

VARIABILIDADE GENÉTICA DE PROGÊNIES DE MARACUJÁ MAÇÃ (*Passiflora maliformis* L.) USANDO MARCADORES RAPD E ISSR

Clotildes Neves da Silva¹, Fabio Gelape Faleiro², Jamile da Silva Oliveira³, Nilton Tadeu Vilela Junqueira² e Kênia Gracielle da Fonseca³

¹Eng. Agr. Mestranda em Agronomia/Universidade Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, 70910-900 Brasília-DF. clohnevesilva@hotmail.com. ²Pesquisador da Embrapa Cerrados, BR 020, km 18, Caixa Postal 08223, 73010-970 Planaltina-DF. ffaleiro@cpac.embrapa.br, junqueir@cpac.embrapa.br. ³Eng. Agr. Doutora em Agronomia/bolsista da Embrapa Cerrados, BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223, 73010-970 Planaltina-DF. jamile.oliveira54@gmail.com, kenia.gfonseca@gmail.com

Marcadores moleculares do DNA são ferramentas úteis na caracterização de genótipos de maracujá, em razão de apresentarem elevada quantidade de polimorfismos sem interferência ambiental. Objetivou-se neste trabalho estudar a variabilidade genética de 22 plantas selecionadas de progênies de meio-irmãos de *P. maliformis*. Essas progênies foram obtidas a partir de ciclos de seleção e recombinação do programa de melhoramento genético por seleção recorrente realizado na Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. Foi realizada a caracterização molecular das 22 plantas com base em marcadores RAPD e ISSR. Foram obtidos 100 marcadores RAPD e 81 marcadores ISSR a partir dos quais foram estimadas as dissimilaridades genéticas entre as plantas selecionadas. A matriz de dissimilaridade genética foi empregada para realizar análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando o método *Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages* como critério de agrupamento e dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais, usando o método das coordenadas principais. As dissimilaridades genéticas entre as 22 plantas selecionadas variaram entre 0,15 e 0,78. Análises de agrupamento evidenciaram uma tendência de agrupamento das plantas oriundas da mesma progênie. Os marcadores RAPD e ISSR foram eficientes na caracterização das plantas selecionadas de *P. maliformis* e na quantificação da variabilidade genética entre elas.

Palavras-chave: Marcador molecular, maracujá silvestre, diversidade genética, seleção recorrente.

Genetic variability of Apple Passion Fruit (*Passiflora maliformis* L.) progenies using RAPD and ISSR markers.

DNA molecular markers are useful tools in the characterization of passion fruit genotypes, due to the high number of polymorphisms without environmental interference. The objective of this work was to study the genetic variability of 22 plants selected from half-sib progenies of *P. maliformis*. These progenies were obtained from cycles of selection and recombination of the genetic breeding program by recurrent selection performed at Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. Molecular characterization of the 22 selected plants was performed using RAPD and ISSR markers. 100 RAPD and 81 ISSR markers were obtained and genetic dissimilarities between the selected plants were estimated. The genetic dissimilarity matrix was used for grouping analysis using dendrogram, using the *Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages* method as a grouping criterion. Graphic dispersion analysis was performed using main coordinates method. Genetic dissimilarities among the 22 plants selected varied between 0.15 and 0.78. Grouping analyzes evidenced a grouping tendency of plants from the same progeny. The RAPD and ISSR markers were efficient in the characterization of the selected plants of *P. Maliformis* and in the genetic variability quantification.

Key words: Molecular marker, wild passion fruit, genetic diversity, recurrent selection.

Introdução

O Brasil é um dos principais centros de distribuição geográfica do gênero *Passiflora*, onde ocorrem aproximadamente 130 espécies, das quais 88 são endêmicas (Bernacci et al., 2005; Cervi, 2010). O Brasil é, atualmente, o maior produtor e consumidor mundial do maracujá, com uma área de 57.183 hectares e produção de 823.284 toneladas, em 2014 (ABF, 2016). O desenvolvimento da cadeia produtiva do maracujá no Brasil ocorreu em virtude das ações de pesquisa e inovação realizadas pelas empresas públicas e privadas, muitas vezes em parceria (Faleiro et al., 2008).

Embora as pesquisas com maracujazeiros estejam amplamente dirigidas às espécies cultivadas e, principalmente, à *P. edulis*, existem várias espécies silvestres de maracujazeiros com grande potencial agrônomo, que não têm recebido devida atenção da pesquisa. Entre estas espécies está a *Passiflora maliformis* L., também conhecida como maracujá cabaça doce, maracujá maçã e maracujá de osso. Esta espécie é cultivada comercialmente na Colômbia, onde é conhecida como cholupa ou granadilla de piedra (Ocampo et al., 2015).

Diante do potencial econômico e social desta espécie de maracujazeiro silvestre, a Embrapa e parceiros desenvolvem ações de pesquisa e desenvolvimento desta espécie envolvendo programas de conservação, caracterização e uso de recursos genéticos e melhoramento (Faleiro et al., 2013; 2015). Tais ações de pesquisa têm utilizado marcadores moleculares do DNA como ferramentas auxiliares em diferentes etapas destes programas, desde a caracterização do germoplasma até as etapas finais de seleção de plantas melhoradas (Faleiro, 2007 e 2011; Faleiro et al., 2014). Coque & Gallais (2006) na busca por métodos de seleção mais eficientes relataram que os marcadores moleculares do DNA podem conferir algumas vantagens em relação ao processo seletivo de plantas, com economia de tempo e recursos financeiros, além de garantir a existência da diversidade genética necessária para a continuidade do programa. Segundo Caixeta et al. (2006), a técnica de RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) tem grandes vantagens em relação aos outros métodos, por apresentar simplicidade, rapidez na obtenção de dados e custo relativamente reduzido, além da aplicabilidade imediata

em qualquer tipo de organismo. De forma complementar os marcadores *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) são dominantes e valiosas ferramentas em estudos de diversidade genética interespecífica de maracujá (Santos et al., 2011).

A caracterização e quantificação da variabilidade genética acessada por meio dos marcadores moleculares permitem estabelecer relacionamentos genéticos entre plantas selecionadas de forma ampla e sem interferência ambiental, o que é muito útil em programas de melhoramento de diferentes espécies, incluindo-se o maracujá.

Objetivou-se avaliar a variabilidade genética de 22 plantas selecionadas de progênies de meio-irmãos de *P. maliformis*, utilizando marcadores RAPD e ISSR.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados, Planaltina/DF. Foram analisados 22 genótipos selecionados de progênies de meio-irmãos do maracujazeiro silvestre *P. maliformis* identificados e descritos da Tabela 1.

Tabela 1. Identificação das 22 plantas selecionadas de *Passiflora maliformis* com informação da progênie, repetição, plantas e seus respectivos códigos

Nº do Genótipo	Progênie	Repetição	Planta*	Código
1	P4	R3	PIS	P4R3PIS
2	P1	R5	PIS	P1R5PIS
3	P2	R1	PIS	P2R1PIS
4	P5	R2	PIS	P5R2PIS
5	P2	R3	PIS	P2R3PIS
6	P4	R3	PIS	P4R3PIS
7	P3	R4	PIS	P3R4PIS
8	P6	R4	PIS	P6R4PIS
9	P3	R5	PIS	P3R5PIS
10	P5	R3	PIS	P5R3PIS
11	P2	R2	PI1	P2R2PI1
12	P2	R2	PI2	P2R2PI2
13	P2	R2	PI3	P2R2PI3
14	P2	R2	PI4	P2R2PI4
15	P2	R2	PI5	P2R2PI5
16	P2	R2	PI6	P2R2PI6
17	P1	R3	PI1	P1R3PI1
18	P1	R3	PI2	P1R3PI2
19	P1	R3	PI3	P1R3PI3
20	P1	R3	PI4	P1R3PI4
21	P1	R3	PI5	P1R3PI5
22	P1	R3	PI6	P1R3PI6

*: PIS = Planta Selecionada.

As plantas foram selecionadas a partir de progênies meio-irmãos obtidas a partir de ciclos de seleção e recombinação do programa de melhoramento genético por seleção recorrente realizado na Embrapa Cerrados.

A metodologia de extração de DNA foi a do CTAB, com algumas modificações (Faleiro et al., 2003). O tecido vegetal fresco foi macerado com auxílio de um bastão de vidro e, em seguida, foram adicionados em cada amostra, 450 μ L de tampão contendo Tris-HCl 100 mM (pH 8,3), CTAB 7%, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M. As amostras seguiram para banho-maria a 65 °C, por 30 minutos. A desproteinização foi realizada adicionando-se 400 μ L de solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1); em seguida, as amostras foram agitadas para a formação de uma emulsão e, na sequência, centrifugadas a 5.000 rpm por cinco minutos, retirando-se, aproximadamente, 200 μ L do sobrenadante que foi colocado em microtubos de 2 mL.

Foram adicionados ao sobrenadante 200 μ L de isopropanol gelado (5°C), invertendo-se os microtubos para promover a precipitação do DNA. Em sucessão, os tubos foram colocados a -20 °C, permanecendo por 30 minutos e, logo após, foram centrifugados a 7.000 rpm, por dez minutos, descartando-se o

sobrenadante. O *pellet* formado foi lavado, por duas vezes, com 200 μ L de etanol 70% e seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 100 μ L de água Milli Q, contendo RNase na concentração de 40 μ L/mL.

A quantidade de DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm (A_{260}), e a relação A_{260}/A_{280} foi utilizada para avaliar a pureza e a qualidade das amostras (Sambrook et al., 1989). As amostras de DNA de cada acesso foram diluídas para 5 ng/ μ L. Inicialmente, foram testados 19 *primers* decâmeros RAPD e 7 *primers* ISSR, dos quais foram selecionados os que geraram maior quantidade de bandas mais informativas e com maior qualidade de amplificação (Tabela 2).

As reações de amplificação para a obtenção de marcadores RAPD foram efetuadas em um volume total de 13 μ L, sendo: 6,29 μ L de água Milli Q, 1,3 μ L de tampão 1x (Invitrogen), 0,78 μ L de $MgCl_2$ 50mM; 0,13 μ L dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) 10 mM; 1,3 μ L de um iniciador-*primer* 2 mM; 0,2 μ L da enzima *Taq* DNA polimerase (1 unidade) e 3 μ L de DNA (15 μ g).

As reações de amplificação para o ISSR foram efetuadas em um volume total de 13 μ L, sendo: 4,9 μ L

Tabela 2. *Primers* testados e utilizados para obtenção dos marcadores RAPD e ISSR de 22 plantas selecionadas de *Passiflora maliformis*, e respectivos números de bandas utilizadas nas análises (BP). Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2016

<i>Primer</i> RAPD	Sequência 5' → 3'	Bandas	<i>Primer</i> ISSR	Sequência 5' → 3'	Bandas
1 - OPD-04	TCTGGTGAGG		* 5 - TriAGC3'RC	AGCAGCAGCAGCAGC	21
* 2 - OPD-07	TTGGCACGGG	11	* 6 - TriAGG3'RC	AGGAGGAGGAGGAGG	13
* 3 - OPD-08	GTGTGCCCCA	20	* 7 - TriCAG3'RC	CAGCAGCAGCAGCAG	12
4 - OPD-10	GGTCTACACC		* 8 - DiGA5'C	CGAGAGAGAGAGAGA	14
5 - OPD-16	AGGGCGTAAG		13 - DiGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAG	
6 - OPE-16	GGTACTGTG		14 - DiGA5'CY	AGAGAGAGAGAGAGA	
* 7 - OPE-18	GGACTGCAGA	06	* 15 - DiGT5'CY	GTGTGTGTGTGTGTGT	21
* 8 - OPE-20	AACGGTGACC	13			
9 - OPF-01	ACGGATCCTG				
10 - OPF-14	TGCTGCAGGT				
11 - OPF-17	AACCCGGGAA				
12 - OPG-01	CTACGGAGGA				
* 13 - OPG-05	CTGAGACGGA	03			
* 14 - OPG-08	TCACGTCCAC	05			
15 - OPG-17	ACGACCGACA				
* 16 - OPH-04	GGAAGTCGCC	29			
* 17 - OPH-12	ACGCGCATGT	13			
18 - OPH-16	TCTCAGCTGG				
19 - OPH-17	CACTCTCCTC				
	Total	100		Total	81

**Primers* selecionados

de água Milli Q, 1,3 iL de tampão, 0,39iL de $MgCl_2$ 50mM; 0,26iL dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) 10 iM; 1,95iL de um iniciador 2 iM; 0,2 iL da enzima *Taq* DNA polimerase (1 unidade) e 3 iL de DNA (15 ng).

As amplificações para obtenção de marcadores RAPD foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um composto pela seguinte sequência: 15 s a 94 °C, 30 s a 35 °C e 90 s a 72 °C. Concluídos os 40 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de seis minutos a 72 °C, e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C. Para ISSR foram realizadas em termociclador, no qual as amostras foram inicialmente, desnaturadas a 94 °C por 2 min, seguidos de 37 ciclos, iniciando-se com 15 segundos a 94 °C; em seguida 30 segundos a 47 °C e posteriormente 72 °C por 1 minuto; ao final de todos os ciclos o processo foi finalizado por 7 minutos a 72 °C e resfriado a 4 °C.

Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 iL de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores RAPD e ISSR gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foi estimada a dissimilaridade genética entre os diferentes genótipos, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li (Nei e Li, 1979), utilizando o Programa Genes (Cruz, 2007). A similaridade genética (SG) foi dada por:

$$S_{gij} = 2N_{ij}/(N_i + N_j), \text{ onde:}$$

N_{ij} é o número de bandas presentes em ambos os genótipos i e j ; N_i e N_j é o número de bandas presentes no genótipo i e j , respectivamente; e, subtraído o valor de SG da unidade (1 - SG), foi obtida a dissimilaridade genética.

A matriz de dissimilaridade genética foi empregada para realizar análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando o método do UPGMA (*Unweighted pair group method arithmetic average*) (Sneath e Sokal, 1973), e a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais, usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS (SAS Institute Inc., 2008) e Statistica

(STATSOFT Inc., 2007). Foi realizada a análise descritiva das estimativas de distâncias genéticas obtidas com base nos marcadores RAPD e ISSR (valores mínimo e máximo, média e o coeficiente de variação), com o auxílio do programa Genes (Cruz, 2007).

Resultados e Discussão

A análise das 22 plantas de *Passiflora maliformis*, por meio do uso dos oito *primers* decâmeros, gerou um total de 103 marcadores RAPD, totalizando uma média de 12,87 marcadores por *primer*. As distâncias genéticas entre as 22 plantas avaliadas variaram entre 0,11 e 0,74. A menor distância (0,11) foi observada entre as plantas 18 (P1R3P12) e 20 (P1R3P14), ou seja, plantas da mesma progênie e repetição. A maior distância (0,74) foi observada entre as plantas 09 (P3R5P1S) e 22 (P1R3P16). A maior proximidade genética entre as plantas 18 e 20 já era esperada, considerando que tem origem comum na mesma progênie. A maior distância obtida entre as plantas 09 e 22 de diferentes progênies, evidenciam a relação dos marcadores moleculares com a genealogia dos genótipos analisados.

Com base na análise da técnica molecular ISSR foram obtidos 82 marcadores com os cinco *primers* decâmeros, perfazendo uma média de 16,4 marcadores por *primer*. As distâncias genéticas entre os 22 acessos avaliados variaram entre 0,15 e 0,78. As menores distâncias genéticas, de 0,15, foram observadas entre plantas de diferentes progênies como a 08 (P6R4P1S) e 09 (P3R5P1S), 10 (P5R3P1S) e 14 (P2R2P14). A maior distância (0,78) foi observada entre os acessos 12 (P2R2P12) e 18 (P1R3P12).

Bellon et al. (2009), estudando a variabilidade genética de acessos obtidos de população silvestres de maracujazeiro-doce com base em marcadores RAPD, encontraram distâncias entre os acessos que variaram entre 0,096 e 0,324. Esta amplitude de distâncias foi menor que a verificada no presente trabalho, evidenciando a ampla base genética das plantas analisadas, que segundo o pesquisador Nilton Junqueira, 2016 (comunicação pessoal)¹ tiveram na base de cruzamentos, acessos de *P. maliformis* originados de Roraima, Rondônia e São Paulo, justificando assim, as distâncias apresentadas pelas progênies avaliadas.

¹Informação fornecida por JUNQUEIRA, N.T.V. pesquisador em fruticultura tropical na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Planaltina, DF, Embrapa Cerrados, 2016.

Pela análise de agrupamento e dispersão gráfica obtida com base nos marcadores RAPD (Figura 1) observou-se a formação de grupos de similaridade contendo plantas de diferentes progênies. Este fato evidencia que existe um inter-relacionamento genético entre as progênies analisadas. Considerando que as progênies analisadas foram obtidas a partir de matrizes selecionadas ao longo de ciclos de seleção e recombinação, é de se esperar esse inter-relacionamento.

Bellon et al. (2007), estudando a variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims com base em marcadores RAPD, encontraram 7 grupos de similaridade genética com uma tendência de agrupamento entre aqueles acessos que eram procedentes da mesma região geográfica. No caso das progênies de *P. maliformis* analisadas no presente trabalho, não há vínculo de origem geográfica, uma vez que os acessos de diferentes regiões foram inter cruzados no início do programa de melhoramento em 2002.

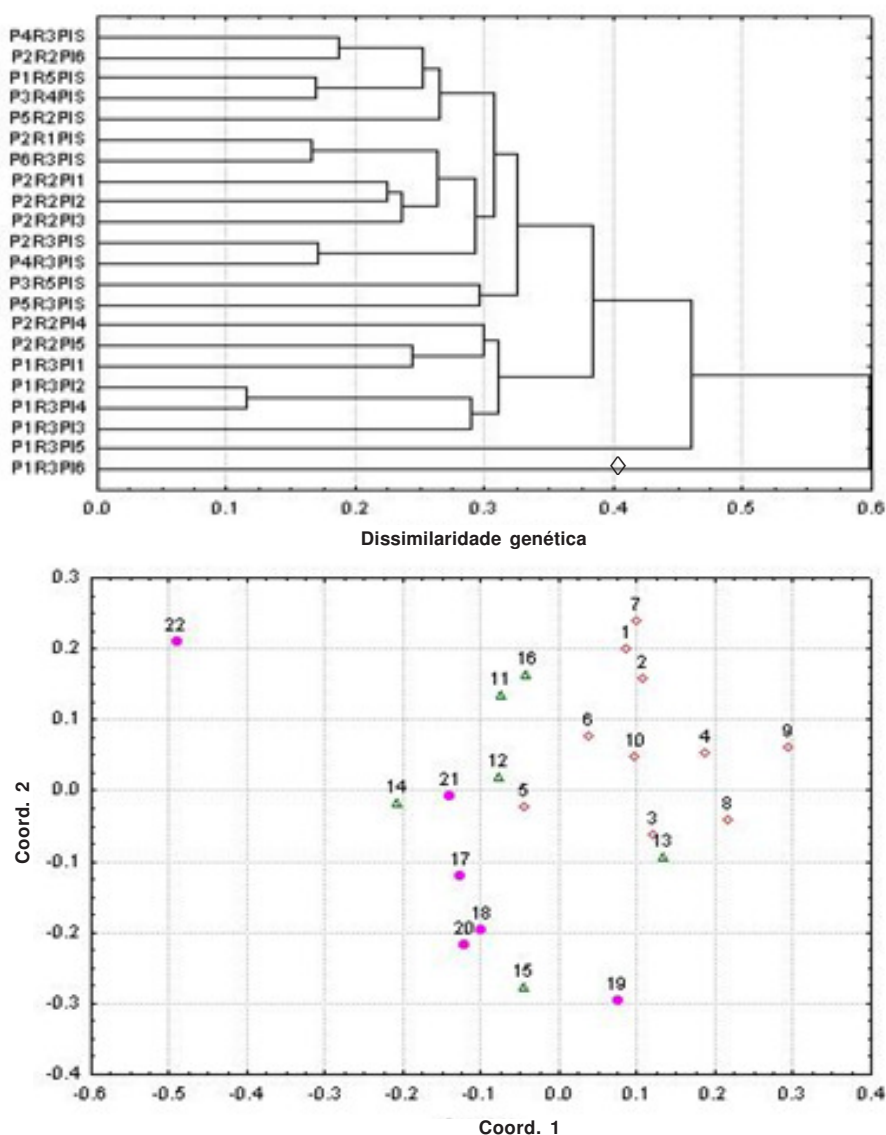
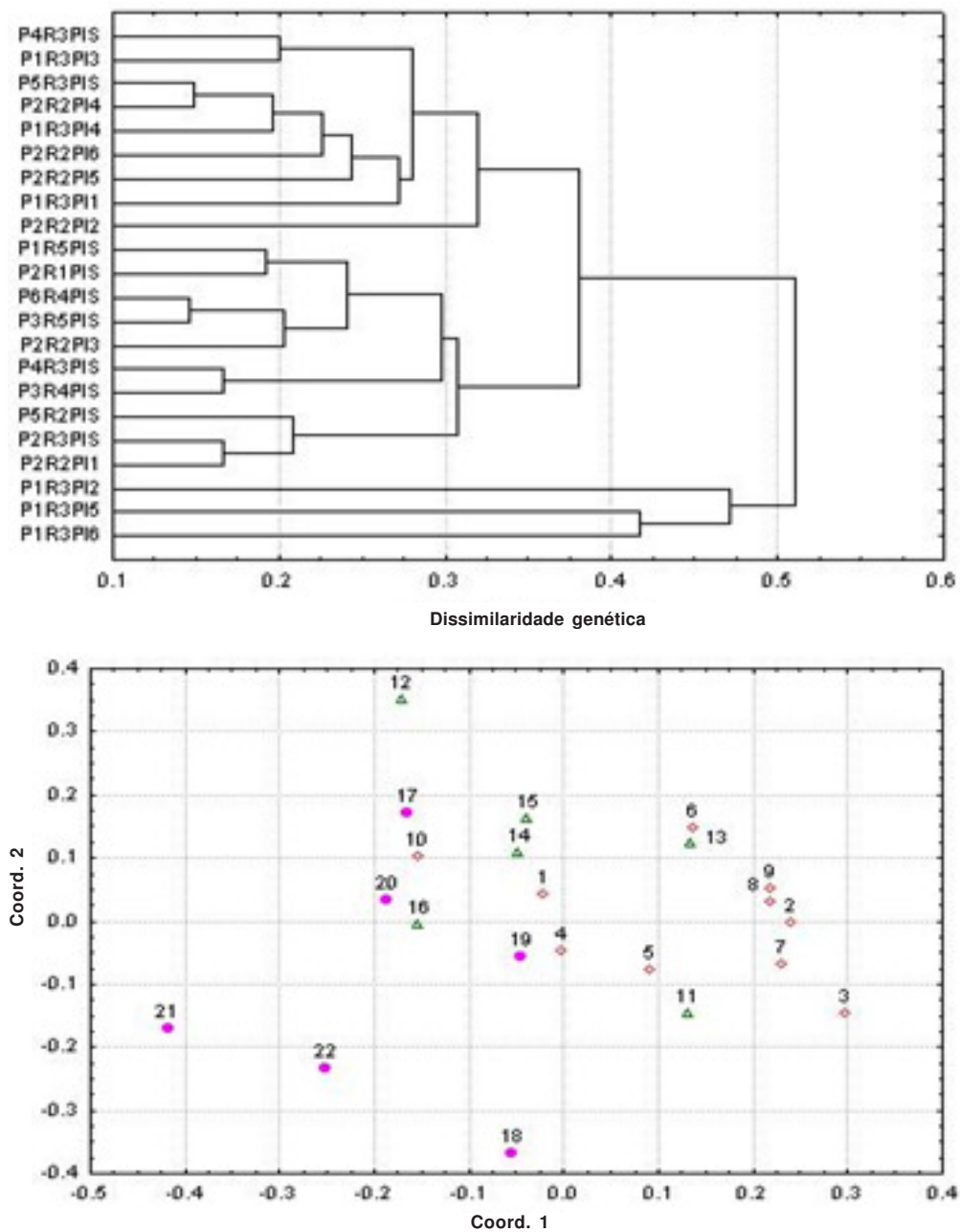


Figura 1. Análise de agrupamento e dispersão gráfica de 22 acessos de *P. maliformis* com base na matriz de dissimilaridade genética calculada utilizando-se 103 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento. O método das coordenadas principais foi utilizado na análise de dispersão gráfica. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0,85. Os números correspondem aos acessos. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2016.



Legenda:

1. P4R3PIS, 2. P1R5PIS, 3. P2R1PIS, 4. P5R2PIS, 5. P2R3PIS, 6. P4R3PIS, 7. P3R4PIS, 8. P6R4PIS, 9. P3R5PIS, 10. P5R3PIS;

▲ 11. P2R2PIS, 12. P2R2PIS, 13. P2R2PIS, 14. P2R2PIS, 15. P2R2PIS, 16. P2R2PIS;

● 17. P1R3PIS, 18. P1R3PIS, 19. P1R3PIS, 20. P1R3PIS, 21. P1R3PIS, 22. P1R3PIS.

Figura 2. Análise de agrupamento e dispersão gráfica de 22 acessos de *Passiflora maliformis*, com base na matriz de dissimilaridade genética calculada utilizando-se 82 marcadores ISSR. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento. O método das coordenadas principais foi utilizado na análise de dispersão gráfica. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,86. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2015.

Em relação às análises de agrupamento e dispersão gráfica com base nos marcadores ISSR (Figura 2), também houve a formação de grupos de similaridade com plantas de diferentes progênies.

Os marcadores moleculares foram muito úteis neste trabalho, pois, auxiliaram o processo de seleção das progênies que se tornarão matrizes na próxima etapa do programa de melhoramento da espécie *P. maliformis*. A seleção foi realizada com base na divergência evidenciada pelas duas técnicas de marcadores utilizadas e também com base nas avaliações agrônomicas realizadas.

Um fato importante evidenciado nas análises de agrupamentos com base nos marcadores RAPD e ISSR é uma tendência das plantas selecionadas (PIS) ficarem mais próximas entre si. Este fato ilustra que o processo de seleção pode levar a uma redução da variabilidade genética das plantas selecionadas, possivelmente porque há uma seleção de genótipos com maior concentração de genes favoráveis. Considerando que a espécie *P. maliformis* é alógama e autoincompatível, é importante que a redução da variabilidade genética das plantas selecionadas não impacte negativamente no processo de vingamento dos frutos e conseqüentemente na produtividade do pomar. A validação das populações em condições comerciais é de suma importância para o processo de desenvolvimento e recomendação de cultivares geneticamente melhorada.

Conclusão

Marcadores moleculares RAPD e ISSR evidenciam a variabilidade genética das plantas e progênies de *P. maliformis* analisadas e uma tendência de agrupamento ou uma tendência de estreitamento da base genética das plantas selecionadas ao longo do programa de melhoramento genético. Esta tendência deve ser considerada pelos melhoristas no desenvolvimento de novas cultivares dessa espécie, considerando o seu modo de reprodução envolvendo a alogamia e autoincompatibilidade.

Literatura Citada

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. (ABF). 2016. Treichel, M. et al. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016. 88 p.

- BELLON, G. et al. 2009. Variabilidade genética de acessos obtidos de populações cultivadas e silvestres de maracujazeiro-doce com base em marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura* 31(1):197-202.
- BELLON, G. et al. 2007. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura* 29(1):124-127.
- BERNACCI, L. C. et al. 2005. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Braga, M. F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF, Embrapa Cerrados. pp.559-586.
- CAIXETA, E. T. et al. 2006. Tipos de Marcadores Moleculares. In: Borém, A.; Caixeta, E. T. Marcadores Moleculares. Viçosa, MG, UFV. p.374.
- CERVI, A. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; BERNACCI, L. C. 2010. Passifloraceae. In: Forzza, R. F. et al. (eds.) Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Rio de Janeiro, RJ, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. pp.1432-1436. v.2.
- CRUZ, C. D. 2007. Programa Genes: Biometria. Editora UFV. Viçosa, MG. 382p.
- COQUE, M.; GALLAIS, A. 2006. Genomic regions involved in response to grain yield selection at high and low nitrogen fertilization in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 112:1205-1220.
- FALEIRO, F. G. et al. 2003. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Planaltina, DF, Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, n. 92.
- FALEIRO, F. G. 2007. Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina, DF, Embrapa Cerrados. 102p.
- FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q. 2008. Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios. Planaltina, DF, Embrapa Cerrados. 184p.

- FALEIRO, F. G. 2011. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. In: Faleiro, F. G.; Andrade, S. R. M.; Reis Júnior, F. B. Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina, DF, Embrapa Cerrados. pp. 55-118.
- FALEIRO, F. G. et al. 2013. Avanços e perspectivas do melhoramento genético de Passifloras no Brasil. In: Congreso Latino - americano de Pasifloras, 2º, Neiva, Huila, Colômbia.; Libro de memorias – Neiva, (Huila), Corporación Cepass Colombia. pp. 12-23.
- FALEIRO, F. G. et al. 2014. Obtenção e validação de descritores das cultivares de maracujazeiro silvestre BRS Pérola do Cerrado, BRS Céu do Cerrado e BRS Rosea Púrpura. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 23, Cuiabá, MT. pp. 4.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; COSTA, A. M. 2015. Ações de pesquisa e desenvolvimento para o uso diversificado de espécies comerciais e silvestres de maracujá (*Passiflora* spp.). Planaltina, DF, Embrapa Cerrados. Documentos nº 329. pp.26.
- NEI, M.; LI, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings. National Academy of Sciences (Allahabad) 76(1):5269-5273.
- OCAMPO, J. A. et al. 2015. El cultivo de lacholupa (*Passiflora maliformis* L.): Una alternativa para la fruticultura colombiana. Neiva (Huila), Corporación Centro de Desarrollo Tecnológico de las Pasifloras de Colombia – CEPASS. pp.52.
- SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. ed. New York, Cold Spring Harbor. pp.653.
- SANTOS, L. F. et al. 2011. ISSR Markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. Biochemical Genetics, New York, Plenum Publishing Corp. v. 49:540-554.
- SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT. 2008. SAS/STAT ® 9.2 user's guide. Cary. p.7857
- SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco, W. H. Freeman. p.573.
- STATSOFT, INC. STATISTICA FOR WINDOWS. 2007. Statistica for Windows (data analysis software system), version 7.1. Statsoft, Tulsa, Oklahoma (USA).