideração.

A Nádia, e Patrícia (RBF), pela amizade e toda ajuda.

A Deus, por ser meu esteio em todos os momentos, a força que me impele a olhar adiante frente às dificuldades da vida, não importando o quão grande elas pareçam ser.

A minha família, por ser meu ponto de referência, para o qual eu sei que sempre posso “voltar”.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	08
SUMMARY	09
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Importância Econômica	12
2.2 Origem e Botânica	14
2.3 Marcadores Moleculares	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Material Vegetal	19
3.2 Coleta de Folhas	20
3.3 Extração de DNA	20
3.4 fAFLP	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÕES	39
6. REFERÊNCIAS	40

DIVERSIDADE GENÉTICA EM MARACUJÁ AMARELO UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES fAFLP

RESUMO - Os maracujazeiros pertencem à família *Passifloraceae* e ao gênero *Passiflora*, reunindo mais de 500 espécies distribuídas pelos trópicos, principalmente no Brasil, centro de origem de pelo menos um terço das espécies, o que determina uma grande variabilidade genética. Como maior produtor mundial da fruta, o Brasil tem cerca de 35 mil hectares de área colhida e produção superior a 317 mil toneladas por ano, no qual Bahia, São Paulo e Sergipe respondem por mais de 50% da produção no País. A avaliação da variabilidade presente é indispensável aos trabalhos de melhoramento genético, cuja caracterização molecular pode fornecer a base para estudos de diversidade, pautando-se na composição genética sem influência do ambiente. Marcadores moleculares fAFLP foram utilizados para estimar a diversidade genética entre 36 acessos de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) coletados em 18 estados do Brasil. Os resultados obtidos permitiram concluir que os marcadores fAFLP se mostraram consistentes na verificação da variabilidade genética, detectando e quantificando a ampla divergência genética entre os 36 acessos de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. analisados, bem como a não formação de estruturação geográfica. Tais resultados podem auxiliar na definição de estratégias mais eficientes a serem utilizadas em programas de melhoramento genético de maracujazeiro amarelo.

Palavras-Chave: fAFLP, marcadores moleculares, *Passiflora edulis* f *flavicarpa* Deg., variabilidade genética

GENETIC DIVERSITY IN YELLOW PASSION FRUIT UTILIZING fAFLP MOLECULAR MARKERS

SUMMARY - Passion fruit trees belong to the *Passifloraceae* family and to the *Passiflora* genus, gathering more than 500 species distributed over the tropics, mainly in Brazil, source of at least one third of the species, what determines a great genetic variability. As the world's biggest producing country, Brazil has around 35 thousand hectares of harvest area, and a production superior to 317 thousand tons per year — from which Bahia, São Paulo and Sergipe are responsible for more than 50%. The assessment of the variability is essential to genetic breeding works, whose molecular characterization can provide us with the basis for studies on diversity, taking into account the genetic composition without environmental influence. fAFLP molecular markers were utilized to estimate genetic diversity among 36 yellow passion fruit accessions (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) collected in 18 Brazilian states. The obtained results led to the conclusion that the fAFLP markers were consistent regarding to the evaluation of genetic variability, detecting and quantifying the ample genetic divergence among the 36 analyzed accessions, as well as to the no geographic structural formation. Such results can be useful to the definition of more efficient strategies to be applied in genetic breeding programs of yellow passion fruit tree.

Keywords: fAFLP, molecular markers, *Passiflora edulis* f *flavicarpa* Deg., genetic variability

1. INTRODUÇÃO

Os maracujazeiros pertencem à família *Passifloraceae* e ao gênero *Passiflora*, reunindo mais de 500 espécies distribuídas pelos trópicos, a maioria na América tropical e principalmente no Brasil, centro de origem de pelo menos um terço das espécies, o que determina uma grande variabilidade genética.

O Brasil, maior produtor mundial da fruta (MELETTI, 1998), tem cerca de 35 mil hectares de área colhida e produção superior a 317 mil toneladas por ano, sendo que as regiões Nordeste e Sudeste respondem por 80% do total. Bahia, São Paulo e Sergipe destacam-se entre os estados, somando mais de 50% da produção no País (AGRIANUAL, 2002). Os cultivos comerciais baseiam-se na espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg., o maracujá amarelo ou azedo, que representa 95% dos pomares devido à qualidade de seus frutos, vigor, produtividade e rendimento em suco (MELETTI, 1998).

Embora no Brasil o maracujazeiro seja uma das principais fruteiras cultivadas e apresente a maior produção mundial, o melhoramento genético da espécie é incipiente e observa-se baixa produtividade dos pomares. A falta de variedades que associem alta produtividade, qualidade e homogeneidade dos frutos e tolerância ou resistência genética às principais doenças da cultura tem sido limitante para elevar a qualidade e a produtividade dos pomares brasileiros. Pontos fundamentais como tamanho de frutos, variações na coloração e rendimento em suco poderiam ser melhor fixados em programas de melhoramento genético (RUGGIERO & OLIVEIRA, 1998a), com cada região produtora desenvolvendo suas variedades de maracujá amarelo, satisfazendo as exigências do consumidor, da indústria e dos produtores (RUGGIERO & OLIVEIRA 1998b).

Por ser centro de origem do maracujá, o Brasil possui o ponto de partida para qualquer programa de melhoramento genético de uma espécie, a ampla variabilidade genética. Sua manipulação por meio de métodos adequados pode levar, seguramente, à obtenção de genótipos superiores, com relação às características agronômicas de

interesse. Essa variabilidade tem na sua caracterização e avaliação ferramentas indispensáveis aos trabalhos de fitomelhoramento, pois se constituem na parte essencial da biodiversidade, e são responsáveis pelo desenvolvimento sustentável da agricultura e da agroindústria. O aproveitamento dos recursos genéticos pressupõe uma série de observações biológicas e agronômicas na variabilidade existente, e, uma vez que o maracujá apresenta grande número de espécies e variedades brasileiras, é imprescindível manter esse patrimônio para utilização agronômica, conservação da base genética e intercâmbio de germoplasma.

Neste aspecto, a caracterização molecular pode fornecer a base para estudos de diversidade, pois se apóia invariavelmente na composição genética do organismo estudado, permitindo sua caracterização precoce sem influência do ambiente. A técnica AFLP tem muitas vantagens para estudos sistemáticos; ela é reproduzível, rápida e confiável, além de haver um número ilimitado de marcadores (KARDOLUS et al., 1998). Tem sido usada em estudos sobre bactéria (JANSSEN et al., 1997), fungos (MUELLER & WOLFENBARGER, 1999) e plantas (SANCHEZ et al., 1999 e KARDOLUS et al., 1998). Com o desenvolvimento de tais ferramentas para as análises genéticas a nível molecular, como os AFLPs, tornou-se possível examinar em maiores detalhes a origem evolucionária dos genomas vegetais, assim como acessar o grau de variabilidade genética relatado em grupos de plantas. Por exemplo, estudos têm sido conduzidos em *Manihot esculenta* Crantz (SANCHEZ et al., 1999; COLOMBO et al., 2000), *Humulus lupulus* (JAKŠE et al., 1996), *Nicotiana tabacum* (REN & TIMKO, 2001) e *Helianthus annuus* (HONGTRAKUL et al., 1997), entre outros, produzindo significativo avanço nas relações filogenéticas e no grau de diversidade genética entre indivíduos e populações.

Este trabalho teve por objetivo a utilização de marcadores moleculares fAFLP para estimar a diversidade genética entre acessos de maracujá amarelo coletados em dezoito estados do Brasil, averiguando a existência de estruturação geográfica entre os mesmos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância Econômica

A grande produção brasileira de frutas que coloca o país como um dos primeiros produtores mundiais está baseada em cerca de vinte espécies, das quais a maioria são exóticas, isto é, não nativas no Brasil. Entre as espécies nativas que têm produção importante estão o abacaxi, o cacau, o caju, a castanha, o mamão e o maracujá (DONADIO, 1998).

Brasil, Peru, Venezuela, África do Sul, Sri Lanka, Austrália, Nova Guiné, Ilhas Fiji, Havaí, Formosa e Quênia respondem por 80 a 90% da produção mundial de maracujá, embora nem todos cultivem a mesma espécie (REITER & HEIDEN, 1998). O Brasil se destaca como o primeiro produtor mundial da fruta, com produção de 317.146 toneladas e 35.637 hectares cultivados. A produção brasileira concentra-se nas regiões Nordeste (43,2%) e Sudeste (36,6%), na qual Bahia e São Paulo destacam-se como os maiores produtores, com produção superior a 126.200 toneladas. Sergipe, Pará, Minas Gerais e Ceará também têm importante contribuição (AGRIANUAL, 2002).

Muitas espécies de *Passiflora* são cultivadas pelas suas propriedades alimentícias, ornamentais e medicinais, mas principalmente pela qualidade de seus frutos. O valor ornamental é conferido pelas belas flores que a planta produz, exercendo atração pelo tamanho, exuberância de cores e originalidade de formas. Os frutos, além de consumidos *in natura*, são usados para fazer sucos, doces, refrescos e sorvetes. O uso medicinal, bastante difundido, baseia-se nas propriedades calmantes da *Passiflorina*, um sedativo natural encontrado nos frutos e nas folhas (SOUZA & MELETTI, 1997). Segundo OLIVEIRA (1987), a planta tem outras propriedades medicinais: é utilizado como vermífugo e febrífugo, além de possuir efeitos diuréticos, antipneumônicos, hipnóticos e abortivos para o gado.

No Brasil, as espécies de maior expressão comercial são *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. (maracujá amarelo ou azedo), *Passiflora edulis* (maracujá roxo) e

Passiflora alata (maracujá doce) (SOUZA & MELETTI, 1997), embora o maracujá amarelo seja o mais cultivado por apresentar características agrônômicas desejáveis, como maior produtividade, vigor e rendimento em suco, menor sensibilidade a certas moléstias e suco mais ácido, o que permite espaço importante tanto no mercado de frutas frescas como na indústria processadora de suco (MEDINA, 1980; LEITE et al., 1994).

O consumo de maracujá no País está mais voltado para fruta *in natura*, fazendo com que o volume de fruta fresca produzido para comercialização seja praticamente destinado ao mercado interno, enquanto que do volume de frutas processadas, principalmente na forma de suco, apenas menos da metade é consumido internamente (BLISKA et al., 1994). De acordo com RUGGIERO¹, o mercado de fruta fresca consome cerca de 50% de toda produção nacional, sendo que o restante destina-se à indústria de suco que o exporta em forma concentrada ou o comercializa no Brasil como suco integral ou néctar. O suco de maracujá é um dos principais produtos classificados como exóticos e que estão aumentando de importância devido à grande expansão de consumo surgida na Europa e nos Estados Unidos (LEITE et al., 1994). Estimativas da FAO indicam que o nicho de mercado dos sucos concentrados tropicais, no qual se inclui o do maracujá, está em grande crescimento, representando um movimento anual da ordem de US\$ 1 bilhão (AGRIANUAL, 2000).

No Estado de São Paulo, pela proximidade aos grandes centros consumidores, o principal mercado para o maracujá é o da fruta *in natura*, que garante ao produtor preços médios superiores a 100% para os frutos de boa qualidade, em relação ao preço daqueles destinados à indústria (RIZZI et al., 1998). Ressalta-se que é uma cultura típica de pequena escala, grande absorvedora de mão-de-obra e potencial geradora de divisas com a exportação de seu suco, constituindo-se em importante alternativa de desenvolvimento para diferentes regiões brasileiras (AGRIANUAL, 2000).

¹ 'RUGGIERO, C. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP. Campus de Jaboticabal) Comunicação Pessoal, 2003.'

2.2 Origem e Botânica

Os maracujazeiros pertencem à ordem *Passiflorales*, família *Passifloraceae*, que apresenta 18 gêneros com mais de 580 espécies, distribuídas essencialmente nas regiões tropicais, ocorrendo nas Américas, Ásia, Oeste da Índia, Austrália, África, Filipinas, Ilhas do Pacífico Sul e Galápagos, sendo que 95% são predominantes da América do Sul (VANDERPLANK, 1991). Segundo SACCO (1980) e CERVI (1986), a família é representada no Brasil por quatro gêneros: *Passiflora* (ocorrência em todo o país), *Dilkea* (Amazonas e Pará), *Mitostemma* (Mato Grosso, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul) e *Tetrastylis* (Bahia, Minas Gerais e Rio Grande do Sul). Entretanto, para OLIVEIRA (1987) e LEITÃO Filho & ARANHA (1974), apenas os dois primeiros gêneros representam esta família no país. Dentro da família, o gênero *Passiflora* é considerado o mais representativo (BENSON et al., 1975), e segundo LOPES (1991), seu maior centro de distribuição geográfica localiza-se no Centro-Norte do Brasil. Assim, existe uma ampla variabilidade genética a ser conhecida, protegida e convenientemente manuseada (SOUZA & MELETTI, 1997).

O gênero *Passiflora* compreende trepadeiras herbáceas ou lenhosas, podendo apresentar-se como ervas e arbustos de hastes cilíndricas ou quadrangulares, angulosas, suberificadas, glabras ou pilosas. Seus representantes apresentam as características da família e diferem dos outros gêneros pela presença de 5 estames, 5 pétalas e 5 sépalas, pelo ginandróforo ereto com estames de extremidades livres e com 3 estigmas (TEIXEIRA, 1994). As folhas são alternas, raramente opostas, inteiras, lobadas ou partidas; as flores são grandes, bonitas, axilares, hermafroditas, muito raramente unissexuais (LEITÃO Filho & ARANHA, 1974). MANICA (1981) relata que este gênero apresenta na axila de cada folha, além de uma gavinha, uma gema florífera e uma gema vegetativa.

A espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. (maracujá amarelo) é a mais cultivada no Brasil (MELETTI, 1998). Entretanto, apresentam expressão comercial também as espécies *Passiflora edulis* (maracujá roxo) e *Passiflora alata* (maracujá doce) (SOUZA & MELETTI, 1997). SALOMÃO & ANDRADE (1987) mencionam que

também são cultivadas, embora em escala bem inferior, *P. quadrangularis* (maracujá-melão), *P. caerulea* (maracujá-de-cobra) e *P. laurifolia* (maracujá-laranja), e mais esporadicamente, *P. ligularis* (maracujá-urucu), *P. maliformis* (maracujá-grande), *P. raddiana* (maracujá-mirim) e *P. capsularis* (maracujá-vermelho-das-Antilhas).

Os estudos taxonômicos em *Passiflora* baseiam-se na caracterização morfológica e agrônômica da planta, levando a uma classificação nítida até o táxon espécie. Porém, dentro das espécies, as dissimilaridades existentes apresentam maiores dificuldades para serem observadas e caracterizadas. Normalmente, em *P. edulis*, a caracterização está relacionada ao fruto e a algumas características pomológicas, tais como produção por safra, peso e tamanho do fruto, rendimento, brix e acidez do suco, sendo que estes caracteres quantitativos não são precisos sob o plano taxonômico (CROCHEMORE et al., 2003).

De acordo com a classificação botânica atual, o maracujá amarelo é considerado uma variedade do maracujá roxo, o que tem gerado controvérsias. Alguns pesquisadores salientaram o alto grau de diversidade do maracujá amarelo em relação ao roxo, podendo vir a ser redefinido taxonomicamente (CASSIANO, 1998).

2.3 Marcadores Moleculares

Nos últimos dez anos, técnicas que permitem fazer a distinção diretamente ao nível de DNA têm permitido acessar a variabilidade genética dentro do “pool” gênico de espécies cultivadas, assim como identificar a diversidade disponível em bancos de germoplasma (SALLA et al., 2002).

Diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para a detecção de variabilidade genética em seqüência de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tanto no estudo de genética como na prática de melhoramento de plantas, caracterizando o genótipo a

partir de amostras de células ou de tecidos, em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, desde que suficiente quantidade de DNA possa ser obtida (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Uma forma de caracterização dos recursos biológicos pode ser através da análise de AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados), representando a tecnologia mais recente para a obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos em genomas de procaríotos e eucaríotos. O ensaio de AFLP combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com a velocidade e praticidade de detecção do polimorfismo via PCR (reação da polimerase em cadeia). A análise de AFLP consiste essencialmente de quatro etapas. Na primeira etapa o DNA genômico total do indivíduo é clivado com duas enzimas de restrição. Na segunda etapa, adaptadores específicos são ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Na terceira etapa, as seqüências dos adaptadores e o sítio de restrição servem como um local de ligação do “primer” para uma subsequente seleção de baixo nível ou amplificação pré-seletiva dos fragmentos de restrição. O “primer” complementar MseI contém uma Citosina na extremidade 3’, enquanto o complementar EcoRI contém uma Adenina na extremidade 3’. Apenas aqueles fragmentos genômicos que tenham um adaptador em cada extremidade amplificam exponencialmente durante a amplificação por PCR. Esse passo efetivamente ‘purifica’ o alvo a partir de seqüências que amplificam apenas linearmente, ou seja, aquelas com uma extremidade modificada. Uma segunda seleção é realizada com “primers” com mais duas bases adicionais nas extremidades. Assim, uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR, utilizando “primers” especificamente desenhados para reconhecer seqüências nos adaptadores. Na quarta e última etapa, a subpopulação de fragmentos amplificados é separada em gel de alta resolução (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Técnicas como AFLP são utilizadas para mapeamento genômico e “fingerprinting”, podendo ser usadas para calcular distâncias genéticas entre genótipos. A identidade e distribuição das bandas de AFLP no genoma estão claramente relacionadas aos iniciadores selecionados. Por se tratar de um marcador não

influenciado pelo ambiente, que se apóia na composição genética do organismo em estudo, permite precoce caracterização do mesmo (FABIANO, 2003).

A maioria dos trabalhos na literatura que dispõe de informações de caracterização de cultivares tem como objetivo principal acessar a variabilidade e o nível de diversidade genética das diferentes culturas. De fato, quando feita sistematicamente e com técnicas padronizadas, a caracterização de cultivares com marcadores moleculares pode levar a obtenção de um banco de dados precioso para programas de melhoramento. Além da caracterização de cultivares, os programas de melhoramento que adotarem o uso de descritores de DNA serão beneficiados com informações adicionais sobre o nível de diversidade e a constituição genética do germoplasma existente.

Alguns trabalhos foram desenvolvidos utilizando a eficiência desta técnica em estudos de diversidade em cultivares de *Saccharum officinarum* (MATSUOKA et al., 2003), acessos de *Cucurbita moschata* D. (RAMOS et al., 2003), genótipos da forrageira *Cynodon* spp. (ZHANG et al., 1999) e em progênie de *Coffea* spp., bem como para obtenção de seu mapa de ligação com QTLs relacionados a resistência ao nematóide *Meloidogyne incognita* (AUKAR, 2003). CLERC et al. (1998) avaliaram a diversidade genética de 23 estirpes de *Pseudomonas syringae* usando as técnicas RAPD e AFLP, detectando que o AFLP foi mais eficiente em avaliar a diversidade intrapatovar do que o RAPD, deixando claro o delineamento entre as distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas. Em estudo realizado por AUKAR et al. (2001), dezenove espécies de *Passiflora* foram satisfatoriamente estudadas com relação à detecção da variabilidade genética com esta técnica. Outros estudos têm sido conduzidos em *Manihot esculenta* Crantz (SANCHEZ et al., 1999; COLOMBO et al., 2000), *Humulus lupulus* (JAKŠE et al., 1996), *Nicotiana tabacum*. (REN & TIMKO, 2001) e *Helianthus annuus* (HONGTRAKUL et al., 1997), produzindo significativo avanço nas relações filogenéticas e no grau de diversidade genética entre indivíduos e populações.

Os marcadores moleculares podem complementar o melhoramento de forma distinta, isto é, fornecendo uma medida confiável da diversidade genética, a qual pode ser utilizada para determinação do grau de parentesco entre linhagens e variedades e

para a proteção dos direitos da propriedade intelectual. Além disso, os marcadores moleculares podem auxiliar na avaliação de características de difícil mensuração e proporcionar o primeiro passo para o entendimento da biologia e da estrutura de muitas características, especialmente das quantitativas (BORÉM, 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, São Paulo.

3.1 Material Vegetal

Sementes e mudas de maracujá amarelo foram obtidas em diversos estados do País num total de 36 amostras. As sementes foram plantadas em sacos plásticos e mantidas em casa de vegetação até a coleta de folhas para a extração do DNA das plantas.

A seguir, tem-se a relação das amostras coletadas e de sua origem:

Tabela 01. Identificação das amostras analisadas.

Amostra	Descrição	Código	Origem
1	EC-3-0	BRA/A	Brasília, DF
2	EC-3-L	BRA/B	Brasília, DF
3	MSC	BRA/C	Brasília, DF
4	Vermelhão	BRA/D	Brasília, DF
5	EC-RAM	BRA/E	Brasília, DF
6	Local	PA/A	Belém, PA
7	Golden	PA/B	Belém, PA
8	Seleção EMBRAPA	PA/C	Belém, PA
9	IAC 273	SP/A	Monte Alegre do Sul, SP
10	IAC 277	SP/B	Monte Alegre do Sul, SP
11	Rafael 1	MG/A	Araguari, MG
12	Rafael 2	MG/B	Araguari, MG
13	SC	SC	Urussanga, SC
14	RS	RS	Pelotas, RS
15	Camacho	MS/A	Campo Grande, MS
16	IAC 275	MS/B	Dourados, MS
17	AFRUEC	SP/C	Vera Cruz, SP
18	CNPMF	BA	Cruz das Almas, BA
19	SE	SE	Aracaju, SE
20	PR	PR	Londrina, PR
21	Barbalha	CE/A	Barbalha, CE

22	Ipiapaba	CE/B	São Benedito, CE
23	AL	AL	Maceió, AL
24	Sooretama	ES/A	Sooretama, ES
25	Linhares	ES/B	Linhares, Es
26	Sinop	MT	Sinop, MT
27	AC	AC	Rio Branco, AC
28	PB	PB	Areia, PB
29	Paulista 1	RR/A	Boa Vista, RR
30	Paulista 2	RR/B	Boa Vista, RR
31	Peroba	RR/C	Boa Vista, RR
32	Regional	RR/D	Boa Vista, RR
33	Amarelo 1	RO/A	Candeias do Jamari, RO
34	Amarelo 2	RO/B	Candeias do Jamari, RO
35	Bananal 1	ES/C	Bananal, ES
36	Bananal 2	ES/D	Bananal, ES

3.2 Coleta de folhas

Três a quatro folhas jovens e sadias de cada amostra foram coletadas, identificadas em sacos plásticos e transportadas sob refrigeração ao laboratório, onde foram lavadas em água corrente, secas com papel toalha, maceradas em Nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C.

3.3 Extração de DNA

A extração de DNA do tecido foliar de cada amostra foi realizada pelo Método proposto por Doyle & Doyle (1991), com modificações descritas a seguir: Pesou-se em microtubo de 1,5 mL 0,10 a 0,14 g de tecido vegetal macerado em Nitrogênio líquido e adicionaram-se 750 µL de tampão de extração CTAB (Tabela 02), sendo a amostra aquecida a 65°C por 30 minutos, agitando ocasionalmente.

Tabela 02. Solução CTAB: reagentes e quantidades (para uma amostra)

Reagentes	Quantidade
Tris 1M pH 7,5	75 μ L
NaCl 5M	210 μ L
EDTA 0,5M pH 8,00	30 μ L
Água	427,75 μ L
CTAB	0,015 g
Mercaptoetanol 0,5%	3,75 μ L

A amostra foi esfriada a temperatura ambiente por aproximadamente 8 minutos e, em seguida, foram adicionados, a cada microtubo, 450 μ L de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, v:v). Agitou-se por inversão por um período de 4 minutos e o microtubo foi centrifugado a 17000xg, a 20°C, por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido pra um novo microtubo. Adicionou-se um volume de 2/3 (aproximadamente 400 μ L) de isopropanol gelado e misturou-se, cuidadosamente, para precipitar os ácidos nucleicos. As amostras foram incubadas a -20°C por pelo menos 2 horas ou a -80°C por 1 hora. Recuperou-se o DNA após centrifugação da solução a 17000xg, por 15 minutos, a 45°C. Em seguida, o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 76% e centrifugado a 17000xg, a 4°C, por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante, cuidadosamente, e o precipitado foi seco ao ar em temperatura ambiente, sendo em seguida resuspendido em 200 μ L de TE (Tris HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM). Após um repouso de 30 minutos, adicionou-se 2 μ L de uma solução de RNase (100 μ g/mL) e incubou-se por 1 hora, a 37°C. Adicionaram-se 200 μ L de água Milli Q filtrada, 80 μ L de acetato de amônio e 1000 μ L de etanol absoluto gelado por amostra. As amostras foram incubadas a -80°C, por 1 hora. Centrifugou-se o DNA a 17000xg, por 15 minutos, a 4°C. A amostra foi seca e ressuspendida em 20 μ L de TE (Tris HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM).

As amostras que não apresentaram leitura da relação 260/280 nm satisfatória, foram submetidas a uma purificação do DNA, descrita a seguir. Completou-se o volume do precipitado de cada amostra para 100 μ L com TE (Tris HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM) e, em seguida, adicionou-se igual volume da solução fenol/clorofórmio/álcool

isoamílico (50:48:2, v:v:v). Centrifugou-se o DNA a 17000xg, por 10 minutos, a 27°C (temperatura ambiente). O sobrenadante foi transferido, adicionou-se igual volume da solução clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, v:v), centrifugando-se em seguida a 17000xg, por 10 minutos e a 27°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 10% do volume transferido de NaCl 1M e o dobro do volume transferido de etanol absoluto gelado. As amostras foram deixadas em repouso por pelo menos 2 horas a -20°C ou por 1 hora a -80°C. Centrifugou-se o DNA a 12000xg por 15 minutos, a 4°C. Em seguida descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 800 µL de etanol 70% gelado. Repetiu-se a centrifugação anterior, bem como as etapas de descarte do sobrenadante e adição do etanol 70% gelado. Logo em seguida centrifugou-se o DNA a 12000xg, por 15 minutos, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi seco ao ar em temperatura ambiente, sendo em seguida ressuscitado em aproximadamente 15 µL de TE (Tris HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM).

As amostras foram diluídas em água Milli Q filtrada para a quantificação dos DNAs, que foi realizada em Biofotômetro, medindo-se a absorbância em contraste com uma amostra de água (branco), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A quantidade de DNA de cada amostra foi estimada utilizando-se o padrão no qual uma unidade de densidade ótica (UDO) equivale a 50ng de DNA por µL de solução. A relação entre as leituras 260/280 nm proveu uma estimativa da pureza do ácido nucléico; amostras que não apresentaram uma leitura entre 1,7 e 2,0 foram descartadas.

3.4 fAFLP

Realizado de acordo com o AFLP "Plant Mapping Protocol" da "Applied Biosystems" (1997):

Digestão com as Enzimas de Restrição

O DNA foi submetido à digestão em uma reação contendo 500 ng de DNA (solução de 10 µL), 1,25 µL de tampão "Ract" 10x, 1,5 U de MseI e 3U de EcoRI. A

reação foi incubada a 37°C por 14 horas e em seguida a 65°C por 10 minutos, para inativação das enzimas de restrição.

Ligação dos Adaptadores

0,33 µL de cada adaptador (para EcoRI e MseI) foram incubados, separadamente, a 95°C por 5 minutos e depois no gelo por 10 minutos. Em seguida foram misturados num mesmo microtubo. A reação de ligação constituiu-se de: 3,67 µL da reação de digestão, 1 µL de tampão T₄ DNA ligase, 0,5 µL da enzima T₄ DNA ligase e 0,66 µL dos adaptadores pareados anteriormente. A reação foi incubada a 20°C, por 2 horas. Após essa reação de ligação, o DNA foi diluído 10x para fazer a reação pré-seletiva, adicionando-se 45 µL de água Milli Q filtrada por amostra.

Amplificação Pré-Seletiva

Os fragmentos ligados aos adaptadores foram amplificados pela reação constituída de 2 µL de DNA ligado, 0,5 µL da mistura de “primers” da pré-seletiva e 7,5 µL de AFLP Core Mix. O programa de amplificação foi de 72°C, por 2 minutos, seguido de 20 ciclos de 94°C por 20 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos. Por fim, permaneceu a 60°C por 30 minutos. As amostras devem ser estocadas a 2-6°C até o momento do uso.

Após a amplificação pré-seletiva foram aplicados 10 µL de cada amostra em um gel de agarose (1,5%) e corado com Brometo de etídeo (0,5 µg/mL) para averiguar se ocorreu a amplificação. O gel deve ser visualizado em um transiluminador com UV. Uma banda difusa do produto entre 100 e 1500 pb deve ser visível.

O produto da amplificação pré-seletiva foi diluído (2x) para a realização da amplificação seletiva, transferindo-se 5 µL de DNA e 10 µL de água Milli Q filtrada, por amostra, para uma nova placa de PCR.

Amplificação Seletiva

A reação de amplificação seletiva foi feita com 1,5 µL do produto de reação de amplificação pré-seletiva, 7,5 µL de AFLP Core Mix, 0,7 µL do “primer” MseI (“primer”-

CXX) e 0,7 μL do “primer” EcoRI (“primer” - AXX - marcado com fluorescência). Foi realizada uma reação de PCR com os seguintes passos: um ciclo de 94°C por 2 minutos; dez ciclos de 94°C por 20 segundos, 66°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, sendo que a cada ciclo deve-se diminuir um grau da temperatura de pareamento até atingir 57°C (66°C, 65°C, ... , 57°C). O décimo primeiro ciclo (94°C por 20 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos) deverá ser repetido 21 vezes. Finalizando o décimo segundo passo com um ciclo de 60°C, por 30 minutos. O produto da amplificação seletiva deve ser estocado a 2-6°C até o momento do uso.

1,5 μL do DNA da amplificação seletiva de cada amostra foi transferido para uma nova placa de PCR, adicionando-se, logo após, 1,5 μL de formamida deionizada, 0,625 μL de azul (“Loading Solution”) e 0,125 μL do padrão interno de peso molecular GeneScan – 500 [ROX] marcado por fluorescência com a cor vermelha. Em seguida, foram incubados a 95°C por 5 minutos, e rapidamente colocados em gelo. Aplicou-se 1,3 μL de cada amostra em um gel 5% denaturante “Long Ranger”, sendo utilizado TEB 1X (Tris – 0,089M, Ácido Bórico – 0,89M, EDTA – 0,002M) como tampão de corrida, no equipamento ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (PE – Applied Biosystems), por 4 horas de corrida, a 2500V.

Análise dos dados de um Gel de fAFLP

Os dados obtidos após a corrida do gel de fAFLP são analisados com o auxílio de três softwares:

- GeneScan Analysis Software (coleta os dados obtidos dos produtos amplificados no gel de eletroforese fAFLP).
- Genotyper DNA Fragment Analysis Software (usa como fonte de análise os dados obtidos através do software GeneScan, gerando eletroferogramas e tabelas binárias de presença (1) e ausência (0) de bandas).

A matriz gerada pelo “Genotyper” foi analisada no Programa “Paup” [4.0b10] para o cálculo da dissimilaridade genética entre as amostras através do Método da Distância, utilizando o padrão de agrupamento “Neighbor-Joining” para, a seguir, construir o dendrograma. Uma análise de “bootstrap” foi realizada com 1000 repetições, para dar suporte à topologia da árvore em relação à remontagem dos dados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amplificações adicionais por PCR são feitas para reduzir a complexidade da mistura de tal modo que possa ser resolvida em um gel de poliacrilamida. Essas amplificações usam “primers” escolhidos a partir de 24 possíveis “primers” AFLP seletivos (8 MseI, 8 EcoRI para plantas com genomas de tamanho regular e 8 EcoRI para plantas com genomas de tamanho pequeno). Após essas amplificações, uma porção de cada amostra foi analisada em um Sequenciador de DNA da Perkin-Elmer Applied Biosystems.

A amplificação seletiva com um “primer” EcoRI e um “primer” MseI amplifica principalmente fragmentos com extremidades EcoRI-MseI. Os fragmentos com extremidades EcoRI-EcoRI não amplificam bem. Os fragmentos MseI-MseI não são visualizados porque eles não contém a marcação com corantes fluorescentes. Apenas os fragmentos contendo extremidade EcoRI são detectados. Genomas individuais produzem distintos perfis de fragmentos de restrição com cada par de “primer” de amplificação.

O padrão interno de peso molecular GeneScan-500[ROX] usado no fAFLP é marcado por fluorescência com a cor vermelha (ROX), possuindo 15 fragmentos com os seguintes comprimentos (pb): 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250*, 300, 340, 350, 400, 450, 490 e 500 (Figuras 01 e 02) (* o pico 250 pb não é levado em conta quando da análise do gel feita através dos softwares GeneScan e Genotyper).

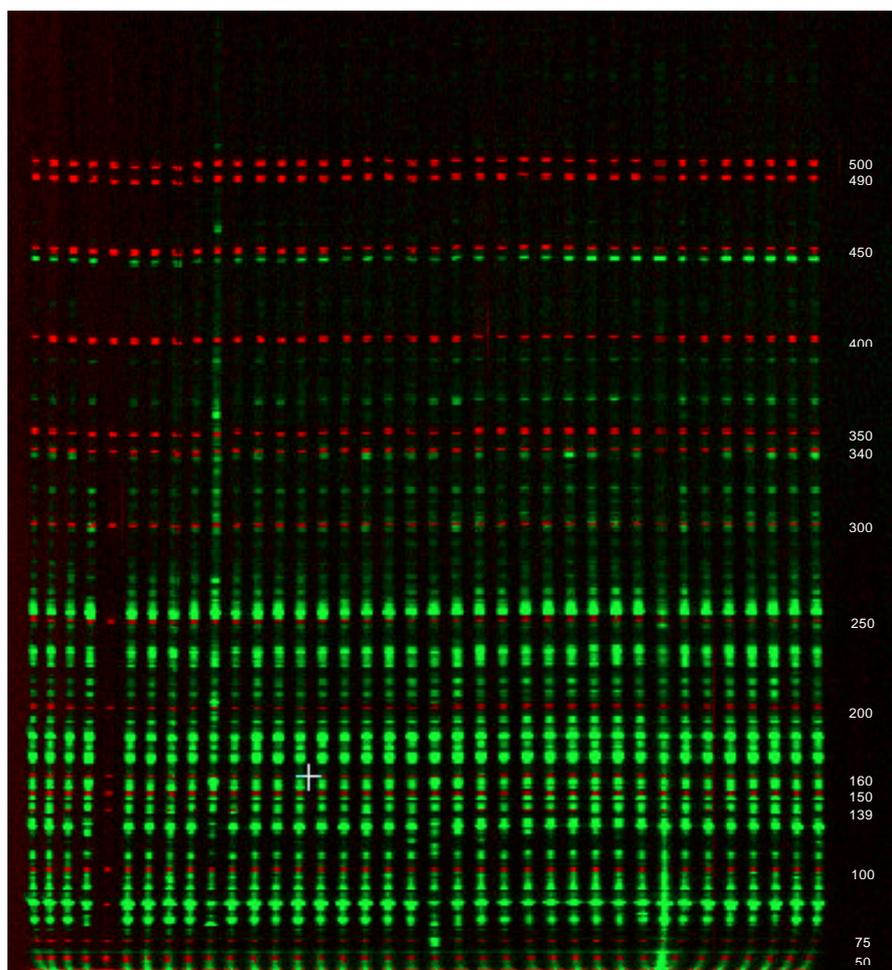


Figura 01. Perfis dos produtos de amplificação dos DNAs, com o “primer” AAG-CAT (Joe), dos 36 acessos de *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. Padrão de peso molecular interno 500-Rox, de 50 a 500 pb (bandas em vermelho). Amostras aplicadas apenas nas canaletas ímpares de 1 a 73 (Tabela 01).

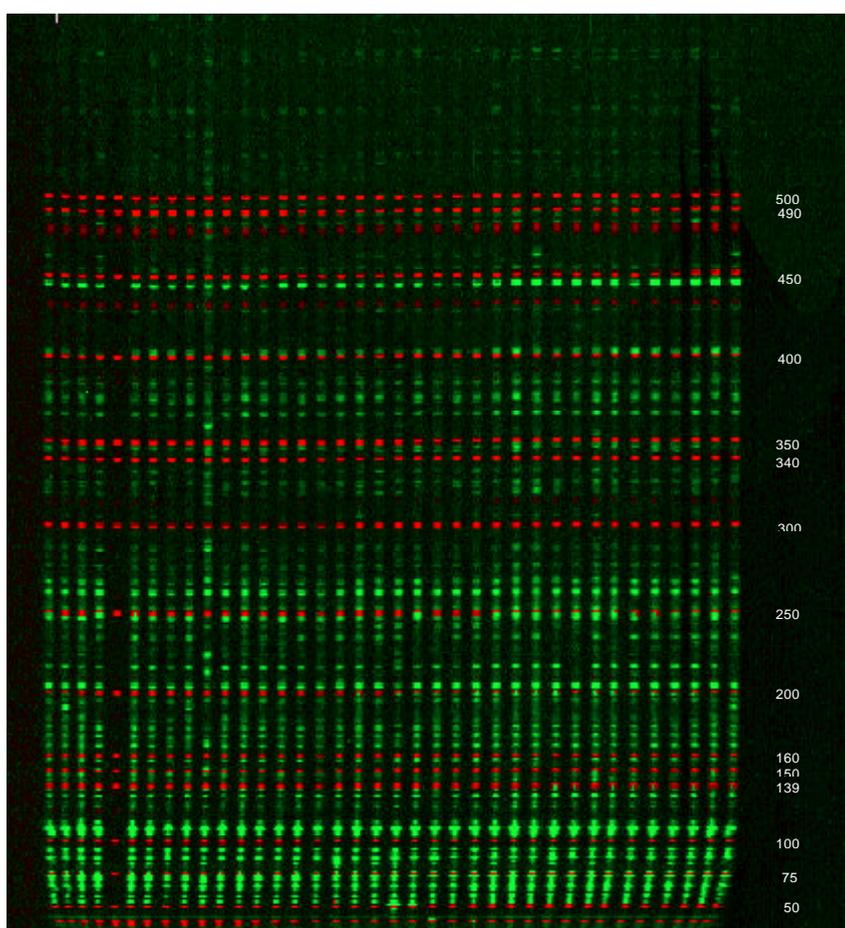


Figura 02. Perfis dos produtos de amplificação dos DNAs, com o “primer” AAG-CTG (Joe), dos 36 acessos de *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. Padrão de peso molecular interno 500-Rox, de 50 a 500 pb (bandas em vermelho). Amostras aplicadas apenas nas canaletas ímpares de 1 a 73 (Tabela 01).

Antes de se iniciar a técnica fAFLP com todas as amostras fez-se uma padronização com duas amostras, para definir qual a melhor diluição (da pré-seletiva para fazer a seletiva) e qual a melhor combinação de “primers”. No protocolo do AFLP Plant Mapping são dadas 64 possíveis combinações de “primers” EcoRI e MseI, sendo que apenas os “primers” EcoRI são marcados por fluorescência na extremidade 5’ com uma das três diferentes cores, a saber, amarela (NED), azul (FAM) ou verde (JOE), a depender do “primer” EcoRI utilizado. Foram testadas quatro combinações de “primers”, sendo um com marcação azul (FAM), um com marcação amarela (NED) e dois com marcação verde (JOE), além de duas diluições, de 4,5x e 2,0x (Tabela 03).

Tabela 03. Combinações de “primers” e diluições testadas para análises fAFLP.

Combinações de “primers” (EcoRI-MseI)	Diluições (H ₂ O + Pré-Seletiva)
ACT-CTT (FAM)	4,5x = 22,5 µL H ₂ O + 5 µL pré-seletiva
AGC-CTC (NED)	2,0x = 10 mL H₂O + 5 mL pré-seletiva
AAG-CAT (JOE)	-
AAG-CTG (JOE)	-

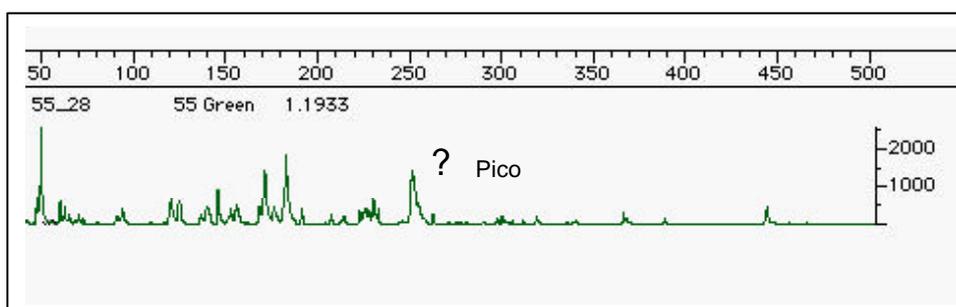
A partir dos resultados obtidos com os testes preliminares foram escolhidos os pares de “primers” AAG-CAT (JOE) e AAG-CTG (JOE), bem como a diluição de 2,0x, para repetir o fAFLP com as 36 amostras, aplicadas apenas nas canaletas ímpares do gel fAFLP.

Os resultados mostraram que os dois pares de “primers” utilizados na análise fAFLP revelaram um total de 123 marcas polimórficas (Tabela 04), variando entre 50 e 500 pb. Um pequeno número de bandas foi monomórfico e, portanto, as bandas foram excluídas da análise. Observa-se que foi possível obter 93,89% de marcas polimórficas a partir das duas combinações de “primers” (AAG-CAT e AAG-CTG), confirmando a precisão da técnica descrita na literatura (VOS et al., 1995; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998), destacando-se entre as demais pelo grande número de fragmentos gerados, permitindo ampla amostragem do genoma.

Tabela 04. Pares de “primers” utilizados e número de fragmentos gerados.

Par de “primer”	Fragmentos		
	Monomórficos	Polimórficos	Total
AAG-CAT	7	67	74
AAG-CTG	1	56	57
Total	8	123	131

O tamanho das marcas variou de 50 a 500bp, conforme se observa nos eletroferogramas (Figuras 03 e 04). Os picos se referem à presença de bandas (ou marcas) nos géis (Figuras 01 e 02), demonstrando o tamanho dos fragmentos pela posição em relação à escala na parte superior das figuras. Apesar de serem da mesma amostra (amostra 28, acesso PB), nota-se que os padrões de bandeamento (picos) nos eletroferogramas diferem entre si, pois os “primers” utilizados amplificam regiões distintas do genoma, gerando um grande número de marcadores moleculares (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

**Figura 03.** Eletroferograma da amostra 28 (PB), “primer” marcado AAG-CAT.

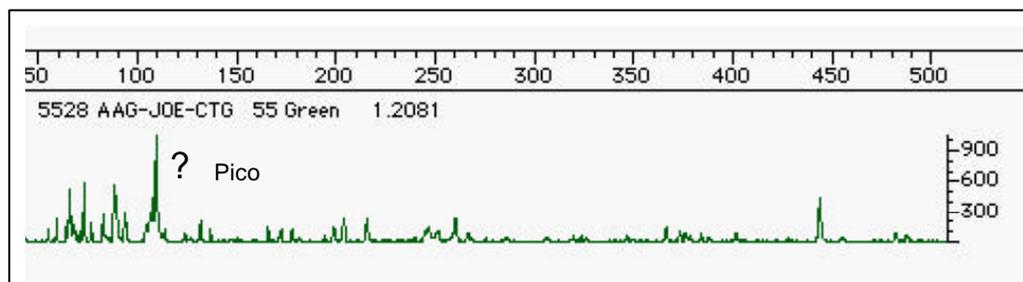


Figura 04. Eletroferograma da amostra 28 (PB), “primer” marcado AAG-CTG.

A divergência ou distância genética entre as plantas variou de 0,065 (ou 8 marcas), entre AFRUVEC e Sooretama, a 0,4959 (ou 61 marcas), entre IAC 273 e Sinop. A Tabela 05 revela a alta divergência observada entre as plantas de maracujazeiro amarelo.

Tabela 05. Divergência genética observada entre 36 genótipos de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. a partir de marcadores fAFLP.

	BRA/A	BRA/B	BRA/C	BRA/D	BRA/E	PA/A	PA/B	PA/C	SP/A	SP/B	MG/A	MG/B	SC	RS	MS/A	MS/B	SP/C	BA
BRA/A		11*	14	29	18	17	20	17	51	12	16	13	9	18	15	20	18	20
BRA/B	0,0894		19	38	21	22	17	20	52	17	25	24	16	25	18	27	29	25
BRA/C	0,1138	0,1545		33	16	19	16	17	51	12	22	21	13	20	19	22	22	22
BRA/D	0,2358	0,3089	0,2683		35	30	41	38	40	33	25	24	30	25	32	31	25	29
BRA/E	0,1463	0,1707	0,1301	0,2846		13	24	19	51	18	24	23	17	20	27	20	22	22
PA/A	0,1382	0,1789	0,1545	0,2439	0,1057		23	22	50	17	21	14	18	17	24	17	19	19
PA/B	0,1626	0,1382	0,1301	0,3333	0,1951	0,1870		23	51	14	28	27	15	28	17	26	32	26
PA/C	0,1382	0,1626	0,1382	0,3089	0,1545	0,1789	0,1870		56	17	21	22	16	19	22	23	21	27
SP/A	0,4146	0,4228	0,4146	0,3252	0,4146	0,4065	0,4146	0,4553		49	51	52	50	53	48	53	55	49
SP/B	0,0976	0,1382	0,0976	0,2683	0,1463	0,1382	0,1138	0,1382	0,3984		22	19	9	16	21	20	24	24
MG/A	0,1301	0,2033	0,1789	0,2033	0,1951	0,1707	0,2276	0,1707	0,4146	0,1789		13	19	20	21	18	10	28
MG/B	0,1057	0,1951	0,1707	0,1951	0,1870	0,1138	0,2195	0,1789	0,4228	0,1545	0,1057		14	17	20	17	13	19
SC	0,0732	0,1301	0,1057	0,2439	0,1382	0,1463	0,1220	0,1301	0,4065	0,0732	0,1545	0,1138		19	16	19	21	25
RS	0,1463	0,2033	0,1626	0,2033	0,1626	0,1382	0,2276	0,1545	0,4309	0,1301	0,1626	0,1382	0,1545		25	20	18	18
MS/A	0,1220	0,1463	0,1545	0,2602	0,2195	0,1951	0,1382	0,1789	0,3902	0,1707	0,1707	0,1626	0,1301	0,2033		25	25	25
MS/B	0,1626	0,2195	0,1789	0,2520	0,1626	0,1382	0,2114	0,1870	0,4309	0,1626	0,1463	0,1382	0,1545	0,1626	0,2033		16	20
SP/C	0,1463	0,2358	0,1789	0,2033	0,1789	0,1545	0,2602	0,1707	0,4472	0,1951	0,0813	0,1057	0,1707	0,1463	0,2033	0,1301		24
BA	0,1626	0,2033	0,1789	0,2358	0,1789	0,1545	0,2114	0,2195	0,3984	0,1951	0,2276	0,1545	0,2033	0,1463	0,2033	0,1626	0,1951	
SE	0,2114	0,2683	0,2439	0,2033	0,2439	0,2195	0,3089	0,2683	0,3333	0,2439	0,2439	0,2358	0,2358	0,2114	0,2683	0,2439	0,2114	0,2439
PR	0,1789	0,2683	0,2276	0,1870	0,2602	0,1870	0,2764	0,2358	0,4309	0,2114	0,1301	0,1220	0,1870	0,1626	0,1870	0,1951	0,1301	0,2439
CE/A	0,1138	0,1545	0,1626	0,2358	0,1463	0,1382	0,2114	0,2195	0,3659	0,1463	0,1789	0,1707	0,1382	0,1626	0,1545	0,1789	0,1626	0,1463
CE/B	0,1220	0,1951	0,1870	0,2276	0,2033	0,1463	0,2033	0,1951	0,4065	0,1870	0,2033	0,1626	0,1626	0,1545	0,1626	0,1870	0,1707	0,1382
AL	0,1382	0,2114	0,1870	0,1626	0,1870	0,1626	0,2358	0,1951	0,3902	0,1870	0,1220	0,1301	0,1789	0,1545	0,1626	0,1220	0,1220	0,1545
ES/A	0,1138	0,2033	0,1789	0,2033	0,1301	0,0894	0,2439	0,1545	0,4309	0,1789	0,1138	0,0894	0,1545	0,1138	0,1707	0,1463	0,0650	0,1626
ES/B	0,1707	0,2439	0,1870	0,2439	0,1870	0,1789	0,2683	0,1951	0,4553	0,2033	0,1382	0,1789	0,1951	0,1707	0,2114	0,1870	0,1382	0,2358
MT	0,1626	0,2520	0,2276	0,2520	0,1626	0,1707	0,2927	0,2033	0,4959	0,2276	0,1463	0,1707	0,2195	0,1789	0,2358	0,2114	0,1301	0,2439
AC	0,1626	0,2195	0,2114	0,2195	0,1626	0,1220	0,2602	0,2195	0,4146	0,2276	0,1463	0,1220	0,1870	0,1789	0,1870	0,1626	0,1138	0,1951
PB	0,0976	0,1870	0,1463	0,2358	0,1463	0,1220	0,2439	0,1707	0,4472	0,1626	0,1301	0,0894	0,1545	0,1463	0,1707	0,1626	0,0976	0,1789
RR/A	0,1789	0,2358	0,1789	0,2683	0,1301	0,1057	0,2276	0,1870	0,4634	0,1951	0,1626	0,1870	0,2195	0,1626	0,2358	0,1951	0,1463	0,2114
RR/B	0,1545	0,2276	0,1870	0,2114	0,1707	0,0976	0,2358	0,1789	0,4228	0,1707	0,1057	0,0976	0,1626	0,1382	0,1626	0,1220	0,1220	0,1870
RR/C	0,1301	0,2195	0,1951	0,2033	0,1789	0,1057	0,2439	0,1870	0,4309	0,1626	0,1301	0,1220	0,1545	0,1138	0,1545	0,1626	0,1301	0,1951
RR/D	0,1545	0,2439	0,1870	0,2276	0,1707	0,1463	0,2846	0,2114	0,4228	0,2033	0,0894	0,1301	0,2114	0,1545	0,2114	0,1545	0,0894	0,2195
RO/A	0,1707	0,2114	0,2195	0,2439	0,2033	0,1789	0,2358	0,2276	0,3740	0,1707	0,1545	0,1626	0,1789	0,1545	0,1626	0,1545	0,1707	0,2033
RO/B	0,1545	0,2439	0,2033	0,1951	0,1870	0,1463	0,2846	0,2114	0,3577	0,1870	0,1220	0,1138	0,1951	0,1382	0,2114	0,1545	0,1220	0,1870
ES/C	0,0813	0,1545	0,1463	0,2683	0,1301	0,1057	0,1951	0,1545	0,4309	0,1301	0,1463	0,1382	0,1057	0,1463	0,1545	0,1301	0,1301	0,1626
ES/D	0,1463	0,1707	0,2114	0,3008	0,2276	0,2358	0,1951	0,1545	0,4472	0,1951	0,1789	0,2033	0,1870	0,1951	0,1382	0,1789	0,1951	0,1951

* números em negrito refletem os valores de divergência em relação ao número de marcas polimórficas entre os acessos.

Tabela 05. Divergência genética observada entre 36 genótipos de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. a partir de marcadores fAFLP.

	SE	PR	CE/A	CE/B	AL	ES/A	ES/B	MT	AC	PB	RR/A	RR/B	RR/C	RR/D	RO/A	RO/B	ES/C	ES/D
BRA/A	26*	22	14	15	17	14	21	20	20	12	22	19	16	19	21	19	10	18
BRA/B	33	33	19	24	26	25	30	31	27	23	29	28	27	30	26	30	19	21
BRA/C	30	28	20	23	23	22	23	28	26	18	22	23	24	23	27	25	18	26
BRA/D	25	23	29	28	20	25	30	31	27	29	33	26	25	28	30	24	33	37
BRA/E	30	32	18	25	23	16	23	20	20	18	16	21	22	21	25	23	16	28
PA/A	27	23	17	18	20	11	22	21	15	15	13	12	13	18	22	18	13	29
PA/B	38	34	26	25	29	30	33	36	32	30	28	29	30	35	29	35	24	24
PA/C	33	29	27	24	24	19	24	25	27	22	23	22	23	26	28	26	19	19
SP/A	41	53	45	50	48	53	56	61	51	55	57	52	53	52	46	44	53	55
SP/B	30	26	18	23	23	22	25	28	28	20	24	21	20	25	21	23	16	24
MG/A	30	16	22	25	15	14	17	18	18	16	20	13	16	11	19	15	18	22
MG/B	29	15	21	20	16	11	22	21	15	11	23	12	15	16	20	14	17	25
SC	29	23	17	20	22	19	24	27	23	19	27	20	19	26	22	24	13	23
RS	26	20	20	20	19	14	21	22	22	18	20	17	14	19	19	17	18	24
MS/A	33	23	19	20	20	21	26	29	23	21	29	20	19	26	20	26	19	17
MS/B	30	24	22	23	15	18	23	26	20	20	24	15	20	19	19	19	16	22
SP/C	26	16	20	21	15	8	17	16	14	12	18	15	16	11	21	15	16	24
BA	30	30	18	17	19	20	29	30	24	22	26	23	24	27	25	23	20	24
SE		30	22	23	23	24	33	32	28	26	34	27	18	25	29	25	24	36
PR	0,2439		24	25	19	18	17	20	20	24	24	15	16	17	21	21	22	26
CE/A	0,1789	0,1951		15	17	14	25	24	18	20	22	21	16	21	19	21	14	22
CE/B	0,1870	0,2033	0,1220		16	15	26	25	21	19	21	20	15	20	22	24	15	21
AL	0,1870	0,1545	0,1382	0,1301		15	16	21	19	19	21	14	15	16	22	16	15	19
ES/A	0,1951	0,1463	0,1138	0,1220	0,1220		17	14	10	10	12	13	10	11	17	13	12	24
ES/B	0,2683	0,1382	0,2033	0,2114	0,1301	0,1382		15	25	21	19	20	19	14	24	20	20	27
MT	0,2602	0,1626	0,1951	0,2033	0,1707	0,1138	0,1220		16	16	16	17	18	15	25	19	18	24
AC	0,2276	0,1626	0,1463	0,1707	0,1545	0,0813	0,2033	0,1301		12	16	11	18	17	21	15	18	28
PB	0,2114	0,1951	0,1626	0,1545	0,1545	0,0813	0,1707	0,1301	0,0976		20	13	16	13	23	17	14	24
RR/A	0,2764	0,1951	0,1789	0,1707	0,1707	0,0976	0,1545	0,1301	0,1301	0,1626		19	20	17	27	23	18	26
RR/B	0,2195	0,1220	0,1707	0,1626	0,1138	0,1057	0,1626	0,1382	0,0894	0,1057	0,1545		11	16	16	14	15	23
RR/C	0,1463	0,1301	0,1301	0,1220	0,1220	0,0813	0,1545	0,1463	0,1463	0,1301	0,1626	0,0894		13	17	17	12	24
RR/D	0,2033	0,1382	0,1707	0,1626	0,1301	0,0894	0,1138	0,1220	0,1382	0,1057	0,1382	0,1301	0,1057		16	12	15	25
RO/A	0,2358	0,1707	0,1545	0,1789	0,1789	0,1382	0,1951	0,2033	0,1707	0,1870	0,2195	0,1301	0,1382	0,1301		12	23	23
RO/B	0,2033	0,1707	0,1707	0,1951	0,1301	0,1057	0,1626	0,1545	0,1220	0,1382	0,1870	0,1138	0,1382	0,0976	0,0976		19	27
ES/C	0,1951	0,1789	0,1138	0,1220	0,1220	0,0976	0,1545	0,1463	0,1463	0,1138	0,1463	0,1220	0,0976	0,1220	0,1870	0,1545		20
ES/D	0,2927	0,2114	0,1789	0,1707	0,1545	0,1951	0,2195	0,1951	0,2276	0,1951	0,2114	0,1870	0,1951	0,2033	0,1870	0,2195	0,1626	

* números em negrito refletem os valores de divergência em relação ao número de marcas polimórficas entre os acessos. (continuação)

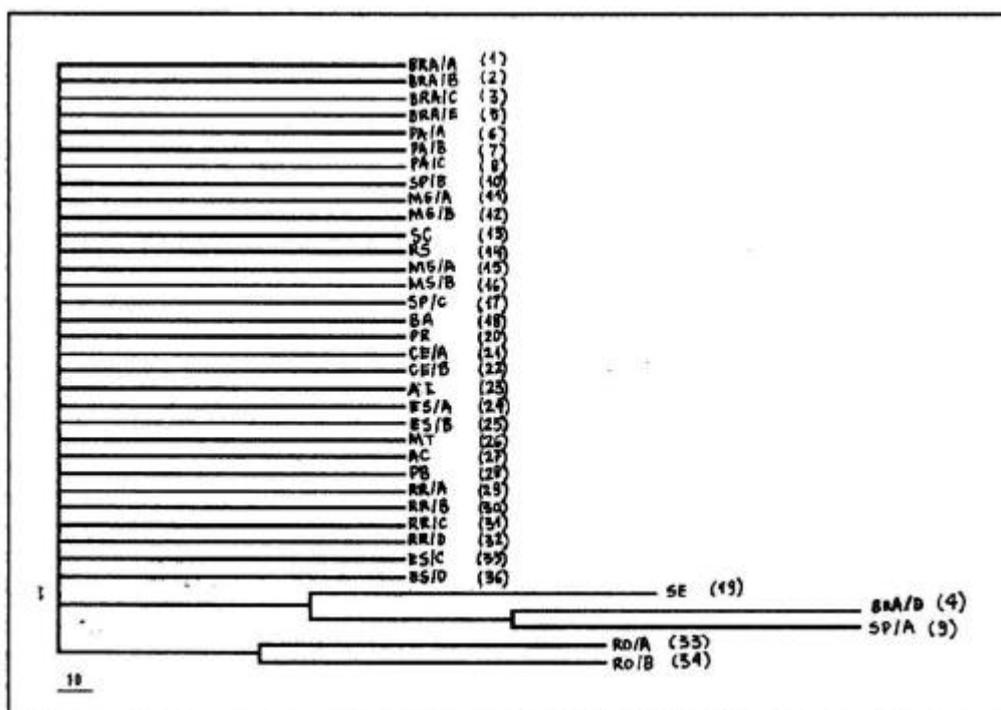


Figura 05. Dendrograma de 36 genótipos de *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg., baseado na técnica fAFLP, utilizando o padrão de agrupamento "Neighbor-Joining".

A análise de agrupamento com base nas distâncias genéticas (Figura 05) mostrou a formação de dois grupos, um composto pelos dois acessos de Rondônia (RO/A e RO/B) e outro composto pelos acessos SE, de Aracaju-SE, IAC 273, de Monte Alegre do Sul-SP e Vermelhão, de Brasília-DF, sendo que os demais acessos não se agruparam em razão da alta diversidade genética entre os mesmos. Deste modo, verifica-se que não houve uma estruturação geográfica em relação à similaridade entre acessos de mesmo estado ou região, exceto para os dois acessos provenientes de Rondônia, havendo entre eles uma dissimilaridade de 0,0975 ou 12 marcas polimórficas. Pelo fato de terem a mesma procedência, esperava-se tal proximidade genética entre eles, inclusive por serem oriundos de uma mesma propriedade.

Resultados semelhantes de não estruturação geográfica foram obtidos por MOURA et al. (2003), estudando a diversidade genética de *Pilocarpus microphyllus* por RAPD em Belém-PA e por RAMOS et al. (2003), no qual os marcadores fAFLP se mostraram consistentes na detecção da diversidade entre 96 acessos de *Cucurbita moschata* D., concluindo que a sua variabilidade está dispersa em diversos estados, não havendo relação direta entre procedência geográfica e similaridade. YEE et al. (1999), analisando acessos de *Vigna angularia*, observaram igualmente a ausência de correlação entre grau de similaridade genética obtida com base em marcadores de DNA e procedência de acessos.

Alto grau de polimorfismo é citado entre acessos de *Malpighia emarginata* (SALLA et al., 2002) e *Stylosanthes macrocephala* (BARROS et al., 2003), através da análise por marcadores moleculares RAPD. Entretanto, CROCHEMORE et al. (2003), em estudo de caracterização agromorfológica de 34 acessos de *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. provenientes de 5 estados brasileiros (SP, PR, MG, ES e SC), entre outras espécies, concluíram que limitada variabilidade foi encontrada dentro do grupo *flavicarpa*. Os dados obtidos no presente estudo sugerem o oposto, sendo que tal contradição pode ser explicada através do efeito de interação e variância de ambiente, como o demonstrado por VIANA et al. (2003) para o caracter largura de frutos em maracujazeiro amarelo, o qual mostrou um forte efeito de ambiente. OLIVEIRA (1980) também não detectou endogamia e heterose na produção de *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. e inferiu que estes efeitos podem não ter se manifestado em função da grande influência ambiental sobre esta característica. De acordo com MATSUOKA et al. (2003), o uso dos marcadores moleculares fAFLP dão alta confiabilidade aos resultados, permitindo a compreensão e a organização da variabilidade de DNA, não influenciada pelo ambiente como o são, por exemplo, os caracteres morfológicos e fenotípicos em geral.

A alta divergência apresentada também se explica pelo fato de ser o maracujá uma espécie alógama, com presença de um sistema genético de auto-incompatibilidade que favorece a polinização cruzada e, conseqüentemente, o fluxo gênico entre genótipos distintos, inclusive entre espécies, pois segundo BRUCKNER (1997), existe

alta compatibilidade interespecífica em cruzamentos dentro do gênero *Passiflora*. Todos os acessos foram obtidos via semente, a maioria em plantios comerciais, o que não exclui, portanto, a possibilidade de cruzamentos com outras espécies compatíveis. Além disso, diversos acessos provêm de Programas de melhoramento, como os do Distrito Federal (EC-3-0, EC-3-L, EC-RAM e Vermelhão, que são híbridos, e MSC = Marília Seleção Cerrado), Pará (tipo Local, Golden Star e Seleção EMBRAPA Amazônia Oriental), São Paulo (IAC 273, IAC 277, IAC 275 coletado no Mato Grosso do Sul e AFRUVEC), Minas Gerais (Rafael 1 e Rafael 2) e Roraima (Paulista 1 e Paulista 2), indicando que são materiais já submetidos a cruzamentos dirigidos e/ou a processos intensos de seleção.

Outro fator considerável no tocante à diversidade refere-se ao trânsito de material pelo País e sua relação com a obtenção de sementes para os plantios comerciais. Sabe-se que o produtor de maracujá, de modo geral, produz suas próprias mudas, com sementes colhidas de frutos de plantios anteriores, de vizinhos ou ainda adquiridos no próprio mercado de frutas frescas, sem nenhum controle sobre a procedência de tais materiais, suas qualidades ou características agronômicas. Além disso, a origem do gênero *Passiflora* está na América do Sul, tendo no Centro-Norte do Brasil o maior centro de distribuição geográfica (LOPES, 1991). Entre as 530 espécies descritas para o gênero, mais de 150 são nativas do Brasil (HOENE, 1946).

Esta diversidade dos locais de coleta implica em diferentes capacidades adaptativas dos acessos analisados, o que é de extremo interesse para programas de melhoramento genético visando à obtenção de variedades adaptadas a diferentes regiões e/ou sistemas agrícolas do País. A avaliação da divergência genética possibilita selecionar combinações com maiores possibilidades de complementação gênica e recuperação de genótipos superiores nas gerações segregantes.

A variabilidade genética de *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. foi avaliada por WENDLAND et al. (1998) trabalhando com diferentes genótipos dessa planta. Os autores avaliaram o comportamento em relação à bacteriose (*Xanthomonas campestris* pv *passiflora*), uma das principais doenças da cultura, e verificaram que existe grande variabilidade entre os materiais avaliados. Em outro trabalho relacionado à bacteriose, a

cultivar Sul Brasil (AFRUEC) apresentou o maior nível de resistência à doença, enquanto IAC 273, IAC 275 e IAC 277, entre outros, apresentaram comportamento intermediário, demonstrando que existe variabilidade quanto ao desenvolvimento da doença, possibilitando a utilização de materiais já com boas características comerciais em programas de melhoramento para a resistência à bacteriose (FOGAÇA-MIRANDA & CAMARGO, 2003).

No agrupamento composto pelos acessos SE, Vermelhão e IAC 273, nota-se que um subgrupo foi formado pelos dois últimos; como são materiais oriundos de programas de melhoramento genético, é possível que tenham algum ancestral em comum, e que inclusive possa ser o que os deixou mais próximos de SE. 'Vermelhão' é um híbrido entre 'Marília Comum' e *Passiflora caerulea* f. *rubra*. O acesso SE se originou de sementes de frutos obtidos em feira livre, característica de pequenos produtores, podendo ser resultado de cruzamentos com materiais já cultivados ou até mesmo silvestres, pois, embora a bibliografia não relate a ocorrência natural da forma selvagem de *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. no Brasil, existem informações que indicam a existência destas formas em algumas regiões de Sergipe e Santa Catarina (CROCHEMORE et al., 2003). Espécies silvestres do gênero *Passiflora* têm sido utilizadas como fonte de genes para resistência a doenças e pragas, bem como para outras características ausentes na espécie cultivada (SOUZA et al., 2003). Formas mutantes amarelas são encontradas com frequência na Austrália (VANDERPLANK, 1996).

Estudos biotecnológicos têm sido realizados em espécies de *Passiflora* (ANTHONY et al., 1999) e tentativas têm sido feitas para obtenção de híbridos com o objetivo tanto do aumento do valor ornamental quanto da obtenção de plantas resistentes a doenças, a baixas temperaturas e com características agrônomicas superiores (SOUZA et al., 2003).

A variabilidade genética existente dentro e entre as espécies de plantas está intimamente relacionada com a sua evolução, e o melhoramento de plantas só ocorre com base nessa variabilidade (BERED et al., 2001). Os indivíduos de uma população de plantas geralmente diferem entre si em diversos caracteres, sendo que essa

variabilidade pode ser determinada pelos efeitos genéticos e do ambiente. Neste aspecto, o uso de marcadores moleculares agrega um avanço importante, a possibilidade de acessar diretamente o genótipo de um indivíduo, evitando a expressão do fenótipo e a influência do ambiente sobre este, além de permitir uma ampla amostragem do genoma.

A identificação de genitores com alta divergência tem sido objetivo de muitos trabalhos de melhoramento, para que, realizada a hibridação, ocorra uma segregação tal na progênie que aumente as possibilidades de ocorrência de genótipos superiores com constituições ajustadas ao ambiente. Assim, a caracterização de germoplasma é necessária, visando assegurar informações sobre fontes de genes para utilização futura, que além de prevenirem a perda desses recursos, são fundamentais para o sucesso da sua produção agrícola.

Este estudo de diversidade genética entre acessos de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) de diversas procedências do País permitiu a obtenção de informações úteis ao seu manejo, pois na literatura não há relatos sobre trabalhos que tenham quantificado a variabilidade existente na espécie com técnicas tão consistentes, gerando resultados sólidos por não serem influenciados pelo ambiente. Acredita-se que esta abordagem seja válida, porém deve ser aliada ao desempenho destes materiais em condições de cultivo, orientando programas de melhoramento na busca de uma cultivar que se adeqüe às reais necessidades dos agricultores.

5. CONCLUSÕES

Os marcadores fAFLP mostraram que os 36 acessos de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. têm grande divergência genética entre si, bem como a não formação de estruturação geográfica. Tais resultados podem auxiliar na definição de estratégias mais eficientes a serem utilizadas em programas de melhoramento de maracujazeiro amarelo.

6. REFERÊNCIAS

AGRIANUAL 2000: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2000. p.398.

AGRIANUAL 2001: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2001. p.406.

AGRIANUAL 2002: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2002. p. 408.

ANTHONY, P.; OTONI, W.; POWER, B.; LOWE, K.C.; DAVEY, M. R. Protoplast isolation, culture and plant regeneration from *Passiflora*. In: HALL, R.D. (Ed.). **Methods in molecular biology**: plant cell culture protocols. Totowa: Humana Press, 1999. v.3, p.169-181.

APPLIED BIOSYSTEMS – PE. **AFLP Plant Mapping Protocol**. 1997. 45p.

AUKAR, A. P. De A. **Identificação de marcadores cDNA e fAFLP em genótipos de *Coffea spp.* Resistentes a *Meloidogyne incognita* (Nemata: Heteroderidae)**. 2003. 75f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

AUKAR, A.P.A.; ZAIDAN, H.A. ; LEMOS, E.G.de M. F-AFLP analysis of genetic diversity within and between *Passiflora spp.* In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 2001, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, 2001. 1CD-ROM.

BARROS, A. M.; FALEIRO, F. G.; SHIRATSUCHI, L. S.; KARIA, C. T.; LOPES, G. K. B.; ANDRADE, R. P. Uso de marcadores RAPD e do sistema de informação geográfica no

estudo da variabilidade genética de *Stylosanthes macrocephala*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. **Melhoramento e qualidade de vida...** Porto Seguro: Kcllic, 2003. 1CD-ROM.

BENSON, W.W. et al. Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. **Evolution**, Lawrence, v.29, p.659-80, 1975.

BERED, F.; CARVALHO, F. I. F. de; BARBOSA Neto, J. F. Variabilidade genética em trigo. Disponível em: <[http://www. Biotecnologia.com.br/bio/bio14/14_d.htm](http://www.Biotecnologia.com.br/bio/bio14/14_d.htm)> Acesso em: 22 dez. 2001.

BLISKA, F. M. de M. et al. Produção do maracujá no Brasil e sua comercialização nas principais centrais de abastecimento. In: SÃO JOSÉ, A. R. **Maracujá**: produção e mercado. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1994. p.206-22.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2ed. Viçosa: UFV, 1998. p.370.

BRUCKNER, C. **Perspectivas do melhoramento genético do maracujazeiro**. **Maracujá**: temas selecionados. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. p. 25-46.

CASSIANO, A. P. A. **Variações genéticas entre espécies de *Passiflora* (*Passifloraceae*) usando marcadores RAPD**. 1998. 47f. Dissertação. (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

CERVI, A. C. In: RIZZO, J. A. (Ed). **Flora do estado de Goiás**. Goiânia: 1986. (Coleção Rizzo, 7).

CLERC, A. MANCEAU, C.; NESME, X.. Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified length polymorphism to assess genetic diversity and genetic

relatedness within genospecies III of *Pseudomonas syringae*. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, n.4, p. 1180-1187, 1998.

COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Genetic relatedness between cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and *M. Flabellifolia* and *m. Peruviana* based on both RAPD and AFLP markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.2, p.417-423, 2000.

CROCHEMORE, M. L.; MOLINARI, H. B.; STENZEL, N; M. C. Caracterização agromorfológica do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p.5-10, 2003.

DONADIO, L. C. Recursos genéticos de espécies frutíferas no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 15., 1998, Poços de Caldas. **Conferências...** Lavras: UFLA, 1998. 232p.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** v.1, p.13-15, 1991.

FABIANO, T. L. T. **Diversidade genética de *Staphylococcus aureus* de origem humana e animal, através da técnica de fAFLP**. 2003. 41f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FOGAÇA-MIRANDA, J.; CAMARGO, L. E. A. Reação de genótipos de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg) a bacteriose causada por *Xanthomonas campestris* pv. *Pasiflorae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, **Melhoramento e qualidade de vida...** Porto Seguro:Kcllic, 2003. 1CD-ROM.

HOEHNE, F. C. **Frutas indígenas**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1946. 88p.

HONGTRAKUL, V.; HUESTIS, G. M.; KNAPP, S. J. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for fingerprinting sunflower germoplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95: p.400-407, 1997.

JAKŠE, J.; KINDLHOFER, K.; JAVORNIK, B. Assessment of genetic variation and differentiation of hop genotypes by microsatellite and AFLP markers. **Genome**, Ottawa, v.44, n.5, p.773-782, 2001.

JANSSEN, P.; MAQUELIN, K.; COOPMAN, R.; TJERNBERG, I.; BOUVET, P.; KERSTERS, K.; DIJKSHOORN, L. Discrimination of Acinetobacter genomic species by AFLP fingerprinting. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**. v.47, p.1179-1187, 1997.

KARDOLUS, J.; ECK, H.; BERG, R. The potential of AFLP in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy. **Plant Systems Evolutive**. v.2, p.87-103, 1998.

LEITÃO-Filho, H.; ARANHA, C. **Botânica do maracujazeiro**. In: SIMPÓSIO DA CULTURA DO MARACUJÁ, 1974, São Paulo, 13p. Mimiografado.

LEITE, R. S. da S. F. et al.. Aspectos econômicos da produção e mercado. In: TEIXEIRA, C. G. et al. **Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. Campinas: ITAL, 1994. p.197-267.

LOPES, S. C. Citogenética do maracujá, *Passiflora* spp. In: SÃO JOSÉ, A. R. **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: Funep, 1991. p.201-209.

MANIATIS, T. et al. J. **Molecular cloning - a laboratory manual**. Cold Spring: Harbor Laboratory, 1982. 545p.

MANICA, I. **Fruticultura tropical**: maracujá. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981. 151p.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA, A. P. de; SOUZA JR, C. L. de; LIMA, M. L. A.; ARIZONO, H. Similaridade genética determinada por AFLP entre as principais cultivares de açúcar dos últimos 40 anos em São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, **Melhoramento e qualidade de vida...** Porto Seguro:Kcllic, 2003. 1CD-ROM.

MEDINA, J. C. Cultura. In: MEDINA, J. C. et al. **Maracujá**: da cultura ao processamento e comercialização. Campinas: ITAL, 1980. p.5-105.

MELETTI, L. M. M. **Caracterização agronômica de progenies de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Degener)**. 1998. 92f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

MELETTI, M. D. et al. Caracterização agronômica e seleção de germoplasma de maracujá (*Passiflora* spp). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 1994, Porto Seguro. **Resumos...** Porto Seguro, 1994. p.821.

MOURA, E. F.; PINTO, J. E. B. P.; SANTOS, J. B. dos, LAMEIRA, O. A.; BERTOLUCCI, S. K. V. Diversidade genética entre acessos de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) por meio de marcadores RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. **Melhoramento e qualidade de vida...** Porto Seguro: Kcllic, 2003. 1CD-ROM.

MUELLER, U. WOLFENBARGER, L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends Plants Science**, v.14, p.389-394, 1999.

OLIVEIRA, J.C. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p.218-46.

OLIVEIRA J. C. de. **Melhoramento genético de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. visando aumento de produtividade**. 1980. 113f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, (Universidade Estadual Paulista), Jaboticabal, 1980.

RAMOS, S. R. R.; PEREIRA, T. N. S.; QUEIRÓZ, M. A. de; ARAÚJO, I. S.; SOUZA Filho, G. A. de; DAHER, R. F.; AMARAL JR, A. T. do; PEREIRA, M. G. Divergência genética em cultivares tradicionais de abóbora via marcadores fAFLP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. **Melhoramento e qualidade de vida...** Porto Seguro: Kclíc, 2003. 1CD-ROM.

REITER, J. M. W.; HEIDEN, F. C. **Maracujá**. Florianópolis: Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina, 1998. 69p. (Estudo de Economia e de Mercado de Produtos Agrícolas, 5).

REN, N.; TIMKO, M.P. AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. **Genome**, Ottawa, v.44, n.4, p.559-571, 2001.

RIZZI, L. C. et al. **Cultura do maracujá azedo**. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, SAA, 1998. 23p. (Boletim Técnico, 235).

RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J.C. de Enxertia do maracujazeiro. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Simpósio Brasileiro sobre a cultura do maracujazeiro**. Jaboticabal: Funep, 1998a, p.70-92.

RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J.C. de Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Simpósio Brasileiro sobre a cultura do maracujazeiro**. Jaboticabal: Funep, 1998b, p.291-310.

SACCO, J. C. **Flora ilustrada catarinense**: pasifloraceas. Itajaí: R. Reitz, 1980. 132p.

SALLA, M. F. S.; RUAS, C. de F.; RUAS, P. M.; CARPENTIER-PÍPOLO, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D. C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.15-22, 2002.

SALOMÃO, T. A.; ANDRADE, V. M. de M. Botânica. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p.20-39.

SANCHEZ, G.; RESTREPO, S.; DUQUE, M.C.; FREGENE, M.; BONIERBALE, M.; VERDIER, V. AFLP assessment of genetic variability in cassava accessions (*Manihot esculenta*) resistant and susceptible to the cassava bacterial blight (CBB). **Genome**, Ottawa, v.42, n.2, p.163-172, 1999.

SÃO JOSÉ, A. R. **Maracujá**: produção e mercado. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1994. 255p.

SOUZA, M. M.; PALOMINO, G.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; VIANA, A. P.; SILVA, L. da C.; SUDRÉ, C.P. Variação interespecífica do tamanho do genoma em *Passiflora* spp. (*Passifloraceae*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. **Melhoramento e qualidade de vida...** Porto Seguro: Kcllc, 2003. 1CD-ROM.

SOUZA, J. S. I. de; MELETTI, L. M. M. **Maracujá**: espécies, variedades, cultivo. Piracicaba: FEALQ, 1997. v.3. 179p.

TEIXEIRA, C. G. et al. **Maracujá**: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. Campinas: ITAL, 1994. 267p.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. 2.ed. Massachussetts: Ed. Cambridge, 1996. 224p.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers and passion fruit**. Cambridge: The Mit Press, 1991, 176p.

VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; AMARAL JR, A. T. do; SOUZA, M. M.; MALDONADO, J. F. M. Parâmetros genéticos em populações de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. **Melhoramento e qualidade de vida...** Porto Seguro: Kcllc, 2003. 1CD-ROM.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. Van de; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIOER, M.; ZABEU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.33, p.4407-4414, 1995.

YEE, E.; KIDWELL, K.K.; SILLS, G.R.; LUMPKIN, T. A.. Diversity among selected *Vigna angularis* (azuki) accessions on the basis of RAPD and AFLP markers. **Crop Science**, v.39, p.268-275. 1999.

WENDLAND, A.; LEITE JR, R.P.; EUNO, B. Avaliação do comportamento de genótipos de maracujazeiro amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa*) a bacteriose causada por *Xanthomonas campestris* pv. *Passiflorae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, p.218, 1998. Suplemento.

ZHANG, L. H.; OZIAS-AKINS, P.; KOCHERT, G.; KRESOVICH, S; DEAN, R.; HANNA, W. Differentiation of bermudagrass (*Cynodon* spp.) genotypes by AFLP analyses. **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p.895-902, 1999.