

Ana Carlina C. Loss¹, Yuri L.R. Leite², Iúri D. Louro³ & Maria do Carmo P. Batitucci⁴

Diversidade genética de populações de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) no estado do Espírito Santo, Brasil⁵

Population genetic structure of sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis), from Espírito Santo, Brazil.

Resumo O maracujá-doce (*Passiflora alata*) é uma planta nativa da América do Sul e se distribui em todas as regiões brasileiras. Por ser uma espécie de interesse comercial, programas de melhoramento genético visam o aumento das características de interesse agrônomo, porém pouco se sabe sobre as populações nativas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a estrutura genética dentro e entre populações de *Passiflora alata* de diferentes regiões do estado do Espírito Santo, com uso de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD). Os valores de divergência genética entre as populações variaram de 0,09 a 0,15 e a análise de variância molecular (AMOVA) indicou maior variação genética intra-populacional (57,44%) que inter-populacional (42,56%). Os resultados mostram que as populações estudadas estão geneticamente estruturadas, sugerindo que ações de conservação para essa espécie devam promover a preservação dos habitats ao longo de toda sua distribuição geográfica.

Palavras-chave RAPD, AMOVA, Mata Atlântica, Passifloraceae.

Abstract The sweet passion fruit (*Passiflora alata*) is an endemic plant from South America and is distributed along all Brazilian regions. Genetic improvement programs target the increase of agronomical important traits because its commercial value, but little is known about native populations. Our goal was to evaluate the genetic structure between and within *Passiflora alata* populations from different regions in the state of Espírito Santo using random amplified polymorphic DNA (RAPD). The genetic divergence varied from 0.09 to 0.15 and the analysis of molecular variance (AMOVA) indicated more intra- (57.44%) than inter-population (42.56%) variation. The results show that populations are genetically structured, suggesting that conservation programs for this species should preserve habitat along all its geographic distribution.

Keywords RAPD, AMOVA, Atlantic Forest, Passifloraceae.

Introdução

A família Passifloraceae compreende 20 gêneros e cerca de 600 espécies (Cervi, 1997) distribuídas predominantemente em áreas tropicais e subtropicais, principalmente nas Américas e África (Joly, 2002). Na América Latina o gênero mais representativo é *Passiflora*, conhecido como maracujás, com aproximadamente 400 espécies, sendo que 113 são encontradas no Brasil. Segundo Lacanallo et al. (2002), das espécies descritas para o gênero, cerca de 90% são originárias do continente americano e o Brasil apresenta a maior diversidade.

O maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) é nativo da América do Sul e tem ocorrência registrada no Brasil em todas as regiões sendo uma espécie invasora no estado do Rio Grande do Sul (Cervi, 1997; Brucker & Picanço, 2001; Koehler-Santos et al., 2006). É utilizado principalmente na alimentação humana e suas folhas possuem propriedades farmacológicas (Lima & Cunha, 2004). Além disso, também é usada como planta ornamental e em trabalhos de paisagismo devido à beleza de suas flores (Lorenzi & Souza, 2001). O

1 Laboratório de Mastozoologia e Biogeografia Depto. de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468, Maruípe, 29043-900 Vitória, ES, Brasil. carol.loss@gmail.com

2 Laboratório de Mastozoologia e Biogeografia, Depto. de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468, Maruípe, 29043-900 Vitória, ES, Brasil. yleite@gmail.com

3 Núcleo de Genética Humana e Molecular, Depto. de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468, Maruípe, 29043-900 Vitória, ES, Brasil. iurilouro@terra.com.br

4 Laboratório de Genética Vegetal e Produtos Naturais, Depto. de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468, Maruípe, 29043-900 Vitória, ES, Brasil. docarmo_batitucci@yahoo.com.br

5 Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo

Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, sendo *P. alata* a terceira espécie mais cultivada (Manica et al., 2005).

O número cromossômico estabelecido para a espécie é $2n = 18$ (Guerra, 1986), que é o mesmo para grande parte das espécies do gênero, como *P. edulis*, *P. quadrangularis* e *P. coccinea* (Hansen et al., 2006). O pólen do maracujazeiro é grande e pesado o suficiente para inviabilizar sua disseminação através da ação dos ventos, impedindo conseqüentemente a anemofilia (Manica, 1997), sendo a vespa mamangava (*Xylocopa* spp.) considerada o principal polinizador para várias espécies de *Passiflora* (Manica et al., 2005; Freitas & Oliveira-Filho, 2003). Assim como a maioria das espécies de maracujá, *P. alata* apresenta um sistema de reprodução auto-incompatível. Mesmo que uma flor apresente tanto estruturas masculinas quanto femininas, ela não é capaz de realizar autopolinização, sendo esse um mecanismo importante para manter altos níveis de heterozigose, uma vez que induz alogamia e, conseqüentemente contribui para o aumento da variabilidade genética.

Conhecer as características genéticas de uma população é bastante útil para programas de melhoramento genético em espécies de interesse comercial. No caso do maracujá-doce, esses programas visam aumento de produtividade, qualidade dos frutos e resistência à patógenos (Manica et al., 2005). Porém, o sistema de propagação vegetativa por estaquia juntamente com a homogeneidade resultante dos métodos tradicionais de melhoramento esbarram no problema da auto-incompatibilidade (Lima & Cunha, 2004), portanto vários genótipos ideais devem ser selecionados para introduzir ativamente variabilidade à lavoura. De acordo com a distribuição da diversidade genética, podem também ser estabelecidas populações ou regiões prioritárias para conservação de determinadas espécies, visando definir unidades de manejo para conservação, principalmente quando há destruição de seu habitat natural.

Considerando que *P. alata* ocorre principalmente em áreas de matas tropicais no Brasil, é necessário estar atento ao comportamento e distribuição dessas populações uma vez que esses ecossistemas apresentam precário estado de conservação (Heringer & Montenegro, 2000). Pouco se conhece sobre a variabilidade genética e estrutura de populações naturais de *P. alata*, pois a maior parte dos estudos é realizada em populações de lavoura para comercialização sendo o mapeamento genético voltado a características de interesse agrônomo. O único estudo de estrutura genética publicado para populações não cultivadas (Koehler-Santos et al., 2006) identificou através de marcadores moleculares a espécie como invasora no estado do Rio Grande do Sul.

Para se estabelecer programas de melhoramento ou de conservação é essencial o conhecimento da quantidade de variação presente na espécie de interesse. Uma das

formas de se ter acesso a essas informações é através do uso de marcadores moleculares. Caracteres morfológicos e agrônômicos podem ser usados como marcadores para medir diversidade genética em algumas populações, porém grande parte da morfologia vegetal é intensamente influenciada por condições ambientais, apresentando variação contínua e elevado grau de plasticidade fenotípica. A técnica molecular RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) apresenta como principal vantagem o fato de poder ser utilizada para qualquer organismo, sem necessidade do conhecimento prévio de suas características genéticas, nem da construção de uma biblioteca de sondas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Esta metodologia universalizou o acesso às informações genéticas, tendo diversas aplicabilidades como, por exemplo: construção de mapas genéticos e localização de genes de interesse agrônomo (Williams et al., 1993); estabelecimento de relações filogenéticas entre indivíduos de diferentes espécies (Farjado et al., 1998; Sheng et al., 2006; Kim & Kim, 2006), análise de diversidade intra-específica (Sreekumar & Renuka, 2006; Chen et al., 2005; Wiethölter, 2005), avaliação de fluxo gênico (Zucchi et al., 2005), estudos de biogeografia (Jorgensen et al., 2003; Barbosa et al., 2006) e, ainda, identificação de clones e indivíduos de uma mesma progênie (Calado & Navarro-Silva, 2005).

Koundal et al. (2006) compararam marcadores RAPD com RFLP e obtiveram a mesma eficiência na distinção de diferentes genótipos em berinjela (*Solanum melongena*), enquanto Benchacho et al. (2002) observaram maior polimorfismo em RAPD quando comparado com isoenzimas no estudo de diferentes espécies de aveia (*Avena* spp.). Marcadores RAPD foram utilizados em diferentes estudos para avaliar a variabilidade genética presente no gênero *Passiflora* (Farjado et al., 1998; Aukar et al., 2002; Crochemore et al., 2003; Viana et al., 2003). O método RAPD juntamente com as análises de distância genética são ferramentas importantes na determinação das relações entre espécies e populações. Estudos como os realizados por Crochemore et al. (2003) utilizando cinco primers RAPD foram eficientes em agrupar indivíduos de *Passiflora edulis* pertencentes à mesma população. Enquanto Farjado et al. (1998) avaliaram relações genéticas entre diferentes espécies de *Passiflora* com 50 primers RAPD, corroborando a classificação baseada em caracteres morfológicos.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a estrutura genética dentro e entre populações de *P. alata* de diferentes regiões do estado do Espírito Santo, com uso de marcadores moleculares RAPD.

Métodos

Coleta e identificação botânica

Foram coletadas amostras de 37 indivíduos em 4 localidades diferentes (Tabela 1) no estado do Espírito Santo, Brasil (Figura 1). Cada indivíduo amostrado recebeu uma sigla de identificação (Anexo I). *Passiflora mucronata* e *Passiflora misera* foram coletadas em Setiba e usadas como grupos externos nas análises filogenéticas.

Tabela 1 Número de indivíduos de *Passiflora alata* coletados por localidade e coordenadas geográficas de cada localidade.

Local	Nº de indivíduos	Coordenadas
Ponta da Fruta	5	20°29'S / 40°21'W
Santa Teresa	4	19°54'S / 40°31'W
Setiba	16	20°36'S / 40°25'W
Venda Nova	12	20°16'S / 41°15'W

Para a extração do DNA foram coletadas folhas de diferentes indivíduos em cada população analisada. Após coletadas, as folhas foram imediatamente colocadas em envelope de papel devidamente identificado, e armazenadas em bolsa térmica com gelo. No laboratório, o material foi congelado em freezer até o momento da extração. Cada ponto de coleta (Anexo I) foi registrado em aparelho GPS (Global Positioning System) marca Garmin, modelo eTrex. A identificação taxonômica do material botânico foi realizada por Maria do Carmo Pimentel Batitucci, sendo depositada uma exsicata no Herbário VIES da Universidade Federal do Espírito Santo, sob o número de registro 14535.

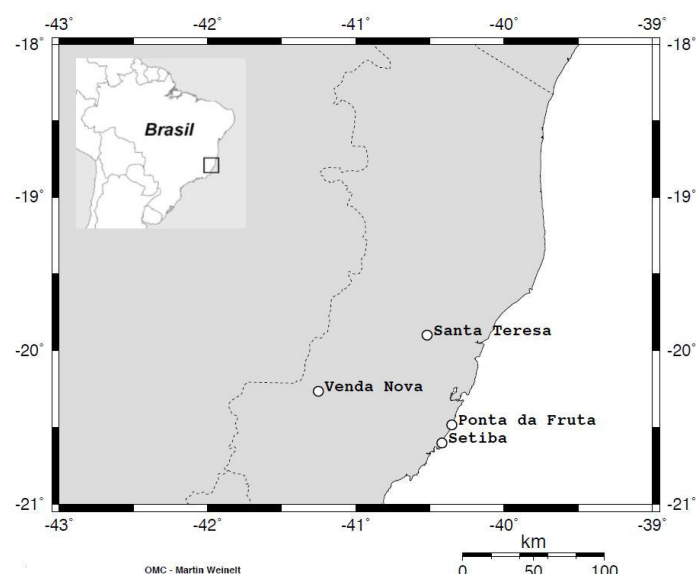


Figura 1 Mapa mostrando localidades de coleta da *Passiflora alata* no estado do Espírito Santo, Brasil.

Extração de DNA

Para o isolamento do DNA, folhas sem as nervuras foram maceradas em nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. A extração do DNA foi realizada seguindo protocolo de CTAB desenvolvido por Doyle & Doyle (1990), sugerido por Molinari e Crochemore (2001) como sendo eficiente na extração de folhas de maracujazeiro para análise RAPD.

Amplificação

As reações de PCR foram realizadas seguindo protocolo de Williams *et al.* (1990). Foram utilizados 4 primers (Tabela 2) diferentes, de acordo com aqueles que apresentaram maior número de bandas polimórficas em ensaios com maracujá, segundo Crochemore *et al.* (2003).

Tabela 2 Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para amplificação de fragmentos de DNA de *Passiflora alata*.

Primer	Sequência (5' - 3')
OPB08	GTCCACACGG
OPB18	CCACAGCAGT
OPB19	ACCCCCGAAG
OPB20	GGACCCTTAC

As reações foram conduzidas em termociclador (Eppendorf modelo Master Cycler Personal) com 45 ciclos de amplificação após desnaturação inicial a 94° C por 10 minutos. Cada ciclo constituiu de 30 segundos a 94° C, para desnaturação, 1 minuto e 20 segundos a 28° C, para o anelamento do primer à fita molde e 30 segundos a 72° C para extensão do fragmento. Ao final de 45 ciclos, foi realizada uma extensão final de 72° C por 7 minutos.

Eletroforese e visualização dos produtos amplificados

Primeiramente, foi realizada uma triagem para verificar qual seria a melhor técnica de visualização dos produtos amplificados com cada primer de acordo com o tamanho dos fragmentos resultantes. Fragmentos de até 500 pb são mais bem visualizados em gel de poliacrilamida, sequências maiores devem ser observadas em agarose (Sambrook *et al.*, 1989). Em gel de agarose 1,5%, os produtos foram submetidos à eletroforese por 40 minutos a 80 volts e, posteriormente, corados com brometo de etídeo, visualizados em transiluminador de luz ultra-violeta, e fotografados com máquina digital através de um filtro de luz cor laranja. Em gel de poliacrilamida 7%, os produtos foram submetidos à eletroforese por 2 horas a 220 volts, e para visualização, corados em nitrato de prata. As análises finais dos fragmentos de até 500pb foram realizadas em gel de poliacrilamida 14%,

submetido à eletroforese por 20 horas a 160 volts. A fim de verificar a presença de polimorfismo na seqüência interna, estes mesmos produtos foram analisados pelo método SSCP (Orita et al., 1989), em gel de poliacrilamida 5%, em cuba vertical modelo S2, por 8 horas a 600 volts, e corados em nitrato de prata. Antes da aplicação no gel SSCP, as amostras foram incubadas a 94° C por 10 minutos, a fim de separar a dupla fita do DNA, e resfriadas em seguida a 4° C para que cada fita simples atingisse sua conformação molecular específica.

Análise de dados

Os resultados obtidos nos géis de eletroforese foram transformados em dados binários, atribuindo-se 1 para presença e 0 para ausência de bandas. Com esses resultados, utilizando o programa PopGene versão 1.32 (Yeh & Boyle, 1997), foram obtidos dados sobre a diversidade genética das populações, construiu-se uma matriz de distância genética entre elas (Nei, 1978) e a partir daí, um dendrograma foi obtido relacionando todas as populações através do método UPGMA (método de agrupamento usando média aritmética não ponderada). Com os dados de presença e ausência de banda calculou-se o coeficiente de similaridade de Jaccard (1901) (S_{ij}) entre todos os indivíduos conforme a expressão:

$$(S_{ij}) = \frac{a}{a+b+c} \quad \text{em que:}$$

a: número de fragmentos compartilhados pelos indivíduos i e j ;

b: número de fragmentos presentes em i e ausentes em j ;

c: número de fragmentos presentes em j e ausentes em i ;

A partir da matriz de similaridade foi construído um dendrograma relacionando todos os indivíduos pelo método UPGMA, com auxílio do programa NTSYS versão 2.01 (Rohlf, 2000).

Para a verificação da estruturação das populações estudadas, foi realizada a análise da variância molecular (AMOVA), conforme descrito por Excoffier et al. (1992) usando o programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier et al., 2005). No Arlequin também foi feito o teste de Mantel com 1000 permutações para avaliar a correlação das distâncias genética e geográfica entre as diferentes populações analisadas. A matriz de distância genética utilizada no teste de Mantel foi gerada no programa PopGene. Para essas análises foram consideradas quatro populações: Ponta da Fruta, Santa Teresa, Setiba e Venda Nova.

Resultados

Visualização dos produtos amplificados

Apenas os fragmentos de OPB18 foram analisados em poliacrilamida 14%, os demais (OPB08, OPB19 e OPB20) foram analisados em gel de agarose 1,5%. OPB18 forneceu baixo número de fragmentos, sendo que uma banda de aproximadamente 180 pb foi observada em todos os indivíduos analisados da espécie *P. alata*. A fim de verificar ocorrência de polimorfismo na seqüência interna do fragmento comum a todos os indivíduos, esses produtos foram submetidos à análise por SSCP. A análise SSCP não indicou presença de polimorfismo dentro dessa seqüência específica, uma vez que em todos os indivíduos observou-se o mesmo padrão de migração no gel. A banda de 180 pb observada em acrilamida 14%, por estar bastante definida, é a única visualizada em SSCP.

Estrutura genética das populações

A porcentagem de loci polimórficos, apresentada na Tabela 3, variou de 57,1% (Setiba) a 22,9% (Santa Teresa). A maior diversidade gênica foi também observada para Setiba ($h=0,1539$), enquanto Santa Teresa apresentou o menor índice ($h=0,0929$).

Tabela 3 Comparação das populações de *Passiflora alata* para medidas de diversidade genética (h) e porcentagem de loci polimórficos (plp).

População	h	plp
Ponta da Fruta	0,1234	31,4%
Santa Teresa	0,0929	22,9%
Setiba	0,1539	57,1%
Venda Nova	0,1512	42,9%

A AMOVA (Tabela 4) indicou que a maior parte do total de variação genética foi expressa entre os indivíduos dentro das populações (57,44%), enquanto que o restante (42,56%) foi entre as populações.

Tabela 4 Análise da variância molecular (AMOVA) para 4 populações de *Passiflora alata* no estado do Espírito Santo, Brasil.

Fonte de variação	gl	variação (%)	Estatística Φ	p
Entre populações	3	42,56	0,4256	<0,0001
Dentro de populações	33	57,44	0,5744	<0,0001

gl – graus de liberdade

O coeficiente de correlação entre as matrizes de distância genética e geográfica foi de -0,1376, porém o re-

sultado não foi significativo ($p < 0,568$). Esse resultado indica que as populações não estão isoladas por distância, logo a divergência genética entre elas não pode ser explicada pela distância geográfica.

A estimativa da distância genética média entre populações indica valores desde 11,6% entre Venda Nova e Setiba até 27% entre as populações de Santa Teresa e Ponta da Fruta. O dendrograma construído a partir das distâncias genéticas de Nei (1978) (Figura 2) mostra o agrupamento das populações de Setiba e Venda Nova, e este grupo com Santa Teresa e Ponta da Fruta externo em relação aos demais.

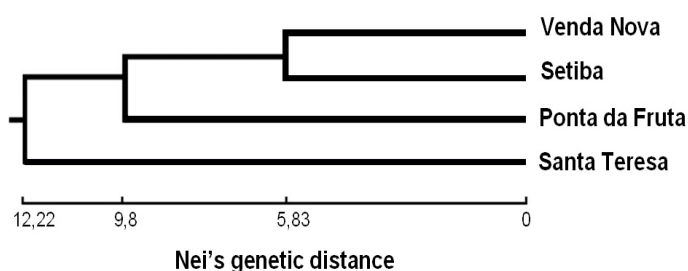


Figura 2 Dendrograma construído pelo método UPGMA utilizando distâncias genéticas de Nei (1978) entre populações de *Passiflora alata* do estado do Espírito Santo,

A Figura 3 apresenta o dendrograma construído a partir das similaridades genéticas de Jaccard (1901) que mostra o agrupamento dos haplótipos por localidade geográfica.

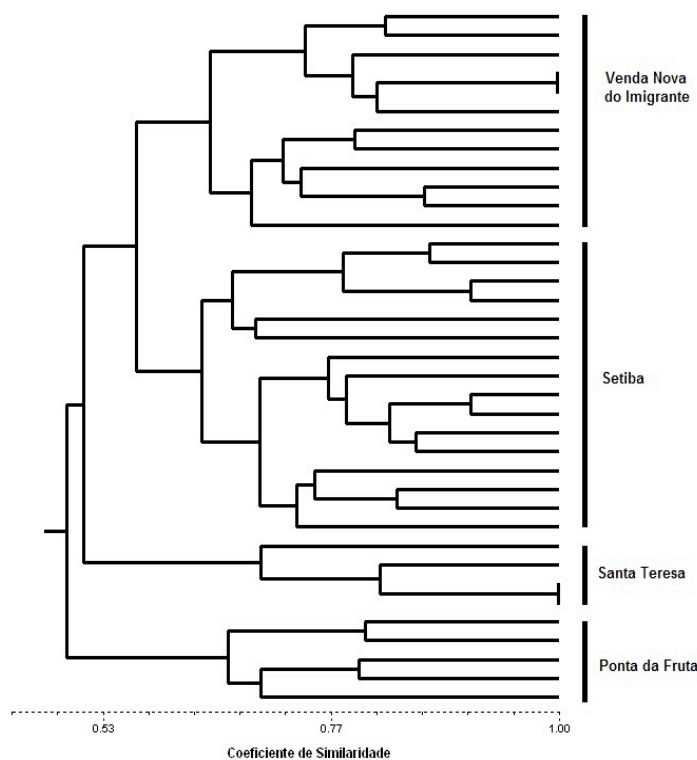


Figura 3 Dendrograma construído a partir das similaridades genéticas de Jaccard entre populações de *Passiflora alata* no estado do Espírito Santo, Brasil.

Discussão

Os valores de diversidade gênica encontrados nas populações de *P. alata* analisadas (0,09 a 0,15) são considerados pequenos quando comparados com estudos realizados em plantas polinizadas pelo vento, como os de Yeth *et al.* (1995), que indicaram um valor de 0,30 para diversidade gênica em *Populus tremuloides*. Porém, quando o índice encontrado em *P. alata* é comparado ao de espécies polinizadas por insetos (Persson *et al.*, 1998), os valores são equivalentes (entre 0,15 e 0,26), devido a menor capacidade de dispersão desses polinizadores.

Maior diversidade genética encontrada dentro das populações e não entre as populações, como indicou a AMOVA (Tabela 4), também foi encontrada em outras espécies de plantas (Sreekumar & Renuka, 2006; Cavallari, 2004; Kundu, 1999; Maguire & Sedgley, 1997). Esses resultados podem estar relacionados ao sistema de auto-incompatibilidade de pólen observado em *Passiflora alata* (Do Rêgo *et al.*, 1999), que induz a polinização cruzada e, conseqüentemente, o aumento do índice de polimorfismos de espécies de uma mesma população, aumentando assim a variabilidade genética.

O agrupamento a partir das distâncias genéticas de Nei (1978) (Figura 2) se baseia em populações pré-estabelecidas, sendo que aquelas presentes em um mesmo grupo são consideradas geneticamente mais próximas. Levando em conta que na AMOVA, estimativas acima de 0,05 são consideradas indicadores de alta estruturação populacional (Matioli, 2001), pode-se concluir que as populações analisadas encontram-se geneticamente estruturadas, de acordo com os valores de Φ apresentados na Tabela 4. O dendrograma construído com base no índice de similaridade de Jaccard (Figura 3), por sua vez, utiliza os haplótipos individualmente para a construção dos grupamentos. A comparação dos dendrogramas mostrou que as relações e os grupos estabelecidos não foram equivalentes, pois houve alternância das populações de Santa Teresa e Ponta da Fruta como grupo basal. Porém a análise dos haplótipos individuais agrupou as amostras de cada região geográfica. O agrupamento de regiões geograficamente distintas pode ser explicado pela falta de isolamento por distância, indicado no teste de Mantel.

Os dados revelam que as populações analisadas estão geneticamente estruturadas, isso implica em estratégias de conservação para *P. alata* dessas regiões que devam buscar a preservação das diversidades tanto inter quanto intra-populacional. Assim, sugerimos que ações de conservação para essa espécie devam promover a preservação dos habitats ao longo de toda sua distribuição e, no caso de reintroduções, essas sejam feitas a partir de estoques reprodutores específicos para cada uma das regiões (autóctones).

Agradecimentos

Ao Marcelo Tavares pelo empréstimo do aparelho de GPS. À Flávia de Paula por disponibilizar a utilização da técnica de SSCP. A Ernani Rodrigues, Jehová Lourenço Junior, Josivaldo Silva Santos, Maria Domingas Loss e Tiago Altoé por auxiliarem nos trabalhos de campo. A Guilherme Batitucci e João Loss por cuidarem das plantas trazidas do campo. À Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (FAPES) e ao Critical Ecosystem Partnership Fund (CEPF) pela concessão de bolsa.

Referências

- Aukar APA, Lemos EGM, Oliveira JC (2002) Genetic variation among passion fruit species using RAPD markers. **Revista Brasileira de Fruticultura** 24: 738-740.
- Barbosa SE, Belisario CJ, Souza RCM, Paula AS, Linardi PM, Romanha AJ, Diotaiuti, L (2006) Biogeography of Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) based on molecular marker and paleo-vegetational data. **Acta Tropica** 99: 144-154.
- Benchacho M, Guma R, Vega MP, García P (2002) The genetic structure of tetraploid avena: a comparison of isozyme and RAPD markers. **Cellular and Molecular Biology Letters** 7: 465-469.
- Bruckner CH, Picanço MC (Org) (2001) **Maracujá: Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes.
- Calado DC, Navarro-Silva MA (2005) Polimorfismo em *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab (Diptera, Culicidae) detectados através de PCR-RAPD. Variabilidade genética entre indivíduos de mesma progênie. **Revista Brasileira de Zoologia** 22: 1121-1126.
- Cavallari MM (2004) **Estrutura genética de populações de *Encholirium (Bromeliaceae)* e implicações para sua conservação**. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba, SP.
- Cervi AC (1997) Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria** 45: 1-92.
- Chen L, Gao Q, Chen D, Xu C (2005) The use of RAPD markers for detecting genetic diversity, relationship and molecular identification of Chinese elite tea genetic resources [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] preserved in a tea germplasm repository. **Biodiversity and Conservation** 14: 1433-1444.
- Crochemore ML, Molinari HBC, Vieira LGE (2003) Genetic diversity in Passion Fruit (*Passiflora* spp.) evaluated by RAPD markers. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 46: 521-527.
- Do Rêgo MMR, Bruckner CH, Da Silva EAM, Finger FL, De Siqueira DL, Fernandes AA (1999) Self-incompatibility in passion fruit: evidence of two locus genetic control. **Theoretical and Applied Genetics** 98: 564-568.
- Doyle JJ, Doyle JL (1991) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12: 13-15.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online** 1: 47-50.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** 131: 479-491.
- Farjado D, Angel F, Grum M, Tohme J, Lobo M, Roca WM, Sanchez I (1998) Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. **Euphytica** 101: 341-347.
- Ferreira ME & Grattapaglia D (1998) **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMPRABA-CENARGEN.
- Freitas BM, Oliveira-Filho JH (2003) Ninhos racionais para mamangava (*Xylocopa frontalis*) na polinização do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*). **Ciência Rural** 33: 1135-1139.
- Guerra M (1986) Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco, I. **Genetics and Molecular Biology** 9: 21-40.
- Hansen AK, Gilbert LE, Simpson BB, Downie SR, Cervi AC, Jansen RK (2006) Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany** 31: 138-150.
- Heringer H, Montenegro MM (Org) (2000) **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos**. Brasília: MMA/ SBF.
- Jaccard P (1901) Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et du Jura. **Bulletin Société Vaudoise des Sciences Naturelles** 37: 547-579.
- Joly AB (2002) **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. São Paulo: Nacional.
- Jorgensen JL, Stehlik I, Brochmann C, Conti E (2003) Implications of ITS sequences and RAPD markers for the taxonomy and biogeography of the *Oxytropis campestris* and *O. arctica* (Fabaceae) complexes in Alaska. **American Journal of Botany** 90: 1470-1480.
- Kim KG, Kim BJ (2006) Molecular phylogeny of *Camponotus* ants in Korea. **Entomological Research** 36: 48-55.
- Koehler-Santos P, Lorenz-Lemke AP, Muschner VC, Bonatto SL, Salzano FM, Freitas LB (2006) Molecular genetic variation in *Passiflora alata* (Passifloraceae), an invasive species in southern Brazil. **Biological Journal of the Linnean Society** 88: 611-630.
- Kundu SK (1999) Comparative analysis of seed morphometric and allozyme data among four populations of neem (*Azadirachta indica*). **Genetic Resources and Crop Evolution** 46: 569-577.
- Lacanalho GF, Corazza-Nunes MJ, Caetano CM, Nunes WMC, Zanutto CA, Milaneze-Gutierrez MA, Itako AT (2002) Estudos da Variabilidade Genética de Passifloráceas Paranaenses Através de Marcadores RAPD. In: **48º Congresso Brasileiro de Genética**, Águas de Lindóia.
- Lima AA, Cunha MAP (Org) (2004) **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Empraba Mandioca e Fruticultura.
- Lorenzi H, Souza HM (2001) **Plantas ornamentais no Brasil: Arbustivas, Herbáceas e Trepadeiras**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum.

- Maguire TL, Sedgley M (1997) Genetic diversity in *Banksia* and *Dryandra* (Proteaceae) with emphasis on *Banksia cuneata*, a rare and endangered species. **Heredity** 79: 394-401.
- Manica I, Brancher A, Icuma I, Aguiar JLP, Azevedo JA, Vasconcellos MAS, Junqueira NTV (Org) (2005) **Maracujá-doce**: Tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes.
- Matioli SR (Org) (2001) **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos.
- Molinari HB, Crochemore ML (2001) Extração de DNA genômico de *Passiflora* spp. para análise PCR-RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura** 23: 447-450.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics** 89: 583-590.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Genetics** 86: 2766-2770.
- Persson HA, Lundquist K, Nybom H (1998) RAPD analysis of genetic variation within and among populations of Turk's cap lily (*Lilium martagon* L.). **Hereditas** 128: 213-220.
- Rohlf FJ (2000) NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1 manual. **Applied Biostatistics** não paginado.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) **Molecular cloning**. A laboratory manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sheng HM, An LZ, Chen T, Xu SJ, Liu GX, Zheng XL, Pu LL, Liu YJ (2006) Analysis of the genetic diversity and relationships among and within species of *Hippophae* (Elaeagnaceae) based on RAPD markers. **Plant Systematics and Evolution** 260: 25-37.
- Sreekumar VB, Renuka C (2006) Assessment of genetic diversity in *Calamus thwaitesii* BEEC. (Arecaceae) using RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology** 34: 397-405.
- Viana AP, Pereira TNS, Pereira MG, Douza MM, Maldonado JFMM, Júnior ATA (2003) Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas determinada por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura** 25: 489-493.
- Wiethöler P (2005) **Análise da variabilidade genética em genótipos de milho crioulo (*Zea mays* ssp. *mays*)**. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** 18: 6531-6535.
- Williams JGK, Rafalski JA, Tingey SV (1993) Genetic analysis using RAPD markers. **Methods in Enzymology** 218: 704-740.
- Yeh FC & Boyle TJB (1997) Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Belgian Journal of Botany** 129: 157.
- Yeh FC, Chong DKX, Yang RC (1995) RAPD variation within and among natural populations of trembling aspens (*Populus tremuloides* Michx.). **Journal of Heredity** 86: 454-460.
- Zucchi MM, Pinheiro JB, Chaves LJ, Coelho ASG, Couto MA, Moraes LK, Vencovsky R (2005) Genetic structure and gene flow of *Eugenia dysenterica* natural populations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 40: 975-980.