

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



AVALIAÇÕES BIOMÉTRICAS, GENÉTICAS E
MOLECULARES VISANDO CONSERVAÇÃO E
MELHORAMENTO DE *PASSIFLORA* SPP.

CARLOS BERNARD MORENO CERQUEIRA-SILVA

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL

Fevereiro de 2009

CARLOS BERNARD MORENO CERQUEIRA-SILVA

**AVALIAÇÕES BIOMÉTRICAS, GENÉTICAS E MOLECULARES VISANDO
CONSERVAÇÃO E MELHORAMENTO DE *PASSIFLORA* SPP.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e Biologia Molecular.

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL

Fevereiro de 2009

CARLOS BERNARD MORENO CERQUEIRA-SILVA

**AVALIAÇÕES BIOMÉTRICAS, GENÉTICAS E MOLECULARES VISANDO
CONSERVAÇÃO E MELHORAMENTO DE *PASSIFLORA* SPP.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 18 de fevereiro de 2009

Dr. Fábio Gelape Faleiro
(CPAC/EMBRAPA)

Prof. Dr. Derval Gomes Pereira
(UESB)

Dr. Abelmon da Silva Gesteira
(CNPMPF/EMBRAPA)

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa
(UESC – Orientador)

Aos meus Pais Antonio Cerqueira Silva & Marly Moreno Silva pela
minha criação, pelo exemplo de vida e principalmente por saberem
superar a saudade e as dificuldades em benefício da minha formação e
realização pessoais

DEDICO

AGRADECIMENTO

Inialmente Ao Grande Arquiteto do Universo, DEUS, por mais esse importante passo galgado na minha trajetória pessoal e profissional;

Aos meus país e irmãos, onde destaco o meu irmão Alexandre Anselmo, pelo apoio incondicional e constante incentivo;

A minha namorada Elisa, pela companhia, cuidado, apoio e, pincipalmente, por acreditar nos meus projetos, onde incluo nosso relacionamento;

Aos Prof. Doutores Ronan Xavier Corrêa, Antonio Carlos de Oliveira e Margarete Magalhães de Souza pela orientação e, principalmente, por acreditarem nas minhas propostas, ponderando na medida exata as críticas e elogios referentes ao meu trabalho;

Ao Doutor, mas principalmente amigo, Leo Duc Haa Carson S. Conceição, pela orientação, auxílio e companheirismo durante as diversas atividades científicas que realizamos em conjunto;

Aos Professores, pela contribuição acadêmica prestada durante as disciplinas ofertadas e pelas discussões realizadas nos ‘bastidores’ das atividades acadêmicas;

Aos membros do grupo de pesquisa GenPlant, onde destaco o colega Cláudio Benício Cardoso-Silva, exemplo de dedicação e empenho nas atividades em que participa;

Aos amigos ‘de longa data’, onde destaco os Membros do Ze di Goby, DeMolays, Filhas de Jó e irmãos Maçons, que mesmo a distância continuam a torcer pela conquista dos meus objetivos;

Aos ‘novos amigos’, onde destaco Juliane, Américo, Gabriele, Adriane e Karen, pela colaboração durante o mestrado e, principalmente, por saberem conquistar e cultivar novos amigos;

Aos colegas da ‘Pós’, onde é necessário destacar pessoas como Fabrício, Cristiano e Claudine, por estarem sempre a disposição para ajudar;

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, onde destaco a secretária Luciana, que sempre nos contagia com seu bom humor;

Ao Programa de pós-graduação e a Universidade Estadual de Santa Cruz pela oportunidade de realização do Mestrado;

As agências de fomento a pesquisa pelos recursos financeiros que direta e indiretamente permitiram a realização deste trabalho, destacando o apoio oriundo do CNPq/PADCT/62.0147/2004-0 e da Bolsa de estudos (CNPq – Proc.132590/2007-7).

“...Ao alcançarmos o meio dia da vida, assim como o Sol em seu meridiano, nos deparamos com metade dos anos já vividos e com a outra metade por viver, onde teremos ocasião de fazer o bem e sermos melhores...”

(autor desconhecido)

ÍNDICE

EXTRATO	X
ABSTRACT	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE TABELAS.....	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XX
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO GERAL DE LITERATURA	5
Aspectos botânicos e econômicos do gênero <i>Passiflora</i>	5
Conservação de germoplasma de <i>Passiflora</i> spp.	6
Uniformidade e qualidade de frutos: fatores importantes para o crescimento da passicultura	8
Fitossanidade como fator limitante para manutenção e expansão da passicultura	9
Estratégias e ações de melhoramento visando manutenção e expansão da passicultura	10
Ações de melhoramento visando incremento de atributos físico-químicos de frutos em maracujazeiros	12
O uso de marcadores moleculares em ações de melhoramento visando caracterização genética em maracujazeiros.....	13
Ações de melhoramento visando resistência de maracujazeiros ao CABMV, agente causal do endurecimento dos frutos	15

CAPÍTULO 1 COMPARAÇÃO DE COEFICIENTES E MEDIDAS DE DISTÂNCIA EM MARACUJAZEIRO MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES E DESCRITORES FÍSICO-QUÍMICOS	17
Resumo	17
Introduction	19
Material and Methods	20
Results and Discussion	22
Acknowledgments	25
References	26
CAPÍTULO 2 DISSIMILARIDADE GENÉTICA INTRA- E INTERESPECÍFICA EM MARACUJAZEIROS ‘AMARELO’ E ‘DO-SONO’ MEDIANTE DESCRITORES FÍSICO-QUÍMICOS DE FRUTOS	32
Resumo	32
Introduction	34
Material and Methods	35
Results and Discussion	37
Acknowledgements	42
References	42
CAPÍTULO 3 DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES SILVESTRES E CULTIVADA DE <i>PASSIFLORA</i> COM BASE EM MARCADORES RAPD.....	51
Resumo	51
Introduction	53
Material and methods	55
Results	56
Discussion.....	57
Acknowledgements	60
References	60
CAPÍTULO 4 SELEÇÃO DE VARIÁVEIS PATOMETRICAS PARA AVALIAR RESISTÊNCIA E INFECTIVIDADE NO PATOSSISTEMA DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS DE MARACUJÁ	72

Resumo	72
Introduction	75
Materials and Methods	77
Results and Discussion	79
Conclusions	83
References	83
CAPÍTULO 5 DETECÇÃO DO GRADIENTE DE RESISTÊNCIA PARA O VÍRUS DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS E SELEÇÃO DE PLANTAS DE MARACUJAZEIRO ‘AMARELO’ EM CONDIÇÕES DE CAMPO	93
Resumo	93
Introduction	95
Material and Methods	96
Results	97
Discussion	100
Acknowledgments	101
References	101
CAPITULO 6 AMPLIFICAÇÃO CRUZADA DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM <i>PASSIFLORA</i> SPP.	105
Resumo	105
Agradecimentos	109
Referências	110
CONCLUSÕES GERAIS	116
REFERÊNCIAS GERAIS	118

EXTRATO

CERQUEIRA-SILVA, Carlos Bernard Moreno, Ms., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Fevereiro de 2009. **Avaliações biométricas, genéticas e moleculares visando conservação e melhoramento de *Passiflora* spp.** Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-Orientador: Antonio Carlos de Oliveira. Co-orientadora: Margarete Magalhães de Souza.

O Brasil constitui o maior centro de diversidade de espécies de *Passiflora* e é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá ‘amarelo’ (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg). Interferências antrópicas em áreas nativas de ocorrência de espécimes silvestres e o rendimento médio da cultura, bem abaixo do potencial produtivo da passicultura, requerem ações de pesquisa na área de genética voltadas à conservação e ao melhoramento destas espécies de *Passiflora*. A baixa produção da passicultura brasileira é justificada, em parte, pela desuniformidade dos pomares e ocorrência de fitopatógenos, destacando-se o vírus do endurecimento de frutos, causado pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). O presente estudo é constituído de seis capítulos. O Capítulo 1 relata a investigação sobre a influência da escolha de sete medidas de distância e de 14 coeficientes de similaridade sobre resultados obtidos de análises multivariadas da fenotipagem de nove descritores físico-químicos de frutos em 14 genótipos de maracujazeiro ‘amarelo’ e da genotipagem de 16 *primers* RAPD em 20 genótipos de maracujazeiro ‘amarelo’. Foi confirmada a influência das medidas de distância, dos coeficientes de similaridade e dos métodos aglomerativos nos estudos de variabilidade genética de *Passiflora*. No Capítulo 2,

fazendo uso do método da média aritmética não ponderada (UPGMA) e da distância generalizada de Mahalanobis, previamente avaliados no primeiro capítulo, foram descritas estimativas da dissimilaridade genética intra- e interespecífica quanto à fenotipagem de nove descritores físico-químicos de frutos entre 14 e oito genótipos de maracujazeiro ‘amarelo’ e ‘do-sono’, respectivamente. Foram identificados os descritores que mais contribuem para a divergência genética e os cruzamentos preferenciais para o incremento de atributos físico-químicos de frutos. No Capítulo 3, fazendo uso da identificação do método UPGMA e do coeficiente de Sorensen-Dice abordados no primeiro capítulo, foram estimadas, mediante o uso de *primers* RAPD, as distâncias genéticas intra-específicas em quatro espécies de *Passiflora*. Foram estimados os valores de distância e discutido o estreitamento da base genética de espécie em melhoramento e silvestres. O Capítulo 4 relata a comparação da eficiência de variáveis fitopatométricas em avaliações do patossistema maracujazeiro vs. CABMV. Foi identificado que as variáveis fitopatométricas ‘índice de intensidade de infecção’ (III) e ‘índice de doença foliar global’ (IDFG) apresentam vantagens em relação à escala de notas, e são igualmente eficientes para identificar, precocemente, genótipos de maracujazeiro mais resistentes ao CABMV, assim como para identificar isolados virais mais severos, úteis em programas de melhoramento. No capítulo 5, fazendo uso da variável IDFG, avaliada no quarto capítulo, e mediante quantificação de variáveis atreladas a produtividade dos genótipos, foi discriminado o gradiente de resistência de 87 genótipos de maracujazeiro ‘amarelo’ ao isolado CABMV UESB-01. Foram detectadas associações entre a quantificação dos sintomas foliares e as variáveis morfo-agronômicas de produtividade ($5,17\% \leq R^2 \leq 11\%$; $0,002 \leq p \leq 0,028$), assim como foi possível selecionar genótipos contrastantes quanto a resistência ao CABMV. O capítulo 6, fazendo uso de 32 *primers* microssatélites (SSR) disponíveis na literatura, avaliou a amplificação cruzada com esses *primers* em 18 *Passiflora* spp. Foram encontrados percentuais de amplificação cruzada para todas as espécies, atestando a possibilidade de uso desta estratégia de amplificação.

Palavras chave: CABMV, Caracterização de germoplasma, Diversidade Genética, Melhoramento genético, Maracujazeiro, Resistência.

ABSTRACT

CERQUEIRA-SILVA, Carlos Bernard Moreno, Ms., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Fevereiro de 2009. **Biometric, genetic and molecular evaluations targeting conservation and improvement of *Passiflora* spp.** Advisor: Ronan Xavier Corrêa. Co-Advisor: Antonio Carlos de Oliveira. Co-Advisor: Margarete Magalhães de Souza.

Brazil is considered the main center of genetic diversity of species of *Passiflora* and is the largest producer and consumer in the world of 'yellow' passion fruits (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg). Anthropoc action in native areas of occurrence of wild specimens and the average yield of the passion fruit culture, well below the productive potential this culture, require actions of research in the area of genetic aimed at the conservation and improvement these species of *Passiflora*. The low production Brazilian passion fruit is justified in part by the imbalance of the orchards and by the occurrence of pathogens, especially the passion fruit woodiness, caused by Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). This study consists of six chapters. The Chapter 1 describes the research about the influence of the choice of seven measures of distance and 14 similarity coefficients in results obtained from multivariate analysis of nine fruit physical-chemical descriptors from 14 passion fruit 'yellow' plants and of 16 primers RAPD in 20 'yellow' passion fruit plants. Were confirmed the influence of the distance measures, of the similarity coefficients and of the grouping analysis methods in studies of genetic variability of *Passiflora*. In Chapter 2, using the unweighted pair-group mean arithmetic method (UPGMA) and the Mahalanobis'

generalized distance, previously evaluated in the first chapter, were described estimates of the intra and inter specific genetic dissimilarity regarding in nine fruit physical-chemical descriptors among 14 e eight genotypes of ‘yellow’ passion fruit and ‘sleep’ passion fruit, respectively. Descriptors contribute most to the genetic divergence and the crosses preferred for the development of physico-chemical attributes of fruit have been identified. In chapter 3, using the identification UPGMA e o Sorensen-Dice coefficient evaluated in the first chapter, were estimated by the use of RAPD primers, the intra specific genetic distances in four species of *Passiflora*. Values of distance have been estimated and the narrowing of genetic base of breeding and wild species has been discussed. The chapter 4 register the comparison of the efficiency of four phytopathometric variables in evaluations of the passion fruit plants vs. CABMV pathosystem. Was identified that phytopathometric variables ‘index of infection intensity’ (III) and ‘global leaf disease index ’ (GLDI) have advantages in relation to grading scale, and are equally effective for identifying, early, passion fruit genotypes more resistant to CABMV, and to identify viral isolates harsher, useful in breeding programs. In chapter 5, using the variable GLDI, evaluated in the fourth chapter, and quantification of variables linked with the productivity of the genotypes, was the gradient identified for resistance of 87 genotypes of ‘yellow’ passion fruit to isolate CABMV UESB-01. Significant associations between the quantification of the leaf symptoms and the morpho-agronomic characteristics related to productivity were detected ($5.17\% \leq R^2 \leq 11\%$; $0.002 \leq p \leq 0.028$), as it the select genotypes contrasting for resistance CABMV was possible. The chapter 6, using 32 primers microsatellite (SSR) available in the literature, evaluated the cross-amplification these primers in 18 *Passiflora* spp. Percentage of cross-amplification have been observed for all species, confirming the possibility of using this strategy of amplification.

Key words: CABMV, Germplasm characterization, Genetic diversity, Genetic breeding, Passion fruit, Resistance.

LISTA DE FIGURAS

- 1 Clustering analysis of ‘yellow’ passion fruit (UESB-*Pe*-G1 a -G14) and ‘sleep’ passion fruit (UESB-*Ps*-G1 a -G8) genotypes. pertaining to the CAGT-*Passiflora*/UESB (*Coleção Ativa de Germoplasma de Trabalho de Passiflora da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia*. in *Vitória da Conquista*. Bahia. Brazil) carried out by UPGMA method. based on Mahalanobis generalized distance and using nine physical-chemical descriptors of fruits. 48
- 2 Clustering of 20 ‘yellow’ passion fruit genotypes (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg) obtained through the clustering method based on the unweighted arithmetic average method (UPGMA) of distances estimated for the Dice-Sorenso coefficient from RAPD bands. *Pe*-G1 to -G20 corresponds to the evaluated genotypes..... 68
- 3 Clustering of 32 *Passiflora cincinnata* obtained through the clustering method based on the unweighted arithmetic average method (UPGMA) of distances estimated for the Dice-Sorenso coefficient from RAPD bands. *Pc*-G1 to -G32 corresponds to the evaluated genotypes..... 69
- 4 Clustering of 24 *Passiflora setacea* obtained through the clustering method based on the unweighted arithmetic average method (UPGMA) of distances estimated for the Dice-Sorenso coefficient from RAPD bands. *Ps*-G1 to -G24 corresponds to the evaluated genotypes..... 70

5 Clustering of 18 *Passiflora trintae* obtained through the clustering method based on the unweighted arithmetic average method (UPGMA) of distances estimated for the Dice-Sorenso coefficient from RAPD bands. *Pc*-G1 to -G18 corresponds to the evaluated genotypes..... 71

6 Dispersion graphics of 87 ‘yellow’ passion fruit plants, mechanically inoculated with UESB-01 CABMV isolate and maintained under field conditions, concerning total weight of the fruits (TWF) and severity of the fruit woodiness disease, evaluated through: ‘GS’ varying from 0 to 3 (1A); ‘III’ varying from 0 to 100 (1B); ‘GLDI’ varying from 0 to 1 (1C); and ‘GISI’ varying from 0 to 3 (1D)..... 89

LISTA DE TABELAS

1	Spearman correlation coefficient ⁽¹⁾ between seven distance measurements related to nine fruit physical-chemical description variables measured in 14 ‘yellow’ passion fruit genotypes.....	28
2	Spearman correlation coefficient ⁽¹⁾ between 14 similarity coefficients related to DNA polymorphism identified based on DNA amplifications with 16 RAPD primers, detected in 20 ‘yellow’ passion fruit plants.....	29
3	Efficacy of the projection of similarity (and dissimilarity) measurements and coefficients in two-dimensional space, in ‘yellow’ passion fruit plants, based on the distortion percentage, the correlation between the original and the projected (r) distance and stress values.	30
4	Efficacy of five grouping methods (closest neighbor – VP; farthest neighbor – VD; Ward – W; Gower – WPGMC: and unweighted pair group method with arithmetic mean - UPGMA) from different similarity (and dissimilarity) measures and coefficients, based on criteria of distortion percentage (D), cophenetic correlation (r_c) and stress percentage values (S).	31

5	Averages, variation coefficients (VC) and results of Tukey test ($\alpha = 0.05$) regarding nine physical-chemical descriptors [fruit weight (FW), equatorial diameter (ED), longitudinal diameter (LD), pulp weight with seeds (PWS), peel weight (PW), peel thickness (PT), pH, total soluble solids (TSS) in °Brix and total titratable acidity (TTA)], evaluated in fruits of 14 ‘yellow’ passion fruit (UESB- <i>Pef</i> -G1 a -G14), superior part of the Table and eight ‘sleep’ passion fruit (UESB- <i>Ps</i> -G1 a -G8), inferior part of the Table.....	46
6	Measurements of intra- and interspecific dissimilarity of Mahalanobis generalized distance (D^2) between pairs of genotypes of <i>Passiflora</i> [‘yellow’ passion fruit (UESB- <i>Pef</i> -G1 a -G14) and ‘sleep’ passion fruit (UESB- <i>Ps</i> -G1 a -G8)] through physical-chemical characterization of fruits.....	47
7	Estimates of the relative contribution (S.j) of each physical-chemical descriptor of fruits for the genetic divergence between ‘yellow’ passion fruit and ‘sleep’ passion fruit plants. based on Mahalanobis generalized distance (D^2).	49
8	Correlation coefficients between the descriptors of higher importance (in the horizontal) and those of less importance (in the vertical). for the nine physical-chemical descriptors of the analyzed fruits.	50
9	Description of the germplasm and the molecular (primers) markers used in the characterization of the <i>Passiflora</i> spp diversity.	64
10	Descriptive analysis of the molecular evaluations in four passion fruit plant species (<i>Passiflora</i> spp.) through RAPD markers.....	65
11	Genetic distance obtained through the complement of Dice-Sorenso similarity index among pairs of genotypes of four species of <i>Passiflora</i> spp., genotyped through RAPD markers.....	66

12	Efficiency of the clustering matrix and of the projection of the distances in the bidimensional plain, from the diversity observed among genotypes of <i>Passiflora</i> spp. through access of molecular polymorphism through RAPD technique.....	67
13	Statistic and descriptive parameters of pathometric variables measured in a population of 87 ‘yellow’ passion fruit plants, mechanically inoculated with UESB-01 CABMV isolate and evaluated under field conditions.....	87
14	Magnitude and significance of <i>p</i> -values of the normality/Lilliefors and linear correlation tests between pathometric variables and productivity, measured in a population of 87 ‘yellow’ passion fruit plants, mechanically inoculated with UESB-01 CABMV isolate and evaluated under field conditions.....	88
15	Magnitude of R^2 values obtained from regressions determined through curve fitting test, among the pathometric (predictive) and productivity (dependent) variables, measured in a population of 87 ‘yellow’ passion fruit plants, mechanically inoculated with UESB-01 CABMV isolate and evaluated under field conditions.....	90
16	Magnitude of <i>p</i> -values determined via bilateral Student’s <i>t</i> -test and bootstrap test, between pathometric and productivity variables of two contrasted sample of populations of ‘yellow’ passion fruit plants on the reaction to CABMV.	91
17	Pathometric variables averages measured in a sample of 10 yellow passion fruit plants, mechanically inoculated with UESB-02 to UESB-11 CABMV isolates and evaluated in greenhouse.	92
18	Descriptive statistics of morpho-agronomic variables of fruits and severity of leaf symptoms measured in 72 yellow passion flower plants that were mechanically inoculated with <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> isolate UESB-01.....	98

19	Correlation and linear regression between the global leaf disease index (predictor variable) and the morpho-agronomic characteristics (dependent variables) measured in 72 yellow passion fruit plants mechanically inoculated with <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> isolate UESB-01.....	98
20	Average results of morpho-agronomic characteristics of fruits and severity of leaf symptoms caused by <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> in eight yellow passion fruit plants selected as ‘resistant’ (‘R’) and ‘moderately resistant’ (‘MR’).....	99
21	Average results <i>per se</i> of morpho-agronomic characteristics of fruits and severity of leaf symptoms of the <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> in eight “yellow” passion flower plants selected as ‘susceptible’ (‘S’) and ‘extremely susceptible’ (‘ES’) to the UESB-01 isolated	99
22	Amplificação cruzada com 25 <i>primers</i> SSR, desenvolvidos a partir de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> (controle; <i>Pef</i>), em 18 espécies de <i>Passiflora</i> spp.	113
23	Amplificação cruzada de sete <i>primers</i> SSR, desenvolvidos a partir de <i>P. alata</i> (controle), em oito espécies de <i>Passiflora</i> spp.	115

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADF	average diameter of the fruits
AFLP	amplified fragment length polymorphism
ANOVA	analysis of variance
ATT	acidez titulável total
AWF	average weight of the fruits
B	coeficiente de similaridade de Baroni
CABMV	<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i>
CAGT- <i>Passiflora</i> /UESB	Coleção Ativa de Germoplasma de Trabalho de <i>Passiflora</i> da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
CV	Coeficiente de variação
D	valores de distorção
D ²	distância de Mahalanobis
DCR	distância de Coler-Rodgers
DE	diâmetro equatorial
DE	distância euclidiana
DEM	distância euclidiana média
DG	distância de Gower
DGM	distância generalizada de Mahalanobis (DGM)
DL	diâmetro longitudinal
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPQR	distância ponderada pelo quadrado do resíduo
EC	espessura da casca
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid

EN	escala de notas
gd_{ij}	Distância Genética
GISI	global incidence and severity index (ver também IGIS)
GLDI	global leaf disease index (ver também IDFG)
H	coeficiente de Hamman
HGS	highest grade of the scale
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	índice de conformidade do fruto
IDFG	índice de doença foliar global (ver também GLDI)
IGIS	índice global de incidência e severidade (ver também GISI)
III	índice de intensidade de infecção
III	infection intensity index
J	coeficiente de similaridade de Jaccard
K	coeficiente de similaridade de Kulczynski
NDL	number of diseased leaves
O	coeficiente de similaridade de Ochiai
OII	coeficiente de similaridade de Ochiai2
P	coeficiente de similaridade Phi
PC	peso da casca
PCR	<i>polimerase chain reaction</i>
<i>Pef</i>	<i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> O. Deg.
PF	peso dos frutos
pH	potencial hidrogeniônico
PP	peso de polpa com sementes
<i>Ps</i>	<i>Passiflora setacea</i>
PV	<i>phytopathometric variable</i>
PWD	Passion fruit woodiness disease
PWV	<i>Passion fruit woodiness virus</i>
QDE	quadrado da distância euclidiana
QTL	<i>quantitative trait loci</i>
r	coeficiente de correlação

RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
r_c	coeficiente de correlação cofenética
RP	rendimento da polpa
RR	coeficiente de similaridade de Russel e Rao
r_s	correlação de Spearman
RT	coeficiente de similaridade de Roger e Tamino
RT-PCR	reverse transcriptase - polimerase chain reaction
S	stress
S	coeficiente de dissimilaridade de Solkal
SD	coeficiente de similaridade de Sorensen-Dice
SG	<i>scale of grades</i> (do português escala de notas)
sg_{ij}	similaridade genética
SM	<i>Simple matching</i>
SS	coeficiente de similaridade de Sokal e Sneath
SSR	<i>simple sequence repeat</i>
SST	sólidos solúveis totais
TBE	tampão composto por Tris –Borato e Ethylenediamine tetraacetic acid
TNF	<i>total number of fruits</i>
TNL	<i>total number of leaves</i>
TWF	<i>total weight of fruit per plant</i>
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
UESC	Universidade Estadual de Santa Cruz
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean</i>
VD	vizinho mais distante
VP	vizinho mais próximo
W	método de Ward
WPGMC	métodode Gower
Y	coeficiente de similaridade de Yule

INTRODUÇÃO

As passifloras, comumente tratadas como maracujazeiros, pertencem à família Passifloraceae e apresentam a maioria das suas espécies compondo o gênero *Passiflora*. Embora não exista consenso entre os taxonomistas do grupo, estima-se que a família Passifloraceae e o gênero *Passiflora* possuam ao menos 580 e 400 espécies, respectivamente (BERNACCI et al., 2003). Estas espécies encontram-se distribuídas quase que em sua totalidade na América Tropical, sendo o Brasil um dos maiores centros de diversidade do grupo, possuindo em seu território um número mínimo de 120 espécies nativas de *Passiflora*.

O interesse pelas passifloras está voltado principalmente para as espécies que produzem frutos comestíveis, a exemplo do maracujazeiro ‘amarelo’ (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg), o qual é predominante nos campos de produção de maracujá do Brasil (Borges et al., 2005). No entanto, cerca de outras 50 espécies do gênero apresentam também alguma importância econômica (VIEIRA; CARNEIRO, 2004). Esta importância pode estar associada, ao menos, ao potencial uso como fitoterápico e, ou, ornamental e mesmo na alimentação humana.

Atualmente, o Brasil se destaca como maior produtor e consumidor mundial de frutos de maracujá, respondendo por cerca de 70% da produção mundial (BELLON et al., 2007; FERREIRA et al., 2005). Entretanto, o aumento da produtividade da passicultura brasileira nos últimos anos está associado à extensão da área cultivada em território nacional. Entre os fatores que justificam a baixa produtividade da passicultura estão a desuniformidade dos pomares, decorrente principalmente da escassez de seleções de genótipos melhorados disponíveis aos produtores (MELETTI

et al., 2000) e à ocorrência de fitopatógenos de origem bacteriana, fúngica e viral (LIMA et al., 1999).

Diante do grande número de espécies silvestres de maracujazeiros e frente aos principais fatores limitantes da cultura, o melhoramento genético mostra-se, por meio da seleção e síntese de genótipos, como uma alternativa racional para homogeneização dos pomares e para convivência com patógenos (FALEIRO et al., 2005a; JUNQUEIRA et al., 2006). Neste sentido, as etapas iniciais de pré-melhoramento (prospecção, caracterização e conservação) são de suma importância, destacando-se (i) avaliação de dados agronômicos, a exemplo das características físico-química de frutos, o uso de estatísticas uni- e multivariada (MOHAMMADI; PRASANNA, 2003) e (ii) caracterização da reação de genótipos a doenças, o uso de chaves descritivas e índices de doenças (LARANJEIRA, 2005).

Várias metodologias para avaliação da diversidade genética são encontradas na literatura, incluindo medidas de distância para dados quantitativos e coeficientes de similaridade para dados qualitativos (MOHAMMADI; PRASANNA, 2003). A escolha do método a ser utilizado deve ser feita em função do tipo de dado a ser caracterizado, levando em consideração critérios previamente estabelecidos, a exemplo da eficiência de projeção no espaço bidimensional e os valores de correlação cofenética. Estes critérios são adotados para avaliação da eficiência de coeficientes e medidas de distância genética em espécies de importância econômica como feijão (EMYGDIO et al., 2003), tomate (GONÇALVES et al., 2008) e milho (BALESTRE et al., 2008; MEYER et al., 2004).

Para passiflora não são encontrados trabalhos que descrevam, à semelhança do que já foi realizado para as culturas supracitadas, quais metodologias para estimativa da dissimilaridade genética devam ser priorizadas para avaliação de dados agronômicos e moleculares. Embora crescente, o número de caracterizações de variabilidade genética em *Passiflora* spp., pode ser considerado incipiente, visto o grande número de espécies silvestres que ainda não foram avaliadas. Ao se considerarem as caracterizações realizadas por meio de descritores agronômicos, à exemplo dos físico-químicos de frutos, os quais possibilitam gerar informações intimamente associadas a qualidade dos frutos, a situação é ainda mais grave,

inexistindo caracterizações interespecíficas que levem em conta este tipo de categoria de variável. Para caracterizações moleculares a realidade não é diferente, estando a maior parte das pesquisas dedicadas a caracterização genético-molecular do maracujazeiro ‘amarelo’, espécie mais cultivada e que representa maior valor econômico, sendo limitadas às ações de pesquisa voltadas para caracterização de espécies silvestres.

No que diz respeito à fitossanidade da cultura, têm-se o registro de uma grande variedade de patógenos, merecendo destaque aqueles que não possuem estratégias eficientes de combate às seguintes doenças: ‘antracnose’, ‘morte prematura’ e o ‘endurecimento dos frutos’, ocasionados, respectivamente, pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* f. *passiflorae* (associado por vezes a outros patógenos) e pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (FISCHER et al., 2007; NAKAMURA, 1987; NASCIMENTO et al., 2004).

Avaliações da reação de genótipos a doenças são realizadas para diversos patossistemas vegetais mediante o uso de chave descritiva (escala de notas) e índice fitopatométrico de doença, a exemplo dos índices de McKinney (1923) e de Czermainski (1999). Para o patossistema maracujazeiro vs. CABMV inexistem relatos sobre a comparação de índices fitopatométricos e, ou emprego dos mesmos na seleção de plantas com resistência de campo ao vírus CABMV. Tais avaliações podem maximizar a identificação de genótipos resistentes que venham contribuir nos programas de melhoramento da cultura para esse fitopatógeno.

Adicionalmente deve-se considerar, com o avanço das técnicas moleculares, a possibilidade de caracterizações genéticas cada vez mais robustas e informativas. Neste sentido, o uso de marcadores moleculares co-dominantes contribui sobre maneira no melhoramento genético, seja nas etapas de pré-melhoramento, através da caracterização de diversidade e identificação de QTLs de interesse, seja na confirmação de híbridos. Contudo, pesquisas relacionadas a marcadores co-dominantes para maracujazeiros estão limitadas à identificação e desenvolvimento de *primers* SSR para *P. alata* (PÁDUA et al., 2005; PENHA et al., 2007) e *P. edulis* f. *flavicarpa* (OLIVEIRA et al., 2005) e estudos preliminares de mapeamento (NUNES et al., 2008). O efetivo uso destes marcadores poderá contribuir para a conservação de

espécies, mediante caracterizações mais robustas de diversidade, e para o melhoramento da cultura, auxiliando no direcionamento de cruzamentos que permitam explorar a variabilidade genética em associação ao incremento de atributos físico-químico de frutos e à resistência de maracujazeiros ao CABMV.

Diante da realidade apresentada, objetivou-se no presente estudo (i) verificar a influência de medidas de distância e coeficientes de similaridade (e dissimilaridade) na caracterização da diversidade de genótipos de maracujazeiro ‘amarelo’ mediante descritores físico-químicos de frutos e marcadores RAPD; (ii) quantificar a dissimilaridade genética intra- e interespecífica entre genótipos de maracujazeiros ‘amarelo’ e ‘do-sono’ mediante avaliação de descritores físico-químico de frutos; (iii) estimar a variabilidade genética de genótipos silvestres e comerciais de quatro espécies de *Passiflora* mediante marcadores RAPD; (iv) comparar a eficiência de variáveis fitopatométricas em avaliações do patossistema maracujazeiro vs. CABMV; (v) avaliar o gradiente de resistência e selecionar genótipos contrastantes de maracujazeiros ‘amarelo’, em condições de campo, em relação ao vírus do endurecimento dos frutos; e (vi) caracterizar o percentual de amplificação cruzada de *primers* microssatélites em espécies de *Passiflora*.

REVISÃO GERAL DE LITERATURA

Aspectos botânicos e econômicos do gênero *Passiflora*

A família Passifloraceae Juss. ex. DC. integra a ordem Violales, Classe Magnoliopsida e Filo Magnoliophyta, sendo oriunda da América Tropical e perfazendo ao menos um número de 580 espécies distribuídas em 18 gêneros (BERNACCI et al., 2003; SOUZA, MELETTI, 1997; VANDERPLANK, 1996), não havendo consenso entre os pesquisadores a respeito da quantidade de espécies e gêneros pertencentes a família Passifloraceae (BERNACCI et al., 2003; BERNACCI et al., 2005). Dentre os gêneros desta família, merece destaque o gênero *Passiflora*, agregando ao menos 400 espécies, entre as quais estão aquelas de maior interesse econômico: *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg, *P. edulis* e *P. alata* Curtis (BERNACCI et al., 2005; BERNACCI et al., 2008; JUNQUEIRA et al., 2005a).

No Brasil o gênero *Passiflora* apresenta pelo menos 120 espécies nativas, dispersas em seu território (BERNACCI et al., 2005; BERNACCI et al., 2008), sendo por este motivo considerado como um dos principais centros de diversidade genética de passifloras (FERREIRA et al., 2005; MELETTI et al., 2005). Toda essa diversidade, que apresenta tanto interesse econômico como ecológico, tem sua sobrevivência ameaçada devido à expressiva redução das áreas florestais, ocasionada pelas altas taxas de desmatamento que acometem as regiões tropicais (BERNACCI et al., 2005).

A importância econômica das passifloras está associada principalmente aos seus potenciais usos como fitoterápico, planta ornamental e ou gênero alimentício. A utilização de folhas, flores, raízes e frutos de espécies silvestres e comerciais de passifloras para combater diferentes enfermidades, à exemplo de verminoses, tumores gástricos e estresse, fazem parte da cultura de diferentes povos (COSTA; TUPINAMBÁ, 2005). No que dizem respeito ao uso ornamental, as passifloras despertam interesse pela beleza de suas folhas, flores e frutos, já se tendo conhecimento do registro de mais de 400 híbridos com objetivo de ornamentação dos mais diversos ambientes (PEIXOTO, 2005; SANTOS, 2008). Por fim, o principal uso das passifloras está na alimentação humana, sendo exploradas tanto no consumo *in natura*, como no consumo de derivados na forma de sucos, sorvetes, doce e licores (RUGGIERO et al., 1996).

O Brasil destaca-se no cenário internacional como maior produtor, consumidor e exportador de maracujá, respondendo por cerca de 70% da produção mundial (BELLON et al., 2007; FERREIRA, 2005; IBGE, 2004), sendo o maracujazeiro ‘amarelo’ (*P. edulis flavicarpa*) a espécie de *Passiflora* mais cultivada, ocupando aproximadamente 95% dos campos de produção de maracujá do Brasil (BORGES et al., 2005). Outras espécies de *Passiflora* apresentam importância econômica, entretanto, estas são de comercialização restrita a determinadas regiões, a exemplo dos maracujazeiros ‘roxo’ (*Passiflora edulis* Sims), ‘melão’ (*Passiflora quadrangularis* L.), ‘suspiro’ (*Passiflora nitida* HBK), ‘azul’ (*Passiflora caerulea*), ‘peroba’ (*Passiflora laurifolia*), ‘do-mato’ (*Passiflora cincinnata* Mast) e ‘do-sono’ (*P. setacea* DC) (CARDOSO-SILVA et al., 2007; INGLEZ DE SOUZA; MELETTI, 1997; MELETTI et al., 2005).

Conservação de germoplasma de *Passiflora* spp.

As principais ações, associadas de algum modo, à conservação de espécies silvestres de *Passiflora* estão relacionadas ao pré-melhoramento da passicultura, destacando-se a caracterização genética da diversidade de genótipos e a construção e

manutenção de bancos ativos de germoplasma (BAGs). Neste contexto, embora as passifloras apresentem um expressivo número de espécies, ao menos 400 somente no Gênero *Passiflora* (BERNACCI et al., 2003; BERNACCI et al., 2005), assim como uma ampla variabilidade (FERREIRA; OLIVEIRA, 1991), a preocupação em preservá-la não tem, de acordo Souza e Meletti (1997), a mesma pujança, em âmbito nacional e mundial, haja vista que o volume de materiais mantido em coleções pode ser considerado ‘modesto’.

A erosão genética em maracujazeiros, decorrente principalmente pela expansão das fronteiras agrícolas e pelo crescimento industrial, representa uma perda significativa para as passifloras silvestres (FERREIRA, 2005). Deste modo, espécies silvestres que apresentam tanto interesse econômico como ecológico, têm sua sobrevivência ameaçada devido redução das áreas florestais, ocasionada por ações antrópicas, a exemplo das altas taxas de desmatamento que acometem de forma generalizada as regiões tropicais (BERNACCI et al., 2005). Dentre as regiões tropicais afetadas pela ação antrópica, estão os fragmentos de mata de cipó, bioma de transição entre caatinga, cerrado e mata atlântica. Este bioma ocorre no alti-plano de Vitória da Conquista, Estado da Bahia, sendo também conhecido como floresta estacional semidecidual do planalto da Conquista (Rebouças et al., 2006), onde têm-se a ocorrência de diversas espécies nativas de *Passiflora*. De acordo com Queiroz et al. (1992), a perda da diversidade genética de espécies silvestres do gênero *Passiflora* no Semi-Árido, dentre outras espécies da flora brasileira, são ocasionadas pela (i) formação de pastagens; (ii) remoção de biomassa vegetal para produção de energia destinada a atividades diversas e (iii) queimadas indiscriminadas. Lamentavelmente, ações relacionadas à preservação das passifloras, como a prospecção e manutenção de acessos em coleções e bancos de germoplasma, não tem recebido a devida atenção (SOUZA e MELETTI, 1997).

É necessário, portanto, um aumento no número de ações que contribuam, direta ou indiretamente, para a conservação e caracterização de alelos importantes presente nestas espécies. Entre estas ações está o uso de marcadores moleculares para caracterização rápida e eficiente da variabilidade genética intra- e interespecífica de populações naturais, sendo registrado nos últimos anos um aumento no número de

estudos deste tipo (AUKAR et al., 2002; BELLON et al., 2007; CROCHEMORE et al., 2003b; FAJARDO et al., 1998; GANGA et al., 2004; SEGURA et al., 2002; VIANA et al., 2003).

Os resultados oriundos de caracterizações moleculares da diversidade genética de *Passiflora* spp. podem contribuir para o direcionamento de quais indivíduos, oriundos de populações naturais, devam ser prioritariamente prospectados e conservados em BAGs e coleções de trabalho.

Uniformidade e qualidade de frutos: fatores importantes para o crescimento da passicultura

A ausência de uniformidade dos frutos produzidos nos campos de produção de maracujá justifica, ao menos em parte, a baixa produtividade da passicultura e apresenta-se como uma limitação para o aumento da produtividade e da qualidade dos pomares de maracujazeiros (MELETTI et al., 2000). Esta ausência de uniformidade, no Brasil, decorre da ampla variabilidade de genótipos existente nos campos de produção comercial de maracujazeiros e pode ser justificado pelo reduzido número de cultivares e, ou seleções comerciais disponíveis e utilizadas pelo produtor (GONÇALVES et al., 2008; PIMENTEL et al., 2008). Destaca-se ainda, que além de serem poucos, nem todos os materiais selecionados e indicados para plantio apresentam uniformidade de frutos, visto que parte do material melhorado, disponível, foi desenvolvido para produção de sucos industrializados e não para o cultivo *in natura* (BORGES et al., 2005).

A importância do estudo das características agrônômicas dos frutos de maracujá, a exemplo das características físicas e químicas, justifica-se pelo fato de que tais características são adotadas como parâmetros pelo mercado consumidor (MELO et al., 2001), chegando a se observar alterações de 150% no valor comercial de frutos a depender da qualidade e classificação que estes apresentem (MELETTI et al., 2000).

Fitossanidade como fator limitante para manutenção e expansão da passicultura

Embora o Brasil seja destaque tanto pela diversidade, quanto pela produção de frutos, a expansão da passicultura tem sido acompanhada pelo aparecimento de diversos problemas fitossanitários que acarretam a redução da vida útil do maracujazeiro de seis para até um ano de cultivo (LIMA et al., 1999; MELO et al., 2001; RUGGIERO, 1996). Deste modo, juntamente com a desuniformidade dos pomares, a ocorrência de fitopatógenos mostra-se como fator limitante para a manutenção e expansão da passicultura.

Para grande parte das enfermidades que acometem a passicultura, não há estratégias eficientes de combate disponíveis (JUNQUEIRA et al., 2005a; JUNQUEIRA et al., 2006), estando entre estas enfermidades a verrugose (*Cladosporium cladosporioides*) (GOES et al., 1998; SANTOS et al., 2008), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) (FISCHER et al., 2007), morte prematura, associada a fungos de solo (*Fusarium oxysporum* f. *passiflorae*, *Fusarium solani*, *Phytophthora* spp), bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* f. *passiflorae*) (NAKAMURA, 1987) e a ocorrência de diversas viroses, sendo o endurecimento dos frutos a principal destas (NASCIMENTO et al., 2004; YAMASHIRO; CHAGAS, 1979).

Em se tratando da ocorrência do vírus do endurecimento dos frutos, o primeiro registro desta virose no Brasil ocorreu no final da década de 70, em plantas comerciais de maracujazeiros ‘amarelo’ e ‘doce’, no Estado da Bahia (YAMASHIRO; CHAGAS, 1979). Com o passar dos anos a doença se alastrou pelos demais estados do país, sendo registrada nos Estados de Pernambuco (LORETO; VITAL, 1983), Sergipe, Ceará (KITAJIMA et al., 1986), São Paulo (CHAGAS et al., 1992) e Minas Gerais (SÃO JOSÉ et al., 1994), sendo atualmente sua ocorrência generalizada nos campos de produção de maracujazeiros.

Inicialmente *Passion fruit woodiness virus* (PWV) foi tido como agente etiológico do endurecimento dos frutos nos maracujazeiros que apresentaram esta doença no Brasil (KITAJIMA et al., 1986), sendo este diagnóstico fundamentado basicamente por avaliações sintomatológicas da doença e, ou por testes sorológicos

como o ELISA (NOVAES; RESENDE, 1999). Contudo, com os avanços das técnicas de diagnóstico molecular, baseado no seqüenciamento de DNA, o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) foi então diagnosticado como o verdadeiro agente etiológico do endurecimento dos frutos em maracujazeiros cultivados em território brasileiro (MOREIRA, 2008; NASCIMENTO et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2006).

Estratégias de combate e controle ao agente etiológico do endurecimento dos frutos vêm sendo buscadas, a exemplo da premunização de maracujazeiros com estirpes tênues do vírus (NOVAES; REZENDE, 2003), estratégia utilizada para este patossistema na Austrália com sucesso por Simmonds (1959) e no patossistema vírus da tristeza vs citros, no Brasil (MÜLLER, 2001), também com sucesso. Contudo resultados positivos para os testes de premunização do patossistema Passiflora/CABMV não foram alcançados no Brasil.

Outra estratégia que vem sendo pesquisada é a geração de plantas transgênicas, com o intuito de promover a resistência por meio de silenciamento gênico (ALFENAS, 2005; TREVISAN, 2005). Até o momento, tais plantas não foram eficientes na promoção de silenciamento gênico para todos os isolados de CABMV a que foram desafiadas, além de que não se conhece, ainda, a reação destas plantas aos demais isolados de CABMV que ocorrem no Brasil.

Com relação à possibilidade de redução de perdas na produtividade de genótipos de maracujazeiro ‘amarelo’, infectados com o CABMV, registra-se uma recente avaliação de estratégias de manejo cultural, embasada em ciclo anual, demonstrando ser economicamente viável, nas condições avaliadas, o convívio da passicultura com o vírus do endurecimento (SAMPAIO et al., 2008).

Estratégias e ações de melhoramento visando manutenção e expansão da passicultura

Considerando a diversidade de espécies silvestres que compõem o gênero *Passiflora* e a possibilidade de intercruzamento entre muitas destas espécies, o melhoramento genético mostra-se, por meio da seleção e síntese de genótipos, como

uma alternativa racional de convivência com patógenos e homogeneização dos pomares (FALEIRO et al., 2005; FALEIRO et al., 2005a; FALEIRO et al., 2006; JUNQUEIRA et al., 2006). Contudo, o melhoramento genético da passicultura pode ser considerado um campo de pesquisa ainda pouco explorado, haja vista a inexistência de cultivares que agreguem características agronômicas de interesse e resistência comprovada a fitopatógenos (MELETTI et al., 2000; MELLETI et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2003).

Diante deste contexto, para o melhoramento genético da passicultura, deve-se estar atento a necessidade de se conhecer tanto a reação de genótipos de maracujazeiros aos principais patógenos que acometem a cultura, quanto às características físico-químicas de frutos. Em avaliações fitopatológicas o uso de chaves descritivas e índices de doenças são de suma importância para uma eficiente quantificação dos sintomas e conseqüente avaliação da severidade de doenças (LARANJEIRA, 2005). Por sua vez, o uso de estatísticas uni- e multivariada são estratégias indicadas para avaliação de dados quantitativos oriundos de caracterizações físico-químicas de germoplasmas (MOHAMMADI; PRASANNA, 2003)

É importante ressaltar que, para o sucesso de um programa de melhoramento genético, cuja realização de hibridações intra- ou interespecíficas são necessárias, as etapas de pré-melhoramento (prospecção, caracterização e conservação de germoplasma) merecem especial atenção (FALEIRO et al., 2005a). Deste modo, o uso de técnicas moleculares como os marcadores genéticos, em associação com as caracterizações de resistência genética a fitopatógenos e quanto as propriedades físico-químicas de frutos, pode maximizar o volume de informações geradas durante as etapas de pré-melhoramento, com vistas a futura identificação de lócus de resistência ou de características quantitativas (QRLs e QTLs, respectivamente). Adicionalmente, o uso de marcadores moleculares podem ainda contribuir com o melhoramento genético propriamente dito como, por exemplo, a identificação/proteção de cultivares por *fingerprint* genômico e seleção assistida por marcadores (FERREIRA; RANGEL, 2005).

Ações de melhoramento visando incremento de atributos físico-químicos de frutos em maracujazeiros

À semelhança do que foi relatado acerca da importância de espécies silvestres de *Passiflora* para o melhoramento objetivando resistência a doenças, espécies silvestres apresentam também longevidade, autocompatibilidade, maior adaptação a condições edafoclimáticas adversas, período de florescimento ampliado, maior concentração de componentes químicos de interesse econômico (JUNQUEIRA et al., 2005a; MELETTI et al. 2005) características físico-química de frutos (CARDOSO-SILVA et al., 2007) e de flores (JUNQUEIRA et al., 2006) desejáveis para a passicultura podendo, portanto, ser exploradas em cruzamentos interespecíficos dirigidos.

Entretanto, mesmo diante do potencial uso de espécies silvestres em programas de melhoramento, pesquisas relacionadas à estimativa de diversidade genética em maracujazeiros silvestres, mediante descritores físico-químicos, são escassas. Como exemplo deste tipo de estudo tem-se a caracterização de genótipos de maracujazeiro ‘do-sono’ (CARDOSO-SILVA et al., 2007), inexistindo até o momento caracterizações interespecíficas realizadas mediante descritores físico-químicos. Deve-se considerar, ainda, que os descritores físico-químicos de frutos fornecem informações intimamente associadas à qualidade dos frutos, objetivo maior no melhoramento genético de fruteiras, a exemplo do maracujazeiro.

Para espécies não relacionadas às passifloras como, por exemplo, o umbu-caja (*Spondias* sp), da pimenta (*Capsicum chinense*) e da mandioca (*Manihot esculenta*), caracterizações de diversidade, por meio de descritores físico-químicos, já foram realizadas com intuito de subsidiar o direcionamento de hibridizações (FONSECA et al., 2008; NICK et al., 2008; RITZINGER et al., 2008). Este tipo de estratégia pode também ser adotada como critério para o direcionamento de cruzamentos interespecíficos de passifloras, haja vista que o uso de cruzamento interespecíficos é uma das formas que propicia o efetivo aproveitamento da variabilidade genética (FALEIRO et al., 2005a; FALEIRO et al., 2006).

O uso de marcadores moleculares em ações de melhoramento visando caracterização genética em maracujazeiros

Em maracujazeiros encontra-se o uso de técnicas moleculares aplicadas na (i) estimativa da variabilidade genética, a exemplo dos estudos realizados mediante uso de enzimas de restrição de sítios de cpDNA (SÁNCHEZ et al., 1999), isoenzimas (SEGURA et al., 2003; SEGURA et al., 2005), polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados (AFLP) (AUKAR et al., 2002; SEGURA et al., 2002) e por meio do polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) (BELLON et al., 2007; CROCHEMORE et al., 2003b; FAJARDO et al., 1998; GANGA et al., 2004; VIANA et al., 2003); (ii) confirmação de híbridos interespecíficos por meio de RAPD (BELO et al., 2008; CERQUEIRA-SILVA et al., 2008a; CONCEIÇÃO et al., 2008; JUNQUEIRA et al., 2008) e (iii) construção de mapas genéticos, a exemplo do uso de uma população F₁ de maracujazeiros ‘amarelo’, genotipada com RAPD (CARNEIRO et al., 2002) e AFLP (LOPES et al., 2006) e identificação de QTLs associados a características de frutos (MORAES, 2005) e resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflora* (MATTA, 2005).

A predominância no uso de marcadores dominantes, como os AFLP e RAPD, podem ser justificados devido a inespecificidade destes marcadores, que não requerem estudos prévios do genoma das espécies a serem estudadas. Assim, o uso dos marcadores dominantes permite tanto uma economia de tempo quanto de recursos financeiros para a execução da pesquisa (BORÉM; CAIXETA, 2005; FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1996). Contudo, marcadores dominantes não permitem caracterizar a variabilidade e a frequência alélica de um determinado loco, o que limita as conclusões oriundas destes estudos. Estas limitações, decorrentes do uso de marcadores dominantes, podem ser superadas mediante emprego de marcadores codominantes, a exemplo dos microssatélites (SSR), descrito originalmente por Tautz (1989).

Os marcadores SSR caracterizam-se por acessar regiões do genoma que apresentam seqüências simples repetidas em *tandem*; serem altamente polimórficos e multialélicos; apresentarem padrão de herança mendeliano e serem comuns tanto em

eucariotos como em procariotos (BORÉM; CAIXETA, 2005; FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1996; TAUTZ, 1989). Em maracujazeiros, os estudos relacionados a marcadores SSR são ainda incipientes, estando limitados ao desenvolvimento e caracterização de *primers* SSR nas espécies de maracujazeiro ‘amarelo’ (OLIVEIRA et al., 2005) e ‘doce’ (PÁDUA et al., 2005).

O limitado uso dos SSR em estudos envolvendo maracujazeiros provavelmente esta associado à necessidade de caracterização prévia do genoma da espécie a ser estudada (BORÉM; CAIXETA, 2005; FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1996). Uma alternativa para sanar este obstáculo é a busca de *primers* que acessem regiões conservadas entre espécies próximas de passifloras nativas e que, portanto apresentem amplificação cruzada. Dessa forma, *primers* já disponíveis na literatura, a exemplo dos desenvolvidos por Oliveira et al. (2005) e Pádua et al. (2005), poderiam ser utilizados para caracterizações moleculares, intra- e interespecífica, das mais diversas espécies de *Passiflora* spp.

Considerando as diferentes fontes de dados, agronômicas e moleculares, utilizados para a estimativa da variabilidade genética em maracujazeiros, tem-se disponível para análise destes dados inúmeras metodologias de estatística uni- e multivariada. Dentre estas metodologias destacam-se o uso de medidas de distância para dados quantitativos e coeficientes de similaridade para dados qualitativos (DIAS, 1998; MOHAMMADI; PRASANNA, 2003).

Frente ao número de metodologias disponíveis para estimativa da dissimilaridade genética, deve-se dedicar especial atenção à escolha do método a ser utilizado, visto que esta escolha pode influenciar consideravelmente nos resultados obtidos (DUARTE et al., 1999; JACKSON et al., 1989). Comparações recentes realizadas entre medidas de distância em aveia (BENIN et al., 2003) e tomate (GONÇALVES et al., 2008), assim como entre coeficientes de similaridade em feijão (EMYGDIO et al., 2003) e milho (BALESTRE et al., 2008; MEYER et al., 2004) são exemplos que comprovam a variação na eficiência de medidas e coeficientes de acordo com a origem e característica dos dados. Ainda assim, é comumente encontrado na literatura, de forma não justificada pelos autores, o uso de diferentes coeficientes para

um mesmo propósito, ou um mesmo coeficiente sendo adotado para diferentes abordagens (EMYGDIO et al., 2003).

Ações de melhoramento visando resistência de maracujazeiros ao CABMV, agente causal do endurecimento dos frutos

Em se tratando de caracterizações da reação de maracujazeiros ao CABMV, observa-se tanto o uso isolado de chave descritiva (escala de notas) (JUNQUEIRA et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2006; NOVAES; REZENDE, 1999; TEMPESTA et al., 2004), como o uso destas escalas de notas associados a testes sorológicos (NOVAES; REZENDE 1999) e avaliação do percentual foliar infectado (LEÃO et al., 2006). Entretanto, diferente do que ocorre para outros patossistemas vegetais, onde se tem o uso de diferentes índices, a exemplo dos propostos por Mckinney (1923), Silva (1969) e Czermainski (1999); inexistem registros a respeito do uso de índices de doença em caracterizações da reação de genótipos de maracujá ao CABMV. Em decorrência deste fato, a eficiência e os potenciais ganhos que tais índices podem apresentar à passicultura, são ainda desconhecidos.

Os trabalhos de avaliação da resistência de maracujazeiros ao CABMV apresentam resultados preliminares, embasados em experimentos que não agregam avaliações de sintomas decorrentes da infecção com CABMV e a produção de frutos em campo (FALEIRO et al., 2007; GIORIA et al., 2000; LEÃO et al., 2006; TEMPESTA et al., 2004). Diante da escassez de informações relacionadas à reação de genótipos comerciais ao CABMV, deve-se enfatizar que diversas espécies silvestres apresentam potencial uso para introgressão de genes de resistência nos genótipos comerciais de maracujazeiro (MENEZES et al., 1994; MELETTI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 1994).

Dentre as espécies indicadas como potenciais fontes de resistência a doenças que acometem a passicultura têm-se *P. cincinnatta*, *P. caerulea*, *P. incarnata*, *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. nitida*, *P. quadrangularis* e *P. setacea* (MELETTI et al., 2005). Destas, o maracujazeiro ‘do-sono’ (*P. setacea* DC) merece particular atenção,

por apresentar elevada resistência, entre outras enfermidades, à ‘morte precoce’ (MENEZES et al., 1994), ‘murcha e podridão de fusário’ (OLIVEIRA et al., 1994), ‘podridão do colo’ (MELETTI; BRUCKNER, 2001), ‘antracnose’ (JUNQUEIRA et al., 2005a)] e a ‘virose do endurecimento de frutos’ (ABREU et al., 2006).

A possibilidade efetiva de uso de espécies silvestres em cruzamentos interespecíficos vem sendo descrita na literatura (BELO et al., 2008; CERQUEIRA-SILVA et al., 2008a; CONCEIÇÃO et al., 2008; JUNQUEIRA et al., 2008), sendo as hibridações entre o maracujazeiro ‘amarelo’ e ‘do-sono’ as mais indicadas para introgressão de genes de resistência (OLIVEIRA; RUGGIERO, 1998). Contudo, em se tratando de hibridações interespecíficas (entre maracujazeiro ‘amarelo e ‘do-sono’) visando a obtenção de híbridos resistentes ao CABMV, cruzamentos recorrente realizados por Junqueira et al. (2006), demonstram que a resistência dos híbridos é diluída gradativamente com o avanço dos ciclos de retrocruzamento.

CAPÍTULO 1
COMPARAÇÃO DE COEFICIENTES E MEDIDAS DE DISTÂNCIA EM
MARACUJAZEIRO MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES E
DESCRITORES FÍSICO-QUÍMICOS

Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva⁽¹⁾; Cláudio Benício Cardoso-Silva⁽²⁾; Leo Duc Haa Carson S. Conceição⁽¹⁾; Juliana Vieira Almeida Nonato⁽²⁾; Antonio Carlos de Oliveira⁽²⁾ e Ronan Xavier Corrêa⁽¹⁾

Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da escolha de sete medidas de distância e 14 coeficientes de similaridade sobre um conjunto de observações de variáveis submetidas à análises multivariadas (distância, projeção e agrupamento), referente ao maracujazeiro ‘amarelo’ (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg.). Para tanto, 14 genótipos foram caracterizados com base na amplificação com 16 *primers* RAPD e avaliação de nove descritores físico-químicos de frutos. As medidas de distância e os coeficientes de similaridade foram comparados por meio do teste de correlação de Spearman, eficácia da projeção no espaço bidimensional e eficiência de agrupamento por meio de cinco métodos aglomerativos, apresentando variação quanto ao ranking dos genótipos. As medidas de distâncias de Coler-Rodger e do quadrado da distância euclidiana, assim como o coeficiente de similaridade de Yule mostraram-se inadequados para projeção no espaço bidimensional, assim como para realização de matrizes de agrupamento. Independente da origem da matriz de distância, o método de agrupamento UPGMA mostrou-se como mais adequado. As medidas de distância, os coeficientes de similaridade e os métodos aglomerativos apresentam eficiência diferenciada quanto aos valores de distorção, correlação cofenética e stress, influenciam nos resultados de caracterizações da variabilidade genética e devem, portanto, ser observados em estudos de maracujazeiros ‘amarelo’.

Comparison of coefficients and distance measurements in passion fruit plants with molecular markers and physical-chemical descriptors

Cerqueira-Silva, CBM¹, Cardoso-Silva, CB², Conceição, LDHCS¹, Nonato, JVA²,
Oliveira, AC², Corrêa, RX¹

¹Departamento de Ciências Biológicas,
Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brasil

²Departamento de Ciências Naturais,
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, BA, Brasil

Corresponding author: C. B. M. Cerqueira-Silva

E-mail: cerqueirasilva1@yahoo.com.br

Genet. Mol. Res. 8 (2): xxxx-xxxx (2009)

Received marc 11, 2009

Accepted marc 20, 2009

Published xxxx, 2009

ABSTRACT. We investigated seven distance measures and 14 similarity coefficients in a set of observations of variables of the ‘yellow’ passion fruit plant (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg.), submitted to multivariate analyses (distance, projection and grouping) selected in a choice. A total of 14 genotypes were characterized, based on DNA amplification with 16 RAPD primers and the assessment of nine fruit physical-chemical descriptors. The distance measurements and the similarity coefficients were compared by the Spearman correlation test, the effectiveness of the projection in two-dimensional space and grouping efficiency using five grouping methods, showing variations regarding the genotype ranking. Coler-Rodger distance measures and measures from the Euclidean distance square as well as the Yule similarity coefficient proved to be inadequate for projection in two-dimensional space or for grouping matrices. Regardless of the origin of the distance matrix, the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) grouping method proved to be more adequate. Distance measurements, similarity coefficients and grouping methods show a differential efficiency regarding values of distortion, cophenetic correlation and stress; they influence the characterization of genetic variability and must therefore be considered and justified their choice in ‘yellow’ passion fruit plant studies.

Key words: Grouping analysis; Genetic divergence; Multivariate statistics; *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg.

Introduction

In genetic improvement programs, the detection and quantification of available intra- and interspecific variability is of fundamental importance. It allows a more efficient use of genetic resources by the breeder and optimizes prioritization in the conservation of specimens and access to the species studied (Dias, 1998; Benin et al., 2003; Emygdio et al., 2003). To estimate the genetic variability between genotypes, access to DNA polymorphism with the generation of molecular markers (Duarte et al. 1999) and the assessment of agronomic descriptors (Gonçalves et al. 2008) are commonly employed. Similarly, various uni- and multivariate statistical methodologies are available to estimate dissimilarity between genotypes and they may be grouped while similarity coefficients are destined for the assessment of qualitative data and also as distance measurements, directed into quantitative data (Dias, 1998; Mohammadi & Prasanna, 2003).

As there are numerous methodologies available for estimating genetic dissimilarity, attention must be paid to choosing the method to be used, since this choice may influence considerably the estimate of dissimilarity (Jackson et al., 1989; Duarte et al., 1999). Thus, the determination of the method to estimate similarity (and its complement; dissimilarity), must be related to the objectives proposed in the research, the data characteristics and the properties inherent to distances and coefficients (Cruz, 1990; Dias, 1998; Benin et al., 2003).

Comparisons performed between distance measurements, having the preliminary assessment of agronomic descriptors as their basis, between oat (Benin et al., 2003) and tomato (Gonçalves et al., 2008) genotypes, as well as comparisons between similar coefficients with the generation of molecular markers, involving the genotypes of beans (Emygdio et al., 2003), sesame (Arriel et al., 2006) and corn (Meyer et al., 2004; Balestre et al., 2008), are all recent examples of how the efficiency of distances and coefficients may vary according to the nature of the variables measured. However, in genetic variability studies, the reason or criterion used to choose the similarity coefficient and the distance measure employed is not commonly reported; different coefficients and measures are employed for the same purpose or a coefficient is adopted for different approaches (Emygdio et al., 2003).

In passion fruit plants (Passifloraceae: *Passiflora*), different distance measures and similarity coefficients are used to characterize intra- and interspecific genetic variability. The following are examples of these studies (*i*) using agronomic descriptors, the employment of multivariate statistics, such as the estimate of the Euclidean distance (Crochemore et al.,

2003a) and the Mahalanobis generalized distance (Cardoso-Silva et al., 2007; Araújo et al., 2008); (ii) using molecular markers, the employment of the distance measurement method (Ganga et al., 2004) and of the Jaccard (Aukar et al., 2002; Crochemore et al., 2003b; Viana et al., 2003) and Nei and Li (Bellon et al., 2007) coefficients.

Similar to what occurs in relation to the estimate of dissimilarity, different grouping strategies are available and adopted in research involving passiflora: Tocher (Araújo et al., 2008), Ward (Viana et al., 2003), neighbor-joining (Ganga et al., 2004) and unweighted pair group method with arithmetic mean (Aukar et al., 2002; Crochemore et al., 2003a; Crochemore et al., 2003b; Bellon et al., 2007). However, these works involving passion fruit trees do not give a description of the criteria that were used to choose methods for the estimation of distance and genotype grouping.

Considering (i) the use of different approaches regarding method and statistical analysis in the characterization of diversity in passion fruit plants, (ii) the influence that these methods may exert on the results obtained, and (iii) the absence of studies related to the efficiency of these methods for the passion fruit culture, we evaluated the influence of similar (and dissimilar) coefficients and of distance measurements in the characterization of the diversity of 'yellow' passion fruit genotypes, with the use of RAPD markers and of fruit physical-chemical descriptors.

Material and Methods

The 'yellow' passion fruit genotypes (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg) used in this study belong to the Active Collection of *Passiflora* Work Germplasm 'Planalto de Conquista' from *Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia* (CAGT-*Passiflora* 'Planalto de Conquista'/UESB), *Vitória da Conquista campus*, Bahia (14° 53'20''S and 40°47'54''O, altitude of 900 m; with an average annual precipitation of 700-800 mm, concentrated between November and March, an average annual temperature of 20-22°C) (*Instituto Nacional de Meteorologia/Ministério da Agricultura e Abastecimento*).

To estimate the distance measurements, a total of 14 'yellow' passion fruit genotypes were analyzed between the months of May and July of 2008, using nine fruit physical-chemical descriptors [fruit weight (FW), equatorial diameter (ED), longitudinal diameter (LD), weight of the pulp with seeds (WP), weight of the skin (WS), thickness of the skin (TS), pH, total soluble solids (TSS) in °Brix and total titratable acidity (TTA)], with the use of a digital scale (precision of 0.01 g), Starrett® 727 digital pachymeter, bench Quimis® pH

meter and manual refractometer with direct reading and corrected to 20° C (Instrutherm RT-30ATC).

To estimate the similarities and genetic distance coefficients, a total of 20 ‘yellow’ passion fruit plants were genotyped through the access and identification of DNA polymorphism with the use of 16 RAPD primers (OPD-03, -05, -07, -11, -13, -18, and -20; OPE-01, -02, -03, -04, -05, -07, -14, -16, and -17), preliminarily selected between the 40 primers that comprise the Operon© OPD and OPE series, since they result in the best standards of amplification of molecular markers.

Genomic DNA used in the PCR reactions was extracted according to the method described by Dolye and Doyle (1990) and the amplification reactions performed according to Williams et al. (1990). The amplification products were then mixed with bromophenol blue and loaded on a agarose gel (1.6%) with ethidium bromide, submerged in TBE (Tris-borate and EDTA buffer), and electrophoretically resolved for 4 h at 90 V. Finally, the gels were exposed to ultraviolet light, photodocumented (Kodak EDAS 290) and assessed for the construction of a binary data matrix (0 for absence and 1 for the presence of bands).

To estimate the distances, based on results derived from physical-chemical descriptors, the following strategies for the calculation of measurements were employed: Coler-Rodgers distance (C-RD); Euclidean distance (ED); average Euclidean distance (AED); Gower distance (GD); Mahalanobis’ generalized distance (MGD); weighed distance by the square of the residue (WDSR); Euclidean distance square (EDS). To estimate the genetic distances (gd_{ij}), with RAPD binary data, the Baroni (B), Hamman (H), Phi (P), Kulczynski (K), Jaccard (J), Ochiai (O), Ochiai2 (OII), Roger and Tamino (RT), Russel and Rao (RR), Simple matching (SM), Sorensen-Dice (SD), Sokal and Sneath (SS), Yule (Y) similarity (gs_{ij}) and the Solkal dissimilarity (gd_{ij}) coefficients were obtained. The similarities obtained (gs_{ij}) were transformed into genetic distance by the following equation: $gd_{ij} = 1 - gs_{ij}$, meeting the presuppositions for transformation, that is, the genetic distance matrices were defined as non negative, according to Johnson and Wichern (1998).

Alterations in genotype ranking, obtained by the distance measurements and similarity (and dissimilarity) coefficients, were analyzed by the Spearman (r_s) correlation. The efficacy of the measurements and coefficients, with regard to the different grouping methods (closest neighbor - CN, farthest neighbor - FN, Ward - W, Gower – WPGMC and unweighted pair group method with arithmetic mean - UPGMA) was estimated on the basis of the original and simplified dissimilarity matrices; the last resulting from the use of one of the grouping

methods with the following parameters: distortion values (D), cophenetic correlation coefficient (r_c) and stress (S).

Alterations in the efficiency of data projection in two-dimensional space, due to the choice of different measures and coefficients, were also assessed. For this, the distortion values (D), correlation coefficients (r) and stress (S), were calculated based on the original and graphic distances (adjusted for two-dimensional space).

The similarity and genetic distance analyses, as well as the estimates of distortion, cophenetic correlation, stress and projection efficiency in two-dimensional space, were calculated using the Genes program (Cruz, 2001). Additionally, the BioEstat 5.0 program was adopted for Spearman correlation analyses (Ayres et al., 2005).

Results and Discussion

The Spearman correlation coefficients between the seven distance measurements were, except for the MGD ($r_s \leq 0.65$), elevated and significant ($r_s \geq 0.80$; $p < 0.001$), indicating that the calculated distances are highly correlated and present themselves with few alterations in the genotype ranking (Table 1). The $r_s = 1$ ($p < 0.001$) observed between ED, AED and EDS stands out, allowing us to infer that these three measurements show the same distance ranking between the genotypes and have differences with regard to the ranking obtained by the GD and MGD. A low correlation value between distance measures ($r_s = 0.53$; between ED and MGD) was also found by Benin et al. (2003) when assessing oat genotypes using agronomic descriptors. This low correlation may be associated with the fact that the Euclidean distances assess the phenotype variation, based on the average of the characteristics, while the Mahalanobis distance assesses the genetic variation, taking repetitions and their deviations as a basis (Cruz, 1990; Benin et al., 2003).

In regard to similarity (and dissimilarity) coefficients, elevated and significant levels of the Spearman correlation ($r_s \geq 0.66$, $p < 0.001$) (Table 2) was also observed, except for the distance obtained by the RR coefficient's complement ($0.31 \leq r_s \leq 0.80$). Among others, the maximum correlations ($r_s = 1$; $p < 0.001$) observed between coefficients B, H, RT, S, SM, and SS stand out, allowing us to infer that distance rankings between the genotypes obtained by these six coefficients are identical. Other coefficients, such as J and SD, also showed $r_s = 1$; however, they were different from the others because they had r_s values < 1 . High Spearman correlation values between coefficients were also observed in other cultures, such as with maize, genotyped using dominant (RAPD) (Meyer et al., 2004) and co-dominant

(microsatellites - SSR) (Balestre et al., 2008) markers, and beans, genotyped by RAPD markers (Corrêa et al., 1999). However, the correlation coefficient values were, at least in part, different between these works and in regard to the results obtained from this study. We found it impossible to generalize results obtained in other plant species with regard to the passion fruit plant culture.

With regard to the projection efficiency in two-dimensional space, the distance measurements showed great variation, with stress values oscillating between 22.6 and 49.9 % (Table 3). The highest stress values were observed based on the C-DR (41.3) and the EDS (49.9) distances, while the lowest stress values were obtained based on the GD (22.7) and the MGD (22.6). Because stress values higher than 40% were obtained, it is possible to classify the C-DR and EDS measures as “inadequate,” according to Kruskal's classification (1964).

For distances estimated based on similarity (and dissimilarity) coefficients, the projection efficiencies in two-dimensional space displayed elevated stress values between 55 and 74.3% (Table 3). The highest stress values were observed for RT (64.7 %), S (71.9 %), RR (73.8 %) and Y (74.3 %). These results are, at least in part, compliant with those obtained by Meyer et al. (2004) and Balestre et al. (2008), who found the highest stress values for RT and RR coefficients with regard to the other coefficients considered in these studies. The results obtained allowed classification, according to Kruskal (1964), of the referred assessed coefficients as being inadequate for assessments in two-dimensional space, based on the matrix of binary data from molecular markers of the dominant type, as with RAPD, in passion fruit plants.

The different combinations between the distance measurements and the five grouping methods gave distinct results concerning the efficacy of the grouping matrix in presenting the original distance matrix ($-2311.0 \leq D \leq 93.2$; $0.33 \leq r_c \leq 0.75$; $22.3 \leq S \leq 395.7$) (Table 4). The UPGMA method was the most efficient among the groupings assessed, showing all distance measurements, distortion and stress values as being closer to zero ($5 \leq D \leq 18.9$; $22.3 \leq S \leq 43.5$) and the highest cophenetic correlation values ($0.65 \leq r_c \leq 0.75$). Thus, the Ward method showed, based on all the distance measurements, the lowest efficiency in the genotype grouping ($-2311.0 \leq D \leq -1477.0$; $0.57 \leq r_c \leq 0.70$; $395.7 \leq S \leq 312.7$). These results indicate that UPGMA has the highest/best efficiency as a grouping method, in regard to an assessment of ‘yellow’ passion fruit plant quantitative variables, as well as the inefficiency of the Ward grouping method for this purpose. Results similar to these were also found by Gonçalves et al. (2008), while assessing the genetic distance of tomato genotypes with

agronomic descriptors and by Arriél et al. (2006), while assessing sesame genotypes, with DNA amplifications using RAPD markers.

The grouping methods, similar to circumstances surrounding the distance measurements, showed different results regarding the efficacy of the grouping matrices in representing the distance matrices obtained by the adopted coefficients ($-6976.4 \leq D \leq 0.39$; $0.04 \leq r_c \leq 0.67$; $6.2 \leq S \leq 743.5$) (Table 4). The UPGMA method was again identified as being the most efficient among the groupings assessed, yielding for all similarity coefficients, distortion and stress values closer to zero ($0.39 \leq D \leq 12.5$; $6.2 \leq S \leq 35.4$) and showing the highest cophenetic correlation values ($0.45 \leq r_c \leq 0.67$). The Ward method also demonstrated, for the similarity coefficients studied, the lowest efficiency in the genotype grouping ($6976.4 \leq D \leq -4942.4$; $0.41 \leq r_c \leq 0.49$; $618.8 \leq S \leq 743.5$).

In preliminary genetic diversity studies involving passion fruit plants, whose distance was estimated using agronomic variables or molecular markers of the dominant type, the UPGMA grouping method is becoming the most adopted one, such as in the work of Aukar et al. (2002), Crochemore et al. (2003ab), and Bellon et al. (2007). Other methods such as the neighbor-joining method used by Ganga et al. (2004) and the Ward method used by Viana et al. (2003) are also selected. The utilization of different grouping methods for the same purpose, without indicating the criterion of choice, may at least make it difficult to compare results obtained by different studies, since the results may be influenced by the method selected for the construction of the grouping matrix.

Grouping efficiency results obtained by the UPGMA method, based on the distance measurements assessed, showed little variation in regard to the cophenetic correlation coefficient ($0.65 \leq r_c \leq 0.75$) and great variation in the stress values ($11.9 \leq S \leq 43.9$) (Table 3). With the exception of stress values observed for the EDS and for C-DR (43.5 and 41.5; respectively), stress values for the other measurements were less than 38.5. The ED and AED that showed the lowest stress values (11.9) stand out. These results make it possible to classify the EDS and C-DR distance measurements as “inadequate” and ED and AED as “good,” according to the classification suggested by Kruskal (1964).

With regard to the similarity (and dissimilarity) coefficients, the efficiency results of groupings obtained with the UPGMA method were similar to those obtained for distance measurements, that is, a lower variation of the cophenetic correlation coefficient ($0.45 \leq r_c \leq 0.67$) and great variation in the stress values ($6.2 \leq S \leq 35.4$) (Table 4). For the stress values, the estimated distances showed, except for the Yule coefficient (stress = 35.4), values less than 15.4. The RR and S coefficients stand out as the lowest stress values (6.3 and 7.1,

respectively). The results obtained allow us to classify, according to Kruskal (1964), the RR and S coefficients as “excellent” and the others as, at least, “regular.”

The different distance measurements and the similarity (and dissimilarity) coefficients influence the results of characterizations of the passion fruit genotype groupings, since they show a wide variation in their results. Therefore, in diversity characterizations of passion fruit plants, based on quantitative data and dominant molecular markers, the use of Coler-Rodger distance measurements, the Euclidean distance square and the Yule coefficient must be avoided, since they show high stress values in the projection of data in two-dimensional space and in the construction of the grouping matrix. In the same way, the Roger and Tamino, and Russel and Rao similarity coefficients must also be avoided in characterizations of the passion fruit genetic variability, since they have a contrasting efficiency with regard to the projection of data in two-dimensional space and in the generation of the cophenetic matrix (grouping matrix). One should be aware of the type of population studied, because as discussed by Corrêa et al. (1999) the efficiency of methods may be influenced by the level of heterozygosity associated with the population studied, since the number of heterozygous loci is usually different between natural and improved populations as well as autogamous and allogamous species.

With regard to the grouping of passion fruit genotypes, the UPGMA may be adopted, based on different strategies for the estimation of distance in passion fruit plants, considering that it shows better values of distortion, cophenetic correlation and stress, compared to the other grouping methods tested.

Acknowledgments

Elisa Susilene Lisboa dos Santos, M.S. contributed to this work during the writing of this article, and Alan Silva Pereira, graduate student, also contributed during laboratory phases. Research supported by CNPq and Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular of UESC for having allowed the development of this research which is part of the master's dissertation of first author.

References

- Araújo FP, Silva NS and Queiroz MA (2008). Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* Mast com base em descritores morfoagronômicos. *Rev. Bras. Frutic.* 30:723-730.
- Arriel NHC, Di Mauro AOD, Di Mauro SMZ, Bakke OA, et al. (2006). Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD. *Pesq. Agropec. Bras.* 41: 801-809.
- Aukar APA, Lemos EGM and Oliveira JC (2002). Genetic variations among passion fruit species using RAPD markers. *Rev. Bras. Frut.* 24: 738-740.
- Ayres M, Ayres Junior M, Ayres DL and Santos AS (2005). *Programa BioEstat 5.0*. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e Biomédicas. Sociedade Civil Mamirauá, Belém, 324p.
- Balestre M, Von Pinho RG, Souza JC and Lima JL (2008). Comparison of maize similarity and dissimilarity genetic coefficients based on microsatellite markers. *Genet. Mol. Res.* 7: 695-705.
- Bellon, G, Faleiro FG, Junqueira KP, Junqueira NTV, et al. (2007). Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. *Rev. Bras. Frut.* 29: 124-127.
- Benin G, Carvalho FIF, Oliveira AC, Marchioro VS, et al. (2003). Comparações entre medidas de dissimilaridade e estatísticas multivariadas como critérios no direcionamento de hibridações em aveia. *Ciênc. Rural* 33: 657-662.
- Cardoso-Silva CB, Melo JRF, Pereira AS, Cerqueira-Silva CBM, et al. (2007). Estudo da diversidade genética mediante caracterização físico-química de frutos de maracujazeiros-dosono nativos. *Magistra* 19: 352-358.
- Corrêa RX, Abdelnoor RV, Faleiro FG, Cruz DC, et al. (1999). Genetic distances in soybean based on RAPD markers. *Bragantia* 58: 15-22.
- Crochemore ML, Molinari HB and Stenzel NMC (2003a). Caracterização agromorfológica do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). *Rev. Bras. Frut.* 25: 5-10.
- Crochemore ML, Molinari HBC and Vieira LGE (2003b). Genetic diversity in passion fruit (*Passiflora* spp.) evaluated by RAPD markers. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46: 521-527.
- Cruz CD (1990). *Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas*. Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento, Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 188p.
- Cruz CD (2001). *Programa Genes: Aplicativo computacional em genética e estatística*. Editora UFV, Viçosa, 648p.

Dias LAS (1998). Análises multidimensionais. In.: Alfenas AC (Ed.) *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Editora UFV, Viçosa, p.405-476.

Doyle JJ and Doyle JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.

Duarte JM, dos Santos JB and Melo LC (1999). Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. *Genet. Mol. Biol.* 22: 427-432.

Emygdio BM, Antunes IF, Choer E and Nedel JL (2003). Eficiência de coeficientes de similaridade em genótipos de feijão mediante marcadores RAPD. *Pesq. Agropec. Bras.* 38: 243-250.

Ganga RMD, Ruggiero C, Lemos EGM, Grili GVG, et al. (2004). Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares fAFLP. *Rev. Bras. Frut.* 26: 494-498.

Gonçalves LSA, Rodrigues R, Amaral Júnior AT, Karasawa M, et al. (2008). Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. *Genet. Mol. Res.* 1289-1297.

Jackson AA, Somers KM and Harvey HH (1989). Similarity coefficients: measures for co-occurrence and association or simply measures of occurrence? *American Naturalist* 133: 436-453.

Johnson RA and Wichern DW (1998). *Applied Multivariate Statistical Analysis*. Prentice-Hall, New Jersey. 607pp.

Kruskal JB (1964). Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a non-metric hypothesis. *Psychometrika* 29: 1-27.

Meyer AS, Garcia AAF, Souza AP and Souza CL Jr (2004). Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in maize (*Zea mays* L). *Genet. Mol. Biol.* 27: 83-91.

Mohammadi SA and Prasanna BM (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants - salient statistical tools and considerations. *Crop Science* 43: 1235-1248.

Viana AP, Pereira TNS, Pereira MG, Souza MM, et al. (2003). Genetic diversity among yellow passion fruit commercial genotypes and among *Passiflora* species using RAPD. *Rev. Bras. Frut.* 25: 489-493.

Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski LA, et al. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary initiator are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

Table 1. Spearman correlation coefficient⁽¹⁾ between seven distance measurements related to nine fruit physical-chemical description variables measured in 14 ‘yellow’ passion fruit genotypes.

Distance measurement	C-DR	ED	AED	GD	MGD	WDSR	EDS
Coler-Rodgers distance (C-DR)	-						
Euclidean distance (ED)	0.99	-					
Average Euclidean distance (AED)	0.99	1.00	-				
Gower distance (GD)	0.97	0.98	0.98	-			
Mahalanobis generalized distance (MGD)	0.65	0.58	0.58	0.59	-		
Weighed distance by the square of the residue (WDSR)	0.86	0.81	0.81	0.81	0.58	-	
Euclidean distance square (EDS)	0.99	1.00	1.00	0.98	0.58	0.81	-

⁽¹⁾ All the correlation coefficients presented in the table showed highly significant correlation values ($p < 0.001$).

Table 2. Spearman correlation coefficient⁽¹⁾ between 14 similarity coefficients related to DNA polymorphism identified based on DNA amplifications with 16 RAPD primers, detected in 20 ‘yellow’ passion fruit plants.

Coefficient	B	H	P	K	J	O	OII	RT	RR	S	SM	SD	SS	Y
Baroni (B)	-													
Hamman (H)	1.00	-												
Phi (P)	0.91	0.91	-											
Kulczynski (K)	0.98	0.98	0.83	-										
Jaccard (J)	0.90	0.98	0.82	1.00	-									
Ochiai (O)	0.98	0.98	0.82	1.00	1.00	-								
Ochiai2 (OII)	0.89	0.89	1.00	0.79	0.79	0.79	-							
Roger and Tamino (RT)	1.00	1.00	0.91	0.98	0.98	0.98	0.89	-						
Russel and Rao (RR)	0.68	0.68	0.36	0.79	0.80	0.79	0.31	0.68	-					
Sokal (S)	1.00	1.00	0.91	0.98	0.98	0.98	0.89	1.00	0.68	-				
Simple matching (SM)	1.00	1.00	0.91	0.98	0.98	0.98	0.89	1.00	0.68	1.00	-			
Sorensen-Dice (SD)	0.98	0.98	0.82	1.00	1.00	1.00	0.79	0.98	0.80	0.98	0.98	-		
Sokal and Sneath (SS)	1.00	1.00	0.91	0.98	0.98	0.98	0.89	1.00	0.68	1.00	1.00	0.98	-	
Yule (Y)	0.93	0.93	1.00	0.86	0.85	0.86	0.99	0.93	0.41	0.93	0.93	0.85	0.93	-

⁽¹⁾All the correlation coefficients presented in the table showed highly significant correlation values ($p < 0.001$).

Table 3. Efficacy of the projection of similarity (and dissimilarity) measurements and coefficients in two-dimensional space, in ‘yellow’ passion fruit plants, based on the distortion percentage, the correlation between the original and the projected (r) distance and stress values.

Measurements and coefficients ⁽¹⁾	Distortion (%)	Correlation (r)	Stress (%)
Coler-Rodgers distance (C-DR)	26.44	0.88	41.3
Euclidean distance (ED)	20.7	0.91	26.3
Average Euclidean distance (AED)	20.7	0.91	26.3
Gower distance (GD)	15.5	0.92	22.7
Mahalanobis generalized distance (MGD)	14.4	0.94	22.6
Weighed distance by the square of the residue (WDSR)	18.5	0.87	32.9
Euclidean distance square (EDS)	28.2	0.83	49.9
Baroni (B)	51.3	0.32	57.8
Hamman (H)	52.9	0.28	58.9
Phi (P)	50.3	0.29	57.6
Kulczynski (K)	53.8	0.29	60.3
Jaccard (J)	58.5	0.25	63.7
Ochiai (O)	53.7	0.29	59.9
Ochiai2 (OII)	55.3	0.27	61.2
Roger and Tamino (RT)	59.7	0.23	64.7
Russel and Rao (RR)	69.9	0.44	73.8
Sokal (S)	59.2	0.13	71.9
Simple matching (SM)	52.9	0.28	58.9
Sorensen-Dice (SD)	54.1	0.28	60.1
Sokal and Sneath (SS)	47.5	0.30	55.0
Yule (Y)	4.7	0.21	74.3

⁽¹⁾ The seven first lines of this column concern the distance measurements, and the other 14 lines are in regard to similarity (and dissimilarity) coefficients.

Table 4. Efficacy of five grouping methods (closest neighbor – VP; farthest neighbor – VD; Ward – W; Gower – WPGMC; and unweighted pair group method with arithmetic mean - UPGMA) from different similarity (and dissimilarity) measures and coefficients, based on criteria of distortion percentage (D), cophenetic correlation (r_c) and stress percentage values (S).

Measurements and coefficients ⁽¹⁾	VP			VD			W			WPGMC			UPGMA		
	D	r_c	S	D	r_c	S	D	r_c	S	D	r_c	S	D	r_c	S
Coler-Rodgers distance (C-DR)	83.2	0.38	64.7	-155.9	0.57	76.1	-2059.1	0.57	373.9	68.6	0.61	51.7	11.0	0.65	33.2
Euclidean distance (ED)	59.9	0.67	42.2	-156.7	0.63	71.2	-2311.0	0.70	395.7	71.0	0.67	49.8	5.0	0.75	22.3
Average Euclidean distance (AED)	59.9	0.67	42.2	-156.7	0.63	71.2	-2311.0	0.70	395.7	71.0	0.67	49.8	5.0	0.75	22.3
Gower distance (GD)	66.1	0.64	47.7	-163.4	0.61	75.2	-2277.6	0.62	384.2	64.1	0.66	45.6	6.8	0.71	26.1
Mahalanobis' generalized distance (MGD)	85.7	0.64	67.8	-221.6	0.65	98.4	-1529.4	0.60	318.1	51.3	0.64	51.8	13.6	0.75	36.1
Weighed distance by the square of the residue (WDSR)	93.2	0.33	79.4	-180.5	0.71	85.2	-1556.4	0.71	317.8	52.5	0.72	45.2	14.7	0.73	38.4
Euclidean distance square (EDS)	88.4	0.56	72.3	-476.6	0.51	164.4	-1477.0	0.60	312.9	65.4	0.67	53.6	18.9	0.67	43.5
Baroni (B)	39.3	0.19	26.2	-71.4	0.44	35.9	-6711.7	0.46	727.9	64.3	0.13	42.5	1.9	0.48	14.0
Hamman (H)	37.9	0.19	25.0	-64.7	0.45	33.1	-6754.3	0.46	730.4	64.7	0.11	43.1	1.7	0.49	13.2
Phi (P)	40.2	0.39	26.1	-65.5	0.45	34.2	-6536.3	0.49	717.3	62.5	0.25	40.9	1.76	0.55	13.3
Kulczynski (K)	39.2	0.21	25.8	-64.7	0.34	34.3	-6746.7	0.44	730.1	61.4	0.12	41.1	1.9	0.45	13.8
Jaccard (J)	0.34	0.23	22.2	-52.3	0.34	28.3	-6874.4	0.45	737.5	61.8	0.09	40.2	1.35	0.47	11.6
Ochiai (O)	39.3	0.21	25.9	-65.2	0.34	34.5	-6747.0	0.44	730.1	61.5	0.12	41.2	1.9	0.45	13.9
Ochiai2 (OII)	35.1	0.44	22.4	-51.8	0.48	27.4	-6865.1	0.46	737.2	57.6	0.35	36.7	1.2	0.57	11.2
Roger and Tamino (RT)	30.9	0.22	19.9	-46.2	0.46	24.5	-6920.5	0.47	740.1	61.8	0.12	39.6	1.0	0.51	10.2
Russel and Rao (RR)	19.4	0.54	19.4	-27.2	0.51	15.4	-6578.2	0.41	719.7	53.6	0.54	32.5	0.39	0.67	6.2
Sokal (S)	25.1	0.24	15.5	-29.4	0.44	16.6	-6976.4	0.44	743.5	58.5	0.18	36.2	0.51	0.54	7.1
Simple matching (SM)	37.8	0.19	25.0	-64.7	0.45	33.1	-6754.2	0.46	730.4	64.9	0.11	43.1	1.7	0.49	13.2
Sorensen-Dice (SD)	39.4	0.23	25.9	-66.3	0.33	34.8	-6722.7	0.44	728.7	65.4	0.04	44.0	1.9	0.46	13.8
Sokal and Sneath (SS)	42.7	0.18	28.7	-80.9	0.44	40.1	-6623.5	0.45	722.8	66.8	0.05	45.2	2.4	0.47	15.5
Yule (Y)	79.8	0.26	61.3	-278.3	0.39	110.3	-4942.4	0.44	618.8	70.7	0.32	54.3	12.5	0.48	35.4

⁽¹⁾ The seven first lines of this column concern the distance measurements, and the other 14 lines are in regard to similarity (and dissimilarity) coefficients.

CAPÍTULO 2

DISSIMILARIDADE GENÉTICA INTRA- E INTERESPECÍFICA EM MARACUJAZEIROS ‘AMARELO’ E ‘DO-SONO’ MEDIANTE DESCRITORES FÍSICO-QUÍMICOS DE FRUTOS

Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva¹; Cláudio Benício Cardoso-Silva²; Juliana Vieira Almeida Notato²; Ronan Xavier Corrêa¹ e Antonio Carlos de Oliveira².

Resumo

A dissimilaridade genética intra- e interespecífica entre 14 e oito genótipos de maracujazeiro ‘amarelo’ e o ‘do-sono’, foi avaliada por meio de nove descritores físico-químicos, cujos valores mensurados foram submetidos à estatísticas descritiva (média, desvio padrão e coeficiente de variação) e inferencial [univariada (ANOVA, teste de médias e correlações) e multivariada (distância de Mahalanobis, agrupamentos hierárquicos, coeficiente de Singh e teste de Mantel)]. Foi encontrada variabilidade intra- e, especialmente, interespecífica entre os maracujazeiros ($p < 0,001$). Os descritores sólidos solúveis totais, diâmetro equatorial, acidez titulável total e peso dos frutos apresentaram os maiores percentuais de contribuição relativa, totalizando 85,2% da divergência observada. Cruzamentos preferenciais entre genótipos com características físico-químicas de frutos desejáveis e dissimilaridade genética útil em cruzamentos divergentes e convergentes foram identificados.



Genetic dissimilarity through physical-chemical descriptors of fruits in ‘yellow’ passion fruit and ‘sleep’ passion fruit

Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva¹; Cláudio Benício Cardoso-Silva²; Juliana Vieira Almeida Notato²; Ronan Xavier Corrêa¹ and Antonio Carlos de Oliveira².

¹Lab. Genética Molecular Aplicada, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Dep. Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz. Km 16 Rod. Ilhéus-Itabuna. CEP: 45662-000, Ilhéus – Bahia, Brazil; ²Lab. Biologia Molecular, Departamento de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. *Campus Vitória da Conquista*. C.P. 95. CEP: 45083-900, Vitória da Conquista – Bahia, Brazil.

(Artigo Aceito para publicação, *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, x: xxx-xxx, 2009)

Abstract – The intra- and inter-specific genetic dissimilarity between 14 ‘yellow’ passion fruit plants and eight ‘sleep’ passion fruit plants were evaluated through nine physical-chemical descriptors, whose measured values were submitted to descriptive (average, standard deviation and variation coefficient) and inferential [univariate (ANOVA, averages and correlations tests) and multivariate (Mahalanobis distance, hierarchical clusterings, Singh coefficient and Mantel test)] statistics. Intra- and, especially, inter-specific variability were found among the passion fruit plants ($p < 0.001$). The total soluble solid, equatorial diameter, total titratable acidity, and fruit weight descriptors presented the highest percentage of relative contribution, totaling 85.2% of the observed

divergence. Preferential crossings among genotypes with physical-chemical characteristics of desirable fruits and useful genetic dissimilarity in divergent and convergent crossings were identified.

Key words: Diversity; multivariate analysis; *Passiflora edulis* Sims; *Passiflora setacea* DC; variability.

Introduction

The Passifloraceae family is originated from tropical America and comprises of about 530 species, of which approximately 150 are distributed in the Brazilian territory (Bernacci et al. 2005). Among these species, the ‘yellow’ passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is highlighted for being cultivated in a great majority of the Brazilian fields used for the production of passion fruit (Meletti et al. 2005), significantly contributing to the Brazil’s position as the world’s major passion fruit producer and exporter (Ferreira et al. 2005). However, the average productivity of the passion fruit plants in Brazil is considered low (Pimentel et al. 2008).

Among the factors that contribute to the low productivity are: occurrence of pests and pathogens, inadequate techniques of cultivation, heterogeneity of the orchards and the reduced number of improved genotypes available to the producers (Meletti et al. 2000; Pimentel et al. 2008). Several wild species of *Passiflora* genus present characteristics in potential for the genetic breeding of passion fruit culture; for example, resistance to pathogens, longevity, self-compatibility, better adaptation to adverse edafo-climatic conditions, enlarged period of flowering and to present physical-chemical characteristics of desirable fruits to the market (Meletti et al. 2005). The ‘sleep’ passion fruit (*P. setacea* DC) is among these species which presents both a resistance to pathogens and the physical-chemical characteristics of desirable fruits for the genetic breeding (Cardoso-Silva et al. 2007).

However, even though Brazil has the largest center of geographical distribution of the *Passiflora* species (Meletti et al. 2000) the effective use of this inter-specific variability in genetic breeding programs of the culture is still considered an open field (Nascimento et al. 2003), having few available results. In this sense, a growth in the number of works, including recent characterizations of genetic diversity of *Passiflora* through molecular markers (Bellon et al. 2007; Junqueira et al. 2008) and agronomic descriptors (Araújo et al. 2008; Negreiros et al. 2008) are observed. There are few publications, such as the ones by Cardoso-Silva et al. (2007) and Godoy et al. (2007), whose evaluation of genetic dissimilarity is based on physical-chemical descriptors which are intimately associated with the quality of the fruit, a major objective in the genetic breeding of fruit plants.

For species unrelated to the *Passiflora* genus, for example, the umbu-caja fruit (*Spondias* sp) and cassava (*Manihot esculenta*), diversity characterizations, through morphologic and physical-chemical descriptors, were already carried out in order to northern the selection of genotypes for hybridization (Ritzinger et al. 2008; Fonseca et al. 2008; Nick et al. 2008).

In order to guarantee and increase the productivity and the quality of the ‘yellow’ passion fruit, from hybridizations with wild species which present resistance to diseases, accompanied with the high organoleptic potential of fruits, the present work aimed (i) to quantify the intra- and inter-specific genetic dissimilarity among genotypes of ‘yellow’ passion fruit plants and ‘sleep’ passion fruit plants through the evaluation of physical-chemical descriptors of fruits; (ii) to estimate, under multivariate analysis, the relative contribution of each of the measured descriptors, and (iii) to identify preferential cross which can contribute to the genetic breeding of physical-chemical attributes of these species.

Material and Methods

An amount of the 22 genotypes of passion fruit plants, originating from natural pollination and belonging to the Active Collection of *Passiflora* Work Germplasm of the *Universidade*

Estadual do Sudoeste da Bahia (CAGT-Passiflora/UESB), Vitória da Conquista campus, Bahia (14°53'20"S and 40°47'54"W, an elevation of 900 m; average annual precipitation of 700-800 mm, concentrated between November and March, average annual temperature of 20-22°C) (Instituto Nacional de Meteorologia/Ministério da Agricultura e Abastecimento) were used. Of these genotypes, 14 are 'yellow' passion fruit (UESB-Pef-G1 a -G14), originating from the germination of seeds of fruits collected in *Vitória da Conquista* street markets and characterized for the reaction to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (Cerqueira-Silva et al. 2008), as well as possessing genotypes previously identified as for the high (UESB-Pef-G11 and -G13) and low (UESB-Pef-G3 and -G5) prolificity, e.g., production of fruits. The other eight genotypes are of 'sleep' passion fruit (UESB-Ps-G1 to -G8), prospected in native areas of *Vitória da Conquista*, presenting themselves without pests and diseases.

The passion fruit were randomly collected during the months of October and November of 2008, only those that were ripe and fallen on the ground with yellowish peel were harvest, solely in the case of the 'yellow' passion fruit. Soil differences and climate variability, possibly existing in the area were not considered. After harvest, the fruits, from 4 to 13 for genotype/species, were evaluated in the Laboratory of Molecular Biology of UESB - *Vitória da Conquista*, for nine physical-chemical descriptors: fruit weight (FW), equatorial diameter (ED), longitudinal diameter (LD), pulp weight with seeds (PWS), peel weight (PW), peel thickness (PT), pH, total soluble solids (TSS) expressed in °Brix and total titratable acidity (TTA). Fruit conformity index [CI=ED/LD] and pulp yield (PY) [PY (%) = (FW-PW/FW) x 100] were also calculated.

For physical characterizations, the fruits and the pulp were weighed with 0.01g of precision. The diameter measurements and peel thickness were obtained with a digital pachymeter Starrett® 727, with 0.01 mm of precision. LD was determined measuring the distance taken between the poles of the fruit, while ED was calculated in the larger equatorial dimension area of the fruit. For chemical characterizations, the pH was calculated employing Quimis® benchtop pHmeter. TSS contents were determined with a manual benchtop refractometer (Abbe model, ATAGO) with direct

reading and corrected for 20° C. Titratable acidity was determined collecting an aliquot of 10 mL of the pulp, following by titration with NaOH to 0.1N in pHmetro until pH 8.2; according to Carvalho (1990).

The statistical analyses used were of (i) descriptive type (average, standard deviation and variation coefficient of each descriptor); (ii) univariate [analysis of variance (ANOVA), followed by mean comparison test (Tukey)] and (iii) multivariate analyses [(iii.a) estimate of the dissimilarity among the genotypes through Mahalanobis generalized distance; (iii.b) clustering of the genotypes through hierarchical methods (Ward, Gower, More Distant Neighbor, Closer Neighbor, and unweighted pair-group method using arithmetic averages); (iii.c) clustering selection for two-dimensional representation (dendogram), based on the values of cophenetic correlation coefficient, distortion and stress; (iii.d) estimates of the relative contribution of each one of the descriptors, adopting Singh criterion (1981), and (iii.e) determination of the correlation values among the descriptors which more and less contribute for the divergence of the genotypes, obtained by Spearman test]. Data normality was verified through Lilliefors test.

For the analyses 'i', 'ii', 'iii.e' and normality test BioEstat 5.0 software was used (Ayres et al. 2005), and Genes software was adopted for the analyses 'iii.a-d' (Cruz, 2001).

Results and Discussion

The average results of the physical-chemical characteristics of fruits presented statistical differences both between the 'yellow' passion fruit plants and between 'sleep' passion fruit plants ($p < 0.001$) (Table 1), which certifies the existence of intra-specific genetic variability. Another indication regarding the intra-specific variability of these species is the percentage of variation coefficient (VC) checked among the genotypes for each one of the physical-chemical descriptors evaluated (Table 1). Except for the percentage of VC checked for TSS and TTA descriptors, the other VCs checked for 'yellow' passion fruit plants (between 6.5 and 21.9 %) and 'sleep' passion fruit plants (between 3.3 and 28.1%) are similar to the ones described by Nascimento et al. (2003)

when characterizing 'yellow' passion fruit progenies. When considering the 22 genotypes of passion fruit plants jointly, the percentile of VC (19% to 57%) are quite superior to the observed inside of each one of the two species (between 6.5 and 36.6% and 3.3 and 28.1% for 'yellow' passion fruit and 'sleep' passion fruit plants, respectively), attesting that the inter-specific dissimilarity is higher than the intra-specific ones.

The magnitude of the average of physical-chemical characteristics (Table 1) and the relative importance of them is the aggregation value in the commercialization of 'yellow' passion fruit plants and 'sleep' passion fruit plants which make it able to foresee the useful genotypes to be used in intra-and inter-specific hybridizations, since the observed values in this work are, as discussed below, similar or higher than those observed in the literature.

Higher levels of TSS superior to °Brix 13 are desired by the juice industry (Meletti et al. 2000; Fortaleza et al. 2005). We observe average result for 'sleep' passion fruit (TSS = 17.9) superior to the average found in 'yellow' passion fruit for Meletti et al. (2000), Nascimento et al. (2003), Godoy et al (2007) and Negreiros et al. (2008) (TSS = 16, 16.2, 13.1, and 15.7; respectively). In this work stands out UESB-Ps-G7 genotype was prominent with TSS °Brix of 19.4.

Average percentages of PY used by the industry (PY in around or superior to 45%) were partly detected in the 'yellow' passion fruit and 'sleep' passion fruit (PY of 41 and 61%, respectively) evaluated. These percentage observed were superior those reported by Ruggiero et al. (1996) of 19.00 to 38.00% and by Ritzinger et al. (1989) of 34.67% to 35.74% and around the average value observed by Godoy et al. (2007) (52.8%) for 'yellow' passion fruit. Attention is drawn to average results checked in the fruits of UESB-Pef-G8 (45%) and UESB-Ps-G6 (72%) genotypes.

In relation at the CI were observed 1.1 for 'yellow' passion fruit and 1.3 for 'sleep' passion fruit. Values similars were found by Fortaleza et al. (2005) found similar values for 'yellow' passion fruit (between 1.05 and 1.22). In this work stands out results checked for UESB-Pef-G5

(1.2) and UESB-Ps-G1, -G2 and -G7 (1.2) genotypes. These values are desirable for the juice industry, considering that the oblong fruits present a superior yield, in up to 10%, in relation to those found in round fruits (Fortaleza et al. 2005).

Although of great importance for a screening of genotypes in pre-breeding and preliminary characterizations of natural populations, the differences observed between the values obtained for the different physical-chemical descriptors of fruits may vary, in part, due to the influence of soil and climatic factors not controlled (Nascimento et al. 2003; Vianna-Silva et al., 2008).

Genetic dissimilarity among the genotypes was estimated from the 484 pairs of passion fruit plants, and revealed considerable genetic variability among genotypes of passion fruit (Table 2). The average genetic distances (D^2) were of 24.5 ($3.4 \leq D^2 \leq 72.8$) and 7.2 ($2.4 \leq D^2 \leq 16.6$) for the 196 pairs and 64 pairs of 'yellow' passion fruit and 'sleep' passion fruit genotypes, respectively. Inter-specific genotypes pairs with higher and lower distance [UESB-*Pef*-G3 vs. UESB-*Ps*-G8 ($D^2 = 369.9$) and UESB-*Pef*-G4 vs. UESB-*Ps*-G5 ($D^2 = 150.1$), respectively] were identified in the dissimilarity matrix (Table 2). These pairs of genotypes can be explored in divergent (with higher dissimilarity) and convergent (with lower dissimilarity) crossings. Inter-specific characterizations have not been reported so far, being this the first work of evaluation inter-specific genetic diversity, through physical-chemical descriptors of fruits among species of passion fruit plants.

The highest diversity values observed among genotypes of 'yellow' passion fruit plants in relation to the 'sleep' passion fruit plants can be explained as being of the consequence that they could come from different places, considering that the seeds that resulted from the 'yellow' passion fruit plants have been obtained from fruits bought in different production fields, when compared with the origin of a same area of the 'sleep' passion fruit seeds. Regarding high intra-specific variability, Junqueira et al. (2005), in studies carried out on 'suspiro' passion fruit (*P. nitida*) accesses, it was observed that access of different origins present a variability superior to the ones of the same origin.

Besides, the 'yellow' passion fruit genotypes were previously selected from a population of working that present genotypes with a high and low productivity and prolificity of the fruits. This contrast can have contributed to the verified value for D^2 average in 'yellow' passion fruit genotypes evaluated.

From the clustering analysis, carried out through the data of Mahalanobis generalized distance, clear inter-specific separation was detected between the 'yellow' passion fruit and the 'sleep' passion fruit plants (Figure 1). This clustering was obtained from the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) that exhibited the best projection coefficients (cophenetic correlation, distortion and stress of 0.94, 4.8, 21.9, respectively), in relation to the other tested methods. The separation of the species into different groups in the dendrogram (Figure 1), derives from the fact that the largest D^2 observed was found in inter-specific pairs that presented a D^2 average of 197.2 and corroborates with the values of VC intra- and inter-specific, previously discussed (Table 1). A higher inter-specific variability was also found when characterizing the variability of access of 'yellow' passion fruit plants and related species of *Passiflora* (Viana et al. 2003). In the present work, the genotypes that differentiated both to a lesser and greater degree were "UESB-*Ps*-G7 with UESB-*Pef*-G3" ($D^2 = 399.3$) and "UESB-*Ps*-G5 with UESB-*Pef*-G4 and UESB-*Pef*-G6" ($D^2 = 150$), respectively.

The relative contributions, individual and accumulated, of the analyzed descriptors for the genetic divergence were identified (Table 3). The characters that contributed more greatly to the genetic diversity were TSS (43.6%), ED (20.1%), TTA (11.9%), and FW (9.6%) which, together, represented 85.2% of the variability that is existent among the genotypes. These results reinforce the existent relationship for the differences of values of VC among the passion fruit plants concerning these physical-chemical characteristics (Table 1). It stands out that those descriptors of higher contribution for divergence of the genotypes are considered decisive in the characterization of the fruits as being appropriate for consumption '*in natura*' or for the production of industrialized juices (Fortaleza et al. 2005).

The correlation values existent among the descriptors that contribute with a greater and lesser degree to genetic divergence were high and significant ($r \geq 0.78$; $p < 0.01$) (Table 4). This high correlation among descriptors, associated to their values of relative contribution (Table 3), indicate that the descriptors of lower relative contribution for divergence (LD, PWS, PW, PT, and pH) highlight the same variation in descriptors of higher importance (TSS, ED, TTA, and FW). From these results, considering Singh (1981) criterion, the descriptors of lower contribution can be considered redundant and disregarded for the purpose of evaluation of new populations of plants, at least in the evaluated species. In studies of genetic characterization of ‘scrub’ passion fruit (*P. cincinnata*) the variables LD, PWS, PW, PT, and pH also presented lower relative contribution (Araújo et al. 2008).

All the physical-chemical descriptors present statistical differences among the ‘passion’ fruit plants and contribute to genetic divergence, standing out due to the elevated values of VC and percentages of relative contribution in the descriptors TSS, ED, TTA, and FW. The observed variability can be explored in divergent (UESB-*Pef*-G3 vs. UESB-*Ps*-G7) and convergent (UESB-*Pef*-G4 vs. UESB-*Ps*-G5) inter-specific crossings, as well as in crossings aimed at the growth in TSS (UESB-*Pef*-G4 vs. UESB-*Pef*-G7), pulp yield (UESB-*Pef*-G8 vs. UESB-*Ps*-G6) and conformity index (UESB-*Pef*-G5 vs. UESB-*Ps*-G7) content. Additionally to the genetic improvement of physical-chemical characteristics, the execution of inter-specific hybridizations between these species may allows the selection of hybrids genotypes of backcrossings between ‘yellow’ passion fruit and ‘sleep’ passion fruit plants, endowed with resistance genes from the ‘sleep’ passion fruit. Since the resistance this species is known to diseases that attack the passion fruit culture (Cardoso-Silva et al., 2007; Meletti et al., 2005).

Acknowledgements

To the CNPq (*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*) and FAPESB (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia*) for the Master's degree and Scientific Initiation scholarships granted to the first two authors, respectively.

Dissimilaridade genética de acessos de maracujazeiros ‘amarelo’ e ‘do-sono’ com base em características físico-químicas de frutos

Resumo – A dissimilaridade genética intra- e interespecífica entre 14 e oito genótipos de maracujazeiro ‘amarelo’ e o ‘do-sono’, foi avaliada por meio de nove descritores físico-químicos, cujos valores mensurados foram submetidos à estatísticas descritiva (média, desvio padrão e coeficiente de variação) e inferencial [univariada (ANOVA, teste de médias e correlações) e multivariada (distância de Mahalanobis, agrupamentos hierárquicos, coeficiente de Singh e teste de Mantel)]. Foi encontrada variabilidade intra- e, especialmente, interespecífica entre os maracujazeiros ($p < 0,001$). Os descritores sólidos solúveis totais, diâmetro equatorial, acidez titulável total e peso dos frutos apresentaram os maiores percentuais de contribuição relativa, totalizando 85,2% da divergência observada. Cruzamentos preferenciais entre genótipos com características físico-químicas de frutos desejáveis e dissimilaridade genética útil em cruzamentos divergentes e convergentes foram identificados.

Palavras-chave: Análise multivariada; diversidade; variabilidade; *Passiflora edulis* Sims; *Passiflora setacea* DC.

References

Araújo FP, Silva NS, Queiroz MA (2008) Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* Mast com base em descritores morfoagronômicos. **Revista Brasileira de Fruticultura** 30: 723-730.

- Ayres M, Ayres Junior M, Ayres DL, Santos AAS (2005) **Programa BioEstat 4.0**. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá, Manaus, 324p.
- Bellon G, Faleiro FG, Junqueira KP, Junqueira NTV, Santos EC, Braga MF, Guimarães CT (2007) Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura 29**: 124-127.
- Bernacci LC, Meletti LMM, Soares-Scott MD, Passos IRS (2005) Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 559-586.
- Cardoso-Silva CB, Melo JRF, Pereira AS, Cerqueira-Silva CBM, Oliveira AC (2007). Estudo da diversidade genética mediante caracterização físico química de frutos de maracujazeiros-do-sono nativos. **Magistra 19**: 352-358.
- Carvalho CRL, Mantovani DMB, Carvalho PRN, Moraes RM (1990) **Análise química de alimentos**, SP: ITAL, 121p.
- Cerqueira-Silva CBM, Moreira CN, Figueira AR, Corrêa RX, Oliveira AC (2008) Detection of a resistance gradient to Passion fruit woodiness virus and selection of ‘yellow’ passion fruit plants under field conditions. **Genetics and Molecular Research 7**: 1209-1216.
- Cruz CD (2001) **Programa Genes: Aplicativo computacional em genética e estatística**. Editora UFV, Viçosa, 648p.
- Ferreira, FR (2005) Recursos genéticos de *Passiflora*. In: Faleiro, FG.; Junqueira, NTV, Braga MF (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. Cap. 2, p. 41-50.
- Fonseca RM, Lopes R, Barros WS, Lopes MTG, Ferreira FM (2008) Morphologic characterization and genetic diversity of *Capsicum chinense* Jacq. accessions along the upper Rio Negro – Amazonas. **Crop Breeding and Applied Biotechnology 8**: 187-194.

Fortaleza JM, Peixoto JC, Junqueira NTV, Oliveira AT, Rangel LEP (2005) Características físicas e químicas em nove genótipos de maracujá-azedo cultivado sob três níveis de adubação potássica. **Revista Brasileira de Fruticultura 27**: 124-127.

Godoy RCB, Ledo CAS, Santos AP, Matos ELS, Lima AA, Waszczynskyj N (2007) Diversidade genética entre acessos de maracujazeiro amarelo avaliada pelas características físico-químicas dos Frutos. **Revista Ceres 54**: 541-547.

Junqueira KP, Faleiro FG, Ramos JD, Bellon G, Paula MS, Junqueira NTV, Braga MF (2005) Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro (*Passiflora nitida* Kunth.) com base nos marcadores moleculares. In: **IV Reunião técnica de pesquisas em Maracujazeiro**. IV RTPM, Planaltina, p.122-127.

Junqueira KP, Faleiro FG, Junqueira NTV, Bellon G, Ramos JD, Braga MF, Souza LS (2008) Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura 30**: 191-196.

Meletti LMM, Santos RR, Minami K (2000) Melhoramento do maracujazeiro-amarelo: obtenção do cultivar ‘composto iac-27’^{1,2}. **Scientia Agricola 57**: 491-498.

Meletti LMM, Soares-Scott MD, Bernacci LC, Passos IRS (2005) Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 55-78.

Nascimento WMO, Tomé AT, Oliveira MSP, Müller CH, Carvalho JEU (2003) Seleção de progênies de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) quanto à qualidade de frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura 25**: 186-188.

Negreiros JRS, Alexandre RS, Álvares VS, Bruckner CH, Cruz CD (2008) Caracterização de frutos de progênies de meios-irmãos de maracujazeiro-amarelo em Rio Branco - Acre. **Revista Brasileira de Fruticultura 30**: 431-437.

- Nick C, Carvalho M, Assis LHB, Carvalho SP (2008) Genetic dissimilarity in cassava clones determined by multivariate techniques. **Crop Breeding and Applied Biotechnology 8**: 104-110.
- Pimentel LD, Stenzel MNC, Cruz CD, Bruckner CH (2008) Seleção precoce de maracujazeiro pelo uso da correlação entre dados de produção mensal e anual. **Pesquisa Agropecuária Brasileira 43**: 1303-1309.
- Ritzinger R, Manica I, Riboldi J (1989) Efeito do espaçamento e da época de colheita sobre a qualidade do maracujá amarelo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira 24**: 241-245.
- Ritzinger R, Soares Filho WS, Carvalho PCL (2008) Evaluation of umbu-caja germplasm in the state of Bahia, Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology 8**: 181-186.
- Ruggiero C, São José AR, Volpe CA, Oliveira JC, Durigan JF, Baumgartner JG, Silva JR, Nakamura K, Ferreira ME, Kavati R, Pereira VP (1996) **Maracujá para exportação**: aspectos técnicos da produção. Brasília: EMBRAPA-SPI. 64p. (FRUPEX. Publicações Técnicas, 19).
- Singh D (1981) The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 41**: 237-245.
- Sousa JSI; Meletti LMM (1997) **Maracujá: espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ, 179 p.
- Vianna-Silva T, Resende ED, Viana AP, Pereira SMF, Carlos LA, Vitoria L (2008) Qualidade do suco de maracujá-amarelo em diferentes épocas de colheita. **Ciência Tecnologia de Alimentos 28**: 545-550.
- Viana AP, Pereira TNS, Pereira MG, Souza MM, Maldonado JFM, Amaral Junior AT (2003). Genetic diversity among yellow passion fruit commercial genotypes and among *Passiflora* species using RAPD. **Revista Brasileira Fruticultura 25**: 489-493.

Table 1. Averages, variation coefficients (VC) and results of Tukey test ($\alpha = 0.05$) regarding nine physical-chemical descriptors [fruit weight (FW), equatorial diameter (ED), longitudinal diameter (LD), pulp weight with seeds (PWS), peel weight (PW), peel thickness (PT), pH, total soluble solids (TSS) in °Brix and total titratable acidity (TTA)], evaluated in fruits of 14 ‘yellow’ passion fruit (UESB-*Pef*-G1 a -G14), superior part of the Table and eight ‘sleep’ passion fruit (UESB-*Ps*-G1 a -G8), inferior part of the Table.

Genotype	Physical-chemical descriptors of fruits								
	FW (g)	ED (mm)	LD (mm)	PWS (g)	PW (g)	PT (mm)	pH	TSS	TTA
UESB- <i>Pef</i> -G1	142.3 a	76.1 a	83.1 ab	58.6 a	83.6 a	8.3 a	3.3 bc	9.4 ab	8.6 bcd
UESB- <i>Pef</i> -G2	100.7 bc	64.2 bcd	68.9 bcd	41.4 bcd	59.2 bc	9.4 ab	3.3 bc	8.5 abcd	10.7 abc
UESB- <i>Pef</i> -G3	124.0 bc	68.5 bcd	74.1 bcd	50.7 abcd	73.2 ab	11.4 a	3.4 bc	5.3 bcdefgh	12.0 a
UESB- <i>Pef</i> -G4	127.2 ab	68.7 bc	82.2 ab	54.4 ab	74.5 ab	10.6 ab	3.3 bc	10.7 a	9.0 abcd
UESB- <i>Pef</i> -G5	157.3 a	72.1 ab	88.3 a	65.5 a	91.8 a	8.1 ab	3.4 bc	8.6 abcd	6.7 bcde
UESB- <i>Pef</i> -G6	108.9 bc	64.5 bcde	69.7 bcd	45.4 abcd	63.4 abc	8.9 ab	3.3 bc	9.5 abc	8.9 abcd
UESB- <i>Pef</i> -G7	99.3 bcde	62.5 bcde	69.9 bcd	38.2 bcde	61.1 bc	8.3 b	3.3 bc	7.8 bcde	7.6 bcd
UESB- <i>Pef</i> -G8	117.5 b	68.1 bc	74.9 b	52.6 ab	64.8 ab	9.5 ab	3.9 ab	5.1 bcdefgh	3.6 bcdef
UESB- <i>Pef</i> -G9	108.0 bcde	66.4 bcd	77.3 bc	44.6 bcd	63.3 bc	10.2 ab	4.1 a	3.8 bcdefgh	4.7 bcde
UESB- <i>Pef</i> -G10	98.3 bcd	65.3 bcd	75.1 bc	41.2 bcde	57.1 bc	9.6 ab	3.8 bc	5.1 bcdefgh	5.4 bcdef
UESB- <i>Pef</i> -G11	77.8 bcde	58.2 bcde	64.2 bcd	30.6 bcde	47.1 bc	10.4 ab	3.9 b	4.8 bcdefgh	4.3 bcdef
UESB- <i>Pef</i> -G12	101.3 bcd	64.2 bcde	71.1 bcd	40.7 bcde	60.5 bc	10.8 a	3.5 bc	6.3 bcdefgh	6.3 bcde
UESB- <i>Pef</i> -G13	90.2 bcde	62.9 bcde	65.2 bcd	31.8 bcde	58.4 bc	11.2 a	3.8 bc	4.7 bcdefgh	3.7 bcdef
UESB- <i>Pef</i> -G14	137.6 b	66.0 bcd	78.7 ab	57.2 abc	80.3 ab	10.4 ab	3.3 bc	6.7 bcdef	7.1 bcd
CV (%) em <i>Pef</i>	19.3	6.5	9.3	21.9	18.0	11.0	8.1	31.4	36.6
UESB- <i>Ps</i> -G1	54.4 a	44.1 a	52.0 bc	32.1 ab	22.4 a	2.8 a	3.2 a	18.1 ab	2.2 bc
UESB- <i>Ps</i> -G2	33.6 abc	35.7 bcdef	43.2 bcd	22.7 bc	10.8 bc	1.6 bc	3.0 bcd	17.0 bc	2.9 ab
UESB- <i>Ps</i> -G3	50.5 abc	38.7 bcde	56.4 ab	32.4 abc	17.7 bc	2.4 bcd	3.2 ab	17.2 bc	1.9 bc
UESB- <i>Ps</i> -G4	53.9 a	40.7 bc	56.4 ab	32.1 a	21.8 a	3.0 a	3.0 abc	18.2 ab	2.3 bc
UESB- <i>Ps</i> -G5	51.4 bc	41.2 bcd	54.0 a	33.4 ab	17.9 ab	2.5 a	2.9 bcd	17.4 ab	3.1 a
UESB- <i>Ps</i> -G6	33.4 abc	33.1 bcdef	48.4 bcd	24.0 bc	9.4 bc	1.5 bc	3.1 abc	17.3 ab	2.6 abc
UESB- <i>Ps</i> -G7	40.9 fabc	39.0 bcde	46.4 bcd	24.9 bc	16.0 bc	2.8 bc	3.1 abc	19.4 a	1.9 bc
UESB- <i>Ps</i> -G8	50.9 bc	38.7 bcde	59.7 a	35.1 bc	15.7 bc	1.9 bc	3.0 bcd	18.5 ab	2.2 bc
CV (%) em <i>Os</i>	19.0	8.6	10.8	16.4	28.1	24.4	3.3	4.5	18.6

Table 2. Measurements of intra- and interspecific dissimilarity of Mahalanobis generalized distance (D^2) between pairs of genotypes of *Passiflora* [‘yellow’ passion fruit (UESB-*Pef*-G1 a -G14) and ‘sleep’ passion fruit (UESB-*Ps*-G1 a G8)] through physical-chemical characterization of fruits.

Genótipos	<i>Pef1</i>	<i>Pef2</i>	<i>Pef3</i>	<i>Pef4</i>	<i>Pef5</i>	<i>Pef6</i>	<i>Pef7</i>	<i>Pef8</i>	<i>Pef9</i>	<i>Pef10</i>	<i>Pef11</i>	<i>Pef12</i>	<i>Pef13</i>	<i>Pef14</i>	<i>Ps1</i>	<i>Ps2</i>	<i>Ps3</i>	<i>Ps4</i>	<i>Ps5</i>	<i>Ps6</i>	<i>Ps7</i>	<i>Ps8</i>	
UESB- <i>Pef</i> -G1	0																						
UESB- <i>Pef</i> -G2	11.5	0																					
UESB- <i>Pef</i> -G3	37.8	14.6	0																				
UESB- <i>Pef</i> -G4	19.4	30.8	66.6	0																			
UESB- <i>Pef</i> -G5	10.5	24.2	50.4	22.7	0																		
UESB- <i>Pef</i> -G6	7.2	4.3	31.3	22.9	13.9	0																	
UESB- <i>Pef</i> -G7	11.1	6.7	27.6	30.8	12.9	3.6	0																
UESB- <i>Pef</i> -G8	36.0	37.0	49.3	60.3	25.1	31.7	21.9	0															
UESB- <i>Pef</i> -G9	46.6	37.9	40.7	68.7	38.1	40.5	27.1	6.1	0														
UESB- <i>Pef</i> -G10	27.7	23.3	32.0	49.7	24.6	23.9	12.4	6.5	4.7	0													
UESB- <i>Pef</i> -G11	43.6	29.9	41.4	62.3	34.8	28.4	16.7	8.1	5.9	5.3	0												
UESB- <i>Pef</i> -G12	21.0	13.1	24.9	38.5	18.7	12.3	6.0	9.4	10.9	3.9	5.5	0											
UESB- <i>Pef</i> -G13	49.7	38.7	47.9	72.8	41.5	35.6	22.9	9.2	10.1	9.2	3.4	8.6	0										
UESB- <i>Pef</i> -G14	16.2	12.8	26.7	30.7	7.7	9.3	5.0	17.3	23.5	12.7	16.5	5.3	22.0	0									
UESB- <i>Ps</i> -G1	180.2	211.4	329.5	162.3	164.2	160.2	178.5	219.0	265.5	234.6	220.5	211.6	234.8	195.3	0								
UESB- <i>Ps</i> -G2	190.0	209.8	322.5	176.9	170.5	160.9	174.8	224.0	268.6	236.1	217.0	211.9	233.3	192.9	7.2	0							
UESB- <i>Ps</i> -G3	192.9	221.5	336.7	167.5	165.7	170.4	183.5	224.4	267.3	236.9	222.1	216.5	241.5	195.5	6.8	7.5	0						
UESB- <i>Ps</i> -G4	196.1	230.4	350.5	167.4	172.5	177.3	194.7	239.0	285.1	252.0	239.7	228.9	257.3	206.8	4.6	11.4	2.4	0					
UESB- <i>Ps</i> -G5	169.9	198.2	310.2	150.1	151.7	149.6	165.6	212.6	257.5	223.2	211.8	200.6	228.7	180.1	3.9	5.3	3.2	3.1	0				
UESB- <i>Ps</i> -G6	211.5	233.9	350.8	188.1	184.1	182.6	195.8	244.3	287.7	256.1	236.8	232.8	257.3	210.3	10.0	3.7	2.5	6.9	5.6	0			
UESB- <i>Ps</i> -G7	237.5	268.4	399.3	212.9	219.0	211.2	232.4	283.4	334.6	299.6	280.2	271.3	295.7	251.6	4.9	8.9	10.5	7.2	9.3	9.5	0		
UESB- <i>Ps</i> -G8	213.7	248.8	369.9	182.0	186.1	195.3	210.1	256.8	302.0	267.0	256.7	247.0	279.1	221.8	13.7	16.6	3.2	3.5	6.9	7.4	15.4	0	

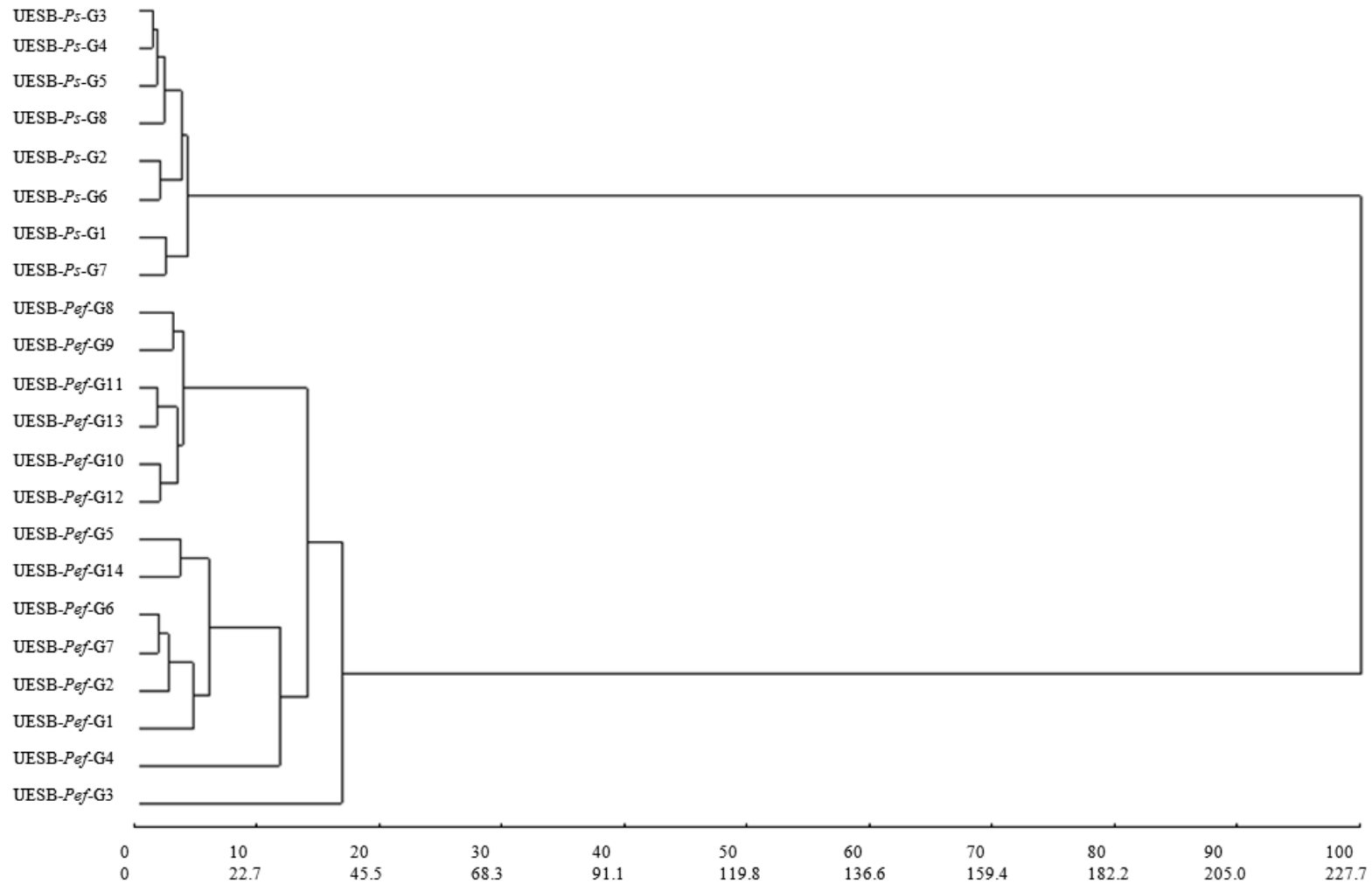


Figure 1. Clustering analysis of ‘yellow’ passion fruit (UESB-*Pef*-G1 a -G14) and ‘sleep’ passion fruit (UESB-*Ps*-G1 a -G8) genotypes. pertaining to the CAGT-*Passiflora*/UESB (*Coleção Ativa de Germoplasma de Trabalho de Passiflora da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia*, in *Vitória da Conquista*, Bahia, Brazil) carried out by UPGMA method, based on Mahalanobis generalized distance and using nine physical-chemical descriptors of fruits.

Table 3. Estimates of the relative contribution (S.j) of each physical-chemical descriptor of fruits for the genetic divergence between ‘yellow’ passion fruit and ‘sleep’ passion fruit plants. based on Mahalanobis generalized distance (D^2).

Descriptors	Relative contribution		
	S.j	Value (%)	Accumulated (%)
total soluble solids	15098.2	43.6	43.6
equatorial diameter	6965.1	20.1	63.8
total titratable acidity	4101.5	11.9	75.6
fruit weight	3333.6	9.6	85.2
peel thickness	2382.3	6.9	92.1
pulp weight with seeds	1320.9	3.8	95.9
pH	569.8	1.6	97.6
peel weight	487.4	1.4	99.0
longitudinal diameter	350.3	1.0	100.0

Table 4. Correlation coefficients between the descriptors of higher importance (in the horizontal) and those of less importance (in the vertical). for the nine physical-chemical descriptors of the analyzed fruits.

Descriptor	FW (g)	ED (mm)	TSS	TTA
LD (mm)	0.969	0.937	-0.767	0.691
PWS (g)	0.948	0.837	-0.568	0.663
PW (g)	0.991	0.979	-0.827	0.772
PT (mm)	0.824	0.920	-0.952	0.708
pH	0.503	0.653	-0.855	0.183

**The correlations presented values of $p < 0.01$; The acronyms are as presented in Table 1.

CAPÍTULO 3

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES SILVESTRES E CULTIVADA DE *PASSIFLORA* COM BASE EM MARCADORES RAPD

Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva; Leo Duc Haa Carson S. Conceição; Cláudio Benício Cardoso-Silva; Alan Silva Pereira; Elisa Susilene Lisboa dos Santos; Antonio Carlos de Oliveira e Ronan Xavier Corrêa

Resumo

A despeito da ampla variabilidade observada em passifloras (Passifloraceae; *Passiflora*), pouco se conhece sobre a diversidade genética da maioria das espécies deste gênero. Entretanto, tais informações são de suma importância para a conservação e melhoramento genético. Avaliamos por meio de *primers* RAPD, a diversidade genética de três espécies silvestre de *Passiflora* (*P. cincinnata*, *P. setacea* e *P. trintae*) e de genótipos em pré-melhoramento pertencentes à principal espécie cultivada (*P. edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg). Foram evidenciados (i) estreitamento da base genética nos genótipos em pré-melhoramento, em relação aos genótipos silvestres e (ii) gradiente de variabilidade nas espécies [*P. cincinnata* ($dg_{ij} = 51$), *P. setacea* ($dg_{ij} = 45$), *P. trintae* ($dg_{ij} = 30$) e *P. edulis* f. *flavicarpa* ($dg_{ij} = 19$)]. Os resultados permitem identificar genótipos convergentes e divergentes, sendo as discussões realizadas em termos da caracterização, conservação e melhoramento das *Passiflora* spp.

Genetic diversity in wild and cultivated species of *Passiflora* based on RAPD markers

C. B. M. Cerqueira-Silva¹; L. D. H. C. S. Conceição¹; C. B. Cardoso-Silva²; A. S. Pereira²; E. S. L. Santos¹; A. C. Oliveira² e R. X. Corrêa¹

¹ Laboratory of *Genética Molecular Aplicada*, Centro de Biotecnologia e Genética, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brazil;

² Laboratory of *Biologia Molecular*, Departamento de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, BA, Brazil.

Corresponding author: Ronan Xavier Corrêa

Postal address: Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Dep. Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz. Km 16 Rod. Ilhéus-Itabuna. CEP: 45662-000, Ilhéus – BA, E-mail: ronanxc@uesc.br, Phone number: (05573) 3680-5183, Fax number: (05573) 3680-5226

Running title: Genetic diversity in species of *Passiflora* spp.

(Artigo Submetido para publicação à *Biodiversity Conservation* em 20 - 03 - 2009)

Abstract. In spite of the wide variability observed in *Passiflora* (Passifloraceae), little it is known about the genetic diversity of most of the species of this genus. However, such information is extremely important for conservation and breeding programs. We evaluated the genetic diversity through RAPD *primers* for three wild species (*P. cincinnata*, *P. setacea*, and *P. trintae*) and genotypes in breeding belonging to the main cultivated species (*P. edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg). Narrowing of the genetic base in the genotypes in breeding regarding the wild genotypes and variability gradient in the species [*P. cincinnata* ($dg_{ij} = 51$), *P. setacea* ($dg_{ij} = 45$), *P. trintae* ($dg_{ij} = 30$) and *P. edulis* f. *flavicarpa* ($dg_{ij} = 19$)] were evidenced. The results allow identifying convergent and divergent genotypes, being the discussions carried out in terms of the characterization, conservation and genetic breeding of the *Passiflora* spp.

Key words: Coefficient of similarity, conservation, genetic breeding, genetic variability, grouping analyses, molecular marker.

Introduction

The Passifloraceae Juss. ex. DC. family belongs to the Violales order, Class Magnoliopsida and Phylum Magnoliophyta. It originates in tropical America and has an approximate number of 580 species and 18 genus (Bernacci et al., 2003; Souza and Meletti, 1997; Vanderplank, 1996). Among these, the *Passiflora* genus deserves prominence for forming a group of at least 400 species (Bernacci et al., 2003), among which is *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg, which presents greater economical interest among the *Passiflora* (Bellon et al., 2007).

In Brazil, the *Passiflora* genus presents at least 120 native species dispersed in its territory (Bernacci et al., 2005; Bernacci et al., 2003), for this reason it is considered as one of the main centers of genetic diversity of the group (Faleiro et al., 2005a). However, this diversity, which presents both economical and ecological interest, has its survival threatened due to the expressive reduction of the forest areas, caused by anthropic actions, for example, the high rates of deforestation that attack the tropical regions in a generalized way (Bernacci et al., 2005).

Among the tropical regions affected for the anthropic action are the fragments of jungle-forest vines, transition biome between scrub brush areas, arid plains and the Atlantic forest of *Vitoria da Conquista* city, in the State of Bahia, Brazil. This biome is also known as the *semidecidual* seasonal forest of Conquista's plateau (Rebouças et al., 2006). Consequently, the devastation of the native vegetation has accelerated and the fragmentation of habitats has been causing, directly or indirectly, loss of the genetic diversity, through extractivism or environmental changes. According to Queiroz et al. (1992), the loss of the genetic diversity of wild species of the *Passiflora* genus in the semi-arid regions, among other species of the Brazilian flora, are caused by the (i) formation of pastures; (ii) production of energy from vegetable biomass to be used in several activities such as baking in commercial bakeries, brick manufacture in brick factories and (iii) other types of industrial burnings. Regrettably, actions related to *Passiflora* preservation, as the search and maintenance of accesses in germplasm collections and banks, have not been receiving the attention they deserve (Souza and Meletti, 1997).

According to Meletti et al. (2005) species of the *Passiflora* genus, such as *P. setacea*, *P. cincinnata*, *P. caerulea*, *P. incarnata*, *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. nitida*, and *P. quadrangularis* have potential use in *Passiflora* breeding programs, considering that these native species present resistance to pests or diseases, greater longevity, a longer flowering

period, adaptation to adverse climatic conditions and high concentration of chemical components of pharmacological interest among other still unexplored potentialities. In relation to *Passiflora* species that occur in the jungle-like forest areas of *Vitoria da Conquista* city, the relates of studies are limited to the physical-chemical characterization of fruits of wild genotypes of *P. setacea* (Cardoso-Silva et al., 2007).

In spite of the lack of studies related to the characterization of the *Passiflora* genus, there are a great number of wild species that recognizably present the genetic variability wanted in breeding programs (Faleiro et al., 2006). Associated to the diversity of wild species which form the *Passiflora* genus, it is the interbreeding possibility among many of these species, and even intra-specific crossings, that makes the pre-breeding (e.g., search, characterization and germplasm conservation) a rational stage for expansion of the passion fruit culture and conservation of the biodiversity (Faleiro et al., 2006a; Faleiro et al., 2005a; Faleiro et al., 2005b).

In this sense, access to molecular polymorphism at the DNA level optimizes the generation of knowledge useful for diversity conservation and to subsidize *Passiflora* spp breeding programs (Ferreira and Rangel, 2005). In passion fruit plants, although different molecular techniques for estimating genetic variability were already applied, for example, the studies carried out using restriction enzymes of cpDNA sites (Sanchez et al., 1999), isoenzymes (Segura et al., 2003) and the amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Segura et al., 2002), the Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) (Bellon et al., 2007; Crochemore et al., 2003; Viana et al., 2003; Fajardo et al., 1998) evaluation prevails in the *Passiflora* genetic variability estimation studies.

The application of RAPD markers is not restricted to characterizations related to the *Passiflora* genus and, consequently, its efficiency in different genetic approaches can be attested to by the recent results obtained through the use of this technique in the solution of problems in different vegetable species, for example, the characterization of genetic variability among genotypes (Juchum et al., 2007; Pan et al., 2004; Pradeepkumar et al., 2003) and elucidation of the genetic structure of populations (Pham et al., 2008; Zhang et al., 2002). Data resulting from the use of RAPD markers has been generating information that is useful for the conservation (Juchum et al., 2007) and for the plant breeding programs (Pham et al., 2008; Pan et al., 2004).

In the present work we quantified, through RAPD primers and of the complement of Sorensen-Dice similarity index, the dissimilarity of genotypes originating from three wild populations of *Passiflora* spp. and of a work collection of *Passiflora edulis* f. *Sims flavicarpa*

O. Deg. The results are discussed in terms of the characterization, conservation and breeding programs of *Passiflora* spp.

Material and methods

Biological material

The genotypes evaluated in the present study totaled 94 individuals belonging to four species of *Passiflora* genus, namely: 22 genotypes of *P. cincinnata* Mast (*Pc*); 24 of *P. setacea* DC (*Ps*); 18 of *P. trintae* (*Pt*); and 20 of *Passiflora edulis* f. Sims *flavicarpa* O. Deg (*Pef*). The genotypes belonging to the first three species were collected in fragments of jungle-like forest in *Vitoria da Conquista, Bahia, Brazil* (14° 53' S and 40°47' W, elevation of 900 m; average annual precipitation of 700-800 mm, concentrated between November and March, average annual temperature of 20-22°C) (*Instituto Nacional de Meteorologia/ Ministério da agricultura e abastecimento*). In turn, the genotypes belonging to the 'yellow' passion fruit are from natural pollination and belonging to the Active Collection of *Passiflora* Work Germplasm of the *Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitoria da Conquista campus* (CAGT-*Passiflora*/UESB 'Planalto de Conquista'), and previously characterized as to the resistance to the *Passion fruit woodiness virus* (Cerqueira-Silva et al., 2008).

Molecular analyses

Samples of leaf tissues of all the 94 passion fruit plants were collected and stocked in an ultra freezer (- 80°C) until the moment of the DNA extraction, through Doyle and Doyle protocol (1990). For the reactions of amplification, standard procedures described for RAPD technique were adopted (Williams et al., 1990), being used between 12 and 16 primers per species (Table 1). These primers were previously selected, among the 40 *primers* that form the OPD and OPE series of Operon©, since they identified a greater amount of molecular polymorphism, of high genetic repeatability (data no showed).

The products of the amplifications were separate for agarose gel electrophoresis to 1.6%, stained with ethidium bromide submerged in TBE 1X (composed by Tris-borate and EDTA buffer). After the electrophoresis, the gels were photographed under ultraviolet light in photo documentation system EDAS 290 (Kodak). The bands pattern observed was used for the construction of a binary data matrix (considering 0 for absence and 1 for presence of bands). Aiming at guaranteeing the reliability of the data, the electrophoretic patterns were

evaluated for two researchers, being considered for the analyses the consensus pattern among the evaluators.

Statistic Analyses

Procedures of multivariate statistics were carried out: (i) estimation of the complement of genetic similarity ($dg_{ij} = 1 - sg_{ij}$; being similarity = sg_{ij} and dissimilarity = dg_{ij}), from the Dice coefficient (Dice, 1945); (ii) genotypes clustering through the unweighted arithmetic average method (UPGMA), being this selected among other hierarchical methods (Ward, Gower, Complete Linkage, Single Linkage) for presenting the smallest distortion and stress values, as well as the largest values of cophenetic correlation (data not presented); (iii) projection of the data in bidimensional space and (iv) evaluation of the quality of the clusterings and of the projection in bidimensional space through the estimation of the distortion, stress and correlation values.

For evaluating the efficiency of the clustering matrix and the projection of the data in a bidimensional plain the classification proposed by Kruskal et al., (1964) was considered, namely perfect ($\leq 5\%$); excellent ($> 5\%$ and $\leq 10\%$); good ($> 10\%$ and $\leq 20\%$); regular ($> 20\%$ and $\leq 40\%$) and unsatisfactory ($> 40\%$). The statistical analyses were carried out with the assistance of the Genes software, version Windows (Cruz, 2001).

Results

The reactions of amplification carried out produced a number of RAPD bands varying from 92 to 113, and the average number of bands per primer oscillating from 5.7 to 9.4 among the four evaluated species of passion fruit plants (Table 2). The largest number of polymorphic bands was observed among the genotypes of 'Ps' (107), while the smallest number of these bands was observed among the genotypes of 'Pef' (54). This last species also presented the largest number of monomorphic bands (38), while only one monomorphic mark was observed for 'Pc'.

The values of the dissimilarity average, obtained by the complement of the Dice index, among the pairs of genotypes in each one of the four species of *Passiflora* spp. varied between 0.51 and 0.19, being these extreme values observed for 'Pc' and 'Pef' respectively (Table 3). The smallest variability values were observed among 'Pef' genotypes, whose distances varied from 0.03 to 0.23. In an opposite way, 'Pc' genotypes presented high variability, with distance values oscillating between 0.20 and 0.80. Thus, a growing level of

diversity was observed among the genotypes of '*Pef*', '*Pt*', '*Ps*', and '*Pc*', attesting to the variability among the wild genotypes of '*Ps*' and '*Pc*' and a narrowing of the genetic base among the wild genotypes of '*Pt*' and in breeding of '*Pef*'. These results indicate that special attention should be given to '*Pt*' and '*Pef*', both for search and conservation of '*Pt*' biodiversity and for identification of divergent genotypes to be explored in initial stages of breeding programs in '*Pef*'. In agreement with the variability gradient presented in the Table 3, there is the record of 21 accesses of '*Pc*' and 10 accesses of '*Ps*' in germplasm collections of Brazilian *Passiflora* (Ferreira, 2005). The same author does not present record of accesses of '*Pt*' in any of the germplasm collections consulted by him.

The matrix clustering obtained through the UPGMA presented percentile values of stress oscillating between 12.8% and 22.3% among the genotypes of '*Ps*' and '*Pt*', respectively (Table 4). The clustering matrix also presented variation for the values of the coefficient of cophenetic correlation (0.46 to 0.76) and for the percentile of distortion (1.93 and 13.2%). In turn, the projections of the distance data in the bidimensional plain presented high percentile values of stress (> 56.9%) and distortion (> 49.8%) and low correlation values between the distance matrix and the projection matrix (< 0.49) (Table 4).

The dendrograms obtained through the UPGMA method presented, for each evaluated species, distance values varying between 0.34 and 0.60 for '*Pc*', 0.35 and 0.50 for '*Ps*', 0.13 and 0.34 for '*Pt*', and 0.11 and 0.19 for '*Pef*' (Figures 1 to 4). The visual evaluation of the clusters allows identifying homogeneous groups formed by genotypes that present low variability among themselves. It is also possible to identify in the dendrograms the groups of genotypes that present the largest intergroups distances.

Discussion

The reduced number of polymorphic bands (54) and the low average relationship of RAPD bands for primer (5.7) observed among the genotypes of '*Pef*', in relation to the other evaluated species (Table 2), can be at least partly explained by the origin of the evaluated germplasm. The genotypes of '*Pef*', considered in this study are from the pollination of genotypes cultivated in production field being, although indirectly, fruits from participative breeding or local selections carried out by their own producers. In turn, for the other species, the evaluated individuals are from natural pollination among wild genotypes.

The variability values observed in the present study for the genotypes in breeding of '*Pef*' ($dg_{ij} = 19$), as well as for the wild genotypes of '*Pc*' ($dg_{ij} = 51$), '*Ps*' ($dg_{ij} = 45$) and '*Pt*'

($dg_{ij} = 30$), are according to the data available in the literature for intra- and inter-specific characterizations carried out in species of passion fruits through RAPD markers. Among the molecular studies that attest to the variability of the *Passiflora* genus are the characterization of the genetic variability of *P. nitida* (Junqueira et al., 2007) and '*Pef*' (Bellon et al., 2007) as well as the estimation of inter-specific variability among *Passiflora* spp (Viana et al., 2003; Crochemore et al., 2003; Aukar et al., 2002; Fajardo et al., 1998). However, although the researches attest to wide variability inherent to the passifloras, these studies also demonstrate, at least for commercial genotypes, smaller genetic variability in '*Pef*' cultivated species (Bellon et al., 2007; Viana et al., 2003; Fajardo et al., 1998). Thus, the characterization of genetic variability among genotypes of '*Pef*' effectively contributes to identification of pairs of divergent individuals that allow exploring the maximum variability still existent for materials from breeding of the species.

In turn, the intra-specific variability characterizations are extremely important for species as '*Ps*' and '*Pt*', that taking as a basis the data presented by Ferreira (2005), present reduced or none representation in collections of Brazilian germplasm. For these species, the studies of characterization of the intra-specific variability present an even larger value.

The molecular characterization of the genetic variability of species contributes both to the conservation and the conducting of breeding stages, allowing: the diagnosis of narrowing of the genetic basis of natural populations and active germplasm banks; the choice of preferential genotypes to be prospected; and to determine convergent and divergent crossings intra- or inter-specifically among wild and commercial genotypes. As much as it is known, this is the first record as for the estimation of intra-specific genetic variability, through molecular markers, for the species *P. cincinnata*, *P. setaceae* and *P. trintae*. Although growing, the number of researches dedicated to the characterization of *Passiflora* germplasm is considered incipient even for '*Pef*' (Nascimento et al., 2003), for which most of the researches are concentrated (Araújo et al., 2008).

The percentile values of stress (< 22.3%) observed for the clustering matrix obtained by UPGMA method (Table 4), allow the classification, according to Kruskal et al. (1964), the clusterings evaluated as 'regular', among the genotypes of '*Pt*' and as 'good', among the genotypes of the other evaluated species. In turn, the high percentile values of stress (> 56.9%) observed for the projection of the distances in the bidimensional plain (Table 4) are considered as inadequate for the classification of Kruskal et al. (1964). Thus, the visual representation of the intra-specific variability, observed among the genotypes of the four

appraised species, should be carried out through dendrograms and not through dispersion graphs.

The clusterings showed in the dendrograms, for each evaluated species, allow visualizing the narrowing of '*Pef*' genetic base (Figure 1), comparatively in relation to the other considered species (Figures 2, 3 and 4). These clusterings reflect well the presented results for the distance estimation (Table 3), and may assist in the selection of convergent and divergent genotypes to be prospected from areas of active forest to be conserved in active banks or collections of germplasm. In this context, the increment of accesses in germplasm banks allows both the conservation of the genetic variability and the increment of this variability in breeding programs (Faleiro et al., 2005b). In passion fruit plants, the number of species and accesses maintained in work collections and active banks of germplasm is considered 'modest', both in national and international extent, to represent the wide variability of the genus (Souza and Meletti, 1997). The increment of banks or collections of germplasm work, similarly to CAGT/Passiflora/UESB '*Planalto de Conquista*', based on criteria seated in the molecular genetic diversity of almost endemic species (for exemple. *P. setacea*) or of location (for example, *P. trintae*), compete for the conservation and use in breeding programs.

The knowledge related to the biological and ecological characteristics, as well as the characterization of the genetic base, is important information for conservation and use of the species variability, and the species that present reduced distribution and, or are endangered deserve special attention (Juchum et al. 2007), for example, '*Pt*' that has restricted occurrence, being found in the North of Minas Gerais and in Bahia state (Nunes & Queiroz, 2006). As for '*Ps*' and '*Pc*' species, whose fruits are commercialized in free markets and whose use is recently expanding on a semi-industrial scale (Araújo et al., 2007), they possess enormous potential for the intra-specific improvement aiming at aggregating commercial values to their fruits.

Due to that, it becomes indispensable to know the genetic variability of these natural populations, aiming at selecting individuals with the largest possible intra-specific variability. Besides, the wild species of occurrence in the Brazilian semi-arid regions can present genes for resistance the certain pathogens, which can be of interest in the breeding of the varieties of larger commercial interest (Ferreira & Oliveira, 1991).

Acknowledgements

To Master Juliane Amorim dos Santos and to the biologist Camile Barbosa Moreira for assistance in laboratory stages. To the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) and the *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia* (FAPESB) for the scholarships granted to the authors.

References

- Araújo FP de (2007). Caracterização da variabilidade morfoagronômica de maracujazeiro (*Passiflora cincinnata* Mast.) no semi-árido brasileiro. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus Botucatu. Faculdade de Ciências Agrônomicas. 94p. Tese (Doutorado).
- Araújo FP, Silva NS, Queiroz MA (2008) Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* Mast com base em descritores morfoagronômicos. *Revista Brasileira de Fruticultura* 30:723-730.
- Aukar APA, Lemos EGM and Oliveira JC (2002) Genetic variations among passion fruit species using rapd markers. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24: 738-740.
- Bellon, G, Faleiro FG, Junqueira KP, Junqueira NTV, Santos EC, Braga MF, Guimarães CT (2007) Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura* 29:124-127.
- Bernacci LC (2003) Passifloraceae. In: Wanderley MGL, Shepherd GJ, Giuliatti AM, Melhem TS (coord.) *Flora fanerogâmica do estado de São Paulo*. São Paulo, RIMA/FAPESP, pp. 247-248.
- Bernacci LC, Meletti LMM, Soares-Scott MD, Passos IRS (2005) Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (ed.) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina, Embrapa Cerrados, pp. 559-586.
- Cardoso-Silva CB, Melo JRF, Pereira AS, Cerqueira-Silva CBM, Oliveira AC (2007). Estudo da diversidade genética mediante caracterização físico química de frutos de maracujazeiros-do-sono nativos. *Magistra* 19: 352-358.
- Carneiro MS, Camargo LEA, Coelho ASG, Vencovsky R, Leite Junior RP, Stenzel NMC, Vieira MLC (2002) RAPD based genetic linkage maps of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). *Genome* 45: 670-678.
- Cerqueira-Silva CBM, Moreira CN, Figueira AR, Corrêa RX, Oliveira AC (2008) Detection of resistance gradient to the Passion fruit woodiness virus and selection of yellow passion fruit plants in field conditions. *Genetics and Molecular Research* 7:1209-1216.

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.

Cruz CD (2001) Programa Genes: Aplicativo computacional em genética e estatística. Editora UFV, Viçosa, 648 p.

Dice LR (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26:297-302.

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

Fajardo 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.

Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (2005a) Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro - Desafios da Pesquisa. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (eds.) Maracujá: Germoplasma e Melhoramento Genético. Planaltina, Embrapa Cerrados, pp. 187-210.

Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (2005b). Pré-melhoramento de *Passiflora*. In: Fávero AP, Ferreira MAJF, Neto EL (Org.) Encontro da sociedade brasileira de melhoramento de plantas, Regional DF. Brasília-DF, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (2006) Importância e avanços do pré-melhoramento de passifloras In: Lopes MA, Fávero AP, Ferreira MAJF, Faleiro FG (org.) Curso internacional de pré-melhoramento de plantas. Brasília-DF, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pp. 138-142.

Ferreira FR, Oliveira JC (1991) Germoplasma de passiflora In: São José AR, Ferreira FR, Vaz RL (Coord.) A cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEP, pp. 187-200.

Ferreira, FR (2005) Recursos genéticos de *Passiflora*. In: Faleiro, FG.; Junqueira, NTV, Braga MF (Ed.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, pp. 41-50.

Ferreira FR, Rangel PHN (2005) Emprego de espécies silvestres no melhoramento genético vegetal: experiência em outras espécies com análise de retrocruzamento avançado de QTLs (AB-QTL) In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (ed.) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, pp. 109-140.

Juchum FS, Leal JB, Santos LM, Almeida MP, Ahnert D, Corrêa RX (2007) Evaluation of genetic diversity in a natural rosewood population (*Dalbergia nigra* Vell. Allemão ex Benth.) using RAPD markers. Genetics and Molecular Research 6:543-553.

Junqueira KP, Faleiro FG, Ramos JD, Bellon G, Junqueira NTV, Braga MF (2007) Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares. Revista Brasileira de Fruticultura 29:571-575.

Junqueira KP, Faleiro FG, Junqueira NTV, Bellon G, Ramos JD, Braga MF, Souza LS (2008). Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura* 30:191-196.

Kruskal JB (1964) Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a non-metric hypothesis. *Psychometrika* 29:1-27.

Meletti LMM, Soares-Scot MD, Bernacci LC, Passos IRS (2005) Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (Ed.) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina: Embrapa Cerrados, pp. 55-78.

Nascimento WMO, Tomé, AT, Oliveira MSP, Müller CH and Carvalho JEU (2003) Seleção de progênies de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) quanto à qualidade de frutos. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25: 186-188.

Nunes TS, Queiroz LP (2001). A família Passifloraceae na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Sitientibus Série Ciências Biológicas*. vol.1, p.33-46.

Pan YB, Burner DM, Legendre BL, Grisham MP, White WH (2004) An assessment of the genetic diversity within a collection of *Saccharum spontaneum* L. with RAPD-PCR. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51:895–903.

Pham TD, Bui TM, Werlemark G, Bui TC, Merker A, Carlsson AS (2008) A study of genetic diversity of sesame (*Sesamum indicum* L.) in Vietnam and Cambodia estimated by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* DOI 10.1007/s10722-008-9393-z

Pradeepkumar T, Karihaloo JL, Archak S, Baldev A (2003) Analysis of genetic diversity in *Piper nigrum* L. using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 469–475, 2003.

Queiroz MA, Nascimento CES, Silva CMM, Lima JLS (1992) Fruteiras nativas do semi-árido do Nordeste brasileiro: algumas reflexões sobre os recursos genéticos. In: *Simpósio Nacional de Recursos Genéticos de Fruteiras Nativas, Cruz das Almas, BA. (Anais...)* Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF, pp. 87-92.

Rebouças ACMN, Souza AM, Santos JG, Pina ES, Sá Neto R (2006) Comparação da diversidade do banco de sementes de uma pastagem e um fragmento de mata de cipó em vitória da conquista – Bahia. 58ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (Anais...), Resumo 1280.

Sánchez I, Angel F, Grum M, Duque MC, Lobo M, Tohme J, Roca W (1999) Variability of chloroplast DNA in the genus *Passiflora* L. *Euphytica* 106:15-26.

Segura SD, Coppens d'EG, Ocampo CH, Ollitrault P (2003) Isozyme variation in *Passiflora* subgenera *Tacsonia* and *Manicata*. Relationships between cultivated and wild species. *Genetic resources and Crop Evolution* 50:417-427.

Segura SD, Coppens D'EG, Bohorquez A, Ollitrault P, Tohmé J (2002) An AFLP diversity study of the genus *Passiflora* focusing on subgenus *Tacsonia*. *Genetic resources and Crop Evolution* 49:111-132 DOI 10.1023/A:1014731922490.

Souza JSI, Meletti LMM (1997) Maracujá: espécies, variedades, cultivo. Piracicaba, FEALQ, 179 p.

Vanderplank J (1996) Passionflowers. 2th ed. London: Cassel.

Viana AP, Pereira TNS, Pereira MG, Souza MM, Maldonado JVM, Amaral Junior AT (2003) Genetic diversity among yellow passion fruit commercial genotypes and among *Passiflora* species using RAPD. Revista Brasileira de Fruticultura 25:489-493.

Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski LA, Tingel SV (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary initiator are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18:6531-6535.

Zhang ZQ, Salomon B, Bothmer RV (2002) Application of random amplified polymorphic DNA markers to evaluate intraspecific genetic variation in the *Elymus alaskanus* complex (Poaceae). Genetic Resources and Crop Evolution 49:397-407.

Table 1 Description of the germplasm and the molecular (primers) markers used in the characterization of the *Passiflora* spp diversity.

Species*	Total genotypes	Primers RAPD (Operon**)
<i>Pef</i>	20	D-03, -05, -07, -11, -13, -16, -18, and -20 E-01, -02, -03, -04, -07, -14, -15, and -18
<i>Pc</i>	32	D-02, -05, -08, -12, and -18 E-03, -04, -05, -06, -07, -11, and -12
<i>Ps</i>	24	D-03, -05, -07, and -11 E-07, -09, -11, -15, -16, -17, -18, and -19
<i>Pt</i>	18	D-01, -02, -05, -07, -11, -12, -13, -18, and -20 E-01, -02, -03, -09, and -11

* *Pef* = *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg., *Pc* = *Passiflora cincinnata* Mast, *Ps* = *P. setacea* DC, and *Pt* = *P. trintae*. ** <http://www.operon.com>

Table 2 Descriptive analysis of the molecular evaluations in four passion fruit plant species (*Passiflora* spp.) through RAPD markers.

Species*	Total Primers	Polymorphic Bands	Monomorphic bands	Bands for primer
<i>Pef</i>	16	54	38	5.7
<i>Pc</i>	13	95	1	7.4
<i>Os</i>	12	107	6	9.4
<i>Pt</i>	14	96	17	8.0

* The description of the species follows as presented in Table 1.

Table 3 Genetic distance obtained through the complement of Dice-Sorenso similarity index among pairs of genotypes of four species of *Passiflora* spp., genotyped through RAPD markers.

Items considered	Species de <i>Passiflora</i> evaluated *			
	<i>Pef</i>	<i>Pc</i>	<i>Ps</i>	<i>Pt</i>
Mean	0.19	0.51	0.45	0.30
Standard derivation	0.03	0.12	0.06	0.09
Minimum distance	0.12	0.20	0.32	0.01
Maximum distance	0.26	0.80	0.60	0.47
Range of distances	0.14	0.60	0.28	0.46
Number of comparisons	400	1024	576	324

* The description of the species follows as presented in Table 1.

Table 4 Efficiency of the clustering matrix and of the projection of the distances in the bidimensional plain, from the diversity observed among genotypes of *Passiflora* spp. through access of molecular polymorphism through RAPD technique.

Species*	Grouping of genotypes			Projection of the distances		
	Distortion	CCC	Stress	Distortion	R	Stress
<i>Pef</i>	1.93	0.46	13.8	54.1	0.28	60.1
<i>Pc</i>	2.05	0.76	14.3	55.6	0.49	61.1
<i>Ps</i>	13.2	0.44	12.8	66.1	0.21	70.3
<i>Pt</i>	5.00	0.60	22.3	49.8	0.44	56.9

CCC = coefficient of cophenetic correlation and r = correlation between the original distance and the distance projected in the bidimensional plain. * The description of the species follows as presented in Table 1.

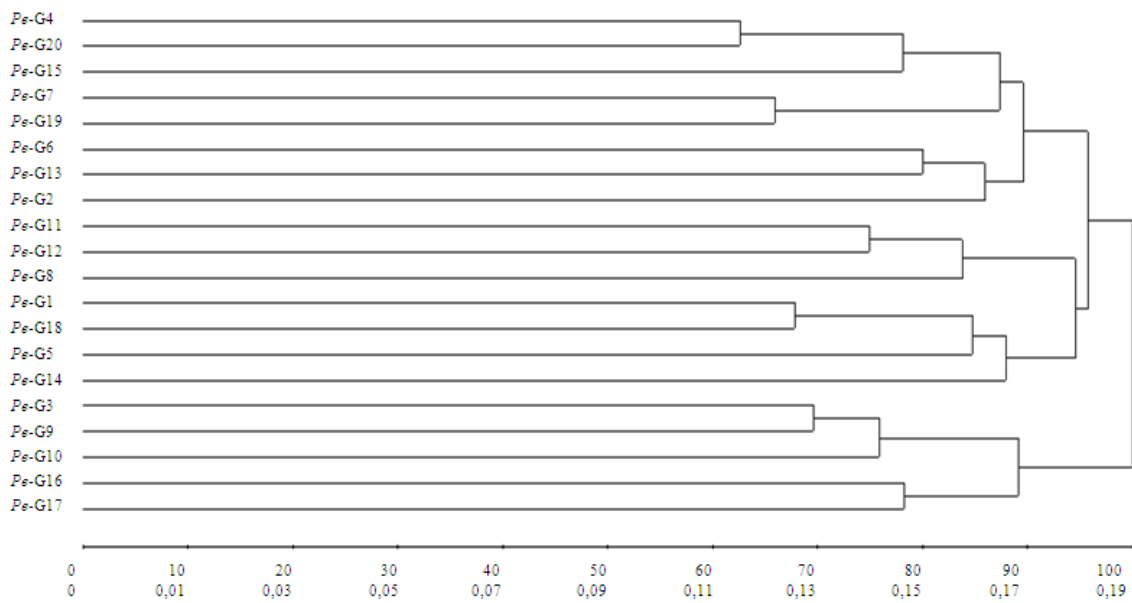


Figure 1 Clustering of 20 ‘yellow’ passion fruit genotypes (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg) obtained through the clustering method based on the unweighted arithmetic average method (UPGMA) of distances estimated for the Dice-Sorenso coefficient from RAPD bands. *Pe*-G1 to -G20 corresponds to the evaluated genotypes.

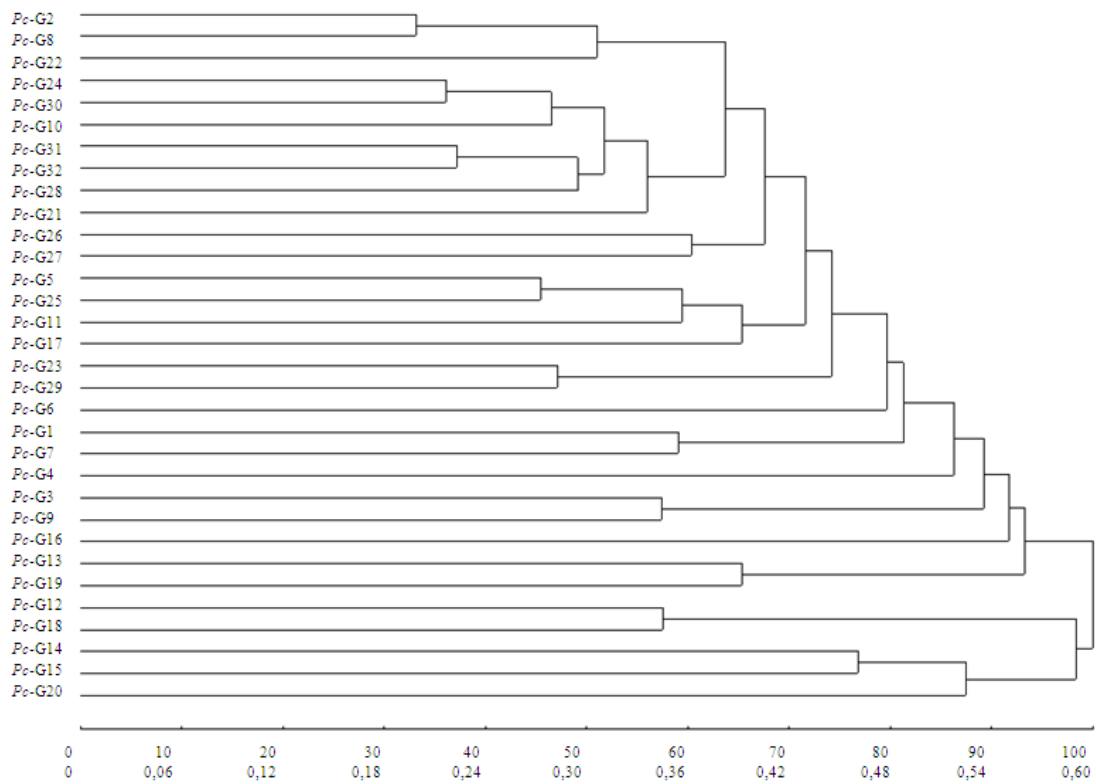


Figure 2 Clustering of 32 *Passiflora cincinnata* obtained through the clustering method based on the unweighted arithmetic average method (UPGMA) of distances estimated for the Dice-Sorenso coefficient from RAPD bands. *Pc*-G1 to –G32 corresponds to the evaluated genotypes.

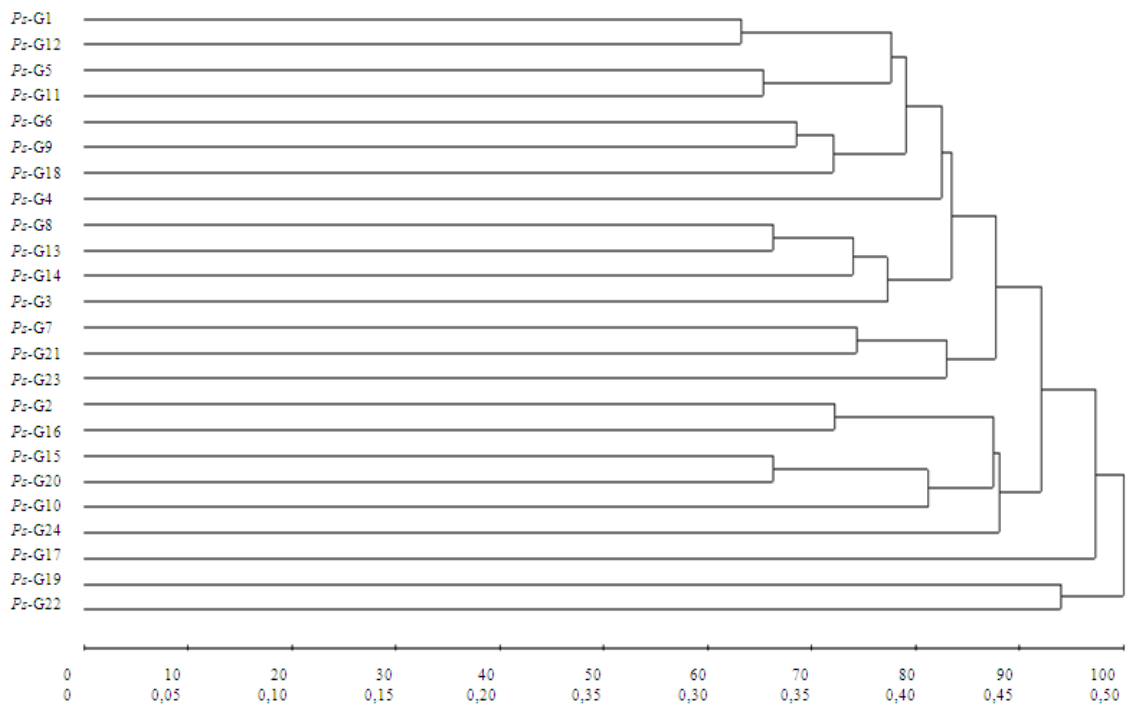


Figure 3 Clustering of 24 *Passiflora setacea* obtained through the clustering method based on the unweighted arithmetic average method (UPGMA) of distances estimated for the Dice-Sorenso coefficient from RAPD bands. *Ps*-G1 to -G24 corresponds to the evaluated genotypes.

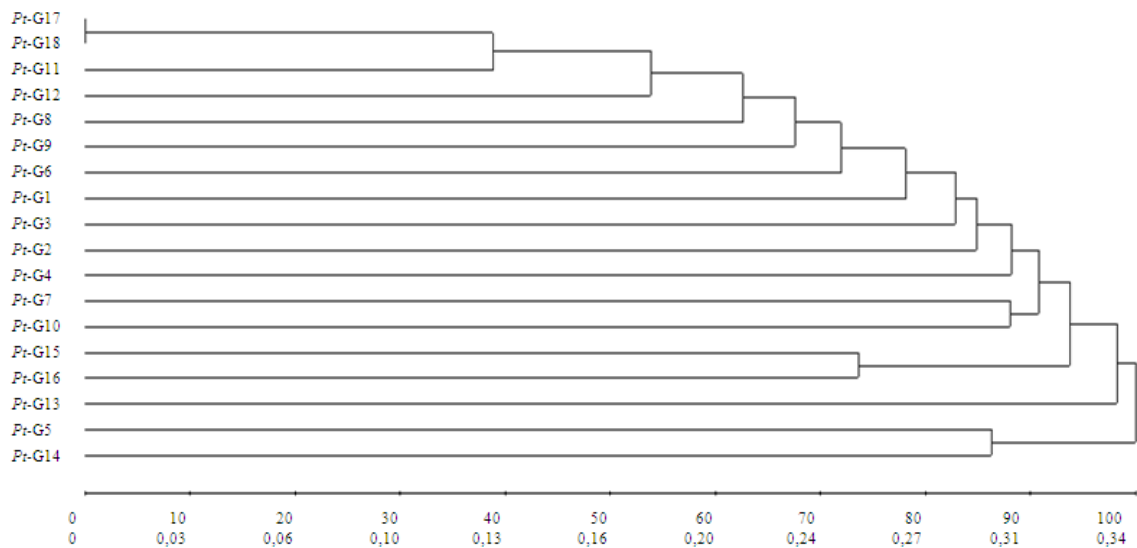


Figure 4 Clustering of 18 *Passiflora trintae* obtained through the clustering method based on the unweighted arithmetic average method (UPGMA) of distances estimated for the Dice-Sorenso coefficient from RAPD bands. *Pc*-G1 to -G18 corresponds to the evaluated genotypes.

CAPÍTULO 4

SELEÇÃO DE VARIÁVEIS PATOMÉTRICAS PARA AVALIAR RESISTÊNCIA E INFECTIVIDADE NO PATOSSISTEMA DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS DE MARACUJÁ

Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva, José Romário Fernandes de Melo, Ronan Xavier Corrêa and Antonio Carlos de Oliveira

Resumo

O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência das variáveis fitopatométricas escala de notas (EN), índice de intensidade de infecção (III), índice de doença foliar global (IDFG) e índice global de incidência e severidade (IGIS) em avaliações do patossistema maracujazeiro/*Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). Plantas de maracujazeiro ‘amarelo’, mecanicamente inoculadas com isolados de CABMV, tiveram o gradiente de associação entre os sintomas foliares ocasionados pela virose e sua produção total de frutos e, também, o gradiente de infectividade entre os isolados virais utilizados, determinados por essas quatro variáveis fitopatométricas. Apenas as variáveis III e GLDI apresentaram regressão significativa com a produção ($p = 0.007$ e 0.006 , respectivamente). De outro modo, as variáveis GISI, IDFG e III foram capazes de detectar gradiente de infectividade viral ($p = 0.0009$; 0.001 e 0.002 , respectivamente). Os resultados indicam que as variáveis III e IDFG são igualmente eficientes para identificar, precocemente, genótipos de maracujazeiro com altos níveis de resistência e suscetibilidade ao CABMV, assim como para identificar isolados mais severos, úteis em programas de melhoramento.

1 **Selection of pathometric variables to assess resistance and infectivity in passion fruit**
2 **woodiness pathosystem**

3

4 Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva⁽¹⁾, José Romário Fernandes de Melo⁽²⁾, Ronan Xavier
5 Corrêa⁽¹⁾ and Antonio Carlos de Oliveira⁽³⁾

6 ⁽¹⁾Universidade Estadual de Santa Cruz, Dep. Ciências Biológicas, Lab. Genética Molecular
7 Aplicada, Rod. Ilhéus-Itabuna - km 16, Salobrinho, CEP 45662-000, Ilhéus, BA, Brasil.
8 (cerqueirasilva1@yahoo.com.br, ronanxc@uesc.br); ⁽²⁾Universidade Federal de Lavras, Dep.
9 de Fitossanidade, Lab. Fitovirologia Molecular, Campus universitário, CEP 37200-000,
10 Lavras, MG – Brasil (romariomelo@gmail.com); ⁽³⁾Universidade Estadual do Sudoeste da
11 Bahia, Dep. Ciências Naturais, Lab. Biologia Molecular, Estrada do Bem Querere – km 4, Bem
12 Querere, CEP 45083-900, Vitória da Conquista, BA, Brasil. (aoliveira@uesb.br).

13

14 **(Artigo à ser submetido para publicação no periódico *Journal of Phytopathology*)**

15

16 **Abstract** – The objective of this work was to compare the efficiency of four pathometric
17 variables (PVs), *i.e.*, grading scale (GS), infection intensity index (III), global leaf disease
18 index (GLDI), and global incidence and severity index (GISI), in evaluations of the passion
19 fruit plants/Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) pathosystem. In ‘yellow’ passion
20 fruit plants, mechanically inoculated with various CABMV isolates the degree of association
21 between leaf symptoms and the total fruit yield, as well as the detection of infectivity degree
22 between viral isolates, was determined by these PVs. Only III and GLDI presented significant
23 regressions with yield ($p = 0.007$ and 0.006 , respectively). These two variables, GLDI and III

1 were capable of detecting groups of viral isolates with different levels of severity (0.001 and
2 0.002, respectively) among different isolates. The results indicate that PVs III and GLDI are
3 equally efficient in identifying, precociously, passion fruit populations with a higher
4 resistance/susceptibility level to CABMV, as well as can be helpful in identifying more severe
5 CABMV isolates, useful in breeding programs.

6 **Index terms:** Disease index, Grading scale, *Passiflora edulis*, Passion fruit woodiness
7 disease, Tolerance.

8

9

10 **Seleção de variáveis patométricas para avaliar resistência e infectividade no**
11 **patossistema do endurecimento dos frutos de maracujá**

12

13 **Resumo** – O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência das variáveis fitopatométricas
14 escala de notas (EN), índice de intensidade de infecção (III), índice de doença foliar global
15 (IDFG) e índice global de incidência e severidade (IGIS) em avaliações do patossistema
16 maracujazeiro/*Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). Plantas de maracujazeiro
17 ‘amarelo’, mecanicamente inoculadas com isolados de CABMV, tiveram o gradiente de
18 associação entre os sintomas foliares ocasionados pela virose e sua produção total de frutos e,
19 também, o gradiente de infectividade entre os isolados virais utilizados, determinados por
20 essas variáveis fitopatométricas. Apenas as variáveis III e IDFG apresentaram regressão
21 significativa com a produção ($p = 0.007$ e 0.006 , respectivamente). Estas duas variáveis,
22 IDFG e III, foram capazes de detectar grupos de isolados virais com diferentes níveis de
23 severidade ($p = 0.001$ e 0.002 , respectivamente) entre diferentes isolados. Os resultados

1 indicam que as variáveis III e IDFG são igualmente eficientes para identificar, precocemente,
2 genótipos de maracujazeiro com altos níveis de resistência e suscetibilidade ao CABMV,
3 assim como para auxiliar a identificar isolados mais severos, úteis em programas de
4 melhoramento.

5

6 **Termos para indexação:** Doença do endurecimento dos frutos do maracujá, escala de notas,
7 índice de doença, *Passiflora edulis*, tolerância.

8

9 **Introduction**

10

11 The yellow passion fruit plant (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* O. Deg.) is the
12 most cultivated *Passiflora* species in the world, and it predominates in the Brazilian market
13 (Alexandre et al., 2004; Bellon et al., 2007). Brazil stands out among the world's producers of
14 passion fruit, producing 429,253 tons in an area of 37,310 hectares (Brasil, 2005). However,
15 Brazil's average production of 10.43 ton/hectare (Brasil, 2005) is considered low when
16 compared to the potential productivity of passiculture, which can reach 40–50 ton/hectare
17 under specific cultivation conditions (Ruggiero, 1987; Meletti et al., 2005).

18 The occurrence of pests and pathogens causes yield and quality damage and generates
19 loss (Meletti et al., 2005). Among the causal agents of passiculture infirmities, the passion
20 fruit woodiness disease (Kitajima et al., 1986), which, in Brazil, is provoked by the Cowpea
21 aphid-borne mosaic virus (CABMV) (Nascimento et al., 2004; Cerqueira-Silva et al., 2008;
22 Moreira, 2008) is one of the most important. In Brazil, the first recorded incidence of this
23 disease occurred in the 1970s in passion fruit plants in the State of Bahia (Yamashiro &
24 Chagas, 1979).

1 Research concerning the reaction of passion fruit to CABMV is limited (Leão et al.,
2 2006), although there are many records regarding its occurrence and general
3 recommendations for its control (Kitajima et al., 1986; Chagas et al., 1992). On the other
4 hand, the evaluation of the damage and losses caused by CABMV to passion fruit is scarce in
5 the literature (Gioria et al., 2000; Junqueira et al., 2003; Cerqueira-Silva et al., 2008). To
6 passion fruit genetic breedings, the identification of cultivars resistant to diseases and pests is
7 a potential solution for reducing the damages and losses (Meletti et al., 2005). However, this
8 field of research is little explored in passiculture (Meletti et al., 2000; Nascimento et al., 2003;
9 Farias et al., 2005a, 2005b).

10 It is common to use descriptive keys in order to quantify symptoms and to employ
11 “disease index” in evaluations of the diseases severity (Laranjeira, 2005; Moraes, 2007;
12 Santos et al., 2009; Santos, 2009). The use of scale of grades and index disease (Novaes and
13 Rezende, 1999; Junqueira et al., 2003; Nascimento et al., 2006; Cerqueira-Silva et al., 2008)
14 are examples of this application for the *Passiflora*/CABMV pathosystem as well as for other
15 pathosystems (McKinney, 1923; Czermainski, 1999). The characterization of the reactions of
16 passion fruit species and genotypes to the virus, through grading scale has been carried out in
17 association with serologic evaluations (Novaes & Rezende, 1999) and determination of the
18 infected leaf percentage (Leão et al., 2006), or with other types of pathometric variables (PVs)
19 (Gioria et al., 2000).

20 Considering the importance of pathometry in the evaluation of the plants’ reaction to
21 pathogens (Czermainski, 1999; Laranjeira, 2005; Santos et al., 2009), this work aim is to
22 compare the efficiency of PVs in the passion fruit/CABMV pathosystem in order to identify:
23 (i) passion fruit genotypes contrasting in terms of resistance/susceptibility to CABMV, and
24 (ii) CABMV isolates with different degrees of viral infectivity.

25

1 **Materials and Methods**

2

3 Vegetal biological material employed in assay A (comparison of PVs in the
4 identification of the degree of resistance/susceptibility between passion fruit plants to
5 CABMV) comprised 87 adult ‘yellow’ passion fruit plants, from the field research area of
6 *Passiflora* of the *Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB)*, obtained from the
7 germination of ‘yellow’ passion fruit seeds resulting from open pollination, bought at the
8 open-air market in the city of *Vitória da Conquista*, Bahia, Brazil. For assay B (comparison of
9 PVs in the identification of degree of infectivity among CABMV isolates), 110 ‘yellow’
10 passion fruit seedlings from the region of passion fruit production surrounding the city of
11 *Livramento de Nossa Senhora*, Bahia, were used.

12 Viral biological material, referring to both assay A (UESB-01 CABMV isolate) and
13 assay B (10 CABMV isolates, i.e., UESB-02 to UESB-11), were from plants with symptoms
14 of the disease collected in the producing region of *Livramento de Nossa Senhora*, Bahia, and
15 exhibited a high percentage of identity (>93%) with the amino acid sequences of the coat
16 protein of the strains of the CABMV available in GenBank (Moreira, 2008).

17 The assay A comprised 87 treatments (1 treatment = 1 ‘yellow’ passion fruit genotype)
18 and 87 experimental units (1 replication by treatment; 1 replication = 1 adult ‘yellow’ passion
19 fruit plant) and was set up in the UESB experimental field, adopting the horticulture treatment
20 of Bruckner and Picanço (2001). Assay B comprised 11 treatments [1 treatment = 1 CABMV
21 isolate, the last treatment being the control (water)] and 110 experimental units (10
22 replications by treatment, 1 replication = 1 ‘yellow’ passion fruit seedling) and was conducted
23 at a UESB greenhouse. Inoculations of viral particles in the plants or seedlings were carried
24 out mechanically, in triplicate, at 60, 75 and 90 days after seeds germination, applying vegetal

1 extract prepared in 5% (w/v) potassium phosphate buffer (0.02 mol.L⁻¹), pH 7.0, from leaf
2 samples of woodiness symptomatic plants.

3 The yellow passion fruit plants' (assay A) and seedlings' (assay B) reactions to
4 artificial inoculation with the CABMV virus were measured at 150 and 60 days, respectively,
5 after the last inoculation time, using four PVs: (i) a grading scale (GS) with four levels, where
6 0 = no symptoms, 1 = mild mosaic without leaf distortion, 2 = severe mosaic without leaf
7 distortion, and 3 = severe mosaic, blisters and leaf distortion, from the descriptive key of
8 Novaes and Rezende (2003); (ii) an index of infection intensity (III), varying from 0 to 100,
9 as described by Silva (1969), and generalized for discrete or quantitative ordinal scales by
10 Czermainski (1999); (iii) an global leaf disease index (GLDI), varying from 0 to 1, as
11 described by Cerqueira-Silva et al. (2008); and, (iv) a global incidence and severity index
12 (GISI), varying from 0 to 3, and calculated, with decimal precision, by the formula:

$$GISI = \frac{\sum GS \times I}{NDL} - \left(1 - \frac{NDL}{TNL}\right)$$

13
15 where $\sum GS \times I$ = sum of GS multiplied by the incidence, NDL = number of diseased leaves,
16 and TNL = total number of leaves. PVs III, GISI and GLDI used, for the calculations, the
17 symptomatologic classification based on the GS. Variable GISI is originally described in the
18 present study. It is important to mention that for the purpose of calculation were evaluated,
19 except for variable GS, all the leaves of 'yellow' passion fruit genotypes (assay A) and 'yellow'
20 passion fruit seedling (Assay B).

21 In addition to the measurement of the four PVs, were also evaluated the total weight of
22 the fruits (TWF). The average values of the PVs measured, for assays A and B, were used to
23 estimate the standard error, coefficient of variation, normality (Lilliefors test) and kurtosis.
24 Specifically for assay B, analysis of variance and tests of comparison of the means (Student-

1 Newman-Keuls ‘SNK’) was employed for identification of degree of infectivity among
2 CABMV isolates. Analysis was performed using BioEstat 4.0 software (Ayres et al., 2005),
3 with $\alpha = 0.05$.

4 Additionally, for assay A, the observed values of the PVs had their significance of
5 association with fruit yield evaluated through linear correlation tests, curve fitting for
6 determination of the best fit regression, bilateral Student’s *t*-test for comparison of means, and
7 comparison of coefficients of variation tests. For the regression tests performed, the PV was
8 considered the predictor variable and fruit yield the dependent variable. Analysis of the
9 dispersion (considering the production of fruit in grams and the different variables
10 pathometry) was also performed in order to determine the variability inherent to the 87
11 individuals concerning productivity and reaction to CABMV.

12 Based on the high or low degree of severity among the 87 plants evaluated, and the
13 low and high fruit productivity of the plants, respectively, two contrasted samples of the
14 populations with 18 genotypes were selected (one sample of 9 passion fruits with high
15 resistance and one sample of 9 passion fruits of high susceptibility) concerning the reaction to
16 CABMV, adopting a 10% selection index. The efficiency in the selection of these contrasted
17 samples was validated by means of Student’s *t*-test and bootstrapping with 10,000 re-
18 samplings.

19

20 **Results and Discussion**

21

22 The average results of GS and GISI (~2.7) are near to the maximum values of the
23 scales of these respective PVs, which vary from 0 to 3 (Table 1). On the other hand, variables
24 III and GLDI presented estimated values near to the means of the respective scales (means of

1 51.4 or 0.61, in intervals which vary from 0 to 100 or 0 to 1, respectively). The tendency
2 observed in variables GS and GISI of classifying the individuals as highly susceptible was
3 confirmed by the Kurtosis values obtained (-0.837 and -0.824, for GS and GISI,
4 respectively), as opposed to those estimated for III and GLDI (-0.051 and -0.020,
5 respectively). These results may be interpreted as being due to the fact that GS and GISI over
6 weighed the high degree of severity. Considering that viral particles of *Potyviridae* do not
7 disperse themselves homogeneously in the various tissues and organs of the vegetal (Novaes
8 & Rezende, 2003), it can be inferred that GS and GISI can fail to detect the existence of the
9 degree of resistance/susceptibility to CABMV among individuals of a passion fruit plant
10 population. The use of GS and GISI, in pathometric analyses, rate the plants according to the
11 most prominent leaf symptom detected, not taking into consideration how the passion fruit as
12 a whole responds to the multiplication and migration of CABMV in its interior, differently
13 from what is obtained when measured using III and GLDI.

14 On the other hand, the magnitude of the values of the estimates of the coefficient of
15 variation with regard to the four PVs were close (10–16%). However, the low magnitude
16 variability in the coefficient of variation of III, differed ($p < 0.001$; comparison of coefficients
17 of variation test) from the values determined for the coefficients of variation of the other PVs.
18 This result corroborates the proposition of Czermainski (1999) that the calculation of III
19 reduces the variability of the values inherent to the symptomatologic evaluations.

20 Inverse and significant correlations [$p = 0.008$; validated through bootstrapping ($p =$
21 0.008 ; 10,000 re-samplings)] between severity measured via III and GLDI *versus* TWF ($r = -$
22 0.278 and -0.282 , respectively; Table 2) were detected. The fact that GS and GISI classified
23 the passion fruits plants, generally, as carriers of similar disease severity, resulted in a non-
24 significant correlation between these two PVs with TWF ($p = 0.13$ and 0.40 , for GS and GISI,
25 respectively), suggesting that these variables are not efficient for distinguishing the degree of

1 resistance/susceptibility to CABMV that may exist in a given population of passion fruit
2 plants.

3 Leão et al. (2006) reported that the GS evaluation, associated with the measurement of
4 the percentage of ‘yellow’ passion fruit lesioned leaf area, mechanically inoculated with
5 CABMV and kept in a greenhouse, allowed the statistical detection of susceptible and
6 resistant individuals to CABMV. However, the characteristic of productivity was not
7 evaluated (Leão et al., 2006).

8 The dependency of TWF in relation to III and GLDI was evaluated through a fitted
9 curve test (Table 3). These two PVs were selected, among the four evaluated, because they
10 presented a significant inverse correlation with TWF (Table 2). It was determined that a
11 logarithmic regression is that which best explains the dependency existing between the
12 predictive (III and GLDI) and dependent (TWF) ($p = 0.007$ and $R^2 = 8.15\%$ for III *versus*
13 TWF; $p = 0.006$ and $R^2 = 8.51\%$ for GLDI *versus* TWF) (Table 3) variables. These results
14 corroborate those obtained through the correlation test, making clear that the degree of severity
15 of the CABMV leaf disease, estimated via III and GLDI, is responsible for part of the
16 damages to fruit production. The damage can be explained, in part, by the action of the viral
17 particles that cause the destruction of chlorophyll molecules in the symptomatic regions,
18 acting negatively on the photosynthetic potential of the plant (Chaves, 2002; Santos et al.,
19 2004).

20 Through analysis of dispersion it was shown that variables III and GLDI allow a high
21 discrimination of the genetic variability existing, among the 87 genotypes, with regard to the
22 reaction to CABMV and fruit productivity (Figure 1). The low dispersion of the genotypes
23 when plotting GS and GISI against TWF (Figure 1A and 1D) is due to the fact that these two
24 PVs result in a low distinction of the reaction among passion fruits plants concerning the leaf

1 symptoms of CABMV. In opposition, the great dispersion of the 87 yellow passion fruits
2 evaluated by means of III and GLDI (Figure 1B and 1C) shows the possibility distinguish the
3 reaction among passion fruits plants in relation the leaf symptoms of CABMV.

4 Variables III and GLDI presented statistically different mean results (*t*-test, $p <$
5 0.0001 ; bootstrap, $0.0001 < p < 0.007$) between the two contrasted samples of ‘yellow’
6 passion fruit plants to CABMV (Table 4). These results support the hypothesis that the
7 selection of passion fruit contrasted samples through differing values of III and GLDI permits
8 the differentiation of statistically different populations (taken to be putative ‘resistant’ and
9 ‘highly susceptible’) with regard to their fruit yield. The sample of ‘resistant’ genotypes
10 presented an increase in TWF on the order of 89% when compared to the sample of ‘highly
11 susceptible’ genotypes (Table 4).

12 Concerning the assay of the comparison of PVs in the determination of the degree of
13 severity among CABMV isolates (assay B), mean results of the disease leaf symptoms,
14 enables identify isolates with different levels of severity (table 5). Both variables III and
15 GLDI identified two statistically different groups about the severity of leaf symptoms ($p =$
16 0.001 and 0.002 , respectively; SNK test comparison of the means). These groups were formed
17 by isolates of greater severity (UESB 02, 09 and 10) and less severity (UESB 05 and 11) for
18 III, and isolated of greater severity (UESB 09 and 10) and less severe (UESB 05) for GLDI.

19 Variables pathometry GS and GISI were not used to the severity evaluations of
20 isolates for having been inefficient in the assay for characterization of genotypes (assay A)
21 and improper for analysis of variance.

22

1 **Conclusions**

2

3 1. The selection of passion fruit samples (populations) that diverge with regard to their
4 resistance and/or susceptibility to CABMV can be carried out efficiently by means of
5 pathometrics, jointly, between variables III and GLDI by their association with the total
6 weight of fruits produced. The use of these variables can help in the characterization and
7 subsequent initial selection of samples (populations) of passion fruit in breeding programs
8 targeting resistance to this disease.

9 2. The pathometric variables III and GLDI can differentiate degrees of viral infectivity
10 of the CABMV isolates. These variables can be helpful in the characterization and subsequent
11 initial selection of mild and severe isolates of CABMV useful in breeding programs.

12

13 **References**

14

15 ALEXANDRE, R.S.; JÚNIOR, A.W.; NEGREIROS, J.R.S.; PARIZZOTTO, A.;
16 BRUCKNER, C.H. Germinação de sementes de genótipos de maracujazeiro. **Pesquisa**
17 **Agropecuária Brasileira**, v.39, p.1239-1245, 2004.

18

19 AYRES, A.; AYRES Jr., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. **BioEstat: aplicações**
20 **estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. Belém, Brasil. 2005. 334p.

21

22 BELLON, G.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, K.P.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SANTOS, E.C.;
23 BRAGA, M.F.; GUIMARÃES, C.T. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais
24 de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira Fruticultura**,
25 v.29, p.124-127, 2007.

26

27 BRASIL. Produção Agrícola Municipal. **IBGE**, 2005.

28

29 BRUCKNER, C.H.; PIKANÇO, M.C. **Maracujá: tecnologia, pós-colheita, agroindústria,**
30 **mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 472p., 2001.

31

32 CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; MOREIRA, C.N.; FIGUEIRA, A.R.; CORRÊA, R.X.;
33 OLIVEIRA, A.C. Detection of a resistance gradient to *Passion fruit woodiness virus* and
34 selection of 'yellow' passion fruit plants under field conditions. **Genetics Molecular**
35 **Research**, v.7, p.1209-1216, 2008.

- 1
2 CHAVES, A.L.R. Sintomas e danos causados por vírus em culturas de importância
3 econômica. **Biológico**, v.64, p.217-219, 2002.
4
- 5 CHAGAS, C.M.; REZENDE, J.A.M.; COLARICCIO, A.; PIZA Jr., C.T.; LOPES, L.C.;
6 GALLETTI, S.R.; FERRARI, J.T.; BELLUZI, B.M. Ocorrência do endurecimento do fruto
7 do maracujazeiro (VEFM) no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.14,
8 p.187-190, 1992.
9
- 10 CZERMAINSKI, A.B.C. Generalização de um índice de intensidade de infecção em
11 experimentos de avaliação de doenças em plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34,
12 p.1545-1555, 1999.
13
- 14 FARIAS, M.A.A.; CUNHA, M.A.P.; FARIA, G.A.; PEIXOTO, C.P.; SAMPAIO, H.S.V.
15 Competição entre sete populações de maracujá amarelo. **Magistra**, v.17, p.142-145, 2005a.
16
- 17 FARIAS, M.A.A.; FARIA, G.A.; CUNHA, M.A.P. PEIXOTO, C.P.; SOUZA, J.S.
18 Caracterização física e química de frutos de maracujá amarelo de ciclos de seleção massal
19 estratificada e de populações regionais. **Magistra**, v.17, p.83-87, 2005b.
20
- 21 GIORIA, R.; BOSQUÊ, G.G.; KITAJIMA, E.W. Incidência de viroses de maracujazeiro na
22 Alta Paulista-SP e danos causados pelo *Passion fruit woodiness virus*. **Fitopatologia**
23 **Brasileira**, v.25, p.182-189, 2000.
24
- 25 JUNQUEIRA, N.T.V.; ANJOS, J.R.N.; SILVA, A.P.O.; CHAVES, R.C.; GOMES, A.C.
26 Reação às doenças e produtividade de onze cultivares de maracujá-azedo cultivadas sem
27 agrotóxico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.1005-1010, 2003.
28
- 29 KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.W.; CRESTANI, O.A. Enfermidades de etiologia viral e
30 associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiro no Brasil. **Fitopatologia**
31 **Brasileira**, v.11, p.409-432, 1986.
32
- 33 LARANJEIRA, F.F. Problemas e perspectivas da avaliação de doenças como suporte ao
34 melhoramento do maracujazeiro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. (Ed.). **Maracujá**
35 **– germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.160-184.
36
- 37 LEÃO, R.M.K.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; RESENDE, R.O.; MATTOS,
38 J.K.A.; MELO, B. Reação de progênies de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento
39 do fruto (*cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV) em casa de vegetação. **Bioscience**
40 **Journal**, v.22, p.87-92, 2006.
41
- 42 McKINNEY, H.H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat
43 seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v.26, p.195-
44 217, 1923.
45
- 46 MELETTI, L.M.M.; SANTOS, R.R.; MINAMI, K. Melhoramento do maracujazeiro-amarelo:
47 obtenção do cultivar ‘composto IAC-27’. **Scientia Agricola**, v.57, p.491-498, 2000.
48
49

- 1 MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R.S.
2 Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA,
3 N.T.V. (Ed.). **Maracujá – germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa
4 Cerrados, 2005. p.54-78.
- 5
6 MORAES, S.A. **Quantificação de doenças de plantas**. 2007. Artigo em Hypertexto.
7 Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/doencas/index.htm>. Acesso
8 em: 25/1/2008.
- 9
10 MOREIRA, C.N. **Caracterização de isolados virais associados ao endurecimento de**
11 **frutos do maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg)**
12 **provenientes de Livramento de Nossa Senhora, BA**. Dissertação (Mestrado em
13 Biotecnologia Vegetal), Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, 2008.
- 14
15 NASCIMENTO, L.C.; PENSUK, V.; COSTA, N.P.; ASSIS FILHO, F.M.; PIO-RIBEIRO,
16 G.; DEOM, C.M.; SHERWOOD, J. Evaluation of peanut genotypes for resistance to *Tomato*
17 *spotted wilt virus* by mechanical and thrips inoculation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**,
18 v.41, p.937-942, 2006.
- 19
20 NASCIMENTO, A.V.S.; SOUZA, A.R.R.; ALFENAS, P.S.; ANDRADE, G.P.;
21 CARVALHO, M.G.; PIO-RIBEIRO, G.; ZERBINI, F.M. Análise filogenética de potyvírus
22 causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia**
23 **Brasileira**, v.29, p.378, 2004.
- 24
25 NASCIMENTO, W.M.O.; TOMÉ A.T.M.; OLIVEIRA, M.S.P.; MULLER, C.A.;
26 CARVALHO, J.E.U. Seleção de progênies de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f.
27 *flavicarpa*) quanto à qualidade de frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, p.186-
28 188, 2003.
- 29
30 NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M. Possível aplicação do DAS-ELISA indireto na seleção
31 de maracujazeiro tolerante ao '*Passionfruit Woodiness Virus*'. **Fitopatologia Brasileira**, v.24,
32 p.76-79, 1999.
- 33
34 NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M. Selected mild strains of *Passion fruit woodiness virus*
35 (PWV) fail to protect pre-immunized vines in Brazil. **Scientia Agricola**, v.60, p.699-708,
36 2003.
- 37
38 RUGGIERO, C. (Ed.). **Maracujá**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p.77-85.
- 39
40 SANTOS, A.A.; BEZERRA, M.A.; CARDOSO, J.E.; VIDAL, J.C.; SOBRAL, A.R.A.;
41 BRAGA, C.A.T. Efeito do amarelão e da mosca-branca na fixação de CO₂, na
42 produção e no teor de sólidos solúveis totais de frutos do meloeiro. **Revista Ciência**
43 **Agrônômica**, v.35, p.214-219, 2004.
- 44
45 SANTOS, E.S.L.; CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; CLEMENT, D.P.L.; LUZ, E.D.M.N.
46 Métodos patométricos na identificação de resistência genética de genótipos de cacaueteiro à
47 podridão-parda. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.XX, p. xxx-xxx, 2009. (In press).
- 48
49

- 1 SANTOS, E.S.L. **Caracterização do gradiente de resistência de genótipos de cacauero**
2 **(F₂SCA6 X ICS1) à podridão-parda por meio de avaliações fitopatométricas, genéticas e**
3 **moleculares.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade
4 Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA, 2009.
5
- 6 SILVA, J.G.C. Análise estatística de um novo índice de intensidade de infecção. **Pesquisa**
7 **Agropecuária Brasileira**, v.4, p.3-7, 1969.
8
- 9 YAMASHIRO, T.; CHAGAS, C.M. Ocorrência de grave virose em maracujá amarelo
10 (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) no Estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO
11 DE FRUTICULTURA, 5., 1979, Pelotas. **Anais**. Pelotas: SBF, 1979. p.915-917.
12

1
2
3
4
5

6
7
8
9

Table 1. Statistic and descriptive parameters of pathometric variables measured in a population of 87 ‘yellow’ passion fruit plants, mechanically inoculated with UESB-01 CABMV isolate and evaluated under field conditions.

Variable	Average	Kurtosis	Standard error	Coefficient of variation
GS	2.74	-0.162	0.05	16 %
III	51.40	-0.051	0.05	10 %
GLDI	0.61	-0.020	0.01	16 %
GISI	2.73	-0.824	0.60	16 %

GS = grading scale; III = index of infection intensity; GISI = global index of incidence and severity; GLDI = global leaf disease index.

1
2
3
4
5
6
7

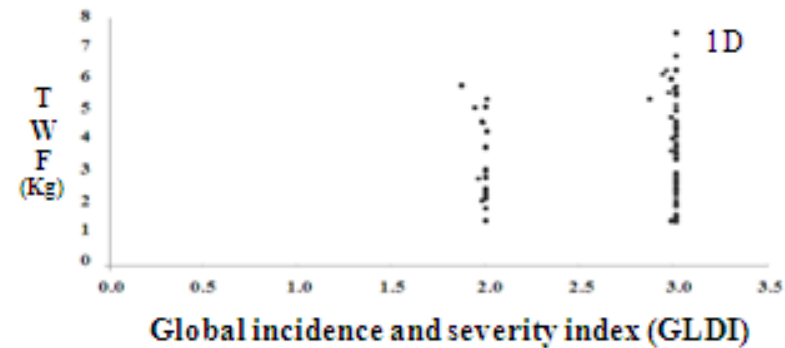
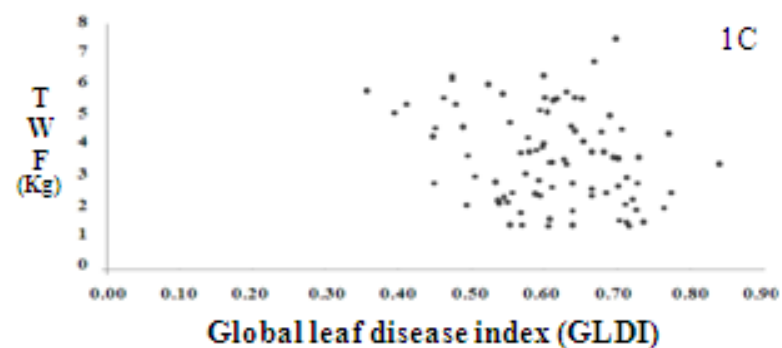
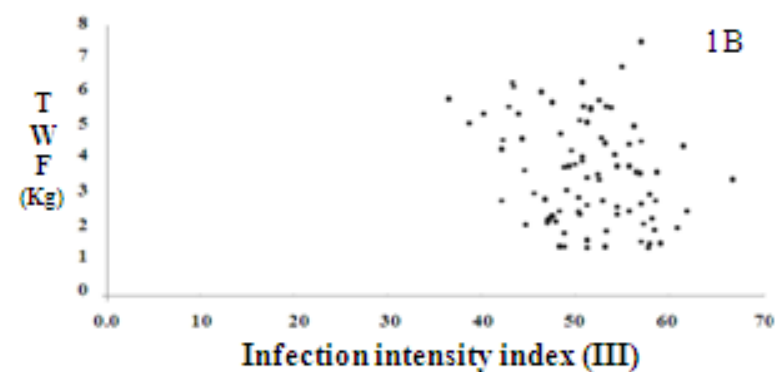
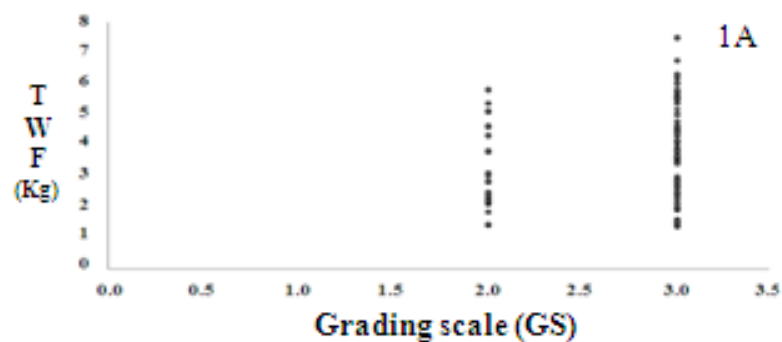
8
9
10

Table 2. Magnitude and significance of *p*-values of the normality/Lilliefors and linear correlation tests between pathometric variables and productivity, measured in a population of 87 ‘yellow’ passion fruit plants, mechanically inoculated with UESB-01 CABMV isolate and evaluated under field conditions.

Variable	<i>p</i> -value	
	Normality ⁽¹⁾	TWF
GS	Abnormal**	0.13
III	Normal ^{ns}	0.008
GLDI	Normal ^{ns}	0.008
GISI	Abnormal**	0.40

⁽¹⁾Values of the Lilliefors normality test. TWF = total weight of the fruits. ns = not significant. **Significant at the 1% level of probability. See Table 1 for abbreviations.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11



12 **Figure 1.** Dispersion graphics of 87 ‘yellow’ passion fruit plants, mechanically inoculated with UESB-01 CABMV isolate and
13 maintained under field conditions, concerning total weight of the fruits (TWF) and severity of the fruit woodiness disease, evaluated
14 through: ‘GS’ varying from 0 to 3 (1A); ‘III’ varying from 0 to 100 (1B); ‘GLDI’ varying from 0 to 1 (1C); and ‘GLSI’ varying from 0
15 to 3 (1D).

Table 3. Magnitude of R² values obtained from regressions determined through curve fitting test, among the pathometric (predictive) and productivity (dependent) variables, measured in a population of 87 ‘yellow’ passion fruit plants, mechanically inoculated with UESB-01 CABMV isolate and evaluated under field conditions.

Regressions evaluated	Predictive and dependent variables	
	III x TWF	GLDI x TWF
Linear	7.77% **	7.78% **
Exponential	7.12% *	7.31% *
Logarithm	8.15% **	8.51% **
Geometric	7.47% *	7.79% **

*Values significant at 5% level of probability. **Values significant at 1% level of probability. See Tables 1 and 2 for abbreviations.

Table 4. Magnitude of p -values determined via bilateral Student's t -test and bootstrap test, between pathometric and productivity variables of two contrasted sample of populations of 'yellow' passion fruit plants on the reaction to CABMV.

Variable	Contrasted samples of population		t -test ⁽³⁾	Bootstrap ⁽⁴⁾
	Higher ⁽¹⁾	Lower ⁽²⁾		
III	41.1	60.3	0.0001**	0.0001
GLDI	0.43	0.75	0.0001	0.0001
TWF	5.1	2.7	0.0001	0.0001

⁽¹⁾ Sample of nine genotypes with low severity of symptoms. ⁽²⁾Sample of nine genotypes with high severity of symptoms. ⁽³⁾ p -values obtained in the bilateral t -test. ⁽⁴⁾ p -values obtained through bootstrapping with 10,000 replications. **Considered significant at the 1% level of probability. See Tables 1 and 2 for abbreviations.

Table 5. Pathometric variables averages measured in a sample of 10 yellow passion fruit plants, mechanically inoculated with UESB-02 to UESB-11 CABMV isolates and evaluated in greenhouse.

Viral isolate	Pathometric variable	
	III	GLDI
UESB 02	54.1 a	0.51 ab
UESB 03	37.3 ab	0.46 ab
UESB 04	30.2 ab	0.37 ab
UESB 05	23.2 b	0.34 ab
UESB 06	31.3 ab	0.40 ab
UESB 07	32.0 ab	0.39 ab
UESB 08	38.0 ab	0.41 ab
UESB 09	47.4 a	0.50 a
UESB 10	39.8 a	0.50 a
UESB 11	26.2 b	0.27 b
Control (distilled water)	1.7 c	0.03 c
Average	35.95	0.41
Standard error	2.9	0.02
Coefficient of variation	26.3 %	18.8 %

⁽¹⁾Values in the same column featuring different letters are statistically different ($p < 0.05$; SNK test comparison of the means).

See Table 1 for abbreviations.

CAPÍTULO 5
DETECÇÃO DO GRADIENTE DE RESISTÊNCIA PARA O VÍRUS DO
ENDURECIMENTO DOS FRUTOS E SELEÇÃO DE PLANTAS DE
MARACUJAZEIRO ‘AMARELO’ EM CONDIÇÕES DE CAMPO

Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva, Charles Neris Moreira, Antonia dos Reis Figueira, Ronan Xavier Corrêa and Antonio Carlos de Oliveira

Resumo

A produtividade do maracujazeiro ‘amarelo’ (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* O. Deg.) é reduzida pela infecção com *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). Nos avaliamos a resistência em 72 plantas de maracujazeiro ‘amarelo’, oriundas da germinação de sementes advindas de polinização aberta. As plantas foram mecanicamente inoculadas com o CABMV e mantidas em condições de campo para seleção de genótipos resistentes. O isolado viral foi obtido de folhas sintomáticas de maracujazeiros ‘amarelo’ cultivados em campo de produção em Livramento de Nossa Senhora, Bahia e foram caracterizados por meio do seqüenciamento do gene da capa protéica. A severidade dos sintomas foliares da doença, avaliados através do índice de doença foliar global, foram mensurados durante o oitavo mês de crescimento das plantas. Variáveis morfo-agronômicas foram avaliadas durante o décimo e décimo segundo meses. Regressão linear significativa entre a quantificação dos sintomas foliares e características morfo-agronômicas relacionadas a produtividade foram detectadas ($5.17\% \leq R^2 \leq 11\%$; $0.002 \leq p \leq 0.028$). Baseado na avaliação da produtividade de frutos, severidade dos sintomas foliares da doença e a aplicação de um índice de seleção de 10 %, quatro grupos contrastantes de plantas de maracujazeiro ‘amarelo’ consideradas “resistentes”, “moderadamente resistentes”, “suscetíveis” e “extremamente suscetíveis” para reação ao CABMV ($0.0001 < p < 0.024$) foram selecionadas. Essas plantas poderam ser utilizadas para estudos genéticos e para o melhoramento de maracujazeiros ‘amarelo’ à resistência a essa doença.

Detection of a resistance gradient to *Passion fruit woodiness virus* and selection of ‘yellow’ passion fruit plants under field conditions

C.B.M. Cerqueira-Silva¹, C.N. Moreira², A.R. Figueira², R.X. Corrêa¹ and A.C. Oliveira³

¹Departamento de Ciências Biológicas,
Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brasil

²Departamento de Fitopatologia,
Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

³Departamento de Ciências Naturais,
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, BA, Brasil

Corresponding author: A.C. Oliveira
E-mail: ancaol@pq.cnpq.br
Genet. Mol. Res. 7 (4): 1209-1216 (2008)
Received July 25, 2008
Accepted August 29, 2008
Published November 4, 2008

ABSTRACT. Productivity of ‘yellow’ passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* O. Deg.) is reduced by infection with *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). We examined resistance in 72 yellow passion fruit plants grown from open-pollinated commercial seed. Plants were mechanically inoculated with CABMV virus and maintained in the field in order to select contrasting genotypes for resistance. Isolates were obtained from symptomatic leaves of yellow passion fruit plants from field production in Livramento de Nossa Senhora, Bahia state and were characterized by sequencing the viral coat protein gene. Severity of leaf symptoms of the disease, evaluated through a global leaf disease index, was measured during the eighth month of growth. Morpho-agronomic variables of fruit were evaluated from months 10 to 12. Significant linear regressions between the quantification of the leaf symptoms and the morpho-agronomic characteristics related to productivity were detected ($5.17\% \leq R^2 \leq 11\%$; $0.002 \leq p \leq 0.028$). Based on evaluations of fruit productivity, severity of leaf symptoms of the disease, and the application of a selection index of 10%, four contrasting groups of ‘yellow’ passion fruit plants considered as “resistant”, “mildly resistant”, “susceptible” and “extremely susceptible” in their reaction to CABMV ($0.0001 < p < 0.024$) were selected. These plants could be useful for genetic studies and for breeding yellow passion fruit plants resistant to this disease.

Key words: CABMV; Passion fruit; *Passion fruit woodiness virus*; tolerance; susceptibility; virology.

Introduction

Passion fruit (Passifloraceae; *Passiflora*) originates from tropical America (Viana et al., 2003); it possesses considerable genetic variability, which should be studied, preserved and used in breeding programs (Faleiro et al., 2005). The ‘yellow’ passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* O. Deg.) is the most widely cultivated *Passiflora* species in the world and predominates in the Brazilian market (Bellon et al., 2007). The main producing countries are located in South America, Brazil accounts for 70% (491,619 metric tons) of the world’s production (IBGE, 2004; Ferreira, 2005); 95% (37,252 ha) of the commercial plantings in this country consist of yellow passion fruit (IBGE, 2004). The Brazilian northeast accounts for 43% of the production, and the main producing state is Bahia, with 21% of the national production (Viana-Silva, 2003).

Production and quality of passion fruit is affected by pests and pathogens (Lima et al., 1999); *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (Kitajima et al., 1986; Nascimento et al., 2004), the cause of Passion Fruit Woodiness Disease (PWD) in Brazil, is one of the main problems. The first register of PWD occurrence, in Brazil, was in commercial ‘yellow’ passion fruit plants and in *P. alata* Ait (‘sweet’ passion fruit) in the state of Bahia, at the end of the 1970s (Yamashiro and Chagas, 1979); later it was found in the states of Pernambuco (Loreto and Vital, 1983), Sergipe, Ceará (Kitajima et al., 1986), São Paulo (Chagas et al., 1992) and Minas Gerais (São José et al., 1994).

Pre-immunization strategies, as used in Australia by Simmonds (1959), did not protect passion fruit plants in Brazil against CABMV (Novaes and Rezende, 2003). Currently, tests are being made with transformed plants resistant to CABMV (Alfenas et al., 2005; Trevisan, 2005). However, until now, these plants have not been developed efficient gene silencing when challenged with multiple CABMV isolates.

There is little information on germplasm characterization and genetic improvement of yellow passion fruit in Brazil (Oliveira, 1980; Meletti et al., 2000; Nascimento et al., 2003; Viana et al., 2003; Farias et al., 2005a,b). Research on resistance of yellow passion fruit to CABMV are still preliminary (Tempesta Jr. et al., 2004; Leão et al., 2006; Faleiro et al., 2007; Fonseca et al., 2007). Damage and production loss caused by CABMV in yellow passion fruit have been evaluated in greenhouse production (Gioria et al., 2000).

We mechanically inoculated yellow passion fruit plants in the field with CABMV to determine their degree of resistance.

Material and Methods

The experiment was conducted in an experimental field of the Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), located in Vitória da Conquista, Bahia State (south latitude 14°53' and west longitude 40°48', average altitude 900 m, annual average precipitation 700-800 mm, concentrated between November and March, annual average temperature 20-22°C) (Instituto Nacional de Meteorologia/Ministério da Agricultura e Abastecimento). Seventy-two yellow passion fruit plants (*P. edulis* f. *flavicarpa*) were tested; these were started from seeds purchased in the central market of Vitória da Conquista.

The leaves were infected with CABMV UESB-01 isolate, by light friction of foliar limbs with a vegetal extract obtained from the maceration of leaves of yellow passion fruit showing severe symptoms of CABMV infestation, including mosaic leaf deformations and blisters, diluted 1:20 (weight:volume) in 0.02 M potassium phosphate buffer, pH 7.0. This virus isolate was originally collected from yellow passion fruit plants in the producing region surrounding the city of Livramento de Nossa Senhora, Bahia. In order to minimize loss of infectivity of the viral particles, the leaves to be used as a source of inoculation were kept at 5°C from the time of collection until they were macerated. In order to minimize escape possibilities, inoculations were performed three times, with four- and five-month-old plant three. Three-month-old plants were transferred from plastic containers to a field plot with wire supports, with 2.5 x 2.0 m spacing and drip irrigation. The plants were cultivated according to cultural treatment normally recommended for this culture.

Molecular characterization was carried out by RT-PCR, using the pair of primers CABMV-F 5' tctgatggaaaggacaaag 3' and CABMV-R 3' cgataactgtggcgaggcg 5'. These primers were used for amplification of the fragment of the coat protein gene of CABMV according to Nascimento et al. (2006), with modifications (without bases referent to enzyme restriction site, once the fragments were not cloned). The PCR were conducted according to Krause-Sakate et al. (2001) and the genomic fragment generated was used to determine percentage of identity of this PWD causal agent with other sequences of CABMV available in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>).

The leaf symptoms caused by PWD were quantified in plants eight months of age; a 'global leaf disease index' (varying from 0 to 1), calculated by $\Sigma GS.L/TNL \times HGS$, where GS = grade of the scale determined for each leaf, L = number of leaves showing to each grade of the scale, TNL = total number of leaves, and HGS = highest grade of the scale. This phytopathometric variable is an adaptation of McKinney's (1923) disease index, which consists of evaluation of the absence or presence of different levels of leaf symptoms of the disease in all leaves of the plant. The scale of grades (0 = without symptoms; 1 = mild mosaic without leaf deformations; 2 = severe mosaic

without leaf deformation, and 3 = severe mosaic, blisters and leaf deformation) employed in this study to calculate the global leaf disease index was described by Novaes and Rezende (1999).

The morpho-agronomical characteristics of the fruit from the 72 yellow passion fruit plants infected with CABMV were measured bi-weekly from months 10 to the 12, including total number of the fruits, total weight of the fruits, average weight of the fruits, and average diameter of the fruits. A digital pachymeter (STARRET - 727-2001; with a precision of 0.01 mm) was employed to measure fruit diameter, and a digital scale (BG 1000 with precision of 0.01 g) was used for fruit weight.

Analysis of the global leaf disease index and the fruit variables consisted of standard deviation calculation, normality test, linear regression, correlation via bootstrapping (10,000 resamplings) and a means comparison test (*t*-test bootstrap), using the Bioestat v4.0 software (Ayres et al., 2005). When necessary, data normalization was made through transformation, using the 'Box and Cox' test (Ayres et al., 2005).

Results

The CABMV UESB-01 isolate that we used for inoculation of yellow passion fruit plants exhibited a high percentage of identity (>93%) with the amino acid sequences of coat protein of the strains of the CABMV available in GenBank. Considering that such molecular criteria are precise and such criteria are accepted by the International Committee of Virus Taxonomy for designation of species of *Potyvirus* (Van Regenmortel et al., 2000), we classified our UESB-01 sample, which caused PWD, as a strain of the CABMV.

The size and weight data are listed in Table 1. Assuming global leaf disease index as the variable predictor and the morpho-agronomic characteristics of the fruit as the dependent variables, a linear regression statistically significant was detected between the quantification of severity of the leaf symptoms of the disease with three of four characteristics evaluated [total weight of fruit, mean weight of fruit and mean diameter of fruit ($5.17\% \leq R^2 \leq 11\%$; $0.002 \leq p \leq 0.028$)], a significant R^2 was not identified ($p = 0.060$) for the regression of global leaf disease index versus total number of fruit (Table 2). However, significant correlations ($0.154 < r < 0.280$; $0.001 \leq p \leq 0.033$), by means bootstrap analysis, between the quantification of the leaf symptoms and all variables referring to the fruit productivity, including total number of fruit, were detected.

Table 1. Descriptive statistics of morpho-agronomic variables of fruits and severity of leaf symptoms measured in 72 yellow passion flower plants that were mechanically inoculated with *Cowpea aphid-borne mosaic virus* isolate UESB-01.

Statistic-parameters	TNF	TWF (Kg)	AWF (g)	ADF (mm)	GLDI
Mean	19.2	3.6	184.9	80.4	0.60
Median	13	3.6	191.3	82	0.56
Standard deviation	5.76	1.23	29.9	3.8	0.097
Coefficient of variation	30	34	16	5	16
Minimum value	10	1.4	127	71.0	0.35
	(UESB-E27)	(UESB-E27)	(UESB-D2)	(UESB-E27)	(UESB-A1)
Maximum value	30	6.3	260	88.6	0.84
	(UESB-B2)	(UESB-B5)	(UESB-C3)	(UESB-E31)	(UESB-A9)

TNF = total number of fruits; TWF = total weight of fruit per plant; AWF = average weight of the fruits; ADF = average diameter of the fruits; GLDI = global leaf disease index (0-1); UESB = identification of the genotype for each extreme value.

Table 2. Correlation and linear regression between the global leaf disease index (predictor variable) and the morpho-agronomic characteristics (dependent variables) measured in 72 yellow passion fruit plants mechanically inoculated with *Cowpea aphid-borne mosaic virus* isolate UESB-01.

Dependent variable	r (r^2)	p^1	(R^2)	p^2
Total number of fruits	0.154 (2.4%)	0.033	3.47%	0.060
Total weight of the fruits	0.280 (7.8%)	0.001	11%	0.002
Average weight of the fruits	0.259 (6.7%)	0.014	5.17%	0.028
Average diameter of fruits	0.171 (2.9%)	0.006	7%	0.013

¹Estimated value of P for the correlation (r and r^2) based on 10,000 bootstrap resamplings. ²Estimated value of p for R^2 .

The plants were selected based on the severity of the leaf symptoms due to CABMV and productivity, adopting a selection index of 10%; 16 contrasting genotypes were designated as ‘resistant’ (UESB-A1, UESB-B2, UESB-A21, and UESB-E31), ‘mildly resistant’ (UESB-A22, UESB-A12, UESB-A23, and UESB-B5), ‘susceptible’ (UESB-E27, UESB-D10, UESB-E26, and UESB-D2), and ‘extremely susceptible’ (UESB-E32, UESB-E20, UESB-D8, and UESB-A9). Those genotypes, which presented lower global leaf disease index values (0.35-0.47) and higher total weight of fruit (5.57-6.30 kg) (Table 3), were considered to be resistant and mildly resistant. Similarly, those plants, which presented, concomitantly, higher values of global leaf disease index (0.72-0.84) and lower values of total weight of fruit (1.40-4.38 kg) (Table 4), were considered to be sensitive and extra-sensitive.

Table 3. Average results of morpho-agronomic characteristics of fruits and severity of leaf symptoms caused by *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in eight yellow passion fruit plants selected as ‘resistant’ (‘R’) and ‘moderately resistant’ (‘MR’).

Genotype	Resistance level	TNF	TWF (Kg)	AWF (g)	ADF (mm)	GLDI
UESB-A1	‘R’	25	5.776	203.1	84.9	0.35
UESB-B2	‘R’	30	5.121	170.1	78.8	0.39
UESB-A21	‘R’	25	5.401	207.0	80.7	0.41
UESB-E31	‘R’	18	4.292	238.4	88.6	0.44
UESB-A22	‘MR’	14	2.814	187.0	79.0	0.45
UESB-A12	‘MR’	28	4.609	158.9	80.3	0.45
UESB-A23	‘MR’	25	5.571	195.0	85.6	0.46
UESB-B5	‘MR’	27	6.308	233.3	8.41	0.47
Mean		24	4.990	199.2	8.27	0.43
Standard deviation		5	1.01	25.9	0.33	0.038
Coefficient of variation (%)		20.8%	20.3%	13%	4%	8.86%

See Table 1 for abbreviations.

Table 4. Average results *per se* of morpho-agronomic characteristics of fruits and severity of leaf symptoms of the *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in eight “yellow” passion flower plants selected as ‘susceptible’ (‘S’) and ‘extremely susceptible’ (‘ES’) to the UESB-01 isolated.

Genotype	Resistance level	TNF	TWF (Kg)	AWF (g)	ADF (mm)	GLDI
UESB-E27	‘S’	10	1.400	139.9	71.0	0.72
UESB-D10	‘S’	15	2.270	151.3	76.0	0.72
UESB-E26	‘S’	12	1.964	163.0	77.0	0.73
UESB-D2	‘S’	22	2.811	127.0	80.5	0.73
UESB-E32	‘ES’	15	3.608	240.0	81.2	0.73
UESB-E20	‘ES’	27	4.388	162.0	78.5	0.77
UESB-D8	‘ES’	13	2.485	191.1	80.1	0.77
UESB-A9	‘ES’	20	3.396	161.7	78.0	0.84
Mean		16.7	2.790	167.0	77.8	0.75
Standard deviation		5.37	0.09	32.7	0.305	0.04
Coefficient of variation (%)		32.11%	32.4%	19.5%	3.92%	5.3%

See Table 1 for abbreviations.

The group of eight yellow passion fruit plants classified as resistant and mildly resistant (Table 3) had significantly higher morpho-agronomic variables [total number of fruit ($p= 0.016$), total weight of fruit ($p= 0.002$), mean weight of fruit ($p= 0.042$), and mean diameter of fruit ($p= 0.0001$) bootstrap (10,000 resamplings) *t*-test] and significantly lower global leaf disease index values ($p= 0.0001$; bootstrap (10,000 resamplings) *t*-test) compared to the eight yellow passion fruit plants classified as sensitive and extrasensitive (Table 4).

Discussion

The high percentage of amino acid identity (>93%) of the region of the coat protein (gene) of the CABMV UESB-01 isolate that we used with other identified strains of CABMV helps confirm that PWD in Brazil is caused by CABMV (Nascimento et al., 2004).

Among the four morpho-agronomic characteristics evaluated (Table 1), mean fruit diameter is very important, because consumers prefer fruit with an equatorial diameter greater than 65 mm (Silva and Rossi, 2005). Since mean fruit diameter ranged from 71 mm (genotype UESB-D10) to 88.6 mm (genotype UESB-E31), the germplasm that we worked with proved to be of good quality for this characteristic. Similarly, the ranges of values observed for mean fruit weight (127 g for genotype UESB-D2 and 238.4 g for genotype UESB-E31) are also close to published ranges for yellow passion fruit (Meletti et al., 2000; Nascimento et al., 2003).

The low linear regression values and the low correlation between gold leaf disease index and the morpho-agronomic variables of the fruit (Table 2) could be a result of high genetic variability between plants originated from commercial seeds (Meletti et al., 2000; Bellon et al., 2007) and the small and variable amount of pollen deposited on the stigma of the flowers by pollinating insects. Higher regression values for severity of leaf symptoms and fruit productivity parameters would be expected if full-sibling families from known parentals were used and/or if the flowers were manually pollinated, which would result in higher uniformity in fruit growth and development.

The significant differences found between the mean morpho-agronomic variables between the resistant/mildly resistant and sensitive/extra-sensitive passion fruit plants ($0.0001 < p < 0.042$; bootstrap *t*-test) could be due to the reduction of photosynthetic capacity because of disease (Chaves, 2002). Similar relationships between pathogen-affected leaf area and loss in the photo-assimilated production have been reported to other viral patho-systems, such as *Rupestris stem pitting associated virus* in wine grapes (*Vitis* spp; Fajardo et al., 2004) and *Melon yellowing-associated virus* in melons (*Cucumis melo*; Santos et al., 2004).

This is the first published report of inter-specific genetic variability of productivity among yellow passion fruit plants related to resistance to CABMV in production fields. Leão et al. (2006) reported on a gradient of resistance and susceptibility of yellow passion fruit plants to the CABMV under greenhouse conditions, evaluating leaf symptomatology, but they did not measure fruit production. There also have been evaluations of vegetative growth of passion fruit plants infected by CABMV under field conditions, again without evaluation of productivity (Tempesta Jr. et al., 2004). The relation between various other diseases of yellow passion fruit, including bacteriosis, anthracnosis, verrucosis and septoriososis, and fruit productivity has been evaluated previously (Junqueira et al., 2003).

We conclude that there is considerable inter-specific genetic variability in the resistance of yellow passion fruit to CABMV. We also found that severity of the disease correlates negatively and significantly with fruit production.

Acknowledgments

We thank Maurício Robério Silva Soares for helping cultivate the plants and CNPq for a Master of Science fellowship for C.B.M. Cerqueira-Silva (132590/2007-7).

References

- Alfenas PF, Braz ASK, Torres LB, Santana EN, et al. (2005). Transgenic passionfruit expressing RNA derived from *Cowpea aphid-borne mosaic virus* is resistant to passionfruit woodiness disease. *Fitopatol. Bras.* 30: 33-38.
- Ayres M, Ayres Junior M, Ayres DL and Santos AS (2005). BioEstat 4.0: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biomédicas. Sociedade Civil de Mamirauá, Belém.
- Bellon G, Faleiro FG, Junqueira KP, Junqueira NTV, et al. (2007). Genetic variability of wild and commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) accessions using RAPD markers. *Rev. Bras. Frutic.* 29: 124-127.
- Chagas CM, Rezende JAM, Colariccio A, Piza CT Jr, et al. (1992). Ocorrência do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (VEFM) no estado de São Paulo. *Rev. Bras. Frutic.* 14: 187-190.
- Chaves ALR (2002). Symptoms and damage caused by virus in economic importance crops. *Biológico* 64: 217-219.
- Fajardo TVM, Eiras M, Santos HP, Nickel O, et al. (2004). Biological and molecular detection and characterization of *Rupestris stem-pitting associated virus* and its effect on photosynthesis of grapevines [Detecção e caracterização biológica e molecular de *Rupestris stem-pitting associated virus* e seu efeito na fotossíntese de videiras]. *Fitopatol. Bras.* 29: 209-214.
- Faleiro FG, Junqueira NTV and Braga MF (2005). Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro - Desafios da Pesquisa. In: Maracujá: Germoplasma e Melhoramento Genético (Faleiro FG, Junqueira NTV and Braga MF, eds.). Embrapa Cerrados, Planaltina, 187-210.
- Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF, Junqueira KP, et al. (2007). Cruzamentos inter-específicos e retrocruzamentos visando à resistência do maracujazeiro a doenças. In: 4º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. CD-ROOM, São Lourenço.
- Farias MAA, Cunha MAP, Faria GA, Peixoto CP, et al. (2005a). Breeding of yellow passionfruit by stratified mass selection and competition with regional populations. *Magistra* 17: 142-145.

- Farias MAA, Faria GA, Cunha MAP, Peixoto CP, et al. (2005b). Physical and chemical fruit characterization of yellow passionfruits of stratified mass selection cycles and local populations. *Magistra* 17: 83-87.
- Ferreira FR (2005). Recursos Genéticos de Passiflora. In: Maracujá: Germoplasma e Melhoramento Genético (Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF, eds.). Embrapa Cerrados, Planaltina, 40-52.
- Fonseca KG, Faleiro FG, Junqueira NTV, Bellon G, et al. (2007). Resistência de Populações RC de Maracujazeiro ao Vírus do Endurecimento dos Frutos. In: 4º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. CD-ROOM, São Lourenço.
- Gioria R, Bosquê GG, Rezende JAM, Amorim L, et al. (2000). Incidência de viroses de maracujazeiro na Alta Paulista SP e danos causados pelo “*Passion fruit woodiness virus*”. *Fitopatol. Bras.* 25: 182-189.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2004). Áreas Destinadas à Colheita e Colhida, Quantidade Produzida, Rendimento Médio e Valor da Produção dos Principais Produtos das Lavouras Permanentes, Segundo as Grandes Regiões e Unidades da Federação - Brasil - 2004. In: Pesquisa Agrícola Municipal. Culturas Temporárias e Permanentes, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, Rio de Janeiro, 90.
- Junqueira NTV, Anjos JRN, Silva APO, Chaves RC, et al. (2003). Reaction to diseases and yield of eleven cultivars of sour-passion fruit cultivated with no pesticides. *Pesq. Agricopec. Bras.* 38: 1005-1010.
- Kitajima EW, Chagas CM and Crestani OA (1986). Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiros no Brasil. *Fitopatol. Bras.* 11: 405-432.
- Krause-Sakate R, Mello RN, Pavan MA, Zambolim EM, et al. (2001). Molecular characterization of two brazilian isolates of *Lettuce mosaic virus* with distinct biological properties. *Fitopatol. Bras.* 26: 153-157.
- Leão RMK, Peixoto JR, Junqueira NTV, Rezende RO, et al. (2006). Reação de progênies de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea aphidborne mosaic virus - CABMV*) em casa de vegetação. *Biosci. J.* 22: 87-92.
- Lima AA, Carvalho JEB and Caldas RC (1999). Seletividade de herbicidas aplicados em pré-emergência para mudas de maracujá amarelo. *Rev. Bras. Frutic.* 21: 379-381.
- Loreto TJG and Vital A (1983). Viroses e Micoplasmoses do Maracujá em Pernambuco. Informe SERDV (Serviço de Defesa Sanitária Vegetal), Recife.
- McKinney HH (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seed lings by *Helminthosporium sativum*. *J. Agric. Res.* 26: 159-217.
- Meletti LMM, Santos RR and Minami K (2000). Breeding of yellow passion-fruit: development of the cultivar ‘COMPOSTO IAC-27’. *Sci. Agric.* 57: 491-498.
- Nascimento AVS, Souza ARR, Alfenas PF, Andrade GP, et al. (2004). Phylogenetic analysis of *potyvirus* isolates causing passionfruit woodiness in Brazil. *Fitopatol. Bras.* 29: 378-383.

- Nascimento AVS, Santana EN, Braz ASK, Alfenas PF, et al. (2006). *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. *Arch. Virol.* 151: 1797-1809.
- Nascimento WMO, Tomé ATM, Oliveira MSP, Müller CA, et al. (2003). Selection of progenies of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) to fruit quality. *Rev. Bras. Frutic.* 25: 186-188.
- Novaes QS and Rezende JAM (1999). Possível aplicação do DAS-ELISA indireto na seleção de maracujazeiro tolerante ao *Passionfruit woodiness virus*. *Fitopatol. Bras.* 24: 76-79.
- Novaes QS and Rezende JAM (2003). Selected mild strains of *Passion fruit woodiness virus* (PWV) fail to protect pre-immunized vines in Brazil. *Sci. Agric.* 60: 699-708.
- Oliveira JC (1980). Melhoramento genético de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg visando aumento de produtividade. Doctoral thesis, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Santos AA, Bezerra MA, Cardoso JE, Vidal JC, et al. (2004). Effect of the melon yellowing-associated virus and whitefly on the carbon fixation, production and solid soluble total of melon fruits. *Cienc. Agron.* 35: 214-219.
- São José AR, Rezende JAM and Costa AF (1994). Ocorrência do Vírus do Endurecimento do Fruto do Maracujazeiro no Norte do Estado de Minas Gerais. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, Salvador, 797.
- Silva JR and Rossi AD (2005). Comercialização de Maracujá: Situação Atual, Perspectivas e Mercado de Exportação. In: Manejo no Controle do Vírus do Endurecimento dos Frutos (PWV) do Maracujazeiro (Sampaio AC, Fumis TF, Rossi AD, Almeida AM, et al, eds.). Anais, Jaboticabal, 21-36.
- Simmonds JH (1959). Mild strain protection as a means of reducing losses from the *Queensland woodiness virus* in the passion vine. *Queensl. J. Agric. Sci.* 16: 371-380.
- Tempesta R Jr, Peixoto JR, Medeiros FMB and Sousa MAF (2004). Desenvolvimento Vegetativo e Severidade do Vírus do Endurecimento do Fruto (Passionfruit Woodiness Virus - PWV) em 17 Genótipos de Maracujazeiro Azedo, Cultivados no Distrito Federal. In: XVIII Congresso Brasileiro de Fruticultura, Sociedade Brasileira da Fruticultura. Anais, CD, Florianópolis. Available at [http://www.sbfruti.com.br/anais_xviii_cbf/resumos/T0876-760.pdf] or [http://maracuja.cpac.embrapa.br/arquivos/artigoscompletos/2_13.pdf].
- Trevisan F (2005). Transformação genética de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) para resistência ao vírus do endurecimento dos frutos. Master's thesis, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Piracicaba.
- Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, et al. (2000). Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the international committee on the taxonomy of viruses. Academic Press, New York.
- Viana AP, Pereira TNS, Pereira MG, Souza MG, et al. (2003). Genetic diversity among yellow passion fruit commercial genotypes and among *Passiflora* species using RAPD. *Rev. Bras. Frutic.* 25: 489-493.

Viana-Silva TEDR, Rosa RCC, Vitorazi L, Pereira SMF, et al. (2003). Avaliação dos estádios de maturação do maracujá amarelo. I. Características físicas dos frutos e rendimento do suco. In: 6º Simpósio Brasileiro sobre a Cultura do Maracujazeiro UENF/UFRRJ, Campos dos Goytacazes, 11.

Yamashiro T and Chagas CM (1979). Ocorrência de grave moléstia virótica em maracujá amarelo no Estado da Bahia. In: 5º Congresso Brasileiro de Fruticultura, Sociedade Brasileira de Fruticultura, Anais, Pelotas, 915-917.

CAPITULO 6

AMPLIFICAÇÃO CRUZADA DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM *PASSIFLORA SPP.*

Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva¹; Léo Duc Haa Carson Schwartzaupt da Conceição¹; Cláudio Benicio Cardoso-Silva²; Antonio Carlos de Oliveira²; Margarete Magalhães de Souza¹; Ronan Xavier Corrêa¹.

Resumo

Avaliações genéticas em *Passiflora* spp. vêm sendo realizadas mediante caracterizações de descritores agronômicos e marcadores moleculares. Contudo tais estudos podem ser considerados incipientes, visto o grande número de espécies ainda não estudadas e o potencial, ainda inexplorado do grande número de tipos de marcadores moleculares, a exemplo dos microssatélites (SSR). Objetivou-se avaliar a amplificação cruzada de 25 *primers* de SSR, desenvolvidos em *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg., e sete SSR desenvolvidos em *P. alata* Curtis para 19 espécies de passifloras. Os produtos de amplificação foram resolvidos em gel agarose (3%) e analisados para determinar a presença/polimorfismo de *amplicons* SSR. Apenas quatro dos 32 *primers* testados não apresentaram amplificação cruzada, para os demais o percentual de amplificação cruzada variou entre 11 e 88,8 %. Os *primers* SSR apresentam, em sua maioria, amplificação cruzada entre *Passifloras*, e, portanto poderão ser utilizados em estudos de variabilidade intra- e interespecífica e mapeamento genético molecular de passifloras.

Amplificação cruzada de marcadores microssatélites em *Passiflora* spp.

Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva¹; Léo Duc Haa Carson Schwartzaupt da Conceição¹; Cláudio Benício Cardoso-Silva²; Alan Silva Pereira²; Antonio Carlos de Oliveira²; Margarete Magalhães de Souza¹; Ronan Xavier Corrêa¹.

¹Laboratório de Genética Molecular Aplicada, Centro de Biotecnologia e Genética, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brasil;²Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, BA, Brasil.

Autor para correspondência: Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa

E-mail: ronanxc@uesc.br

(Artigo em fase de tradução para submissão à *Molecular Ecology Notes*)

Resumo - Avaliações genéticas em *Passiflora* spp. vêm sendo realizadas mediante caracterizações de descritores agronômicos e marcadores moleculares. Contudo tais estudos podem ser considerados incipientes, visto o grande número de espécies ainda não estudadas e o potencial, ainda inexplorado do grande número de tipos de marcadores moleculares, a exemplo dos microssatélites (SSR). Objetivou-se avaliar a amplificação cruzada de 25 *primers* de SSR, desenvolvidos em *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg., e sete SSR desenvolvidos em *P. alata* Curtis para 19 espécies de passifloras. Os produtos de amplificação foram resolvidos em gel agarose (3%) e analisados para determinar a presença/polimorfismo de *amplicons* SSR. Apenas quatro dos 32 *primers* testados não apresentaram amplificação cruzada, para os demais o percentual de amplificação cruzada variou entre 11 e 88,8 %. Os *primers* SSR apresentam, em sua maioria, amplificação cruzada entre *Passifloras*, e, portanto poderão ser utilizados em estudos de variabilidade intra- e interespecífica e mapeamento genético molecular de passifloras.

Palavras-chave: Passifloras silvestres, maracujeiro ‘amarelo’, maracujazeiro ‘doce’, marcadores moleculares, transferência, transferibilidade.

O maracujazeiro (*Passifloraceae*; *Passiflora*) é amplamente distribuído na América latina e possui elevada variabilidade genética a ser pesquisada e conservada (Faleiro et al., 2005). No cenário internacional o Brasil ocupa o posto de maior produtor, consumidor e exportador de maracujá, respondendo por cerca de 70% da produção mundial (Bellon et al., 2007). A esse respeito, o maracujazeiro ‘amarelo’ (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg.) desponta como a espécie de *Passiflora* mais cultivada, ocupando aproximadamente 95% dos campos de produção de maracujá do Brasil (Borges et al., 2005).

Outras espécies de *Passiflora* spp., de comercialização restrita e, ou inexploradas comercialmente, apresentam importância para (i) comercialização regional, a exemplo de *P. edulis* Sims, *P. quadrangularis*., *P. nitida*, *P. caerulea*, *P. laurifolia*, *P. cincinnata* e *P. setacea* (Inglez de Souza e Meletti, 1997; Meletti et al., 2005) e (ii) melhoramento genético associado à resistência a fitopatógenos, a exemplo das espécies *P. cincinnata*, *P. caerulea*, *P. incarnata*, *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. nitida*, *P. quadrangularis* e *P. setacea* (Meletti et al., 2005) e associado a características organolépticas, como a *P. setacea* (Cardoso-Silva et al., 2007).

Entretanto, mesmo diante do potencial uso de espécies silvestres em programas de melhoramento, pesquisas relacionadas ao acesso de polimorfismo em nível de DNA, para caracterização da diversidade, a exemplo de estudos mediante marcadores RAPD (Fajardo et al., 1998; Junqueira et al., 2007; Bellon et al., 2007), AFLP (Segura et al., 2002) e isoenzimas (Fajardo et al., 2003), são incipientes ou inexistentes para a maioria das espécies de *Passiflora* spp.

As primeiras pesquisas com SSR em maracujazeiros foram publicadas em 2005 com o desenvolvimento de *primers* SSR para *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Oliveira et al., 2005) e para *P. alata* (Padua et al., 2005), seguido pelo desenvolvimento de novos *primers* para *P. alata* (Penha, 2007; Penha et al., 2008). O emprego destes *primers* ainda é limitado, e está associado a resultados preliminares de construção (Laperuta et al., 2005) e integração (Nunes et al., 2008) de mapas genéticos. O pequeno volume, até o momento, de pesquisas envolvendo marcadores SSR em *Passiflora*, se justifica, ao menos em parte, devido ao volume de tempo e de recursos dispendidos na geração destes marcadores.

A despeito do reduzido emprego de marcadores SSR em *Passiflora* ssp., estes vêm sendo utilizados com êxito em pesquisas genéticas objetivando caracterizações de similaridade genética em milho (Senior et al., 1998); estrutura genética de populações em cevada (Malysheva-Otto et al., 2006) e mapeamento genético de QTLs em milho (Wisser et al., 2008). Uma estratégia adotada para reduzir os custos e o tempo dispensado para o uso

destes marcadores é a utilização de *primers* que apresentem amplificação cruzada entre espécies relacionadas, a exemplo do que foi realizado por Penha et al. (2007) entre *primers* SSR descritos para *P. edulis* f. *flavicarpa* e amplificados em *P. alata*.

Foi avaliado no presente trabalho, a amplificação cruzada de 25 *primers* SSR, desenvolvidos a partir de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e sete *primers* SSR desenvolvidos a partir de *P. alata*, para um total de 19 espécies de *Passiflora* spp. Os resultados são discutidos em termos da aplicação dos SSR em futuros estudos de diversidade, mapeamento e melhoramento genético de *Passiflora* spp.

Para os ensaios de transferência de *primers* desenvolvidos originalmente para *P. edulis* f. *flavicarpa* foram utilizadas 19 espécies, a saber: *Passiflora gibetii* (*Pgi*); *P. watsoniana* (*Pw*); *P. alata* (*Pa*); *P. cincinnata* (*Pc*); *P. gardneri* (*Pg*); *P. coccinea* (*Pco*); *P. kermesina* (*Pk*); *P. rubra* (*Pr*); *P. capsulares* (*Pca*); *P. misera* (*Pm*); *P. suberosa* (*Psu*); *P. nitida* (*Pn*); *P. bahiensis* (*Pb*); *P. setacea* (*Ps*); *P. galbana* (*Pga*); *P. amethystina* (*Pam*); *P. palmeri* var. *sublanceolata* (*Pp*); *P. foetida* var. *foetida* (*Pf*); e *P. edulis* f. *flavicarpa* (*Pef*) que foi utilizado como controle. Por sua vez, para os ensaios de transferência dos *primers* SSR originalmente desenvolvidos para *P. alata* foram utilizadas nove espécies, a saber: *Pw*, *Pg*, *Pb*, *Pga*, *Pam*, *Pp*, *Pf*, *Pef* e *Pa*, sendo esta última utilizada como controle. Os genótipos utilizados foram amostrados no Banco Ativo de Germoplasma de *Passiflora* da Universidade Estadual de Santa Cruz (BAG-*Passiflora*/UESC) e na Coleção Ativa de Germoplasma de Trabalho de *Passiflora* da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (CAGT-*Passiflora*/UESB).

Amostras de DNA das 19 espécies de *Passiflora* foram extraídas por meio do protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990). As reações de amplificação (PCR) foram realizadas mediante uso de 25 *primers* SSR desenvolvidos a partir de *P. edulis* var. *flavicarpa* (Oliveira, 2005; Oliveira et al., 2005) e sete *primers* SSR desenvolvidos a partir de *P. alata* (Padua et al., 2005), sendo utilizado os protocolos e programas de amplificação descritos pelos autores que desenvolveram os referidos *primers*.

Os produtos da PCR foram resolvidos em gel agarose (3%), corado com brometo de etídio, submetido a eletroforese por 4 h a 110 V. Para visualização dos *amplicons* os géis foram expostos, após a corrida, a luz ultra-violeta (UV) e fotodocumentados com *software* Kodak Digital Science 1D v.3.0.1. Adotou-se como controle para o ensaio o acesso a locos SSR de DNA de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata*, visto que os *primers* utilizados foram desenvolvidos para estas espécies.

Para os *primers* SSR desenvolvidos a partir de *P. edulis* f. *flavicarpa*, foi observada um percentual de amplificação cruzada, entre as espécies de *Passiflora*, variando de 20% em

Pk até 60% nas espécies *Pc* e *Pg* (Tabela 1). Valores percentuais diferenciados de amplificação entre as espécies de *Passiflora* spp, também foram observados em relação aos *primers* desenvolvidos a partir de *P. alata*, variando de 14,2 % em *Pam* até 72,4 % em *Pef* (Tabela 2). Estes resultados permitem afirmar que os *primers* SSR desenvolvidos originalmente para *Pef* e *Pa* são capazes de acessar locos SSR, via amplificação cruzada, em outras espécies de *Passiflora*. Estudos semelhantes foram realizados para outras espécies vegetais, a exemplo de estudos de amplificação cruzada de SSR entre espécies de *Coffea* spp. (Poncet et al., 2004; Hendre et al., 2008), assim como para passifloras (Padua, 2005; Penha et al. 2007). Estes autores detectaram amplificação cruzada de pares de *primers* SSR desenvolvidos a partir de *Pa* para diferentes espécies de *Passiflora* spp. Contudo, a presente pesquisa apresenta o primeiro registro de amplificação de DNA mediante *primers* SSR em 17 das 19 espécies avaliadas.

Dentre os 32 pares de *primers* testados, apenas os pares Pe22, Pe42 e Pa2 não resultaram em amplificação cruzada com as espécies de *Passiflora* avaliadas (Tabela 1 e 2). De forma oposta, os demais pares de *primers* apresentaram amplificação para ao menos duas das 18 espécies avaliadas com os *primers* desenvolvidos para *Pef* (Tabela 1) e uma das oito espécies avaliadas com os *primers* desenvolvidos para *Pa* (Tabela 2). Esses valores de amplificação cruzada obtida entre as espécies, corroboram a utilização de amplificação cruzada entre *primers* SSR de *Passiflora*, mas demonstram claramente que nem todos os *primers* SSR podem ser adotados.

Os resultados gerados demonstram ser possível a utilização de *primers* SSR, selecionados por meio de testes de amplificação cruzada, para realização de ensaios genéticos que explorem todo o potencial dos microssatélites que permitem a realização de estudos de diversidade e mapeamento genéticos. Desta forma, espécies silvestres com pequeno interesse comercial, mas com potencial uso em programas de melhoramento que exploram o valor ornamental, farmacológico e a resistência a pragas e doenças, passam a contar com a possibilidade de estudos genético-moleculares sofisticados, fazendo uso dessa metodologia de acesso a locos SSR.

Agradecimentos

A Mestre e Elisa S. Lisboa dos Santos e ao mestrando Samuel M. de Jesus Branco pelo auxílio prestado nas atividades laboratoriais. À FAPESB, CNPq e UESC pelos financiamentos e bolsas concedidas.

Referências

- Bellon G, Faleiro FG, Junqueira KP, Junqueira NTV, Santos EC, Braga MF, Guimarães CT (2007) Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura** **29**:124-127.
- Borges RS, Scaranari C, Nicoli AM, Coelho RR (2005) Novas variedades: validação e transferência de tecnologia In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, pp. 618-640.
- Cardoso-Silva CB, Melo JRF, Pereira AS, Cerqueira-Silva CBM, Oliveira AC (2007). Estudo da diversidade genética mediante caracterização físico química de frutos de maracujazeiros-do-sono nativos. **Magistra** **19**: 352-358.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** **12**:13-15.
- Fajardo 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.
- Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (2005) Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro - Desafios da Pesquisa. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (eds.) **Maracujá: Germoplasma e Melhoramento Genético**. Planaltina, Embrapa Cerrados, pp. 187-210.
- Junqueira KP, Faleiro FG, Ramos JD, Bellon G, Junqueira NTV, Braga MF (2007) Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Fruticultura** **29**:571-575.
- Hendre PS, Phanindranath R, Annapurna V, Lalremruata A, Aggarwal, RK (2008) Development of new genomic microsatellite markers from Robusta coffee (*Coffea canephora* pierre ex a. Froehner) showing broad cross-species transferability and utility in genetic studies. **BMC plant biology** **8**:51 doi:10.1186/1471-2229-8-51.
- Inglez de Souza JS, Meletti LMM. **Maracujá espécies, variedades e cultivo**. Piracicaba: FEALQ, 1997. v. 3, 150 p.
- Nascimento WMO, Tomé ATM, Oliveira MSP, Müller CA, Carvalho JEU (2003) Selection of progenies of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) to fruit quality. **Revista Brasileira de Fruticultura** **25**:186-188.

Laperuta LC, Matta FP, Oliveira EJ, Moraes MC, Lopes R, Consoli L, Pastina MM, Garcia AAF, Vieira MLC (2008) Mapeamento de QRL (*Quantitative Resistance Loci*) para resposta à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* com base em um mapa genético integrado de maracujá-amarelo In. 54 Congresso Brasileiro de Genética (**Anais**), Resumo 9.

Meletti LMM, Soares-Scott MD, Bernacci LC, Passos IRS (2005) Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 55-78.

Nunes ES, Penha HA, Hanai LR, Oliveira CA, Vieira MLC (2008) Construção de um mapa genético integrado para o maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) utilizando marcadores AFLP e SSR In. 54 Congresso Brasileiro de Genética (**Anais...**), Resumo 25.

Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Camargo LEA, Fungaro MHP, Vieira MLC (2005) Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Molecular Ecology Notes** 5:331-333 doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.00917.x

Pádua JG, Oliveira EJ, Zucchi MI, Oliveira ZCX, Camargo LEA, Vieira MLC (2005) Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: *Passifloraceae*). **Molecular Ecology Notes** 5:863-865 doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01090.x.

Penha HA, Zucchi MI, Fungaro MHP, Paula FM, Munhoz CF, Oliveira EJ, Hanai LR, Consoli L, Vieira MLC (2007) Desenvolvimento de bibliotecas enriquecidas com microssatélites (SSR) em *Passiflora alata* e análise de transferibilidade de marcadores SSR entre *Passiflora* f. *edulis flavicarpa* e *Passiflora alata*. In: 53º Congresso Brasileiro de Genética (**Anais...**), Resumo 108.

Poncet V, Hamon P, Minier J, Carasco C, Hamon S, Noirot M (2004) SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.) **Genome** 47: 1071–1081 doi: 10.1139/G04-064.

Segura SD, Coppens DEG, Ocampo CH, Ollitrault P (2003) Isozyme variation in *Passiflora* subgenera *Tacsonia* and *Manicata*. Relationships between cultivated and wild species. **Genetic resources and Crop Evolution** 50:417-427.

Segura SD, Coppens DEG, Bohorquez A, Ollitrault P, Tohmé J (2002) An AFLP diversity study of the genus *Passiflora* focusing on subgenus *Tacsonia*. **Genetic resources and Crop Evolution** 49:111-132 doi.org/10.1023/A:1014731922490.

Malysheva-Otto LV, Ganai MW, Röder MS (2006) Analysis of molecular diversity, population structure and linkage disequilibrium in a worldwide survey of cultivated barley germplasm (*Hordeum vulgare* L.). **BMC Genetics** 7:6 doi:10.1186/1471-2156-7-6.

Senior ML, Murphy JP, Goodman MM, Stuber SW (1998) Utility of SSRs an agarose gel system for determining genetic similarities and relationships in maize using. **Crop Sci.** **38**:1088–1098.

Wisser RJ, Murray SC, Kolkman JM, Ceballos H, Nelson RJ (2008) Selection Mapping of Loci for Quantitative Disease Resistance in a Diverse Maize Population. **Genetics** **180**: 583–599.

Tabela 1. Amplificação cruzada com 25 primers SSR, desenvolvidos a partir de *P. edulis* f. *flavicarpa* (controle; *Pef*), em 18 espécies de *Passiflora* spp.

Codigo	Descrição dos Primers* SSR Sequencia de nuclotídica	Espécie de <i>Passiflora</i> spp**																		Total	%	
		<i>Pgi</i>	<i>Pw</i>	<i>Pa</i>	<i>Pc</i>	<i>Pg</i>	<i>Pco</i>	<i>Pk</i>	<i>Pr</i>	<i>Pca</i>	<i>Pm</i>	<i>Psu</i>	<i>Pn</i>	<i>Pb</i>	<i>Ps</i>	<i>Pga</i>	<i>Pam</i>	<i>Pp</i>	<i>Pf</i>			<i>Pef</i>
PE01	f = CAGGATAGCAGCAGCAATGA r = AGCCAAATGTCAAACCTGAAC	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	5	27,7
PE02	f = GGACGACAATCAAGTGAGG r = CCCAAACTATGCAACACCAA	-	-	1	1	1	1	-	1	-	1	1	1	-	-	1	-	-	-	1	9	50
PE03	f = GCAGCGAGGGAAGAAAAA r = TGAGACATCGTGCGTGAA	-	-	-	1	1	-	-	1	-	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	7	38,8
PE04	f = ATGCTTTTGGAAATCCGTTT r = TGCTCATGCAAAGTCACTGG	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	10	55,5
PE05	f = GCGGGATTCTCTTGGCTTAC r = TAATCTCAGCTGGGTTTGGT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	2	11,1
PE06	f = AGCGGGGAGGAGAGTAGC r = GCCTGATGTCAAAAACACAG	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	1	-	1	5	27,7
PE07	f = TGCTCATTGATGGTGCTTG r = TCGTCTCTTCTCCTCCTTCA	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	16	88,8
PE08	f = TCTAATGAGCGGAGGAAAGC r = CCGGATACCCACGCATTA	1	-	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-	-	1	16	88,8
PE09	f = GGGCCTTTATCCATGTTTGA r = GGAAATCCGAAAACCTGGTTG	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	15	83,3
PE10	f = AACCTTGATCTCCAGCCTAT r = GTTTTCGCCCCGCGTATT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
PE11	f = TTAACAGGACTTAGCACTTGA r = CTCATCCTTCTCCATCTTTG	1	1	-	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	8	44,4
PE19	f = GCATAAGTTGTCGGTCTTGG r = CCTCGAACCTCTATCATCCA	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1	-	1	1	1	6	33,3
PE27	f = TTGTCATTGCACTCATCCT r = GCAGACATTTCTGGAGCA	1	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	1	-	1	1	1	-	-	1	9	50
PE28	f = GCCACTAACGTTAACTGTGCT r = CAAGCTCTTATTAGGCATCCA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
PE37	f = CAAAAGGATAGGCCTGATGTC r = TGCTTGGTCATCCACTGAAG	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	-	1	1	1	16	88,8

A tabela continua na próxima pagina...

PE38	f= GATCGGTCCTCGGTTAGAC r= AGTCACACAGCATGAGAAATC	1	-	-	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	1	-	1	-	-	1	7	38,8
PE42	f= GTCACTTCATTCTTCCTTTCC r= TTAGCCCCTCAAACACAA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
PE54	f= TGGTGTGTGTGGGTGATTAG r= CATTCTCCTGCCACCTGAGT	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	3	16,6	
PE58	f= GCAATTTACCATCTTCTGCT r= CCACGGTCATGGATGTTT	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	7	38,8
PE59	f= GAACACTTCGCATGGCTAGA r= TTCCGAATCAAACCGTAACT	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	1	-	1	1	11	61,1	
PE60	f= TCCTCACCTTTGTTTATGCT r= AATGACCTATTTGAACCTGGA	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	2	11,1	
PE64	f= ATCAATTCCGCACCCCAAAC r= GGAACGTCAATCAAGTGAGGA	1	-	1	1	1	1	-	-	1	-	1	-	1	1	1	1	1	1	13	72,2	
PE66	f= CCATAGTCCCAACAAGCATC r= GCTGTGGACCCTAACTCAGTC	-	1	1	1	1	1	1	1	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	13	72,2	
PE75	f= CACAATCGGTGGGAAAGATA r= GTAGTTTTGGGCAGTTTGC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	1	16	88,8	
PE90	f= TCAGGAAGATTGCATGTTAGT r= CTGGGTTTTGTTTATGTTGC	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	6	33,3	
Total de ampliações cruzadas		12	12	12	15	10	11	5	10	10	10	8	10	11	14	12	10	10	10	25		
Porcentagem de ampliações cruzadas (%)		48	48	48	60	40	44	20	40	40	40	32	40	44	56	48	40	40	40	100		

* *Primers* SSR selecionados a partir de Oliveira (2005) e Oliveira et al. (2005). ** *Pgi* = *Passiflora gibetti*; *Pw* = *P. watsoniana*; *Pa* = *P. alata*; *Pc* = *P. cincinnata*; *Pg* = *P. gardneri*; *Pco* = *P. coccinea*; *Pk* = *P. kermesina*; *Pr* = *P. rubra*; *Pca* = *P. capsulares*; *Pm* = *P. misera*; *Psu* = *P. suberosa*; *Pn* = *P. nitida*; *Pb* = *P. bahiensis*; *Ps* = *P. setacea*; *Pga* = *P. galbana*; *Pam* = *P. amethystina*; *Pp* = *P. palmeri* var. *sublanceolata*; *Pf* = *P. foetida* var. *foetida*; *Pef* = *P. edulis* f. *flavicarpa*. Códigos: 1 = ocorreu amplificação; - = não ocorreu amplificação.

Tabela 2. Amplificação cruzada de sete *primers* SSR, desenvolvidos a partir de *P. alata* (controle), em oito espécies de *Passiflora* spp.

Codigo	Descrição dos Primers SSR Sequencia de nuclotídica	<i>Espécie de Passiflora spp**</i>									Total	%
		<i>Pw</i>	<i>Pg</i>	<i>Pb</i>	<i>Pga</i>	<i>Pam</i>	<i>Pp</i>	<i>Pf</i>	<i>Pef</i>	<i>Pa</i>		
PA01	GCGGGATTCTCTTGCCTTAC ACAAAACACATCAGCCACCA	-	-	-	-	-	1	-	1	1	2	25
PA02	AGAGTCGTCTAACCCCTTTGC TCTTGCTTACGCGTGGACTA	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
PA03	GCCTTAGCTTGCAACTTTTCG GGAGGCAACCCGAGTATAAA	1	1	-	-	-	-	-	1	1	3	37,5
PA04	GGGCGGAAGAAAAGAGAAG GAAACACACGATGCGAAAA	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1	12,5
PA05	GGAAGTGAAGGAGAAGAAGA CCCTCTGGTTGTCTACCTAC	1	1	1	1	-	-	-	1	1	5	62,5
PA06	TAACCGACTTCGCCCACA GAGCAGGGGAAGAAAAGGA	-	-	-	-	-	1	1	1	1	2	25
PA07	CACATTTGCCGTCCTGG CGGCATACGATAAATCTCCTG	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	100
Total de amplificações cruzadas		3	3	2	2	1	4	2	5	7		
Porcentagem de amplificações cruzadas (%)		43	43	29	28,5	14,2	57,1	29	71,4	100		

* *Primers* SSR selecionados a partir de Padua et al. (2005). ** as abreviaturas seguem como descrito na

Tabela 1. *Códigos: 1 = ocorreu amplificação; - = não ocorreu amplificação.*

CONCLUSÕES GERAIS

A escolha da medida de distância para variáveis qualitativas, assim como a de coeficientes de similaridade (e dissimilaridade) para variáveis quantitativas, influencia na caracterização de diversidade genética em maracujazeiros. Avaliações de diversidade, ao menos em maracujazeiros, devem preferir o uso das medidas de distância de Coler-Rodger, do quadrado da distância euclidiana, do coeficiente de Yule, de Roger e Tamino e de Rusel e Rao, visto que estes apresentam altos valores de stress para projeção dos dados no espaço bidimensional e, ou, para construção da matriz de agrupamento.

Os diferentes métodos de agrupamento adotados influenciam os resultados de variabilidade entre genótipos, sendo o método de agrupamento baseado na média aritmética não ponderada (UPGMA) o mais indicado para construção da matriz cofenética e, conseqüente, do dendrograma, independente da origem dos dados da matriz original de similaridade.

Genótipos de maracujazeiro ‘amarelo’ e ‘do-sono’ apresentam variabilidade genética intra- e interespecífica atestada por testes estatísticos, sendo os descritores ‘sólido solúveis totais’, ‘diâmetro equatorial’, ‘acidez titulável total’ e ‘peso de frutos’ responsáveis, ao menos nas condições avaliadas, pela maior parte da variabilidade observada merecendo, portanto, atenção especial em futuras caracterizações de diversidade intra- e interespecífica.

A variabilidade observada entre os maracujazeiros ‘amarelo’ e ‘do-sono’, em relação às características físico-químicas de frutos, permite o direcionamento de cruzamentos preferenciais a serem explorada em hibridações divergentes, convergentes; que objetivem o incremento de atributos organolépticos desejados para a passicultura.

As seleções realizadas em programas de melhoramento genético e, ou pelos produtores de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, estão ao menos em parte, ocasionando estreitamento genético da espécie.

Os baixos valores de diversidade e a ausência de acessos de *P. trintae*, assim como a baixa representatividade de acessos de *P. setacea*, nas coleções de trabalho de *Passiflora* do Brasil aumentam a necessidade de ações de conservação e caracterizações relacionados a estas espécie.

Cruzamentos divergentes entre espécies cuja base genética esteja reduzida, a exemplo de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. trintae* devem ser incentivados, sendo os dados de polimorfismo molecular úteis para o direcionamento de cruzamentos preferenciais, ao menos para manutenção da variabilidade genética em bancos de germoplasma.

Os índices de doença são eficientes para avaliações do patossistema *Passiflora* vs. CABMV, apresentando vantagens em relação ao uso isolado de escala de notas. Entre as variáveis fitopatométricas avaliadas, deve-se priorizar o uso do ‘índice de doença foliar global’ e ‘índice de intensidade de doença’, visto que ambos são eficientes para seleção de genótipos de maracujazeiro e para caracterização da severidade de isolados virais.

Os genótipos de maracujazeiro ‘amarelo’ avaliados apresentam considerável variabilidade em relação ao gradiente de resistência ao vírus do endurecimento dos frutos, podendo ser utilizados em programas de melhoramento que visem o incremento de resistência ao CABMV. Os sintomas foliares ocasionados pelo vírus do endurecimento apresentam correlação negativa e significativa, podendo ser adotados como critério para seleção de genótipos contrastantes quanto à resistência a esta enfermidade.

A estratégia de amplificação cruzada de *primers* microssatélites em espécies nativas de *Passiflora* spp. pode ser explorada com sucesso para realização de ensaios genéticos, o que permite ampliar e, ou, aprofundar os conhecimentos acerca da diversidade, filogenia e do mapeamento genético em espécies desse gênero.

Espécies silvestres de *Passiflora* que apresentam pequeno interesse comercial, mas que em contrapartida possuem potencial uso nas diferentes frentes de ações que explorem o valor ornamental, farmacológico e a resistência a pragas e doenças, passam a contar com a possibilidade de estudos genético-moleculares sofisticados, fazendo uso da metodologia de amplificação cruzada de microssatélites, especialmente nas etapas de pré-melhoramento de *Passiflora*.

REFERÊNCIAS GERAIS

ABREU SPM (2006) Desempenho Agronômico, características físico-químicas e reação a doenças em genótipos de maracujazeiros-azedo cultivados no Distrito Federal. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de Brasília, Brasília, 129p.

ALFENAS PF, BRAZ ASK, TORRES LB, SANTANA EN, et al. (2005). Transgenic passionfruit expressing RNA derived from *Cowpea aphid-borne mosaic virus* is resistant to passionfruit woodiness disease. **Fitopatologia Brasileira**. 30: 33-38.

AUKAR APA, LEMOS EGM and OLIVEIRA JC (2002). Genetic variations among passion fruit species using RAPD markers. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 24: 738-740.

BALESTRE M, VON PINHO RG, SOUZA JC and LIMA JL (2008). Comparison of maize similarity and dissimilarity genetic coefficients based on microsatellite markers. **Genetics Molecular Research** 7: 695-705.

BELLON, G, FALEIRO FG, JUNQUEIRA KP, JUNQUEIRA NTV, et al. (2007). Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura** 29: 124-127.

BENIN G, CARVALHO FIF, OLIVEIRA AC, MARCHIORO VS, et al. (2003). Comparações entre medidas de dissimilaridade e estatísticas multivariadas como critérios no direcionamento de hibridações em aveia. **Ciência Rural** 33: 657-662.

BERNACCI LC (2003) Passifloraceae. In: WANDERLEY MGL, SHEPHERD GJ, GIULIETTI AM, MELHEM TS (coord.) **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**. São Paulo, RIMA/FAPESP, pp. 247-248.

BERNACCI LC, MELETTI LMM, SOARES-SCOTT MD, PASSOS IRS (2005) Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: FALEIRO FG, JUNQUEIRA NTV, BRAGA MF (ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, Embrapa Cerrados, pp. 559-586.

BERNACCI LC, SOARES-SCOTT MD, JUNQUEIRA NTV, PASSOS IRS, MELETTI LMM (2008) *Passiflora edulis* SIMS: The correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). **Revista Brasileira de Fruticultura** 30:566-576.

BELO, G. O. et al. Confirmação molecular de híbridos (*Passiflora watsoniana* vs. *P. Gardneri*) por meio de marcadores RAPD. In: LIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE INTERAMERICANA DE HORTICULTURA TROPICAL, 2008, Vitória. (**resumos**) LIV Reunião Anual da Sociedade Interamericana de Horticultura Tropical, 2008 (CD-Rom).

BORGES RS, SCARANARI C, NICOLI AM, COELHO RR (2005) Novas variedades: validação e transferência de tecnologia In: FALEIRO FG, JUNQUEIRA NTV, BRAGA MF (ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, pp. 618-640.

BORÉM A, MIRANDA GV (2005) **Melhoramento de plantas**. 4. ed. Viçosa: Editora UFV, 525p.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. et al. Confirmação de híbridos interespecíficos obtidos de cruzamentos entre *Passiflora watsoniana* e *Passiflora alata*. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2008, Vitória – ES (**resumos**) XX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2008a (CD-Rom).

CONCEICAO, L. D. H. C. S. et al. Confirmação de fecundação cruzada entre espécies passifloras, visando a obtenção de híbridos ornamentais. In: 54º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2008, Salvador – BA (**resumos**) 4º Congresso Brasileiro de Genética, 2008 (www.sbg.org.br).

CARDOSO-SILVA CB, MELO JRF, PEREIRA AS, CERQUEIRA-SILVA CBM, OLIVEIRA AC (2007). Estudo da diversidade genética mediante caracterização físico química de frutos de maracujazeiros-do-sono nativos. **Magistra** 19: 352-358.

CHAGAS, C.M.; REZENDE, J.A.M.; COLARICCIO, A.; PIZA Jr., C.T.; LOPES, L.C.; GALLETTI, S.R.; FERRARI, J.T.; BELLUZI, B.M. Ocorrência do endurecimento do fruto

do maracujazeiro (VEFM) no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.14, p.187-190, 1992.

COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. O maracujá e suas propriedades medicinais – estado da arte. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 475-508.

CZERMAINSKI, A.B.C. Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de avaliação de doenças em plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1545-1555, 1999.

CROCHEMORE ML, MOLINARI HB and STENZEL NMC (2003a). Caracterização agromorfológica do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura** 25: 5-10.

CROCHEMORE ML, MOLINARI HBC and VIEIRA LGE (2003b). Genetic diversity in passion fruit (*Passiflora* spp.) evaluated by RAPD markers. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 46: 521-527.

DIAS LAS (1998). Análises multidimensionais. In: Alfenas AC (Ed.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Editora UFV, Viçosa, p.405-476.

DUARTE JM, dos SANTOS JB and MELO LC (1999). Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. **Genetic Molecular Biology** 22: 427-432.

EMYGDIO BM, ANTUNES IF, CHOER E and NEDEL JL (2003). Eficiência de coeficientes de similaridade em genótipos de feijão mediante marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 38: 243-250.

FAJARDO 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.

FALEIRO FG, JUNQUEIRA NTV, BRAGA MF (2005a) Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro - Desafios da Pesquisa. In: FALEIRO FG, JUNQUEIRA NTV, BRAGA MF (eds.) **Maracujá: Germoplasma e Melhoramento Genético**. Planaltina, Embrapa Cerrados, pp. 187-210.

FALEIRO FG, JUNQUEIRA NTV, BRAGA MF (2006) Importância e avanços do pré-melhoramento de passifloras In: LOPES MA, FÁVERO AP, FERREIRA MAJF, FALEIRO FG (org.) **Curso internacional de pré-melhoramento de plantas**. Brasília-DF, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pp. 138-142.

FALEIRO FG, JUNQUEIRA NTV, BRAGA MF (2005b). Pré-melhoramento de *Passiflora*. In: FÁVERO AP, FERREIRA MAJF, NETO EL (Org.) **Encontro da sociedade brasileira de melhoramento de plantas**, Regional DF. Brasília-DF, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

FALEIRO FG, JUNQUEIRA NTV, BRAGA MF, JUNQUEIRA KP, et al. (2007). Cruzamentos inter-específicos e retrocruzamentos visando à resistência do maracujazeiro a doenças. In: 4º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. (**Anais...**) CD-ROOM, São Lourenço.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, DF: Embrapa Cenargen, 1996. 220 p.

FERREIRA FR, OLIVEIRA JC (1991) Germoplasma de passiflora In: SÃO JOSÉ AR, FERREIRA FR, VAZ RL (Coord.) **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, pp. 187-200.

FERREIRA, FR (2005) Recursos genéticos de *Passiflora*. In: FALEIRO, FG.; JUNQUEIRA, NTV, BRAGA MF (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. Cap. 2, p. 41-50.

FERREIRA FR, RANGEL PHN (2005) Emprego de espécies silvestres no melhoramento genético vegetal: experiência em outras espécies com análise de retrocruzamento avançado de QTLs (AB-QTL) In: FALEIRO FG, JUNQUEIRA NTV, BRAGA MF (ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, pp. 109-140.

FISCHER IH, ARRUDA MC, ALMEIDA AM, GARCIA MJM, JERONIMO EM, PINOTTI RN, BERTANI (2007) Doenças e características físicas e químicas pós-colheita em maracujá amarelo de cultivo convencional e orgânico no centro oeste paulista. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 29: 254-259.

FONSECA RM, LOPES R, BARROS WS, LOPES MTG, FERREIRA FM (2008) Morphologic characterization and genetic diversity of *Capsicum chinense* Jacq. accessions

along the upper Rio Negro – Amazonas. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 8: 187-194.

GIORIA, R.; BOSQUÊ, G.G.; KITAJIMA, E.W. Incidência de viroses de maracujazeiro na Alta Paulista-SP e danos causados pelo *Passion fruit woodiness virus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.182-189, 2000.

GOES, A. Doenças fúngicas da parte aérea da cultura de maracujá. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., 1998, Jaboticabal. (Anais...) Jaboticabal: Funep, 1998. p. 208-216.

JACKSON AA, SOMERS KM and HARVEY HH (1989). Similarity coefficients: measures for co-occurrence and association or simply measures of occurrence? **American Naturalist** 133: 436-453.

GANGA RMD, RUGGIERO C, LEMOS EGM, GRILI GVG, GONÇALVES MM, CHAGAS EA, WICKERT E (2004) Diversidade genética em maracujazeiro amarelo utilizando marcadores moleculares fAFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura** 26:494-498.

GONÇALVES LSA, RODRIGUES R, AMARAL JÚNIOR AT, KARASAWA M, et al. (2008). Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. **Genetics Molecular Research** 7: 1289-1297.

JUNQUEIRA NTV, BRAGA MF, FALEIRO FG, PEIXOTO JR, BERNACCI LC (2005a) Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 81-107.

JUNQUEIRA NTV, FALEIRO FG, BRAGA MF, PEIXOTO JR (2006) Uso de Espécies Silvestres de Passifloras no Pré-melhoramento do Maracujazeiro In: Lopes MA, Fávero AP, Ferreira AMAJF, Faleiro FG (Org.) **Curso internacional de pré-melhoramento de plantas**. Brasília-DF, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pp. 133-137.

JUNQUEIRA KP, FALEIRO FG, JUNQUEIRA NTV, BELLON G, RAMOS JD, BRAGA MF, SOUZA LS (2008) Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura** 30: 191-196.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2004). Áreas Destinadas à Colheita e Colhida, Quantidade Produzida, Rendimento Médio e Valor da Produção dos Principais Produtos das Lavouras Permanentes, Segundo as Grandes Regiões e Unidades da Federação - Brasil - 2004. In: **Pesquisa Agrícola Municipal. Culturas Temporárias e Permanentes, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, Rio de Janeiro, 90.

INGLEZ DE SOUZA, J. S.; MELETTI, L. M. M. **Maracujá espécies, variedades e cultivo**. Piracicaba: FEALQ, 1997. v. 3, 150 p.

LARANJEIRA, F.F. Problemas e perspectivas da avaliação de doenças como suporte ao melhoramento do maracujazeiro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. (Ed.). **Maracujá – germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.160-184.

LIMA AA, CARVALHO JEB and CALDAS RC (1999). Seletividade de herbicidas aplicados em pré-emergência para mudas de maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 21: 379-381.

LORETO TJG and VITAL A (1983). **Viroses e Micoplasmoses do Maracujá em Pernambuco**. Informe SERDV (Serviço de Defesa Sanitária Vegetal), Recife.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.W.; CRESTANI, O.A. Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.409-432, 1986.

LEÃO, R.M.K.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; RESENDE, R.O.; MATTOS, J.K.A.; MELO, B. Reação de progênies de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (*cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV) em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, v.22, p.87-92, 2006.

McKINNEY, H.H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v.26, p.195-217, 1923.

MELETTI, L. M. M.; BRUCKNER, C. H. Melhoramento genético. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. (Ed.) **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 345-385.

MELETTI LMM, SANTOS RR, MINAMI K (2000) Melhoramento do maracujazeiro-amarelo: obtenção do cultivar 'composto iac-27'^{1,2}. **Scientia Agricola** 57: 491-498.

MELETTI LMM, SOARES-SCOTT MD, BERNACCI LC, PASSOS IRS (2005) Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 55-78.

MELO KT, MANICA I, JUNQUEIRA NTV (2001) Produtividade de seis cultivares de maracujazeiro-azedo durante três anos em Vargem Bonita, DF. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 36: 1117-1125.

MENEZES, J. M. T.; OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C.; BANZATTO, D. A. Avaliação da taxa de pagamento de enxertos de maracujá-amarelo sobre espécies tolerantes à “morte prematura de plantas”. **Científica**, v. 22, n. 1, p. 95-104, 1994.

MEYER AS, GARCIA AAF, SOUZA AP and SOUZA CL Jr (2004). Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in maize (*Zea mays* L). **Genetic Molecular Biology** 27: 83-91.

MOHAMMADI SA and PRASANNA BM (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants - salient statistical tools and considerations. **Crop Science** 43: 1235-1248.

MOREIRA, C.N. **Caracterização de isolados virais associados ao endurecimento de frutos do maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg) provenientes de Livramento de Nossa Senhora, BA**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal), Universidade Federal de Lavras, 2008.

MULLER, G.W. Uso da premunização ou proteção cruzada no controle do vírus da tristeza dos citros em São Paulo, Brasil. In: **Symposium internacional virus de la tristeza de los citricos**, 2001.

NASCIMENTO, L.C.; PENSUK, V.; COSTA, N.P.; ASSIS FILHO, F.M.; PIO-RIBEIRO, G.; DEOM, C.M.; SHERWOOD, J. Evaluation of peanut genotypes for resistance to *Tomato spotted wilt virus* by mechanical and thrips inoculation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.937-942, 2006.

NASCIMENTO, A.V.S.; SOUZA, A.R.R.; ALFENAS, P.S.; ANDRADE, G.P.; CARVALHO, M.G.; PIO-RIBEIRO, G.; ZERBINI, F.M. Análise filogenética de potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.378, 2004.

NASCIMENTO, W.M.O.; TOMÉ A.T.M.; OLIVEIRA, M.S.P.; MULLER, C.A.; CARVALHO, J.E.U. Seleção de progênies de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) quanto à qualidade de frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, p.186-188, 2003.

NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M. Possível aplicação do DAS-ELISA indireto na seleção de maracujazeiro tolerante ao 'Passionfruit Woodiness Virus'. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.76-79, 1999.

NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M. Selected mild strains of *Passion fruit woodiness virus* (PWV) fail to protect pre-immunized vines in Brazil. **Scientia Agricola**, v.60, p.699-708, 2003.

NUNES ES, PENHA HA, HANAI LR, OLIVEIRA CA, VIEIRA MLC (2008) Construção de um mapa genético integrado para o maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) utilizando marcadores AFLP e SSR In. 54 Congresso Brasileiro de Genética (**Anais...**), Resumo 25.

NICK C, Carvalho M, Assis LHB, Carvalho SP (2008) Genetic dissimilarity in cassava clones determined by multivariate techniques. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 8: 104-110.

OLIVEIRA EJ, PÁDUA JG, ZUCCHI MI, CAMARGO LEA, FUNGARO MHP, VIEIRA MLC (2005) Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Molecular Ecology Notes** 5:331-333 doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.00917.x

OLIVEIRA, J. C. de; NAKAMURA, K.; MAURO, A. O.; CENTURION, M. A. P. da C. Aspectos gerais do melhoramento do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A. R. (Ed.). **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista: UESB, 1994. p. 27-28.

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, 5., 1998, Jaboticabal. (**Anais...**) Jaboticabal: FUNEP, 1998. p. 291-314.

PÁDUA JG, OLIVEIRA EJ, ZUCCHI MI, OLIVEIRA ZCX, CAMARGO LEA, VIEIRA MLC (2005) Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: *Passifloraceae*). **Molecular Ecology Notes** 5:863-865 doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01090.x.

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 456-464.

PENHA HA, ZUCCHI MI, FUNGARO MHP, PAULA FM, MUNHOZ CF, OLIVEIRA EJ, HANAI LR, CONSOLI L, VIEIRA MLC (2007) Desenvolvimento de bibliotecas enriquecidas com microssatélites (SSR) em *Passiflora alata* e análise de transferibilidade de marcadores SSR entre *Passiflora* f. *edulis flavicarpa* e *Passiflora alata*. In: 53º Congresso Brasileiro de Genética (**Anais...**), Resumo 108.

PIMENTEL LD, STENZEL MNC, CRUZ CD, BRUCKNER CH (2008) Seleção precoce de maracujazeiro pelo uso da correlação entre dados de produção mensal e anual. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 43: 1303-1309.

QUEIROZ MA, NASCIMENTO CES, SILVA CMM, LIMA JLS (1992) Fruteiras nativas do semi-árido do Nordeste brasileiro: algumas reflexões sobre os recursos genéticos. In: Simpósio Nacional de Recursos Genéticos de Fruteiras Nativas, Cruz das Almas, BA. (**Anais...**) Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, pp. 87-92.

REBOUÇAS ACMN, SOUZA AM, SANTOS JG, PINA ES, SÁ NETO R (2006) Comparação da diversidade do banco de sementes de uma pastagem e um fragmento de mata de cipó em vitória da conquista – Bahia. 58ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciencia (**Anais...**), Resumo 1280.

RITZINGER R, SOARES FILHO WS, CARVALHO PCL (2008) Evaluation of umbu-caja germplasm in the state of Bahia, Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 8: 181-186.

RUGGIERO C, SÃO JOSÉ AR, VOLPE CA, OLIVEIRA JC, DURIGAN JF, BAUMGARTNER JG, SILVA JR, NAKAMURA K, FERREIRA ME, KAVATI R, PEREIRA VP (1996) **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: EMBRAPA-SPI. 64p. (FRUPEX. Publicações Técnicas, 19).

SÃO JOSÉ AR, REZENDE JAM and COSTA AF (1994). Ocorrência do Vírus do Endurecimento do Fruto do Maracujazeiro no Norte do Estado de Minas Gerais. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, (**Anais...**) Salvador, 797.

SAMPAIO AC, SCUDELLER N, FUMIS TF, ALMEIDA AM, PINOTTI RN, GARCIA MJM, PALLAMIN ML (2008) Manejo cultural do maracujazeiro-amarelo em ciclo anual visando à convivência com o vírus do endurecimento dos frutos: um estudo de caso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 2, p.343-347.

SÁNCHEZ I, ANGEL F, GRUM M, DUQUE MC, LOBO M, TOHME J, ROCA W (1999) Variability of chloroplast DNA in the genus *Passiflora* L. **Euphytica** 106:15-26.

SANTOS EA. **Melhoramento de passifloras para ornamentação utilizando *Passiflora palmeri*, *Passiflora foetida* e híbridos F1 ornamentais: confirmação via RAPD, parâmetros genéticos e efeitos do sombreamento.** Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – BA, 2008.

SANTOS CEM, PISSIONI LLM, MORGADO MADOM, CRUZ CD, BRUCKNER CH (2008) Estratégias de seleção em progênies de maracujazeiro amarelo quanto ao vigor e incidência de verrugose. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 2, p. 444-449.

SEGURA SD, COPPENS D'EG, BOHORQUEZ A, OLLITRAULT P, TOHMÉ J (2002) An AFLP diversity study of the genus *Passiflora* focusing on subgenus *Tacsonia*. **Genetic resources and Crop Evolution** 49:111-132 DOI 10.1023/A:1014731922490.

SEGURA SD, COPPENS d'EG, OCAMPO CH, OLLITRAULT P (2003) Isozyme variation in *Passiflora* subgenera *Tacsonia* and *Manicata*. Relationships between cultivated and wild species. **Genetic resources and Crop Evolution** 50:417-427.

SEGURA SD, COPPENS d'EG, OCAMPO CH, OLLITRAULT P (2005) Isozyme variation in *Passiflora* subgenus *Tacsonia*: geographic and interspecific differentiation among the three most common species. **Genetic Resources and Crop Evolution** 52: 455-463 DOI 10.1007/s10722-005-2255-z

SIMMONDS JH (1959). Mild strain protection as a means of reducing losses from the *Queensland woodiness virus* in the passion vine. **Queensl. J. Agric. Sci.** 16: 371-380.

SOUZA JSI, MELETTI LMM (1997) **Maracujá: espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba, FEALQ, 179 p.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, 17: 6463-6471. 1989.

TEMPESTA R Jr, PEIXOTO JR, MEDEIROS FMB and SOUSA MAF (2004). Desenvolvimento Vegetativo e Severidade do Vírus do Endurecimento do Fruto (Passionfruit Woodiness Virus - PWV) em 17 Genótipos de Maracujazeiro Azedo, Cultivados no Distrito Federal. In: XVIII Congresso Brasileiro de Fruticultura, Sociedade Brasileira da Fruticultura. (**Anais...**), CD, Florianópolis. Available at [http://www.sbfruti.com.br/anais_xviii_cbf/resumos/T0876-760.pdf] or [http://maracuja.cpac.embrapa.br/arquivos/artigoscompletos/2_13.pdf].

TREVISAN F (2005). **Transformação genética de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) para resistência ao vírus do endurecimento dos frutos**. Master's thesis, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Piracicaba.

VANDERPLANK J (1996) **Passionflowers**. 2th ed. London: Cassel.

VIANA AP, PEREIRA TNS, PEREIRA MG, SOUZA MM, MALDONADO JVM, AMARAL Junior AT (2003) Genetic diversity among yellow passion fruit commercial genotypes and among *Passiflora* species using RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura** 25:489-493.

VIEIRA, M. L. C.; CARNEIRO, M. C. *Passiflora* spp. Passionfruit. In: LITZ, R. (Ed). **Biotechnology of fruit and nut crops**. Oxford: CABI, p. 436-453, 2004.

YAMASHIRO, T.; CHAGAS, C.M. Ocorrência de grave virose em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) no Estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., 1979, Pelotas. **Anais**. Pelotas: SBF, 1979. p.915-917.