

Variabilidade de matrizes selecionadas de *Passiflora quadrangularis* L. com base em marcadores ISSR e RAPD

¹ Jamile da Silva Oiveira, ¹Fábio Gelape Faleiro, ¹ Carolina Gomes Viana, ¹ Marcelo Libindo Viana, ¹ Kenia Gracielle da Fonseca

¹ Embrapa Cerrados, BR 020, km 18, Zona Rural, Planaltina, CEP 73310-970, Brasília, DF, Brasil. E-mails: jamile.oliveira54@gmail.com, fabio.faleiro@embrapa.br, carolviana.queen@gmail.com, kenia.gfonseca@gmail.com

Resumo: A quantificação da variabilidade genética existente entre matrizes selecionadas no programa de melhoramento genético do *Passiflora quadrangularis* é importante a cada ciclo de seleção recorrente. Neste trabalho, objetivou-se caracterizar e quantificar a variabilidade genética de 13 matrizes selecionadas de *P. quadrangularis* utilizando marcadores moleculares ISSR e RAPD. Um acesso de *P. quadrangularis*, um de *P. alata* e um híbrido interespecífico de *P. alata* x *P. quadrangularis* foram incluídos nas análises como *outgroups*. Para tanto, amostras de DNA genômico de cada genótipo foram extraídas, quantificadas por espectrofotometria e amplificadas utilizando-se *primers* para marcadores RAPD e ISSR. Os marcadores moleculares obtidos foram transformados em uma matriz de dados binários. Essa matriz foi utilizada para estimar as dissimilaridades genéticas entre os genótipos. O agrupamento foi obtido por meio de dendrograma, utilizando o método *Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*. A dispersão gráfica foi baseada em escalas multidimensionais, usando o método das coordenadas principais. Os marcadores RAPD e ISSR foram úteis para quantificar a variabilidade genética das matrizes selecionadas de *P. quadrangularis*, sendo que a PL6 e PL12 foram as que apresentaram maior dissimilaridade em relação às demais matrizes. Os marcadores RAPD e ISSR foram complementares na caracterização dos genótipos, sendo que os marcadores ISSR permitiram maiores estimativas de dissimilaridades e maior diferenciação desses genótipos.

Palavras chaves: Genética molecular, Passifloras silvestres, Seleção recorrente.

Variability of selected matrices of *Passiflora quadrangularis* L. based on ISSR and RAPD markers

Abstract: The quantification of genetic variability among selected matrices of *Passiflora quadrangularis* is important for each recurrent selection cycle in the genetic improvement program. The objective of this work was to characterize and quantify the genetic variability of 13 selected matrices of *P. quadrangularis* using molecular markers ISSR and RAPD. One access of *P. quadrangularis*, one of *Passiflora alata* and one interspecific hybrid of *P. alata* x *P. quadrangularis* were included in the analyzes as *outgroups*. Genomic DNA samples from each genotype were extracted, quantified by spectrophotometry and amplified using primers for RAPD and ISSR markers. The molecular markers obtained were transformed into a binary data matrix. This matrix was used to estimate the genetic dissimilarities among the genotypes. The grouping was obtained by dendrogram using the *Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*. The dispersion graphic was based on multidimensional scales, using the principal coordinate method. The RAPD and ISSR markers were useful to quantify the genetic variability of the *P. quadrangularis* selected matrices. PL6 and PL12 were the most dissimilar in relation to the other matrices. The RAPD and ISSR markers were complementary in the characterization of the genotypes, and the ISSR markers allowed greater estimates of dissimilarities and greater differentiation of these genotypes.

Keywords: Molecular genetics, Wild passifloras, Recurrent selection.

Introdução

A espécie *Passiflora quadrangularis* é também conhecida no Brasil como maracujá-melão, em função do tamanho, formato e consumo de seus frutos. Os frutos normalmente possuem mais de 1 Kg de massa, são de cor amarelada quando maduros e possuem formato oblongo. O hábito de consumo dos frutos desta espécie é bastante peculiar, pois além da polpa, o mesocarpo também pode ser consumido diretamente (Martin & Nakasone, 1970). É uma planta trepadeira que além de ser utilizada para alimentação, estuda-se seu uso ornamental, por possuir flores grandes, coloridas e aromáticas.

Devido, principalmente as características de fruto, a espécie *P. quadrangularis*, apresenta um imenso potencial comercial a ser explorado. A planta pode ser usada diretamente na diversificação de sistemas de produção visando à comercialização de frutas frescas e produtos processados de alto valor agregado. Para o desenvolvimento de cultivares, a elaboração de trabalhos de pesquisa básica nas áreas de conservação e caracterização dos recursos genéticos e pesquisa aplicada voltada para o melhoramento genético são essenciais (Faleiro et al., 2015). Dentro deste contexto, a espécie *P. quadrangularis* tem sido trabalhada na Embrapa. Por meio de ciclos de recombinação e seleção está sendo possível a seleção de matrizes promissoras com maior produtividade e adaptadas ao cultivo na região do Cerrado, tendo em vista que a região do Distrito Federal vem se destacando na produção de frutíferas.

No programa de melhoramento genético de *P. quadrangularis*, o emprego dos marcadores moleculares tem auxiliado em diferentes etapas, envolvendo a caracterização de recursos genéticos, estudos de variabilidade genética entre matrizes selecionadas e confirmação da fecundação cruzada durante o avanço de gerações.

A biotecnologia tem avançado e desenvolvido soluções tecnológicas em todos os campos da ciência, especialmente, ferramentas aplicadas à agropecuária. Exemplos dessas ferramentas são os marcadores moleculares do DNA que têm sido cada vez mais utilizados nas atividades relacionadas ao melhoramento

genético, pois apresentam várias aplicações nas mais diferentes etapas, desde a caracterização dos recursos genéticos, pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento, permitindo análises diretas de genótipos, sem influência ambiental (Faleiro, 2011, Myburg et al., 2014, Barbosa et al., 2015, Camargo et al., 2017, Fonseca et al., 2017, Taheri et al., 2018 & Oliveira et al., 2019).

A caracterização e quantificação da variabilidade genética de matrizes selecionadas é importante, pois permite estabelecer relacionamentos genéticos entre tais matrizes e analisar a base genética do programa de melhoramento tendo em vista a manutenção da variabilidade durante os ciclos de seleção recorrente para maximizar os ganhos genéticos e diminuir os efeitos da endogamia que são comuns em diferentes espécies do gênero *Passiflora*. Neste sentido, objetivou-se caracterizar e quantificar a variabilidade genética de matrizes selecionadas de *P. quadrangularis*, utilizando marcadores moleculares ISSR e RAPD.

Material e métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados. Foram caracterizadas 13 matrizes selecionadas de *P. quadrangularis* com base na produtividade, qualidade física e química dos frutos, adaptabilidade a sistemas de produção no Cerrado e resistência a doenças. Um acesso de *P. quadrangularis* (CPAC MJ-07-03), um de *P. alata* (CPAC MJ-02-19) e um híbrido interespecífico de *P. alata* x *P. quadrangularis* (CPAC MJ H-44) do Banco Ativo de Germoplasma 'Flor da Paixão' (BAG) foram incluídos nas análises como *outgroups*. As matrizes selecionadas de *P. quadrangularis* estão sendo avaliadas, dentro do programa de melhoramento genético realizado na Embrapa e parceiros, quanto às características agrônômicas de interesse.

A metodologia de extração de DNA foi a do CTAB, com algumas modificações (Faleiro et al., 2003). O tecido vegetal fresco foi macerado usando nitrogênio líquido com auxílio de um bastão de vidro e, em seguida, foram adicionados

em cada amostra, 450 μ L de tampão contendo Tris-HCl 100 μ M (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 desproteção 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 colocando em microtubos do tipo *ependorf* 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 colocados na geladeira, permanecendo por 30 minutos e, em continuidade, os tubos 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 a 70% e secado na temperatura do ar ambiente. Após completamente seco, o *pellet* foi ressuscitado em 100 μ L de água ultrapura, 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 (Sambroock et al., 1989). As amostras de DNA de cada acesso foram diluídas para 5 ng/ μ L. Foram realizadas as ampliações das amostras de DNA via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) testando-se 7 iniciadores para marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) e 13 iniciadores decâmeros para marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Tabela 1).

Tabela 1- Iniciadores utilizados para obtenção dos marcadores ISSR e RAPD para 16 acessos de *Passiflora* e respectivos números de bandas polimórficas (BP) e monomórficas (BM). Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2017.

Primers ISSR	Sequência 5'→3'	BP	BM
ISSR-5	AGCAGCAGCAGCAGC	13	-
ISSR-6	AGGAGGAGGAGGAGG	-	-
ISSR-7	CAGCAGCAGCAGCAG	13	-
ISSR-8	CGAGAGAGAGAGAGA	-	-
ISSR-13	GAGAGAGAGAGAGAG	-	-
ISSR-14	AGAGAGAGAGAGAGA	13	-
ISSR-15	GTGTGTGTGTGTGTGT	5	-
Total		44	-
Primers RAPD	Sequência 5'→3'	BP	BM
OPD-07	TTGGCACGGG	8	2
OPD-08	GTGTGCCCCA	12	-
OPD-10	GGTCTACACC	-	-
OPE-16	GGTGACTGTG	-	-
OPE-18	GGAAGTGTG	-	-
OPF-17	AACCCGGGAA	-	-
OPG-01	CTACGGAGGA	-	-
OPG-05	CTGAGACGGA	22	4
OPG-08	GGCTCATGTG	16	7
OPG-17	ACGACCGACA	-	-
OPH-04	GGAAGTGTG	11	1
OPH-12	ACGCGCATGT	6	5
OPH-16	TCTCAGCTGG	15	-
Total		90	19

Primers utilizados nas ampliações; - não amplificou.

Para obtenção dos marcadores ISSR, o DNA foi amplificado utilizando-se os iniciadores listados na tabela 1. A reação de amplificação foi composta por 20 ng de DNA genômico, 1 unidade de Taq DNA polimerase, 0,3 μM de *primer* em uma solução de 13 μl , contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 100 μM de cada um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP).

A amplificação para ISSR foram realizadas em termociclador (PTC-100™ *Programmable Thermal Controller*), no qual as amostras foram inicialmente desnaturadas a 94 °C por 2 min, seguidos de 37 ciclos: iniciando-se com 15 s a 94 °C, 30 s a 47 °C, 1 min a 72 °C extensão final a 72 °C por 7 min, e resfriado a 4 °C.

As reações de amplificação para a obtenção de marcadores RAPD foram efetuadas em um volume total de 13 μL , contendo: Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 100 μM de cada um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 μM de um primer (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) (Tabela 1), uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA.

As amplificações para obtenção de marcadores RAPD foram efetuadas em termociclador (PTC-100™ *Programmable Thermal Controller*), 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 e extensão final de seis minutos a 72 °C, e resfriado a 4 °C.

Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 μl 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 ISSR e RAPD 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 & Li, 1979), utilizando o Programa Genes (Cruz, 2007). A similaridade genética (SG) foi dada por: $S_{ij} =$

$2N_{ij}/(N_i + N_j)$, 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.

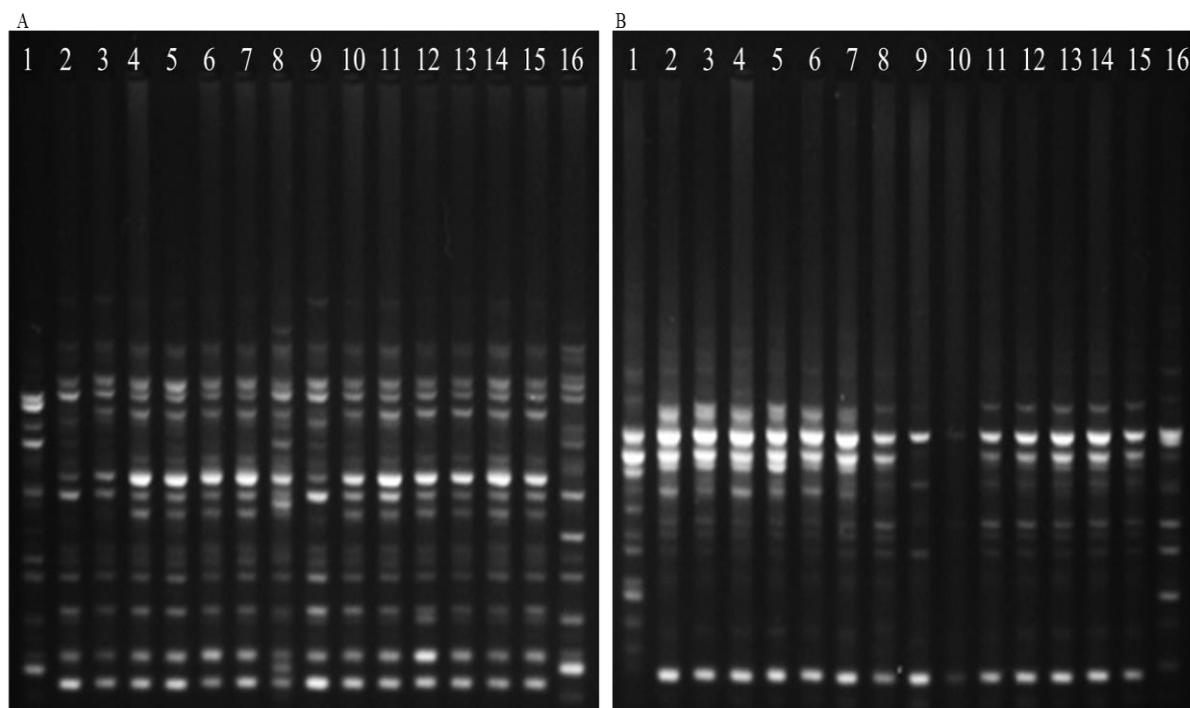
A matriz de dissimilaridade genética foi empregada para realizar análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando o método do UPGMA (*Unweighted pairgroup method arithmetic average*) (Sneath & Sokal, 1973) como critério de agrupamento, utilizando o programa Genes (Cruz, 2013) e a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais, usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS Institute Inc. (SAS, 2008) e Statistica Inc. (Statsoft, 2007). Para realização do ponto de corte, foi utilizado o critério subjetivo, utilizando a experiência da equipe do programa de melhoramento.

Resultados e discussão

Dos sete *primers* ISSR utilizados, um total de quatro foram eficientes na amplificação dos marcadores. Para os marcadores RAPD, sete dos 13 *primers* utilizados amplificaram o DNA da espécie. Os marcadores selecionados para as análises foram aqueles que geraram maior quantidade de bandas polimórficas e apresentaram melhor qualidade das amplificações (Tabela 1).

Os quatro *primers* utilizados para obtenção de marcadores ISSR dos 16 genótipos geraram um total de 44 marcadores moleculares polimórficos, perfazendo uma média de 11 marcadores por *primer* (Tabela 1). Não foram observados marcadores ISSR monomórficos, evidenciando um alto polimorfismo entre os genótipos analisados, incluindo acessos das espécies *P. quadrangularis* e *P. alata* (Figura 1A). Elevado polimorfismo entre acessos e espécies do gênero *Passiflora* por meio de marcadores ISSR também foi verificado por Sousa et al. (2015), Costa et al. (2012), Santos et al. (2011), Fonseca et al. (2017) e Oliveira et al. (2019).

Figura 1 - Perfil eletroforético dos marcadores ISSR (A) e RAPD (B) para os 16 acessos de *Passiflora* spp. usando os *primers* 5-58489 (A) e OPG-08 (B). Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2017.



Legenda: 1. *P. alata* (CPAC MJ-02-19) 2. *P. quadrangularis* (CPAC MJ-07-03), 3. *P. quadrangularis* PL1 4. *P. quadrangularis* PL2, 5. *P. quadrangularis* PL3, 6. *P. quadrangularis* PL4, 7. *P. quadrangularis* PL5, 8. *P. quadrangularis* PL6, 9. *P. quadrangularis* PL7, 10. *P. quadrangularis* PL8, 11. *P. quadrangularis* PL9, 12. *P. quadrangularis* PL10, 13. *P. quadrangularis* PL11, 14. *P. quadrangularis* PL12, 15. *P. quadrangularis* PL13, 16. *P. quadrangularis* x *P. alata* (CPAC MJ H-44).

Esse elevado polimorfismo de marcadores ISSR para genótipos de *P. quadrangularis*, *P. alata* e *P. alata* x *P. quadrangularis* verificado no presente trabalho pode ser explicado pela eficiência da técnica na diferenciação dos genótipos e pela variabilidade interespecífica que foi analisada.

Com base nos marcadores ISSR, as distâncias genéticas estimadas variaram de 0,00 (entre os acessos 11. *P. quadrangularis* PL9 e 12. *P. quadrangularis* PL10) a 1,00 (entre os acessos 15. *P. quadrangularis* PL13 e os acessos 1. *P. alata* (CPAC MJ-02-19), 7. *P. quadrangularis* PL5, 11. *P. quadrangularis* PL9, 12. *P. quadrangularis* PL10 e 14. *P. quadrangularis* PL12) (Tabela 2). Não foi verificada dissimilaridade genética entre as matrizes (PL9) e (PL10). Também foi

evidenciado pela matriz, que os valores de dissimilaridade mostram a proximidade existente, entre o acesso original *P. quadrangularis* (CPAC MJ-07-03) e as matrizes selecionadas, com exceção da matriz (PL 12), que apresentou uma distância de 0,57 em relação ao acesso original. Este valor de dissimilaridade genética é um indicativo que a matriz PL12 possa ser um híbrido interespecífico entre *P. quadrangularis* e *P. alata*.

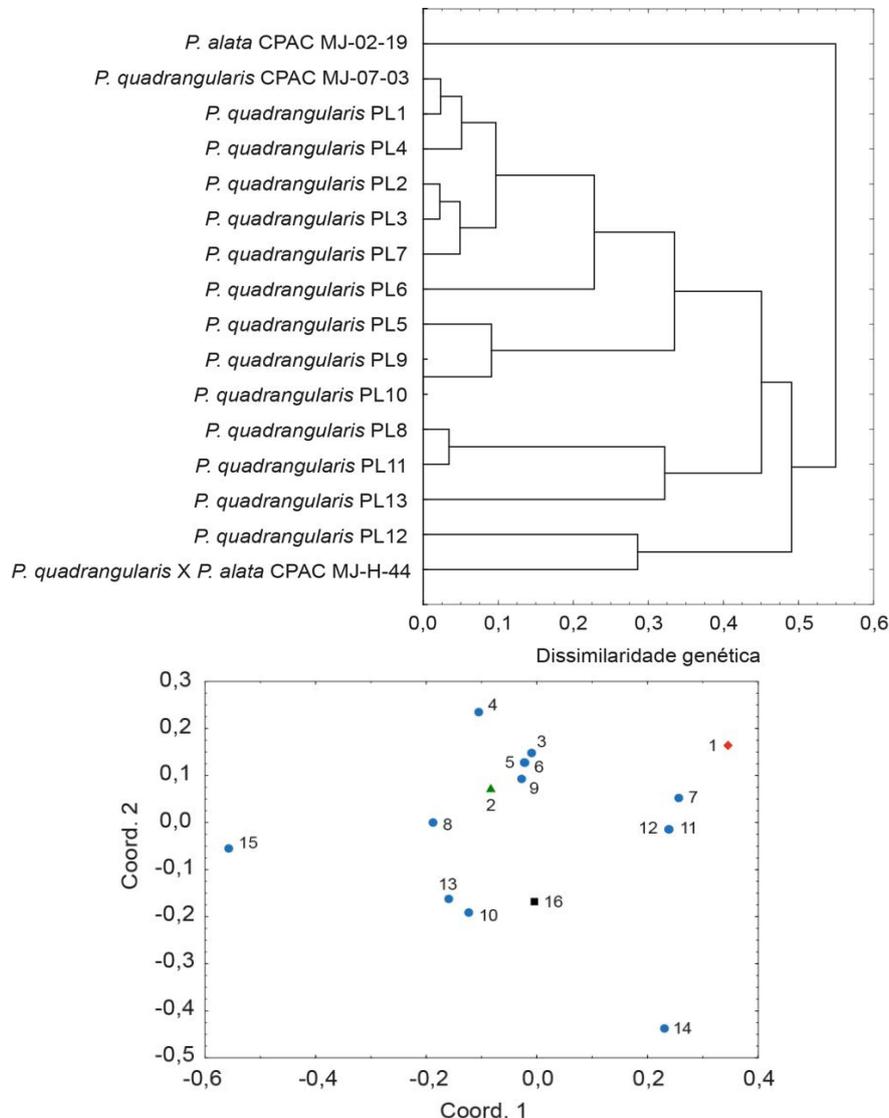
Análises de agrupamento e dispersão gráfica, com base na matriz de dissimilaridade genética obtida utilizando os marcadores ISSR evidenciaram a divergência entre os genótipos analisados (Figura 2). O ajuste das medidas de dissimilaridade e das distâncias gráficas foi adequado com base no alto coeficiente de correlação cofenética ($r=0,85$).

Tabela 2 - Matriz de dissimilaridade genética entre 16 genótipos de *P. alata*, *P. quadrangularis* e *P. quadrangularis* x *P. alata*, calculadas com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, utilizando 44 marcadores ISSR. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2017.

Acessos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	0,00	0,56	0,39	0,57	0,41	0,44	0,39	0,71	0,45	0,65	0,45	0,45	0,65	0,65	1,00	0,44
2		0,00	0,02	0,23	0,09	0,05	0,35	0,20	0,07	0,28	0,37	0,37	0,24	0,57	0,47	0,37
3			0,00	0,16	0,07	0,06	0,32	0,29	0,05	0,38	0,32	0,32	0,35	0,65	0,56	0,41
4				0,00	0,02	0,07	0,41	0,28	0,05	0,48	0,39	0,39	0,44	1,00	0,44	0,43
5					0,00	0,05	0,30	0,23	0,05	0,32	0,26	0,26	0,29	0,61	0,53	0,42
6						0,00	0,26	0,25	0,08	0,33	0,29	0,29	0,30	0,63	0,53	0,42
7							0,00	0,43	0,15	0,48	0,09	0,09	0,48	0,48	1,00	0,39
8								0,00	0,11	0,28	0,49	0,49	0,25	0,61	0,45	0,26
9									0,00	0,30	0,29	0,29	0,27	0,60	0,51	0,37
10										0,00	0,36	0,36	0,03	0,36	0,36	0,43
11											0,00	0,00	0,42	0,42	1,00	0,41
12												0,00	0,42	0,42	1,00	0,41
13													0,00	0,39	0,28	0,35
14														0,00	1,00	0,29
15															0,00	0,38
16																0,00

Legenda: 1. *P. alata* (CPAC MJ-02-19) 2. *Passiflora quadrangularis* (CPAC MJ-07-03), 3. *P. quadrangularis* PL1 4. *P. quadrangularis* PL2, 5. *P. quadrangularis* PL3, 6. *P. quadrangularis* PL4, 7. *P. quadrangularis* PL5, 8. *P. quadrangularis* PL6, 9. *P. quadrangularis* PL7, 10. *P. quadrangularis* PL8, 11. *P. quadrangularis* PL9, 12. *P. quadrangularis* PL10, 13. *P. quadrangularis* PL11, 14. *P. quadrangularis* PL12, 15. *P. quadrangularis* PL13 e 16. *P. quadrangularis* x *P. alata* (CPAC MJ H-44).

Figura 2 - Dendrograma e dispersão gráfica de 16 acessos de *P. alata*, *P. quadrangularis* e *P. quadrangularis* x *P. alata*, com base na matriz de dissimilaridade genética calculada utilizando-se 44 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 0,85. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2017.



Legenda: 1. *P. alata* (CPAC MJ-02-19) 2. *Passiflora quadrangularis* (CPAC MJ-07-03), 3. *P. quadrangularis* PL1 4. *P. quadrangularis* PL2, 5. *P. quadrangularis* PL3, 6. *P. quadrangularis* PL4, 7. *P. quadrangularis* PL5, 8. *P. quadrangularis* PL6, 9. *P. quadrangularis* PL7, 10. *P. quadrangularis* PL8, 11. *P. quadrangularis* PL9, 12. *P. quadrangularis* PL10, 13. *P. quadrangularis* PL11, 14. *P. quadrangularis* PL12, 15. *P. quadrangularis* PL13

Além da divergência entre os acessos, as análises de agrupamento mostraram a formação de quatro grupos de similaridade, considerando como o ponto de corte a distância genética média de 0,4. Observou-se que, o acesso de *P. alata* (CPAC MJ-02-19) ficou separado do acesso de *P. quadrangularis* (CPAC MJ-07-03) e das matrizes selecionadas, formando o grupo um. O grupo dois

foi formado pelo acesso de *P. quadrangularis* e as matrizes PL1, PL4, PL2, PL3, PL7, PL6, PL5, PL9 e PL10. O grupo três foi formado pelas matrizes PL8, PL11 e PL13. O grupo quatro foi formado pela matriz PL12 e o híbrido interespecífico entre *P. quadrangularis* x *P. alata* (CPAC MJ H-44). Esta proximidade da matriz PL12 e o híbrido interespecífico corrobora com a hipótese que

essa matriz também se trata de um híbrido interespecífico entre *P. alata* e *P. quadrangularis*. Devido a compatibilidade já observada entre as duas espécies (*P. quadrangularis* e *P. alata*) e a proximidade observada entre a matriz PL12 e o híbrido interespecífico. A matriz PL12 possivelmente é um híbrido interespecífico que foi formado pelo cruzamento natural entre as duas espécies.

Com base na análise de RAPD, foram obtidos 109 marcadores com os 13 *primers* decâmeros, perfazendo uma média de 8,4 marcadores por *primer* (Figura 1B). Aproximadamente 82,5% dos marcadores moleculares RAPD obtidos foram polimórficos entre os genótipos analisados, incluindo acessos

das espécies *P. quadrangularis* e *P. alata*. Elevado polimorfismo entre acessos e espécies do gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD também já foi reportado por Bellon et al. (2009, 2014), Cerqueira-Silva et al. (2012) e Castro et al. (2011).

As distâncias genéticas geradas pelos marcadores RAPD variaram de 0,00 a 0,53 (Tabela 3). Em comparação com os marcadores ISSR, os RAPD geraram estimativas menores de distâncias genéticas entre os genótipos avaliados. Os marcadores ISSR e RAPD acessam diferentes regiões do genoma e, no caso, os marcadores RAPD foram menos polimórficos, gerando assim menores estimativas de distância genética entre os genótipos analisados no trabalho.

Tabela 3 - Matriz de dissimilaridade genética entre 16 acessos de *P. alata*, *P. quadrangularis* e *P. quadrangularis* x *P. alata*, calculadas com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, utilizando 109 marcadores RAPD. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2017.

Acessos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	0,00	0,44	0,49	0,50	0,52	0,49	0,47	0,42	0,45	0,48	0,48	0,49	0,49	0,53	0,50	0,17
2		0,00	0,04	0,07	0,10	0,05	0,04	0,14	0,04	0,06	0,05	0,05	0,05	0,10	0,05	0,43
3			0,00	0,04	0,07	0,02	0,02	0,11	0,06	0,03	0,03	0,03	0,03	0,08	0,03	0,48
4				0,00	0,03	0,00	0,01	0,12	0,07	0,03	0,03	0,02	0,02	0,07	0,03	0,49
5					0,00	0,00	0,01	0,11	0,08	0,03	0,03	0,03	0,02	0,07	0,03	0,47
6						0,00	0,01	0,12	0,07	0,03	0,03	0,02	0,02	0,07	0,03	0,49
7							0,00	0,12	0,06	0,04	0,02	0,02	0,02	0,07	0,02	0,47
8								0,00	0,11	0,08	0,09	0,09	0,10	0,16	0,10	0,42
9									0,00	0,02	0,02	0,03	0,05	0,10	0,05	0,46
10										0,00	0,02	0,02	0,04	0,10	0,05	0,48
11											0,00	0,02	0,03	0,08	0,03	0,48
12												0,00	0,02	0,07	0,02	0,49
13													0,00	0,06	0,02	0,48
14														0,00	0,02	0,50
15															0,00	0,47
16																0,00

Legenda: 1. *P. alata* (CPAC MJ-02-19) 2. *Passiflora quadrangularis* (CPAC MJ-07-03), 3. *P. quadrangularis* PL1 4. *P. quadrangularis* PL2, 5. *P. quadrangularis* PL3, 6. *P. quadrangularis* PL4, 7. *P. quadrangularis* PL5, 8. *P. quadrangularis* PL6, 9. *P. quadrangularis* PL7, 10. *P. quadrangularis* PL8, 11. *P. quadrangularis* PL9, 12. *P. quadrangularis* PL10, 13. *P. quadrangularis* PL11, 14. *P. quadrangularis* PL12, 15. *P. quadrangularis* PL13 e 16. *P. quadrangularis* x *P. alata* (CPAC MJ H-44).

Bellon et al. (2009), quantificando a variabilidade genética existente entre acessos obtidos de população silvestres de maracujazeiro-doce (*P. alata*) com base em marcadores RAPD, encontraram distâncias entre os acessos que variaram de 0,096 a 0,324. Os valores encontrados no presente estudo, estão entre os valores reportados por Bellon et al. (2009) apenas em relação a distância genética entre as matrizes selecionadas de *P. quadrangulares* (PL1, PL2, PL3, PL4, PL5, PL6, PL7, PL8, PL9, PL10, PL11 e PL12).

Quando compara-se os demais acessos (*P. alata* (CPAC MJ-02-19), *P. quadrangulares* (CPAC MJ-07-03) e o híbrido interespecífico *P. quadrangulares* x *P. alata* (CPAC MJ H-44)) as distâncias genéticas obtidas no presente estudo, são maiores do que as relatadas por Bellon et al. (2009). Possivelmente, porque os autores citados estudaram acessos de uma população da mesma espécie.

A matriz PL4 não diferiu das matrizes PL2 e PL3 com base nos marcadores RAPD. A maior distância genética (0,53) foi observada entre o acesso de *P. alata* (CPAC MJ-02-19) e a matriz *P. quadrangularis* PL12. Pela matriz de dissimilaridade, observa-se que a matriz (PL12) e a matriz (PL6) apresentaram as maiores dissimilaridades genéticas em relação ao acesso original *P. quadrangularis* (CPAC MJ-07-03). Estas matrizes são importantes para a manutenção da variabilidade nos ciclos de seleção recorrente e também para a identificação de pares de indivíduos divergentes dentro da espécie, possibilitando uma máxima exploração da variabilidade genética disponível.

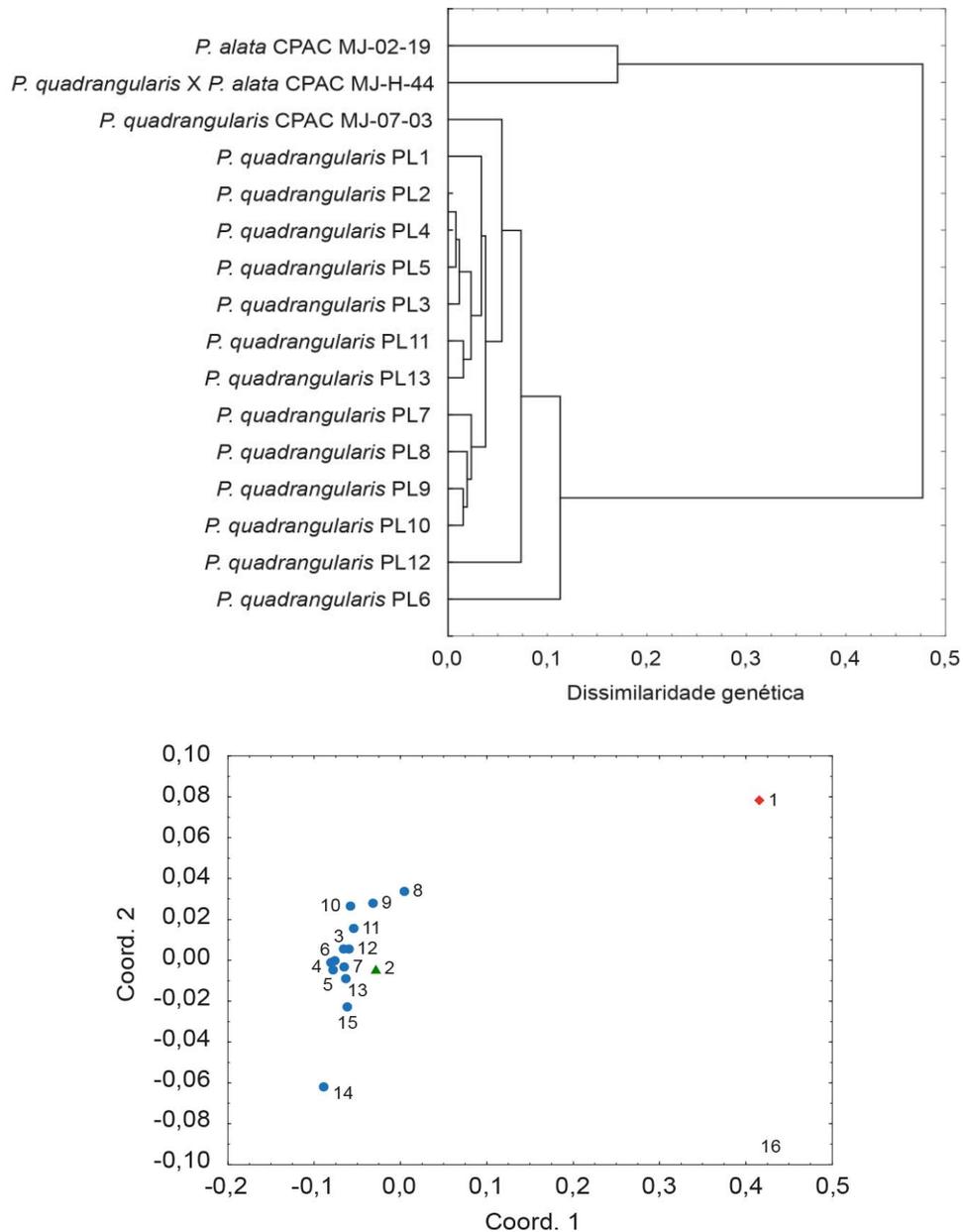
Utilizando-se os marcadores RAPD,

obteve-se a análise de agrupamento via dendrograma (Figura 3), no qual adotando como ponto de corte a distância média de 0,3; observou-se a formação de dois grupos de similaridade, onde o acesso de *P. alata* (CPAC MJ-02-19) ficou no mesmo grupo que o híbrido entre *P. quadrangularis* x *P. alata* (Figura 3). Os demais genótipos ficaram agrupados, sendo eles, o acesso original *P. quadrangularis* (CPAC MJ-07-03) e as 13 matrizes selecionadas.

O gráfico de dispersão corrobora com as informações da análise de agrupamento, onde há a separação do acesso original *P. quadrangularis* (CPAC MJ-07-03) e as 13 matrizes selecionadas do acesso de *P. alata* e o híbrido interespecífico. Assim como observado para os marcadores ISSR, o coeficiente de correlação cofenética do dendrograma foi alto ($r = 0,96$), validando a consistência no ajuste entre a representação gráfica da similaridade genética e a sua matriz original, o que assegura que sejam realizadas inferências por meio da avaliação visual do dendrograma.

Os resultados obtidos com os marcadores moleculares ISSR e RAPD mostraram a existência de variabilidade genética entre as matrizes selecionadas de *P. quadrangularis* e a possibilidade de ampliar esta variabilidade por meio de cruzamentos interespecíficos com acessos de *P. alata*, uma vez que o híbrido interespecífico apresentou maior nível de polimorfismo e maiores distâncias genéticas em relação às matrizes selecionadas de *P. quadrangularis*.

Figura 3 - Dendrograma e dispersão gráfica de 16 genótipos (*P. alata*, *P. quadrangularis* e *P. quadrangularis* x *P. alata*), com base na matriz de dissimilaridade genética calculada utilizando-se 109 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) foi de 0,96. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2017.



Legenda: 1. *P. alata* (CPAC MJ-02-19) 2. *Passiflora quadrangularis* (CPAC MJ-07-03), 3. *P. quadrangularis* PL1 4. *P. quadrangularis* PL2, 5. *P. quadrangularis* PL3, 6. *P. quadrangularis* PL4, 7. *P. quadrangularis* PL5, 8. *P. quadrangularis* PL6, 9. *P. quadrangularis* PL7, 10. *P. quadrangularis* PL8, 11. *P. quadrangularis* PL9, 12. *P. quadrangularis* PL10, 13. *P. quadrangularis* PL11, 14. *P. quadrangularis* PL12, 15. *P. quadrangularis* PL13 e 16. *P. quadrangularis* x *P. alata* (CPAC MJ H-44).

Conclusão

As distâncias genéticas entre as matrizes selecionadas de *P. quadrangularis* e o híbrido interespecífico entre *P. alata* e *P. quadrangularis*, evidenciam a possibilidade de ampliação da base genética do programa de melhoramento por meio do uso de cruzamentos entre estas duas espécies. Marcadores moleculares ISSR e RAPD permitiram caracterizar e quantificar a variabilidade genética de matrizes selecionadas de *P. quadrangularis*. Tais informações serão importantes para o uso destas matrizes no avanço dos ciclos de seleção e recombinação.

Referências

- Barbosa, A.C.O.F., et al. (2015). Range-wide genetic differentiation of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) populations in Brazilian Cerrado. *Biochemical Systematics and Ecology*, 59, 288-296. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.02.004>.
- Bellon, G., et al. (2014). Variabilidade genética de genótipos elite de maracujazeiro, obtidos em programas de retrocruzamento envolvendo espécies silvestres e comerciais com base em marcadores RAPD. *Bioscience Journal*, 30 (6) 1692-1697.
- 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 Fruticultura*, Jaboticabal, 31 (1), 197-202.
- Camargo, N.G., Gontijo, O.J.S., & Barbosa, A.C.D.O.F. (2017). Caracterização de marcadores microssatélites em plantas nativas do Cerrado brasileiro. *Multi-Science Journal*, 1 (6), 41-47. DOI: <http://dx.doi.org/10.33837/msj.v1i6.116>
- Castro, A.P.G., et al. (2011). Genetic variability of *Passiflora* spp. from comercial fields in the Federal District, Brazil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 41 (6), 996-1002.
- Cerqueira-silva, et al. (2012). Genetic variation in a wild population of the 'sleep' passion fruit (*Passiflora setacea*) based on molecular markers. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, 11 (1) 731-738. Doi: 10.4238/2012.March.22.3.
- Costa, J.N., et al. (2012). Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, Viçosa, 12 (4), 253-260. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-70332012000400004>
- Cruz, C.D. (2013). GENES: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum Agronomy*, 35 (3), 271-276. Doi: 10.4025/actasciagron.v35i3.21251
- Faleiro, F.G., Andrade, S. R. M., & Reis Jr., F.B. (2011). *Biotechnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária* (730 p). Planaltina: Embrapa Cerrados.
- Faleiro, F.G., et al. (2003). *Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado* (Comunicado Técnico, n. 92). Planaltina: Embrapa Cerrados.
- Faleiro, F.G., et al. (2015). Potencial de uso das plantas agrícolas nativas e de seus parentes silvestres. In: Veiga, R.F.A., & Queiróz, M.A. (Org.). *Recursos fitogenéticos: a base da agricultura sustentável no Brasil*. (v. 1, pp. 291-298). Viçosa: Ed. UFV.
- Fonseca, K.G., et al. (2017). Morphoagronomic and molecular characterization of ornamental passion fruit cultivars. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 52 (10), 849-860. Doi: <https://doi.org/10.1590/s0100204x2017001000004>
- Martin, F.W., & Nakasone, H.Y. (1970). The edible species of *Passiflora*. *Economic Botany*, New York, 24 (3), 336-347.
- Myburg, A.A., et al. (2014). The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature*, 5010 (7505), 356-362. Doi: 10.1038/nature13308. Epub 2014 Jun 11.

Nei, M., & Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 76 (10), 5269-5273. Doi: 10.1073/pnas.76.10.5269

Oliveira, J.S., et al. (2019). Genetic variability of *Passiflora* spp. based on ISSR and RAPD. *Asian Journal of Science and Technology*, 10 (1), 9375-9378.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (2nd ed., 653 p). New York: Cold Spring Harbor.

Santos, L.F., et al. (2011). ISSR Markers as a Tool for the Assessment of Genetic Diversity in *Passiflora*. *Biochemical Genetics*, 49 (7-8), 540-554.

SAS Institute Inc. (2008). *SAS user's guide: statistic: version 9.1.3*. (846 p). Cary: SAS Institute.

Sneath, P.H.A., & Sokal, R.R. (1973). *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*, (573 p). San Francisco, W.H: Freeman and Company.

Sousa, A.G.R., et al. (2015). ISSR markers in wild species of *Passiflora* L. (Passifloraceae) as a tool for taxon selection in ornamental breeding. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, 14 (4), 18534-18545. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2015.December.23.41>

Statsoft, Inc. (2007). *Statistica for Windows: data analysis software system* [Programa de computador] (version 7.1). Tulsa, Oklahoma: Statsoft.

Taheri, S., et al. (2018). Mining and development of novel SSR markers using next generation sequencing (NGS) data in plants. *Molecules*, 23 (2), 399. Doi: 10.3390/molecules23020399.

Recebido em: 26/01/2018

Aceito em: 04/08/2020