

NAIRA COSTA SOARES BARBOSA

**ANATOMIA FOLIAR E DIVERSIDADE GENÉTICA EM
Passiflora spp. (PASSIFLORACEAE L.) RESISTENTES AO
Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)**

SALVADOR

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGR. DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIODIVERSIDADE

ANATOMIA FOLIAR E DIVERSIDADE GENÉTICA EM
***Passiflora* spp. (PASSIFLORACEAE L.) RESISTENTES AO**
Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)

NAIRA COSTA SOARES BARBOSA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos para a obtenção do título de *Mestre em Genética e Biodiversidade*.

ORIENTADORA: DRA. ALESSANDRA SELBACH SCHNADELBACH (UFBA)

CO-ORIENTADORA: DRA. KELLY REGINA BATISTA LEITE (UFBA)

SALVADOR

2016

Sistema de Bibliotecas da UFBA

Barbosa, Naira Costa Soares.

Anatomia foliar e diversidade genética em *Passiflora spp.* (Passifloraceae L.) resistentes ao Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) / Naira Costa Soares Barbosa. - 2016.
119 f.: il.

Inclui anexo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Selbach Schnadelbach.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Kelly Regina Batista Leite.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Biologia, Salvador, 2016.

1. Maracujá. 2. Plantas - Anatomia. 3. Microssatélites (Genética). 4. Maracujá - Genética.
5. Vírus. I. Schnadelbach, Alessandra Selbach. II. Leite. Kelly Regina Batista. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Biologia. IV. Título.

CDD - 634.425
CDU - 634.776.3

BANCA EXAMINADORA



Membro: Prof.^a Dr.^a Alessandra Selbach Schnadelbach
Instituição: Universidade Federal da Bahia-UFBA



Membro: Prof. Dr. Paulo Ernesto Meissner Filho
Instituição: Embrapa Mandioca e Fruticultura



Membro: Prof. Dr. José Geraldo Aquino de Assis
Instituição: Universidade Federal da Bahia-UFBA

Salvador

2016

A Deus que me acompanha em todos os momentos.

À minha mãe, Eliene Costa, meu exemplo de força.

Dedico

*“Plus j'étudie la nature, plus
j'admire le Créateur.”*

(Quanto mais eu estudo a
natureza, mais admiro o Criador).

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me capacitado e me dado forças nesta trajetória.

À minha família, principalmente a minha mãe, Eliene Costa e minha irmã, Nathália Costa, pelo apoio, carinho e paciência durante este período.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade da Universidade Federal da Bahia, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, por conceder a bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, FAPESB, pelos recursos financeiros fornecidos para a realização de todo o trabalho.

Ao Centro Tecnológico da Agropecuária da Bahia, CETAB, por disponibilizar a infraestrutura para a realização das análises moleculares.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura pela concessão de recursos através do Projeto Rede *Passiflora* da Bahia: estudos biotecnológicos e de manejo sustentável da virose e fusariose do maracujazeiro.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Alessandra Selbach Schnadelbach pelos ensinamentos e orientação do trabalho em si, mas também pela sua amizade, paciência, compreensão e disponibilidade, que foram muito importantes durante todo o mestrado.

À Dra. Cristiane de Jesus Barbosa, que também me orientou durante todo o processo, pelo incentivo e por todas as contribuições para o meu crescimento profissional.

À Prof^a. Dra. Kelly Regina Batista Leite, minha co-orientadora, pelo conhecimento transmitido, pelos conselhos e pelo estímulo durante o curso.

Ao técnico de laboratório da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Sr. Epaminondas do Patrocínio, a quem tanto admiro pela sua experiência e dedicação à Biologia Molecular, pelas suas orientações e auxílio que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Pesquisador Msc. João Roberto Pereira Oliveira e ao motorista Jair Rebouças, da Embrapa Mandioca e Fruticultura, que me acompanharam e auxiliaram nas coletas.

Aos Pesquisadores Dr. Onildo Nunes de Jesus, Dra. Taliane Leila Soares e Dr. Emanuel Felipe Medeiros Abreu, da Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela concessão das plantas para as análises anatômicas e pelas contribuições em fitopatologia e melhoramento vegetal.

À Dra. Maria Luiza Silveira de Carvalho, Tutti, pelo auxílio com as análises de genética de populações.

Ao colega Cecil P. Fazolato pela produção do mapa.

À Profa. Maria Lenise Silva Guedes e à colega Cássia por coletarem as amostras de Licínio de Almeida.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular e Fitopatologia do CETAB, Sarah, Hayala, Lorenço e Luma e a todos os outros que eu conheci e que estiveram presentes durante este período, pela convivência e por todos os momentos compartilhados.

A toda a equipe do Laboratório de Anatomia Vegetal e Identificação de Madeiras, LAVIM, pelo carinho e apoio recebido sempre.

Ao todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade, pelo conhecimento transmitido através das disciplinas, fundamentais para a minha formação acadêmica.

Aos colegas do mestrado pela troca de experiências durante as aulas.

Todas essas contribuições foram de grande importância para a realização deste trabalho!

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	RESUMO	
	ABSTRACT	
1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	A família Passifloraceae	15
2.2	O cultivo do maracujá no Brasil	16
2.3	Pragas do maracujazeiro	17
2.4	Fontes de resistência em espécies silvestres	19
2.5	Estudos anatômicos de plantas infectadas por vírus	21
2.6	Marcadores moleculares na caracterização dos recursos genéticos	22
2.7	Marcadores moleculares no gênero <i>Passiflora</i>	23
3	REFERÊNCIAS	27
4	OBJETIVOS	42
4.1	Objetivo geral	42
4.2	Objetivos específicos	42
	CAPÍTULO I - Alterações anatômicas em folhas de cinco espécies de maracujazeiros infectadas com o Cowpea aphid-borne mosaic vírus	43
	RESUMO	44
	ABSTRACT	45
1	INTRODUÇÃO	46
2	MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1	Material vegetal	47
2.2	Ensaio biológico e amostragem	48
2.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	48
2.4	Microscopia óptica	48
2.5	Análise estatística	49
3	RESULTADOS	50
3.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	50

3.2	Microscopia óptica	50
3.2.1	Seções paradérmicas	50
3.2.2	Seções transversais	50
3.2.3	Análise estatística	51
4	DISCUSSÃO	53
5	CONCLUSÕES	56
6	AGRADECIMENTOS	56
7	REFERÊNCIAS	57
	CAPÍTULO II - DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES	70
	DE <i>Passiflora setacea</i> DC. DO ESTADO DA BAHIA	
	UTILIZANDO MARCADORES SSR	
	RESUMO	71
	ABSTRACT	72
1	INTRODUÇÃO	73
2	MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1	Coleta do material	75
2.2	Extração do DNA	78
2.3	Amplificação do DNA por marcadores SSR	78
2.4	Análise dos dados	80
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
3.1	Variabilidade genética intra e interpopulacional	82
3.2	Análise de estruturação genética	86
3.3	Análise de padrões genéticos	89
3.4	Distância genética e análise fenética	91
3.5	Diversidade haplotípica	95
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
5	AGRADECIMENTOS	97
6	REFERÊNCIAS	98
	ANEXO I	108
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
8	REFERÊNCIAS	117

RESUMO

O maracujá, *Passiflora* sp., possui grande importância econômica no Brasil, sendo o país o principal produtor mundial da fruta e importante centro de diversidade do gênero. As pragas são os principais problemas que afetam a cultura, e dentre estas destaca-se o endurecimento do fruto, causada, principalmente, pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, CABMV. Ainda não se conhece uma medida de controle efetiva para esta doença, de forma que são imprescindíveis técnicas alternativas para seu controle e manejo. Neste contexto, o melhoramento genético do maracujazeiro pode ser realizado a partir de espécies silvestres resistentes a pragas. Este trabalho teve como objetivos: a) avaliar as alterações anatômicas decorrentes da infecção com o CABMV em cinco espécies de *Passiflora* (*P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. maliformis* e *P. setacea*) e b) avaliar a diversidade genética em populações da espécie com menores alterações anatômicas decorrentes da infecção. Para a avaliação anatômica foi estabelecido um ensaio biológico, constituído de seis plantas de cada espécie, das quais a metade foi inoculada mecanicamente com um isolado do CABMV e a outra metade inoculada somente com tampão de inoculação. Após 60 dias da inoculação, foram coletadas, como amostras, a quinta folha, do ápice para a base, de cada planta. As amostras foram fixadas em FAA e posteriormente conservadas em etanol 70%, posteriormente foram realizadas seções paradérmicas e transversais, à mão livre e em micrótomo rotativo. Para cada espécie foram realizadas comparações das plantas infectadas com as sadias através de análises qualitativas e quantitativas. As alterações anatômicas observadas nas plantas infectadas foram a hiperplasia e hipertrofia de células parenquimáticas, depressões no limbo e desorganização do sistema vascular. *P. setacea* foi a espécie que, quando infectada com o vírus, apresentou menos alterações anatômicas, sendo selecionada para o estudo de diversidade genética. Para tanto, foram coletadas folhas jovens de 18 populações no estado da Bahia, nas regiões do Centro-Sul e Chapada Diamantina, totalizando 147 indivíduos, e testados 55 loci de SSR, dos quais seis foram selecionados para as análises. Os resultados das análises bayesiana de estruturação genética e da análise fenética indicaram a existência de dois grupos genéticos no estado, que não apresentaram correlação significativa com as distâncias geográficas. A AMOVA mostrou grande

diversidade interpopulacional (45%), apesar do maior percentual de variação intrapopulacional (55%). Foi encontrado um G_{st} médio de 0,221 indicando um alto nível de estruturação genética entre as populações. As populações de maior diversidade foram as de Licínio de Almeida e Caetité, com maior percentual de polimorfismo, além de pertencerem a grupos genéticos distintos, sendo, portanto, consideradas as mais promissoras para enriquecimento de bancos de germoplasma de *P. setacea* e utilização em programas de melhoramento genético do maracujá.

Palavras-chave: maracujá, PWV, anatomia vegetal, microssatélites, variabilidade genética.

ABSTRACT

The passion fruit, *Passiflora* sp., has great economic importance in Brazil, the country the world's leading producer of fruit and important genetic diversity center. Pests are the main problems affecting the culture, and among them stands out the passion fruit woodiness disease, caused mainly by the *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, CABMV. An effective control measure for this disease has not yet known, so that they are indispensable alternative techniques for its control and management. In this context, the genetic improvement of passion fruit can be held from wild species that are resistant to diseases and pests. This work aimed: a) to evaluate the anatomical changes resulting from infection with CABMV in five species of *Passiflora* (*P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. maliformis* and *P. setacea*) and b) to evaluate the genetic diversity in populations of species with smaller anatomical changes resulting from infection. For anatomical assessment was established a bioassay, consisting of six plants of each species, of which half were mechanically inoculated with an isolated characterized the CABMV and the other half only inoculated with inoculation buffer. After 60 days of inoculation, they were collected as samples, the fifth leaf from the apex to the base of each plant. Samples were fixed in FAA and later preserved in 70% ethanol, were subsequently held paradermic and cross sections, freehand and rotary microtome. For each species comparisons were made of plants infected with sound through qualitative and quantitative analysis. The anatomical changes observed in infected plants were hyperplasia and hypertrophy of parenchyma cells, depressions in limbo and disorganization of the vascular system. *P. setacea* was the kind that when infected with the virus, had fewer anatomical changes, being selected for the study of genetic diversity. To this end, young leaves of 18 populations were collected in the state of Bahia, in the regions of South-Central and Chapada Diamantina, totaling 147 individuals, and 55 tested loci SSR, of which six were selected for analysis. The results of bayesian analysis of genetic structure and phenetics analysis indicated the existence of two genetic groups in the state, which showed no significant correlation with the geographical distances. The AMOVA showed great inter-population diversity (45%), despite the higher percentage of intra-population variation (55%). An average G_{st} was found of 0.221 indicating a high level of genetic structure among populations. The populations of most diversity were Licinio de Almeida and Caetité, with the highest percentage of

polymorphism, in addition to belonging to different genetic groups and they are therefore considered the most promising for enrichment of *P. setacea* genebanks and use in breeding programs of passion fruit.

Keywords: passion fruit, PWV, plant anatomy, microsatellites, genetic variability.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os maracujás (*Passiflora* spp.) pertencem à família Passifloraceae, que possui diversas espécies de grande potencial ornamental e alimentício, com distribuição essencialmente pantropical (SOUZA e LORENZI, 2012). O número de gêneros e espécies presentes na família possui divergências segundo diferentes autores — cerca de 17 gêneros e 700-750 espécies, segundo Feuillet e MacDougal (2007), e cerca de 20 gêneros e 600 espécies, segundo Souza e Lorenzi (2012).

A maioria das espécies de *Passiflora* descritas é originária dos Neotrópicos (VASCONCELLOS, 2005). O Brasil é um dos principais centros de diversidade genética da família Passifloraceae (CERVI, 2006). Apenas no estado do Bahia, há cerca de 29 espécies, presentes em quase todos os seus biomas (NUNES, 2002). Além disso, o país é o principal produtor mundial de maracujá (IBGE, 2014; MELETTI, 2011) que é plantado em quase todos os estados brasileiros, proporcionando economia e renda em inúmeros municípios (FERREIRA, 2005).

Os problemas fitossanitários como as pragas são os principais fatores limitantes da produtividade dos cultivos de maracujá, sendo as principais doenças: o endurecimento dos frutos, a bacteriose, a murcha de *Fusarium* e a antracnose (JUNQUEIRA et al., 2005).

A doença do endurecimento dos frutos, causada, no Brasil, pelos vírus *Passion fruit woodiness virus* (PWV) e *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), é considerada uma das mais importantes economicamente, devido aos prejuízos causados à produção (NASCIMENTO et al., 2006; LEÃO et al., 2006; PINTO et al., 2008). A virose é transmitida mecanicamente ou por afídeos, não se conhecendo ainda uma medida de controle efetiva (PIO-RIBEIRO e MARIANO, 1997; MELETTI et al., 2005). Assim, torna-se importante a obtenção de cultivares resistentes, associada a outras técnicas de manejo integrado, para o controle da virose.

O gênero *Passiflora*, com sua grande diversidade, apresenta variabilidade no grau de resistência ao vírus do endurecimento do fruto, sendo esta variação inter e intraespecífica (JUNQUEIRA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2013a). Muitas espécies silvestres de *Passiflora* podem oferecer contribuições importantes ao melhoramento genético do maracujazeiro por apresentarem maior resistência a pragas, maior longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas e período de florescimento ampliado entre outras potencialidades (MELETTI et al., 2005).

Caracterizar a diversidade genética das espécies é muito importante no planejamento das estratégias de melhoramento, como em cruzamentos interespecíficos, visando a obtenção de híbridos resistentes. Para tanto, os marcadores moleculares de DNA são uma ferramenta importante, sendo utilizados desde a caracterização do germoplasma até as etapas finais de seleção de plantas melhoradas (FALEIRO et al., 2005).

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os aspectos anatômicos de espécies silvestres de *Passiflora*, consideradas mais resistentes ao CABMV. Além disso, pretendeu-se avaliar a variabilidade genética da espécie silvestre que apresentou, no estudo anatômico, menores alterações anatômicas em resposta à infecção, utilizando marcadores microssatélites ou SSR.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A família Passifloraceae

Passifloraceae, ordem Marpighiales (APG III, 2009), constitui grupo monofilético bem sustentado por análises moleculares (MUSCHNER et al., 2003; JUDD et al., 2009; TOKUOKA, 2012) e pela presença de uma coroa bem desenvolvida nas flores (BRIZYCK, 1961).

A família é dividida em duas tribos: Paropsieae e Passifloreae (WILDE, 1971; 1974; ESCOBAR, 1988). Esta última está representada no continente americano por quatro gêneros, entre os quais destaca-se o gênero *Passiflora* (WILDE, 1974; CERVI, 2006).

A família inclui plantas trepadeiras ou lianas com gavinhas axilares (Figura 1) (JUDD et al., 2009). Possui caule lenhoso e lignificado na base, enquanto no ápice é herbáceo e pouco lignificado (Figura 1A-C) (KLUGE, 1998). As folhas são simples, lobadas ou digitadas, com bordos lisos ou serrados, alternas e espiraladas, em geral com nectários no pecíolo (Figura 1D) (KLUGE, 1998; JUDD et al., 2009).

As flores são completas, geralmente bissexuais, radiais, solitárias, axilares, pedunculadas e diclamídeas (Figura 2) (KLUGE, 1998; NUNES, 2002; JUDD et al., 2009). O cálice e a corola são pentâmeros, geralmente apresentam cinco estames, dispostos em um pedúnculo junto com o gineceu, constituindo o androginóforo (JUDD et al., 2009). Em geral apresentam três carpelos, conatos, ovário súpero, e

dispostos sobre um pedúnculo (JUDD et al., 2009). A variação na estrutura da coroa possui importância taxonômica (NUNES, 2002).

As espécies de Passifloraceae geralmente necessitam de polinização cruzada, sendo auto-incompatíveis (KLUGE, 1998). As flores podem ser brancas, verdes, azuis ou purpúreas, sendo polinizadas principalmente por abelhas (JUDD et al., 2009).

No Brasil, há cerca de 150 espécies de passifloráceas aceitas, sendo 87 endêmicas (BERNACCI et al., 2016). No Estado da Bahia foram registradas 30 espécies, sendo que 29 pertencem ao gênero *Passiflora* e apenas uma ao gênero *Tetrastylis* (NUNES, 2002).

2.2 O cultivo do maracujá no Brasil

O maracujá-amarelo ou maracujá-azedo, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. é a espécie de maior importância na família do ponto de vista econômico, devido à qualidade dos frutos, à divulgação junto aos consumidores e ao incentivo da agroindústria (BERNACCI et al., 2003). O maracujá-amarelo representa uma boa opção entre as frutas por oferecer rápido retorno econômico, bem como a oportunidade de uma receita distribuída pela maior parte do ano (MELETTI, 2011).

O cultivo do maracujazeiro no Brasil, em escala comercial, teve início no começo da década de 1970, com o maracujá-amarelo (LEÃO et al., 2006). É uma cultura que vem se expandindo nos últimos 30 anos e ocupando um lugar de destaque na fruticultura tropical (MELETTI, 2011). A maior parte da produção nacional concentra-se na região Nordeste, sendo que em 2014, a região era responsável por 70,9% da produção brasileira (IBGE, 2014). Somente o estado da Bahia era responsável por 46,3% da produção nacional neste mesmo ano, seguido pelo Ceará, com 17,5% (IBGE, 2014).

No mercado interno, o fruto é consumido principalmente *in natura*, enquanto os sucos concentrados representam a maior parcela da exportação, sendo que os principais destinos são os países europeus (MELETTI, 2011).

A importância crescente deste cultivo, pelo incremento de área plantada e pela abertura de novos mercados, tem sido acompanhada, nos últimos dez anos, pela divulgação de resultados de experimentos e destinação de novas verbas para pesquisas, possibilitando ao fruticultor, a obtenção de conhecimentos que diminuem

o risco desta atividade produtiva, tornando-a mais previsível, obedecendo às leis de mercado (GRECO, 2014).

2.3 Pragas do maracujazeiro

Com o aumento da área plantada e a concentração de grandes pomares de maracujá em determinadas regiões do Brasil, várias doenças e pragas têm aumentado e se disseminado, reduzindo a produção e o período de vida útil dos pomares brasileiros (PINTO et al., 2008).

As pragas são os principais fatores que ameaçam a expansão e a produtividade dos cultivos de maracujá, incluindo doenças que chegam a causar sérios prejuízos e até mesmo inviabilizar economicamente a cultura em algumas áreas (FISCHER, 2005). As principais doenças dos maracujazeiros são a virose do endurecimento do fruto, causadas pelos *Passion fruit woodiness virus* (PWV) e *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), a bacteriose, causada pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, a murcha de *Fusarium*, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae*, e a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (JUNQUEIRA et al., 2005).

Destas, o endurecimento dos frutos é considerada uma das mais importantes economicamente (LEÃO et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2006; PINTO et al., 2008). O PWV passou a ser detectado em diferentes regiões produtoras do Brasil a partir da década de 1970, afetando severamente tanto a cultura quanto à produtividade, valor comercial dos frutos e período economicamente produtivo (PIO-RIBEIRO e MARIANO, 1997). Atualmente é considerada uma doença limitante em regiões produtoras dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal e Pará e da Região Nordeste (JUNQUEIRA et al., 2010).

O *Passion fruit woodiness virus* (PWV), gênero *Potyvirus*, família Potyviridae, foi identificado como agente causador do endurecimento do fruto do maracujazeiro por Cobb, na Austrália, em 1901 (SHUKLA e WARD, 1988).

No Brasil, o vírus foi primeiramente descrito no estado da Bahia (CHAGAS et al., 1961) tendo sido relatado em outras importantes regiões produtoras - Ceará (BEZERRA et al., 1995); São Paulo (CHAGAS et al., 1992; NOVAES E REZENDE, 2003), Pará (TRINDADE et al., 1999), Minas Gerais (NASCIMENTO, 2006) e Distrito Federal (RODRIGUES, 2014), e em outros estados - Espírito Santo, Paraíba, Pernambuco, Goiás, Paraná (NASCIMENTO, 2006; RODRIGUES, 2014).

Até o início da década de 1990, acreditava-se que a única espécie de *Potyvirus* causadora de endurecimento dos frutos em maracujazeiros era o PWV (NASCIMENTO et al., 2004). Contudo, análises moleculares de isolados de vírus causadores de endurecimento do fruto em maracujazeiros, anteriormente classificados como PWV, foram identificados como CABMV, podendo ser esta considerada como a principal espécie de *Potyvirus* causadora da doença no Brasil (BRAZ et al., 1998; NASCIMENTO et al., 2004).

O CABMV é um vírus de RNA de fita simples (BERGER, 2001), também pertencente ao gênero *Potyvirus*, família Potyviridae (MINK e SILBERNAGEL, 1992), sendo esta a principal família de vírus que infecta plantas (BERGER, 2001). Apresenta como principais hospedeiros, espécies das famílias Fabaceae e Passifloraceae, já tendo sido relatadas ocorrência do vírus em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) (LOVISOLO e CONTI, 1966), feijão-da-praia (*Canavalia rosea*) (KITAJIMA et al., 2008), *Crotalaria juncea* (NICOLINI et al., 2012), amendoim (*Arachis hypogaea*) (PIO-RIBEIRO et al., 2000), e em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (NASCIMENTO et al., 2006).

Um estudo filogenético realizado com isolados de CABMV do estado da Bahia, do município de Livramento de Nossa Senhora, após comparação com sequências obtidas de isolados de outros estados do Brasil e de outros países, sugeriu que estes poderiam estar presentes apenas no estado e serem filogeneticamente mais distantes de outros isolados presentes na mesma região (MELO et al., 2015).

Os vírus causadores do endurecimento do fruto são transmitidos principalmente por várias espécies de afídeos, sendo as principais: *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (CHAGAS et al., 1981; NOVAES e REZENDE, 2003) e *Aphis gossypii* (Glover, 1877) (CHAGAS et al., 1981; DI PIERO et al., 2006). Pode ocorrer também transmissão mecânica, através de instrumentos de poda, por exemplo, ou por enxertia (PIO-RIBEIRO e MARIANO, 1997; MELLETTI, 2005).

Os principais sintomas nas folhas das plantas infectadas são mosaico, bolhosidades e enrugamento (VIANA e COSTA, 2003; FISCHER et al., 2005), enquanto os frutos apresentam redução de tamanho, espessamento e endurecimento do pericarpo, com redução do espaço interno e conseqüente diminuição da quantidade de polpa (FISCHER et al., 2005; FORTALEZA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2006; CAVICHIOLE et al., 2011) (Figura 3). As plantas infectadas têm sua longevidade e produtividade reduzidas e os frutos têm sua

aparência e qualidade comprometidas tornando-os impróprios para a comercialização (FISCHER et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2010).

O longo período de cultivo do maracujazeiro e a transmissão não persistente do vírus pelo pulgão tornam os esforços para controlar a doença pelo combate ao vetor pouco eficientes (PIO-RIBEIRO e MARIANO, 1997). Ainda não se conhece nenhuma medida de controle efetiva para a doença após ser instalada no pomar (FISCHER et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2010).

As recomendações técnicas são relacionadas a medidas de exclusão, como a manutenção de mudas sadias em locais telados ou plantios em locais isolados, para evitar a disseminação do vírus através do pulgão, e cuidados ao realizar a poda, para que não haja transmissão mecânica, através dos instrumentos de poda (MELETTI et al., 2005). O controle químico do pulgão não tem oferecido resultados satisfatórios (JUNQUEIRA et al., 2010).

Assim, torna-se importante encontrar medidas eficientes para o manejo das doenças como a utilização de cultivares resistentes obtidos a partir de programas de melhoramento genético. O uso de cultivares resistentes, associado a outras técnicas de manejo integrado, é uma das medidas mais eficazes de controle de doenças de plantas (JUNQUEIRA et al., 2005).

2.4 Fontes de resistência em espécies silvestres

Fontes de resistência a doenças têm sido identificadas em germoplasma de espécies cultivadas e selvagens de *Passiflora* (PAULA et al., 2010). Além da maior resistência, as espécies silvestres podem apresentar maior longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, maior concentração de componentes químicos interessantes para a indústria farmacêutica e outras potencialidades (MELETTI et al., 2005).

Acessos com resistência a distintas doenças, como antracnose, bacteriose, virose do endurecimento dos frutos e fusariose foram registrados em várias espécies silvestres de *Passiflora*, (JUNQUEIRA et al., 2005; MELETTI et al., 2005; PAULA et al., 2010; CARVALHO et al., 2013, OLIVEIRA et al., 2013b). A caracterização e a exploração da variabilidade genética destas espécies e da espécie cultivada (*P. edulis* f. *flavicarpa*) podem revelar fontes de resistência de grande valor para o controle dessas doenças no campo e para a utilização em

programas de melhoramento genético (FALEIRO et al., 2005). Devido às poucas barreiras de incompatibilidade entre as espécies de Passifloraceae, hibridações interespecíficas visando à obtenção de cultivares resistentes têm sido realizadas com sucesso (JUNQUEIRA et al., 2005; MELLETTI et al., 2005). O Brasil, sendo o principal centro de biodiversidade do gênero, exibe variabilidade genética suficiente para o desenvolvimento de novas variedades (REIS et al., 2011; FREITAS et al., 2012).

Para o endurecimento dos frutos, assim como para outras doenças, a avaliação da severidade da doença nas plantas é realizada com base na sintomatologia visual nas folhas e nos frutos. Uma escala de notas é atribuída de 1 a 4, sendo que a nota 1 é atribuída em plantas resistentes, com pouco ou nenhum sintoma, e a nota 4, a plantas altamente suscetíveis, com muitos sintomas (PINTO et al., 2008; OLIVEIRA et al. 2013a). Assim, folhas com poucos ou nenhum sintoma geralmente apresentam frutos normais, enquanto folhas com mosaico, bolhas e deformações, geralmente apresentam frutos deformados, com manchas e endurecimento (PINTO et al., 2008; OLIVEIRA et al. 2013a).

A resistência de campo ao CABMV foi avaliada em várias espécies de *Passiflora* e híbridos interespecíficos, com base nos sintomas apresentados nas folhas (JUNQUEIRA et al., 2005). *P. edulis* f. *flavicarpa* mostrou-se altamente suscetível, enquanto *P. gibertii* N.E.Br., *P. setacea* DC. e o híbrido de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. setacea* foram considerados resistentes ao vírus, com plantas cujas folhas apresentaram mosaico leve, visível em em menos de 50% das folhas. Uma outra análise mostrou que estas espécies apresentaram maior resistência de campo ao CABMV, especialmente *P. setacea*, na qual não se observam sintomas da doença nos frutos, embora seja possível observar folhas com mosaico leve e algumas deformações (OLIVEIRA et al., 2013a).

O trabalho de Maciel et al. (2009) com 16 espécies silvestres de *Passiflora*, inclusive as cinco que serão analisadas no presente trabalho (*P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. cincinnata* Mast., *P. gibertii*, *P. maliformis* Vell. e *P. setacea*), mostrou que essas plantas quando inoculadas mecanicamente com o CABMV, desenvolvem sintomas e o vírus pode ser detectado em seus tecidos por análises sorológicas.

A avaliação dos sintomas do endurecimento do fruto em plantas pertencentes ao Banco de Germoplasma de Maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura também mostrou que o maracujazeiro-amarelo é a espécie mais suscetível ao

CABMV, enquanto outras espécies silvestres do gênero mostraram mais resistência em condições de campo (OLIVEIRA et al. 2013a). Estes resultados mostram o potencial do uso de espécies silvestres para o melhoramento genético do maracujá na busca de resistência ao CABMV.

2.5 Estudos anatômicos de plantas infectadas por vírus

Os estudos anatômicos podem constituir uma importante ferramenta no melhoramento genético vegetal visando à seleção de cultivares resistentes a doenças. As plantas infectadas por patógenos exibem sintomas macroscópicos associados, muitas vezes, a alterações anatômicas (ESAU, 1967; MARQUES et al., 2007; TAKIMOTO et al., 2009; GOMES et al. 2010; TRIVEDI, 2014).

Estudos de anatomia foliar destacam-se neste contexto, por ser a folha um dos primeiros órgãos a apresentar variações morfológicas visíveis e consequentes alterações histológicas como resposta ao ataque de patógenos (ESAU, 1967; MARQUES et al., 2007; TAKIMOTO et al., 2009; GOMES et al. 2010; TRIVEDI, 2014).

Em relação às doenças causadas por vírus, as análises anatômicas das plantas infectadas auxiliam na compreensão da relação entre os vírus e os tecidos de seus hospedeiros (ESAU, 1967). Quando a planta é infectada, inicialmente ocorrem modificações fisiológicas e bioquímicas com ativação ou bloqueio de determinadas atividades celulares, e posteriormente, mudanças morfológicas visíveis surgem em decorrência destas alterações (LEITE e PASCHOLATI, 1995). Entre os sintomas comuns em plantas infectadas por vírus, estão necrose, hipertrofia e hiperplasia de alguns tecidos (ESAU, 1967).

Alguns estudos têm sido realizados visando a identificação de alterações histológicas em plantas infectadas por vírus, tendo potencial aplicação na área de diagnose e melhoramento genético (MARQUES et al., 2007; TAKIMOTO et al., 2009; GOMES et al. 2010).

Foram analisadas as alterações morfoanatômicas em folhas de laranjeira-doce, infectadas pelo *Citrus leprosis virus* (CiLV), com o objetivo de compreender as interações entre o vírus e a planta hospedeira (MARQUES et al., 2007). De acordo com as alterações observadas, os autores concluíram que ramos gravemente infectados pelo vírus definham devido ao comprometimento do transporte causado pela obliteração dos elementos de tubo crivado do floema e pela obstrução, pela

mucilagem, dos elementos de vaso do xilema. As alterações observadas no tecido floemático dos ramos lesionados evitam a infecção sistêmica pelo CiLV-C na planta e a necrose dos feixes vasculares na folha pode ser um mecanismo para limitar o deslocamento do vírus.

Em algodoeiros infectados pelo *Cotton leaf roll dwarf virus* (CLRDV) foi observado maior acúmulo de calose, maior quantidade de drusas, evidência de alteração química no interior da célula do parênquima paliçádico, e inclusões nos vasos do floema e, ocasionalmente, no xilema. O acúmulo de calose e a presença de inclusões no floema indicaram a relação do vírus com esse tecido (TAKIMOTO et al. 2009).

Os efeitos do *Clerodendrum chlorotic spot virus* (CICSV) foram avaliados em folhas de plantas saudáveis e infectadas de *Clerodendrum x speciosum*, *Hibiscus schizopetalus* Hook.f., *Salvia leucanta* Cav., *Malvaviscus arboreus* Cav. e *Annona muricata* L. (GOMES et al., 2010). Observou-se efeitos histopatológicos já relatados para outras plantas infectadas por vírus, como hipertrofia e hiperplasia das células do parênquima lacunoso, lise da célula do parênquima lacunoso e na região da nervura central, depressões resultantes da obliteração de células da epiderme e a presença de conteúdo granular além de células totalmente necrosadas.

No presente trabalho as análises anatômicas de diferentes espécies de *Passiflora* infectadas com o CABMV visam identificar as alterações decorrentes da infecção e quais entre as espécies analisadas sofrem menos alterações, o que pode ser um indicativo de maior resistência.

2.6 Marcadores moleculares na caracterização dos recursos genéticos

As hibridações interespecíficas podem ser utilizadas em programas que visam à transferência de genes de resistência a doenças, encontrados nas espécies silvestres para a espécie comercial (VIANA et al., 2003). Também podem ser utilizadas quando se deseja melhorar características físicas, químicas ou sensoriais de alguma espécie de interesse para a incorporação ao mercado consumidor, em função de seu potencial como fruta exótica, ou devido as suas propriedades medicinais (JUNQUEIRA et al., 2008).

Para tanto, torna-se necessário o conhecimento da variabilidade genética presente nas espécies parentais (VIANA et al., 2003). Neste contexto, os marcadores moleculares destacam-se como uma ferramenta importante na

caracterização dos recursos genéticos, sendo utilizados no melhoramento vegetal e em atividades relacionadas à conservação, desde a caracterização do germoplasma até as etapas finais de seleção de plantas melhoradas (DUDLEY, 1993; FALEIRO et al., 2005; HENRY, 2012; OLIVEIRA et al., 2013b).

Os marcadores moleculares podem contribuir para aumentar o conhecimento do material genético disponível, caracterizando e quantificando a diversidade e a divergência genética, facilitar e aprofundar o conhecimento da herança dos caracteres de interesse, permitindo com isso, direcionar os procedimentos de melhoramento, e atuar como ferramenta na escolha de genitores de forma a explorar a heterose (PEREIRA et al., 2005).

Os marcadores têm sido utilizados em várias aplicações, incluindo análises de relações genéticas entre indivíduos, mapeamento de genes úteis, seleção assistida, estudos de genética de populações e análises filogenéticas (KALIA et al., 2011).

Marcadores baseados em DNA são definidos como fragmentos de DNA que revelam variações, e podem ser utilizados para detectar o polimorfismo entre os diferentes genótipos (ou pool gênico) de uma população ou espécie (JIANG, 2013). Estes fragmentos são associados a determinados loci e podem ser detectados por ferramentas de biologia molecular.

2.7 Marcadores moleculares no gênero *Passiflora*

Devido a sua ampla diversidade e grande importância econômica, diversos estudos de caracterização genética no gênero *Passiflora* têm sido realizados com diferentes marcadores moleculares.

Os primeiros estudos foram realizados com marcadores RAPD (*Randomly Amplified Polimorphic DNA*; WILLIAMS et al., 1990). Populações de *P. alata* Curtis, *P. cincinnata*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. foetida* L., *P. gibertii*, *P. malacophylla* Mast., *P. maliformis*, *P. mucronata* Lam. e *P. suberosa* L., e plantas provenientes de cultivos de *P. edulis* f. *flavicarpa*, foram avaliadas com marcadores RAPD (VIANA et al., 2003). Observou-se baixa variabilidade entre os indivíduos de *P. edulis*, e grande variabilidade interespecífica, indicando uma possibilidade de utilização das espécies silvestres de *Passiflora* no melhoramento genético do gênero. Outros estudos com RAPD em *Passiflora* mostraram resultados semelhantes (BELLON et al., 2007; CERQUEIRA-SILVA et al., 2010).

Posteriormente, os marcadores RAPD foram gradualmente substituídos por marcadores ISSR (*Inter Single Sequence Repeat*; ZIETKIEWICZ et al., 1994), outro marcador dominante que, no entanto, é considerado mais confiável por não apresentar problemas de reprodutibilidade, além de detectar altos níveis de polimorfismo (BORNET et al., 2002). Acessos de *P. alata* e de *P. edulis*, provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura foram analisados com este marcador, que revelou grande variabilidade entre os mesmos, permitindo seu agrupamento de acordo com o seu local de origem (SANTOS et al. 2011).

Populações nativas de *P. setacea* do sudoeste do estado da Bahia foram avaliadas por meio de 11 primers de ISSR e quatro pares de primers RGA (*Analogs Markers of Resistance Gene*) (PEREIRA et al., 2015). Neste estudo, foi detectada variação na porcentagem de locos polimórficos e considerável diferenciação genética entre as populações. Os resultados sugerem que a diferenciação genética ocorreu entre as populações de *P. setacea*, mesmo quando diferentes loci são testados, podendo estes dados ser úteis para o desenvolvimento de estratégias para a preservação desta espécie no cerrado.

Os marcadores RAPD e ISSR, embora sejam bastante eficientes em detectar níveis de polimorfismos em populações e entre espécies relacionadas, constituem marcadores dominantes, e a informação gerada por eles é limitada em relação aos marcadores codominantes. Desta forma, estudos com marcadores codominantes, como os microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeat*) estão sendo preferencialmente utilizados no estudo de espécies de interesse econômico.

Os marcadores SSR constituem repetições de sequências simples (SSRs) amplamente distribuídos no genoma, de evolução rápida, e capazes de detectar altos índices de polimorfismo e heterozigosidade (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Estes marcadores têm ganhado importância considerável em genética de plantas e melhoramento devido a muitos atributos genéticos incluindo hipervariabilidade, natureza multialélica, herança codominante, reprodutibilidade, abundância relativa, cobertura extensiva do genoma incluindo genomas organelares, localização específica do cromossomo e receptividade de automação e alta taxa de transferência genética (PÁDUA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006, KALIA et al., 2011; JIANG, 2013). No entanto, a técnica de SSR requer um alto

custo e um extensivo trabalho no processo de desenvolvimento de primers específicos (JIANG, 2013).

As regiões que contem sequências únicas repetidas são amplificadas individualmente através de PCR a partir de um par de primers específicos complementares às sequências únicas que flanqueiam o microssatélite (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). O alto grau de variação alélica revelada por estes marcadores resulta de variação no número de motivos repetidos em um locus causado por deslizamento de replicação e/ou crossing-over desigual durante a meiose (KALIA et al., 2011). Os segmentos amplificados a partir destes sítios, quase invariavelmente apresentam um extenso polimorfismo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos. Cada segmento amplificado de tamanho diferente, representa um alelo diferente do mesmo locus (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Desde os anos 1990, marcadores microssatélites têm sido extensivamente utilizados na construção de mapas genéticos, mapeamento de QTLs, seleção assistida por marcadores e análise de germoplasma em uma vasta gama de espécies de plantas (SCHLÖTTERER, 2004; JIANG, 2013). Os SSR são importantes na verificação das mudanças nos parâmetros genéticos das populações ao longo dos ciclos de seleção, por identificarem alterações e perdas alélicas em cada loco individualmente (OLIVEIRA et al., 2005). Além disso, são também utilizados para avaliar a diversidade genética de populações nativas (SALLA et al., 2002; GANGA et al., 2004; ALZATE-MARIN et al., 2005).

Em *Passiflora* os SSRs têm sido utilizados em estudos de diversas espécies, a exemplo de *P. alata*, *P. cincinnata*, *P. contracta* Vitta, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. foetida*, *P. gibertii*, *P. maliformis*, *P. setacea*, *P. suberosa*, entre outras (OLIVEIRA et al., 2005; CAZÉ et al., 2012; CERQUEIRA-SILVA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013a; CERQUEIRA-SILVA et al., 2014).

Para as espécies de *Passiflora* incluídas no presente estudo, foram desenvolvidos marcadores específicos para *P. edulis* f. *flavicarpa* (OLIVEIRA et al., 2005; CERQUEIRA-SILVA, 2014), *P. cincinnata* (CERQUEIRA-SILVA, 2012; CERQUEIRA-SILVA, 2014) e *P. setacea* (CERQUEIRA-SILVA, 2014).

A diversidade de *P. edulis* f. *flavicarpa* de acessos pertencentes à coleção do Instituto Agrônômico do Paraná (Londrina, Brasil) foi avaliada com marcadores SSR (OLIVEIRA et al., 2005). A análise foi realizada com 12 acessos, seis cultivadas no

estado de São Paulo, três de Minas Gerais, um da Bahia, um do Paraná e um material sob seleção artificial. Foram obtidos no estudo valores de heterozigosidade observada e esperada muito semelhantes ($H_o=0,52$; $H_e=0,54$). A diversidade dentro dos acessos ($H_s = 0,341$) foi superior à diversidade entre eles ($D_{ST} = 0,103$). O estudo confirmou o potencial destes marcadores para estudar a diversidade do maracujá amarelo.

Marcadores específicos para acessos de *P. cincinnata* do banco de Germoplasma da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) foram desenvolvidos por Cerqueira-Silva et al. (2012). Entre os 25 marcadores microssatélites que foram desenvolvidos, sete foram polimórficos (21%), com diferentes graus de polimorfismo. Entretanto, os autores afirmaram que pode haver uma taxa maior de polimorfismo entre outras populações de *P. cincinnata* ou entre outras espécies de *Passiflora*.

Em alguns trabalhos foi avaliado o potencial de transferabilidade dos marcadores SSR entre as espécies de *Passiflora* (CAZÉ et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013a; CERQUEIRA-SILVA et al., 2014).

Primers de microssatélites estabelecidos para *P. contracta*, foram testados e amplificados com sucesso em *P. ovalis* (CAZÉ et al. 2012). Porém houve baixa eficiência, com apenas dois loci amplificados, reforçando a diferenciação entre essas duas espécies que antes eram consideradas como uma única. Os primers de SSR desenvolvidos para *P. edulis* também amplificaram outras 11 espécies do gênero *Passiflora*, incluindo *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. maliformis* e *P. setacea* (OLIVEIRA et al., 2013b). Neste caso, foram obtidos produtos de alta qualidade indicando a possibilidade de transferabilidade, o que minimiza os custos do desenvolvimento de primers específicos.

Primers específicos de SSR foram desenvolvidos também para *P. setacea*, e testados em acessos de *P. cincinnata*, *P. edulis* e *P. setacea* do banco de Germoplasma da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014). A porcentagem de loci polimórficos foi de 15% em *P. edulis*, 29% em *P. setacea*, e 20% em *P. cincinnata*, demonstrando que estes marcadores foram eficientes para analisar a diversidade nas três espécies.

3 REFERÊNCIAS

AGUIAR, T.V.; SANT'ANNA-SANTOS, B.F.; AZEVEDO, A.A.; FERREIRA, R.S. 2007. ANATI QUANTI: software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. **Planta daninha**, **25 (4)**: 649-659.

ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. 2005. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, **30**: 333-342.

APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, **161**: 105–121.

BELLON, G.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, K.P.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SANTOS, E.C.; BRAGA, M.F.; GUIMARÃES, C.T. 2007. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **29 (1)**: 124-127.

BERGER, P.H. 2001. **Potyviridae**. Encyclopedia of life sciences, doi: 10.1038/npg.els.0000755.

BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; NUNES, T.S.; IMIG, D.C.; MEZZONATO, A.C. 2016. Passifloraceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12506>>. Acesso em: 13 Fev. 2016.

BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D. 2003. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, **25 (2)**: 355-356.

BEZERRA, D.R.; LIMA, J.A.A.; XAVIER FILHO, J. 1995. Purificação e caracterização de um isolado cearense do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro. **Fitopatologia Brasileira**, **20**: 553-560.

BORNET, B.; MULLER, C.; PAULUS, F.; BRANCHARD, M. 2002. High informative nature of Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) sequences amplified with tri- and tetra-nucleotide primers from cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) DNA. **Genome**, **45 (5)**: 890-896.

BRAZ, A.S.K.; SANTANA, E.N.; ZAMBOLIM, E.M.; COSTA, A.F.; OTONI, W.C.; ZERBINI, F.M. 1998. Molecular characterization of two isolates of South African *Passiflora* virus infecting Passion fruit in Brazil. **Virus Reviews and Research**, **3 (3)**: 146.

BRIZICKY, G.K. 1961. The genera of Turneraceae and Passifloraceae in the southeastern united states. **Journal of the Arnold Arboretum** **42**: 204-218.

CARVALHO, M.A.F.; PAIVA, R.; ALVES, E.; NOGUEIRA, R.C.; STEIN, V.C.; CASTRO, E.M.; PAIVA, P.D.O.; VARGAS, D.P. 2013. Morphogenetic potential of native passion fruit (*Passiflora gibertii* N. E. Brown.) calli. **Brazilian Journal of Botany**, **36 (2)**: 141-151.

CAVICHIOLO, J.C.; CORREA, L.S.; BOLIANI, A.C.; SANTOS, P.C. 2011. Desenvolvimento e produtividade do maracujazeiro-amarelo enxertado em três porta-enxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **33 (2)**: 567-574.

CAZÉ, A.L.; KRIEDT, R.A.; BEHEREGARAY, L.B.; BONATTO, S.L.; FREITAS, L.B. 2012. Isolation and Characterization of Microsatellite Markers for *Passiflora contracta*. **International Journal of Molecular Sciences**, **13 (9)**: 11343-11348.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S.; SANTOS, E.S.L.; CARDOSO-SILVA, C.B.; PEREIRA, A.S.; OLIVEIRA, A.C.; CORRÊIA, R.X. 2010. Genetic variability in wild genotypes of *Passiflora cincinnata* based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, **9 (4)**: 2421-2428.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; SANTOS, E.S.L.; SOUZA, A.M.; MORI, G.M.; OLIVEIRA, E.J.; CORRÊA, R.X.; SOUZA, A.P. 2012. Development and characterization of microsatellite markers for the wild South American *Passiflora cincinnata* (Passifloraceae). **American Journal of Botany**, **99 (4)**: e170–172.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; SANTOS, E.S.L.; VIEIRA, J.G.P.; MORI, G.M.; JESUS, O.N.; CORRÊA, R.X.; SOUZA, A.P. 2014. New Microsatellite Markers for Wild and Commercial Species of *Passiflora* (Passifloraceae) and Cross-Amplification. **Applications in Plant Sciences**, **2 (2)**: 1300061.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; FALEIRO, F.G.; JESUS, O.N.; SANTOS, E.S.L.; SOUZA, A.P. 2016. The Genetic Diversity, Conservation, and Use of Passion Fruit (*Passiflora* spp.). In: AHUJA, M.R.; JAIN, S.M. (Eds.) **Genetic Diversity and Erosion in Plants - Case Histories**. Vol. 2. Springer International Publishing: Switzerland. pp. 215-231.

CERVI, A. C. 2006. O gênero *Passiflora* (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. **Adumbrationes ad Summæ Editionem**, **16**: 1-5.

CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W.; UN, M.T.; GAMA, M.I.C.S.; YAMASHIRO, T. 1961. Grave moléstia do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg) no Estado da Bahia, causada por um isolado do vírus do "Woodiness" do maracujá. **Fitopatologia Brasileira**, **6**: 259-268.

CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T.; GAMA, M.I.C.S.; YAMASHIRO, T. 1981. Grave moléstia em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Estado da Bahia, causado por um isolado do vírus do "woodiness" do maracujá. **Fitopatologia Brasileira**, **6**: 259-268.

CHAGAS, C.M.; REZENDE, J.A.M.; COLARICCIO, A.; PIZA JR.; C.T., LOPES, L.C.; FERRARI, J.T.; BELLUZI, B.M. 1992. Ocorrência do endurecimento do fruto do maracujazeiro no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **14**: 187-190.

DI PIERO, R.M.; REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; PASCHOLATI, S. F.; DELFINO, M.A. 2006. Transmissão do *Passion fruit woodiness virus* por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e colonização de maracujazeiro pelo vetor. **Neotropical Entomology**, **35(1)**: 139-140.

DUDLEY, J.W. 1993. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. **Crop Science**, **33 (4)**: 660-668.

ESAU, K. 1967. Anatomy of plant virus infections. **Annual Review of Phytopathology**, 5: 45-74.

ESCOBAR, L.K. 1988. **Passifloraceae**. Flora de Colombia, Vol. 10. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. 2005. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro - Desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 187-209.

FERREIRA, F.R. 2005. Recursos genéticos de *Passiflora*. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 41-51.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3^a Ed. Brasília: Embrapa, 220 pp.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J.M. 2007. Passifloraceae. In: KUBITZKI, K. **The families and genera of vascular plants**, Vol. 9, Berlin: Springer-Verlag. pp. 270-281.

FISCHER, I.H.; KIMATI, H.; REZENDE, J.A.M. 2005. Doenças do maracujazeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN-FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4^a Ed, v. 2, São Paulo: Ceres. pp.467-474.

FORTALEZA, J.M.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; OLIVEIRA, A.T.; RANGEL, L.E.P. 2005. Características físicas e químicas em nove genótipos de maracujá-azedo cultivado sob três níveis de adubação potássica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 27 (1): 124-127.

FREITAS, J.P.X.; OLIVEIRA, E.J.; JESUS, O.N.; CRUZ-NETO, A.J.; SANTOS, L.R. 2012. Formação de população base para seleção recorrente em maracujazeiro-amarelo com uso de índices de seleção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 47 (3): 393-401.

GANGA, R.M.D.; RUGGIERO, C.; LEMOS, E.G.M.; GRILI, G.V.G.; GONÇALVES, M.M.; CHAGAS, E.A.; WICKERT, E. 2004. Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **26 (3)**: 494-498.

GOMES, R.T.; KITAJIMA, E.W., TANAKA, F.A.O., MARQUES, J.P.R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. 2010. Anatomia de lesões foliares causadas pelo vírus da Mancha Clorótica do *Clerodendrum*, transmitido pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* em diferentes espécies. **Summa Phytopathologica**, **36 (4)**: 291-297.

GRECO, S.M.L. 2014. **Caracterização físico-químico e molecular de genótipos de maracujazeiro azedo cultivados no Distrito Federal**. Tese de Doutorado em Agronomia. Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal. 149p.

HENRY, R.J. 2012. **Molecular markers in plants**. Oxford: Wiley-Blackwell. 216 pp.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agrícola municipal**. 2014. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/pam/>. Acesso em 06 de janeiro de 2016.

JIANG, G.L. 2013. Plant marker-assisted breeding and conventional breeding: challenges and perspectives. **Advances in Crop Science and Technology**, **1**: e106. doi: 10.4172/2329-8863.1000e106.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; SETEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. 2009. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3ª Ed. Porto Alegre, RS: Artmed. 612 p.

JUNQUEIRA, N.T.V.; ANJOS, J.R.N.; SILVA, A.N.P.; CHAVES, R.C.; GOMES, A.C. 2003. Reação às doenças e produtividade de onze cultivares de maracujá-azedo cultivadas sem agrotóxicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **38(8)**: 1005-1010.

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; BERNACCI, L.C. 2005. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Embrapa Cerrados, pp. 81-108.

JUNQUEIRA, K.P., FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V., BELLON, G., RAMOS, J.D., BRAGA, M.F., SOUZA, L.S. 2008. Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **30 (1)**: 191-196.

JUNQUEIRA, N.T.V.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, K.P.; JUNQUEIRA, L.P.; PEIXOTO, J.R. 2010. **Avanços no manejo integrado de doenças na cultura do maracujazeiro no Brasil**. In: Anais do Congresso Latinoamericano de *Passiflora*, Neiva, Colômbia: Cepass Huila, pp. 71-84.

KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. 2010. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, **177 (3)**: 309-334.

KITAJIMA, E. W.; ALCÂNTARA, B. K.; MADUREIRA, P. M.; ALFENAS-ZERBINI, P.; REZENDE, J. A.; ZERBINI, F. M. 2008. A mosaic of beach bean (*Canavalia rosea*) caused by an isolate of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) in Brazil. **Archives of Virology**, **153 (4)**: 743-747.

KLUGE, R.A. 1998. **Maracujazeiro**. In: CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A. Ecofisiologia de fruteiras tropicais, São Paulo: Nobel. 111p.

LEÃO, R.M.K.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; RESENDE, R.O.; MATTOS, J.K.A.; MELO, B. 2006. Reação de progênies de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*-CABMV) em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, **22 (2)**: 87-92.

LEITE B.; PASCHOLATI, S.F. 1995. Hospedeiro: alterações fisiológicas induzidas por fitopatógenos. In: BERGAMIN-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**. Ceres, São Paulo, p.417-453.

LIMA, D.M.; GOLOMBIESKI, E.R.; AYUB, R.A. 2000. Aplicação de técnicas de biotecnologia à cultura e melhoramento do maracujazeiro. **Ciência Rural**, **30 (2)**: 359-363.

LOVISOLO, O.; CONTI, M. 1966. Identification of an aphid-transmitted *cowpea mosaic virus*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, **72 (3)**: 265-269.

MACIEL, S.C., NAKANO, D.H., REZENDE, J.A.M., VIEIRA, M.L.C. 2009. Screening of *Passiflora* species for reaction to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* reveals an immune wild species. **Scientia Agricola**, **66(3)**: 414-418.

MARQUES, J.P.R.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTUA, J. APPEZZATO-DA GLÓRIA, B. 2007. Lesões foliares e de ramos de laranja-doce causadas pela leprose-dos-citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **42 (11)**: 1531-1536.

MELETTI, L.M.M. 2011. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **33 (E)**: 083-091.

MELETTI, L.M.M., SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R.S. 2005. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, pp.55-78.

MELO, J.R.F.; FIGUEIRA, A.R.; MOREIRA, C.N.; OLIVEIRA, A.C. 2015. Recent characterization of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) in Bahia State, Brazil, suggests potential regional isolation. **African Journal of Biotechnology**, **14 (9)**: 735-744.

MINK, G. I.; SILBERNAGEL, M. J. 1992. Serological and biological relationships among viruses in the bean common mosaic virus subgroup. **Archives of Virology (supplement) 5**: 397-406.

MUSCHNER, V.C.; LORENZ, A.P.; CERVI, A.C.; BONATTO, S.L.; SOUZA-CHIES, T.T.; SALZANO, F.M.; FREITAS, L.B. 2003. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany**, **90(8)**: 1229-1238.

NASCIMENTO, A.V.S. 2006. **Estudo de isolados brasileiros de potyvírus causadores de endurecimento dos frutos do maracujazeiro e análise da resistência à doença em linhagens transgênicas R1 de maracujá-amarelo**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 64p.

NASCIMENTO, A.V.S., SANTANA, E.N., BRAZ, A.S.K., ALFENAS, P.F., PIO-RIBEIRO, G., ANDRADE, G.P., CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. 2006. *Cowpea*

aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in Passion fruit in Brazil, and causes Passion fruit woodiness disease. **Archives of Virology**, **151 (9)**: 1797-1809.

NASCIMENTO, A.V.S.; SOUZA, A.R.R.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, G.P.; CARVALHO, M.G.; PIO-RIBEIRO, G.; ZERBINI, F.M. 2004. Análise filogenética de potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira** **29 (4)**: 378-383.

NICOLINI, C.; RABELO FILHO, F. A. C.; RESENDE, R. O.; ANDRADE, G. P.; KITAJIMA, E. W.; PIO-RIBEIRO, G.; NAGATA, T. 2012. Possible host adaptation as an evolution factor of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* deduced by coat protein gene analysis. **Journal of Phytopathology**, **160**: 82-87.

NOVAES, Q. S.; REZENDE, J. A. M. 2003. Selected mild strains of *Passion fruit woodiness virus* (PWV) fail to protect pre-immunized vines in Brazil. **Scientia Agricola**, **60 (4)**: 699-708.

NUNES, T.S. 2002. **A família Passifloraceae no estado da Bahia, Brasil**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia. 190 p.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. 2005. Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Molecular Ecology Notes**, **5 (2)**: 331-333.

OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. 2005. Espécies de maracujá com potencial agrônômico. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 143-158.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSK, R.; VIEIRA, M.L.C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, **29 (2)**: 294-307.

OLIVEIRA, E.J.; SOARES, T.L.; BARBOSA, C.J.; SANTOS-FILHO, H.P.; JESUS, O.N. 2013a. Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes

de resistência em condições de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **35(2)**: 485-492.

OLIVEIRA, G.A.F.; PÁDUA, J.G.; COSTA, J.L.; JESUS, O.N.; CARVALHO, F.M.; OLIVEIRA, E.J. 2013b. Cross-species amplification of microsatellite loci developed for *Passiflora edulis* Sims. in related *Passiflora* Species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, **56(5)**: 785-792.

PÁDUA, J.G.; OLIVEIRA, E.J.; ZUCCHI, M.I.; OLIVEIRA, G.C.X.; CAMARGO, L.E.A.; VIEIRA, M.L.C. 2005. Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: Passifloraceae). **Molecular Ecology Notes**, **5(4)**: 863-865.

PAULA, M.S.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S.; PEIXOTO, J.R. 2010. Caracterização genética de espécies de *Passiflora* por marcadores moleculares análogos a genes de resistência. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **32 (1)**: 222-229.

PEREIRA, D. A.; CORRÊA, R. X.; OLIVEIRA, A. C. 2015. Molecular genetic diversity and differentiation of populations of 'somnus' passion fruit trees (*Passiflora setacea* DC): Implications for conservation and pre-breeding. **Biochemical Systematics and Ecology**, **59**: 12-21

PEREIRA, M.G., PEREIRA, T.N.S., VIANA, A.P. 2005. Marcadores moleculares aplicados ao melhoramento genético do maracujazeiro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 277-292.

PINTO, P.H.D.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; RESENDE, R.O.; MATTOS, J.K.A.; MELO, B. 2008. Reação de genótipos de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV). **Bioscience Journal**, **24 (2)**: 19-26.

PIO-RIBEIRO, G.; PAPPU, S.S.; PAPPU, H.R.; ANDRADE, G.P.; REDDY, D.V.R. 2000. Occurrence of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in peanut in Brazil. **Plant Disease**, **84**: 760-766.

PIO-RIBEIRO, G.E.; MARIANO, R.L.R. 1997. Doenças do maracujazeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L. BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3ª Ed., v. 2. São Paulo: Agronômica Ceres. pp. 528-533.

REIS, R.V.; OLIVEIRA, E.J.; VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; SILVA, M.G.M. 2011. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro-amarelo detectada por marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **46 (1)**: 51-57.

RODRIGUES, L.K. 2014. **Epidemiologia do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* e manejo do maracujazeiro-azedo no Vale do Ribeira, São Paulo**. Dissertação (Mestrado) - Instituto Biológico, São Paulo, Brasil.

SALLA, M.F.S.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. 2002. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, **24 (1)**: 015-022.

SANTOS, L.F.; OLIVEIRA, E.J.; SILVA, A.S.; CARVALHO, F.M.; COSTA, J.L.; PADUA, J.G. 2011. ISSR Markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. **Biochemical Genetics**, **49 (7-8)**: 540-554.

SCHLÖTTERER, C. 2004. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? **Nature Reviews**, **5**: 63-69.

SHUKLA, D.D.; WARD, C.W. 1988. Amino acid sequence homology of coat protein as a basis for identification and classification of the potyvirus group. **Journal of General Virology**, **69**: 2703-2710.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. 2012. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**, 3 ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum.

TAKIMOTO, J.K.; QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; CIA, E. 2009. Alterações anatômicas em algodoeiro infectado pelo vírus da doença azul. **Bragantia**, **68 (1)**: 109-116.

TOKUOKA, T. 2012. Molecular phylogenetic analysis of Passifloraceae *sensu lato* (Malpighiales) based on plastid and nuclear DNA sequences. **Journal of Plant Research**, **125 (4)**: 489-497.

TRINDADE, D.R.; POLTRONIERI, L.S.; ALBUQUERQUE, F.S.; REZENDE, J.A.M.; NOVAES, Q.; KITAJIMA, E.W. 1999. Ocorrência do "Passion fruit woodiness virus" (PWV) em maracujazais do estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, **24(2)**: 196.

TRIVEDI, R. 2014. Morpho-anatomical characterization of groundnut genotypes showing differential reaction to late leaf spot pathogen. **Journal of SAT Agricultural Research**, **12**: 1-5.

VASCONCELLOS, M.A.S. 2005. Ecofisiologia do maracujazeiro e implicações na exploração diversificada. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Embrapa Cerrados, pp. 295-314.

VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; SOUZA, M.M.; MALDONADO, F.; AMARAL JÚNIOR, A.T. 2003. Diversidade entre genótipos de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras determinada por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **25 (3)**: 489-493.

VIANA, F.M.P.; COSTA, A.F. 2003. Doenças do maracujazeiro. In: FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E.; VIANA, F.M.P. (Eds.) **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. pp. 270-291.

WILDE, W.J.J.O. 1971. The systematic position of tribe Paropsieae, in particular the genus *Ancistrothyrsus*, and a key to the genera of Passifloraceae. **Blumea**, **19(1)**: 99-104.

WILDE, W.J.J.O. 1974. The genera of tribe Passifloreae (Passifloraceae), with special reference to flower morphology. **Blumea**, **22**: 37-50.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, **18 (22)**: 6531-6535.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, **20 (2)**: 176-183.



Figura 1. *Passiflora* spp do Banco de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas. A. Hábito trepadeiro *P. gibertii*. B. Ramo de *P. cincinnata* mostrando as gavinhas axilares. C. Ramos de *P. maliformis* com flores. D. Folha de *P. edulis* f. *flavicarpa* evidenciando os nectários (setas) no pecíolo. Fotos: Naira C. S. Barbosa.

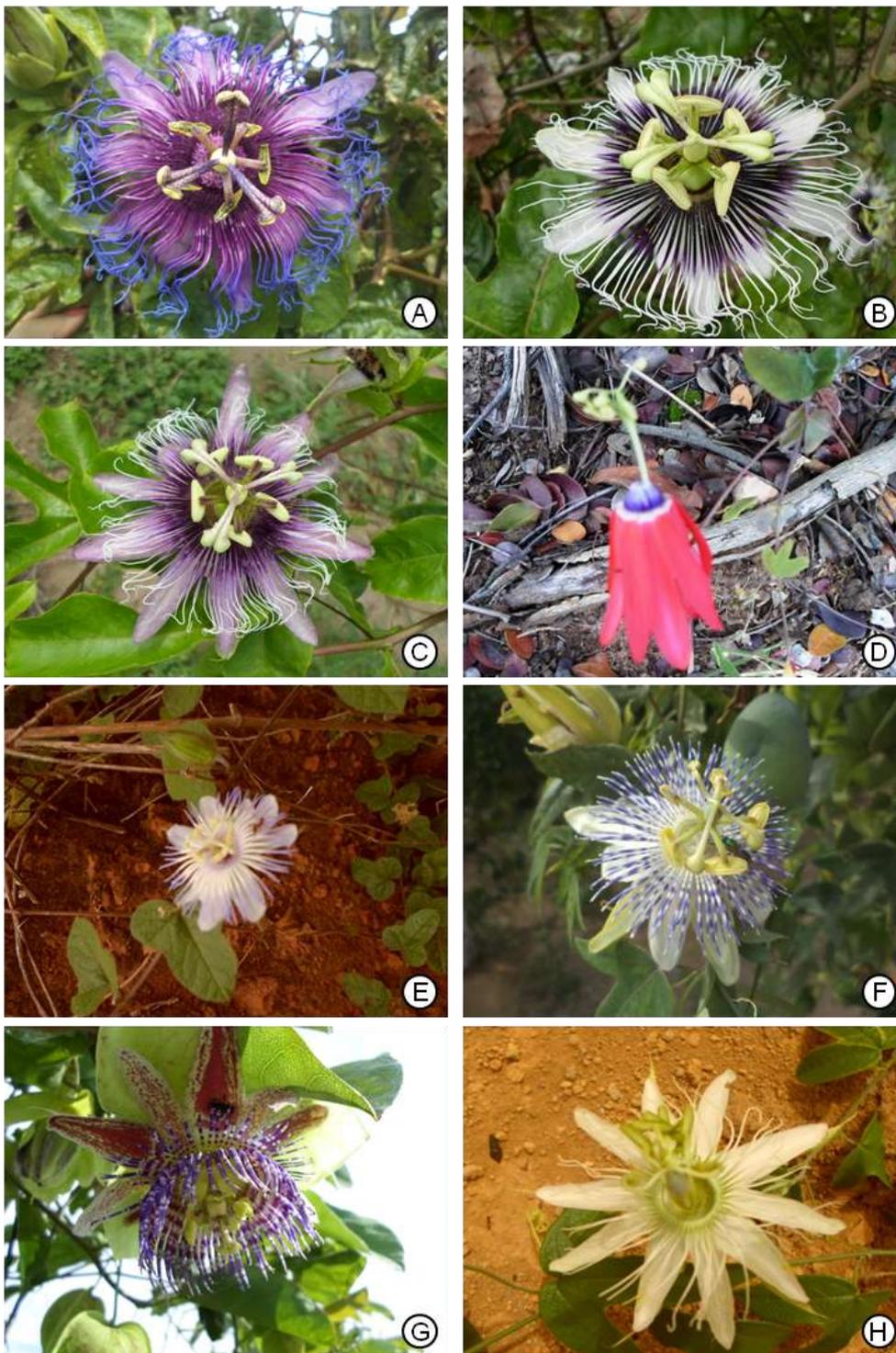


Figura 2. Flores de diferentes espécies de *Passiflora*. A. *P. cincinnata* Mast. B. *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. C. Híbrido interespecífico de *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg x *P. cincinnata* Mast., pertencente ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura. D. *P. edmundoi* Sacco. E. *P. foetida* L. F. *P. gibertii* N.E.Br. G. *P. maliformis* Vell. H. *P. setacea* DC. Fotos: Naira C. S. Barbosa (B, C, D, E, G e H) e Alessandra S. Schnadelbach (A e F).



Figura 3. Sintomas do endurecimento dos frutos em *P. edulis* f. *flavicarpa*. A D. Plantas de campo naturalmente infectadas pelo CABMV. A, B e C. Folhas exibindo mosaico, bolhosidades e deformações. D-E. Frutos endurecidos, deformados e com manchas na casca. Fotos: Cristiane de Jesus Barbosa.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações anatômicas decorrentes da infecção com o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* em cinco espécies de *Passiflora* e a diversidade genética de populações naturais da espécie com menores alterações.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a presença e tipo de alterações anatômicas decorrentes da infecção com o CABMV em *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. maliformis* e *P. setacea*;
- Identificar a espécie silvestre de *Passiflora* com menores alterações anatômicas decorrentes da infecção com o CABMV;
- Avaliar a diversidade genética da espécie com menores alterações anatômicas decorrentes da infecção com o CABMV, através de um estudo populacional utilizando marcadores SSR;
- Contribuir para os estudos de diversidade e melhoramento genético do maracujá.

CAPÍTULO I

ALTERAÇÕES ANATÔMICAS EM FOLHAS DE CINCO ESPÉCIES DE MARACUJAZEIROS INFECTADAS COM O *Cowpea aphid-borne mosaic virus*

RESUMO

Alterações anatômicas em folhas de cinco espécies de maracujazeiros infectadas com o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* - O endurecimento dos frutos do maracujazeiro causado pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) constitui um dos principais problemas fitossanitários da cultura, ocasionando queda de produtividade e qualidade dos frutos. O objetivo do trabalho foi avaliar a presença de alterações anatômicas foliares em espécies de maracujá infectadas pelo CABMV que possam auxiliar no conhecimento da interação vírus-hospedeiro e contribuir na identificação de genótipos resistentes a este patógeno. Foram estudadas as espécies silvestres *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. maliformis* e *P. setacea*, consideradas como mais resistentes ao CABMV, e a espécie comercial de maracujá amarelo, *P. edulis* f. *flavicarpa*, considerada suscetível ao vírus. As plantas foram obtidas de sementes, mantidas em casa de vegetação, inoculadas mecanicamente com um isolado virulento do CABMV e, após 60 dias, coletou-se a quinta folha de cada planta como amostras para o estudo anatômico, que foi realizada por microscopia eletrônica de varredura e óptica. Foram mensuradas a espessura da epiderme adaxial e abaxial, do parênquima paliçádico e esponjoso, espessura foliar total e densidade estomática. As principais alterações decorrentes da infecção pelo CABMV foram: desorganização dos feixes vasculares, alterações no tecido parenquimático e depressões no limbo, às quais estavam presentes em maior intensidade em *P. edulis* f. *flavicarpa*. O padrão de deposição da cera epicuticular cristalóide esteve presente em todas as espécies silvestres analisadas e ausente na espécie comercial, podendo ser utilizado como um marcador histológico para a seleção de plantas resistentes ao CABMV em programas de melhoramento. A espécie *P. setacea* foi a que apresentou menores alterações em decorrência da infecção com o CABMV.

Palavras-chave: *Passion fruit woodiness virus*, PWV, histologia vegetal, melhoramento.

ABSTRACT

Anatomical alterations in leaves of five species of passion fruit trees infected by Cowpea aphid-borne mosaic virus - Passion fruit woodiness disease caused by the *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) represents one of the main phytosanitary culture problems, causing a drop in productivity and fruit quality. The goal of this work was to evaluate the presence of anatomical leaf alterations in passion fruit species infected by CABMV that can assist in the understanding about the host-virus interaction and contribute to the identification of genotypes that are resistant to this pathogen. The wild species *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. maliformis* and *P. setacea*, were studied since they are considered resistant to CABMV and the commercial species of the yellow passion fruit, *P. edulis* f. *flavicarpa*, considered susceptible to the virus. The plants were obtained from seeds kept in a greenhouse, mechanically inoculated with a virulent isolate CABMV and, after 60 days, collected up to fifth leaf of each plant as samples for anatomical study, which was performed by scanning electron microscope and optical. The thickness of the adaxial and abaxial epidermis, of the palisade and spongy parenchyma, of the total leaf thickness and stomatal density were measured. The main alterations resulting from CABMV infection were: disorganization of the vascular bundles, alterations in the parenchyma tissue and depressions in the leaf blade, which were present in greater intensity in *P. edulis* f. *flavicarpa*. The pattern of the deposition of the epicuticular wax crystalloid was present in all the analyzed wild species and absent in the commercial species. This could be used as a histological marker for the selection of plants that are resistant to CABMV in improvement programs. The species *P. setacea* was the one that showed minor alterations resulting from the infection by CABMV.

Keywords: *Passion fruit woodiness virus*, PWV, plant histology, improvement.

1 INTRODUÇÃO

O maracujazeiro é uma planta tropical da família Passifloraceae, que possui distribuição pantropical, incluindo cerca de 20 gêneros e 600 espécies (SOUZA e LORENZI, 2012). O Brasil é um dos principais centros de diversidade para a família, com cerca de 150 espécies aceitas (BERNACCI et al., 2016). O gênero *Passiflora* é o mais representativo em Passifloraceae, sendo a maioria das espécies originárias da América Tropical (OLIVEIRA e RUGGIEIRO, 2005).

O maracujá-amarelo ou maracujá-azedo, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. é a principal espécie cultivada e comercializada (VIANA et al., 2003; MELETTI, 2011), cujo cultivo ocorre em quase todo o território nacional, principalmente na região Nordeste (BORGES e SOUZA, 2010; GONÇALVES e SOUZA, 2006).

Apesar de o Brasil ser o maior produtor mundial de maracujá, com produção estimada de 776 mil toneladas colhidas em uma área de 58 mil hectares, a produtividade brasileira é considerada baixa, 13,42 t ha⁻¹ (IBGE, 2014). Dentre os fatores que limitam a expansão da cultura, causam redução na produtividade e na vida útil dos pomares merece destaque a doença do endurecimento do fruto causada no Brasil, principalmente, pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (NASCIMENTO et al., 2006; CERQUEIRA-SILVA et al., 2014).

O CABMV pertence ao gênero *Potyvirus* e à família Potyviridae (MINK e SILBERNAGEL, 1992) – a principal família de vírus que infecta plantas (BERGER, 2001). É um vírus de RNA de fita simples (BERGER, 2001), que apresenta como principais hospedeiros espécies das famílias Fabaceae e Passifloraceae (LOVISOLO e CONTI, 1966; PIO-RIBEIRO et al., 2000; NASCIMENTO et al., 2006; KITAJIMA et al., 2008; NICOLINI et al., 2012).

Este vírus é transmitido de maneira não persistente por afídeos e os principais sintomas são o endurecimento do pericarpo e deformidades dos frutos, mosaico, bolhosidades e distorção da lâmina foliar, além da redução da produtividade dos maracujazeiros (FISCHER et al., 2005). Ainda como agravante, até o momento não existem medidas de controle efetivas da doença (TREVISAN et al., 2006; SAMPAIO et al., 2008). Portanto, a identificação de fontes de resistência genética em espécies de *Passiflora* torna-se uma alternativa interessante para introgressão de genes de na espécie comercial, *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Espécies silvestres de *Passiflora* têm sido apontadas como resistentes a pragas em avaliações de campo (JUNQUEIRA et al. 2005; CERQUEIRA-SILVA, et al. 2008; MACIEL et al., 2009; CAVICHIOLI et al., 2011) entre as quais estão as espécies *P. setacea* DC., *P. cincinnata* Mast. e *P. gibertii* N.E.Brown que apresentam potencial de uso em programas de hibridações interespecíficas (JUNQUEIRA et al., 2005; CERQUEIRA-SILVA et al., 2008; MACIEL et al., 2009; CAVICHIOLI et al., 2011, CARVALHO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013). No entanto, esses estudos são focados quase exclusivamente no comportamento em relação à presença e severidade de sintomas externos, não tendo sido realizado nenhum estudo anatômico, que possa auxiliar na seleção de plantas resistentes, até o momento.

Os estudos anatômicos associados à presença de patógenos exercem importante papel para o melhor entendimento da patogênese e das reações apresentadas pelo hospedeiro, quando exposto à ação dos patógenos. Apesar de existirem trabalhos abordando aspectos anatômicos em *Passiflora* (NOGUEIRA FILHO et al., 2010; BERALDO e KATO, 2010; VIEIRA et al., 2011) não há estudos que relacionem diferenças anatômicas como resposta à infecção pelo CABMV, que possam fornecer subsídios para o programa de melhoramento genético do maracujazeiro.

Este trabalho teve, portanto, o objetivo de avaliar características anatômicas foliares em *P. cincinnata* Mast., *P. gibertii* N.E.Br., *P. maliformis* L., *P. setacea* DC. e *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg., infectadas pelo CABMV que possam contribuir na identificação e seleção de genótipos resistentes a este patógeno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Para este estudo foram utilizadas cinco espécies de *Passiflora*, sendo quatro delas silvestres, consideradas mais resistentes ao CABMV — *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. maliformis* e *P. setacea* — e a espécie comercial, de maracujá-amarelo, *P. edulis* f. *flavicarpa*, suscetível ao CABMV (Figura 1). As sementes foram obtidas do Banco de Germoplasma de Maracujazeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

2.2 Ensaio biológico e amostragem

O ensaio biológico foi estabelecido em casa de vegetação na Embrapa Mandioca e Fruticultura em novembro de 2013. Foram obtidas seis plantas de cada espécie, das quais a metade foi inoculada mecanicamente com o CABMV e a outra metade inoculada somente com tampão de inoculação.

As plantas foram inoculadas quando atingiram o tamanho médio de 20 cm, a partir de extrato de folhas de plantas com mosaico foliar e infectadas com um isolado do CABMV, previamente identificado via RT-PCR (FRÓES et al., 2014). O extrato foi preparado a partir de 1 g de amostras de folhas com mosaico em 5 mL de solução tampão (fosfato de potássio 0,1 M e sulfato de sódio 0,1 M, com pH 7,0), acrescido do abrasivo “celite”. O vírus foi inoculado friccionando as partes superiores (superfície adaxial) da folha com os dedos contendo o inóculo. Após, as plantas foram lavadas para retirar o excesso do abrasivo de forma a evitar a queima das folhas.

Realizou-se, semanalmente, a avaliação da presença de sintomas de mosaico nas folhas de cada planta do ensaio. Após 60 dias da inoculação, quando todas as plantas inoculadas já apresentam sintomas de mosaico, foram coletadas amostras para as análises anatômicas. Foi considerada como amostra para as análises, a quinta folha, do ápice para a base, de cada planta.

2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise das superfícies foliares, adaxial e abaxial, em microscopia eletrônica de varredura (MEV), os segmentos foliares foram desidratados em série etílica crescente. As amostras foram submetidas à secagem em ponto crítico de CO₂ e em seguida montadas sobre suportes metálicos (*stubs*) e metalizadas com ouro por 180 segundos. As imagens foram obtidas por microscópio eletrônico de varredura de pressão variável JEOL® JSM-6930LV.

2.4 Microscopia óptica

Para as análises em microscopia óptica, seções paradérmicas do limbo foliar foram obtidas à mão livre com auxílio de lâmina de barbear, submetidas à clarificação com hipoclorito de sódio a 50% e em seguida lavadas em água

destilada (KRAUS e ARDUIN, 1997). As seções foram coradas com safranina alcoólica 1%, e montadas em lâminas semi-permanentes com glicerina 50%. Foram também realizados cortes em micrótomo rotativo na região transversal da lâmina foliar. Para isso, fragmentos do terço mediano das folhas foram emblocados com kit de Histo-resina LEICA®.

Os cortes obtidos foram corados com Azul de toluidina 0,05% (O'BRIEN et al., 1964), para a montagem das lâminas permanentes em Entellan. A documentação fotográfica foi realizada em microscópio óptico Carl Zeiss® Axio Scope A1 acoplado a uma câmera de vídeo Canon® e um microcomputador, empregando o Software EOS Utility®, versão 1.4.0.1.

As fotos foram utilizadas para as medições das espessuras dos tecidos, nas seções transversais da lâmina foliar (espessura da epiderme adaxial (EAd) e abaxial (EAb), espessura do parênquima paliçádico (PP) e esponjoso (PE) e a espessura total do limbo (EL)) por meio do programa de imagens AxioVision® Rel. 4.8. Para cada medida utilizou-se 10 cortes de cada uma das folhas, totalizando assim um número amostral de 30 unidades.

Nas seções paradérmicas das superfícies inferiores foi realizada a contagem dos estômatos, obtendo-se a densidade estomática por mm² (DE), utilizando-se o programa ANATI QUANTI (AGUIAR et al., 2007). Em cada uma das folhas foi realizada a contagem em 10 regiões distintas, estimando 30 medidas de folhas infectadas e 30 de folhas sadias para cada espécie.

2.5 Análise estatística

Para a análise quantitativa dos caracteres anatômicos (EAd, EAb, PP, PE, EL e DE), as médias obtidas das plantas infectadas foram comparadas com as obtidas das plantas sadias pelo teste T de Student, utilizando-se o programa R 3.0.3 (R CORE TEAM, 2013).

3 RESULTADOS

3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Por meio da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar nas superfícies adaxial e abaxial das folhas de *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. maliformis* e *P. setacea* (Figura 2E-T) a presença evidente de cera epicuticular com aspecto cristalóide (BARTHLOTT et al., 1998), o que não foi visualizado na espécie *P. edulis* em ambas faces epidérmicas (Figura 2A-D).

Em relação à superfície adaxial das folhas de *P. edulis* observou-se uma descamação tanto nas folhas infectadas como nas sadias (Figura 2A-B). Comportamento similar foi observado na superfície abaxial, mas em menor intensidade (Figura 2C-D).

3.2 Microscopia óptica

3. 2.1 Seções paradérmicas

Ao analisar as seções paradérmicas e transversais em ambas as faces da lâmina foliar, observou-se estômatos apenas na face abaxial, sendo as folhas classificadas como hipoestomáticas. Em vista frontal, foram identificadas células epidérmicas poligonais de paredes anticlinais retas a levemente sinuosas na face adaxial (Figura 3A, B, E, F, I, J, M, N, Q e R), enquanto na face abaxial, estas paredes apresentam contorno mais sinuoso (Figura 3C, D, G, H, K, L, O, P, S e T).

Verificou-se ainda que as plantas infectadas pelo CABMV apresentaram menor grau de sinuosidade das células epidérmicas, na face adaxial de *P. edulis* quando comparado às plantas sadias (Figura 3A-D). Para as outras espécies, não foram observadas diferenças no formato das células comparando as plantas infectadas com as sadias (Figura 3E-T).

3.2.2 Seções transversais

No presente estudo, foi observado para as espécies *P. edulis* (Figura 4B), *P. gibertii* (Figura 4F) e *P. maliformis* (Figura 4H) infectadas pelo CABMV uma depressão na região do limbo foliar. *P. edulis* foi a única espécie que apresentou hipertrofia nas células do parênquima esponjoso. Enquanto as espécies, *P.*

cincinnata (Figura 4D) e *P. setacea* (Figura 4J) não apresentaram diferenças nas seções transversais comparando as plantas infectadas com as sadias.

Na região da nervura central (Figura 5A-M) observou-se que nas folhas sadias (Figura 5A, C, E, G, J, L) observou-se que na região da nervura central, ocorre colênquima do tipo angular, seguido de parênquima fundamental e sistema vascular formado por feixes vasculares do tipo colateral.

Em relação às plantas sadias, observou-se diferenças em relação à quantidade e distribuição do sistema vascular. Em *P. edulis* a nervura principal é constituída por quatro feixes, aproximadamente do mesmo tamanho, dispostos em forma de círculo, estando um mais voltado para a face adaxial, e três localizados medianamente à nervura (Figura 5A, C). *P. cincinnata* (Figura 5E, F) e *P. maliformis* (Figura 5I, J) apresentaram dois conjuntos de feixes, sendo um feixe maior, em forma de círculo, na região aproximadamente mediana da nervura, e um feixe pequeno e circular, mais voltado para a face adaxial. As espécies *P. gibertii* (Figura 5G, H) e *P. setacea* (Figura 5K, L) apresentaram um único feixe, localizado na região central.

As folhas de *P. edulis*, infectadas pelo CABMV apresentaram alteração no sistema vascular, com nervura principal formada por um único feixe maior, voltado à face inferior e presença de um feixe menor voltado à face superior (Figura 5B, D). As outras espécies não apresentaram diferenças nos feixes vasculares (Figura 5F, H, K, M).

3.2.3 Análise estatística

Na análise dos caracteres anatômicos das folhas observou-se diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$) em todas as variáveis estudadas (espécies, tratamento – não inoculado e inoculado com CABMV) (Tabela 1).

Em relação às análises quantitativas, *P. edulis* f. *flavicarpa* evidenciou diferenças anatômicas decorrentes da presença do CABMV para quase todos os caracteres avaliados, exceto para a espessura da epiderme abaxial (EAb). Nesta espécie, observou-se maior espessura dos tecidos na presença do vírus para a maioria das características avaliadas – espessura da epiderme adaxial (EAd), parênquima paliçádico (PP), parênquima esponjoso (PE) e espessura total do limbo (EL) enquanto a densidade estomática (DE) foi menor nas plantas infectadas (Tabela 1). Por outro lado, *P. setacea* não mostrou diferenças significativas para

nenhuma característica analisada. *P. cincinnata* evidenciou diferença significativa apenas para uma característica – EAd, *P. gibertii* para duas características – EAd e PE, e *P. maliformis* para três características – EAd, EAb e DE.

Para a EAd, observou-se que *P. edulis* inoculado com o vírus apresentou maior espessura com 26,97 μm seguido de *P. maliformis* com 21,83 μm . Por outro lado, *P. setacea* controle (não inoculado) foi que apresentou a menor EAd com 11,63 μm , não tendo diferido do tratamento com inoculação. Comportamento similar foi observado para a espessura da EAb, visto que *P. edulis* inoculado com CABMV apresentou maior espessura com 19,27 μm , embora não tenha diferido significativamente do tratamento controle (18,81 μm). Enquanto *P. setacea* apresentou menor EAb com 8,99 μm e 9,16 μm , nos tratamentos controle e inoculado, respectivamente.

A DE foi maior em *P. gibertii* (346,35 est/ mm^2) inoculada com o vírus CABMV, mas não houve diferença significativa em relação às plantas controle. Enquanto *P. maliformis* inoculada (330,03 est/ mm^2) apresentou diferença significativa para esta variável em relação ao controle (215,85 est/ mm^2).

4 DISCUSSÃO

A presença da cera epicuticular em padrão cristalóide, em todas as espécies silvestres analisadas e ausência na espécie cultivada foi a característica mais diferenciada entre essas espécies. A perda da cera epicuticular em *P. edulis* f. *flavicarpa* pode ter ocorrido ao longo do processo de sua domesticação.

As espécies silvestres têm sido descritas como mais resistentes ao CABMV (JUNQUEIRA, 2005; OLIVEIRA et al., 2013). A presença de cera epicuticular nessas espécies pode estar relacionada à resistência observada, podendo afetar o processo de aquisição e transmissão do vírus pelos vetores. Alguns trabalhos têm relacionado a presença de cera epicuticular à resistência contra afídeos em várias espécies, como couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*), cevada, framboesa (*Rubus idaeus*) e ervilha (*Pisum sativum*) (THOMPSON, 1963; TSUMUKI et al., 1989; SHEPHERD et al., 1999; WHITE e EIGENBRODE, 2000; COSTA et al., 2014). A cera epicuticular foi associada à prevenção da transmissão do *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) pela mosca branca em algodão silvestre (*Gossypium arboreum*), por ser uma barreira física contra o ataque do vetor (KHAN et al., 2015).

Estando a presença de cera epicuticular relacionada à resistência observada nas espécies silvestres (JUNQUEIRA, 2005; OLIVEIRA et al., 2013), pode constituir um marcador histológico importante para a seleção precoce de híbridos resistentes ao CABMV.

P. edulis f. *flavicarpa* foi a única espécie que apresentou diferenças consideráveis na forma das células epidérmicas em vista frontal, tendo menor sinuosidade nas células da epiderme adaxial das plantas infectadas. Alguns autores relacionam a menor sinuosidade da parede celular a características adaptativas contra a perda excessiva de água (ELIAS et al., 2003; SCATENA et al., 2005; LIMA Jr. et al., 2006).

A sinuosidade das paredes anticlinais das células epidérmicas pode ser atribuída às condições ambientais, sendo mais pronunciada em plantas adaptadas a ambientes úmidos (GOMES, 1992), enquanto que as células epidérmicas que apresentam paredes retas possuem características que garantem o seu desenvolvimento em ambientes secos (WILKINSON, 1979). Farias et al. (2009) também afirmaram que os agentes físicos (umidade atmosférica e intensidade

luminosa) interferem no desenvolvimento foliar e constituem um efeito marcante sobre a estrutura das paredes da epiderme.

Como o contorno da parede celular está muitas vezes relacionado à maior absorção de luz e conseqüente aumento de área celular exposta, acredita-se que a presença de sinuosidade nas paredes celulares de ambas as faces epidérmicas esteja relacionada ao grupo taxonômico, pois está presente também em outras espécies de *Passiflora* (GARCÍA et al., 2008; MERUVIA et al., 1993a; 1993b).

As alterações anatômicas causadas por vírus relatadas no presente estudo, como depressões em regiões do limbo, colapso da epiderme e hipertrofia de células do parênquima esponjoso, foram apontadas também por outros autores em diversas espécies de plantas (SOFY et al., 2007; TAKIMOTO et al., 2009; SIDHU et al., 2010; GOMES et al., 2010; MARQUES et al., 2010; TROMAS et al., 2014).

Alterações anatômicas em tecidos foliares causadas pelo *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) foram avaliadas em *Citrus sinensis* L. (MARQUES et al., 2007). As características observadas nas folhas das plantas infectadas foram hipertrofia das células parenquimáticas, hiperplasia e acúmulo de compostos lipídicos. Os autores associaram estas alterações com possíveis mecanismos que podem impedir que o vírus se torne sistêmico.

Diferentes espécies infectadas com o *Clerodendrum chlorotic spot virus* (CICSV), apresentaram hipertrofia em algumas células do parênquima lacunoso e eventual hiperplasia no parênquima paliçádico, partes da epiderme necrosadas e colapsadas, e região vascular com indícios de necrose (GOMES et al., 2010). Os autores associaram estes efeitos à invasão e replicação do CICSV e também aos mecanismos de reação da planta para impedir a expansão do vírus.

No presente estudo, o fato de *P. edulis* f. *flavicarpa* sendo a espécie mais suscetível ao CABMV ter apresentado mais alterações anatômicas ao ser infectada pode estar, desta forma, relacionada também aos mecanismos de defesa da planta à infecção viral.

As variações no sistema vascular das plantas infectadas foram consideradas muito relevantes, tendo em vista a importância do sistema vascular para a manutenção da planta, na condução de água, sais minerais e nutrientes orgânicos, sendo que estas foram observadas apenas nas folhas de *P. edulis* f. *flavicarpa* infectadas com o CABMV.

Alterações observadas nos feixes vasculares de diferentes plantas por infecção viral já haviam sido observadas em diversos trabalhos e a degeneração do floema, e o colapso e obliteração de elementos do sistema vascular foram apontados como as mais comuns e danosas ao desenvolvimento das plantas (ESAU, 1967; TAKIMOTO, 2009; GOMES et al., 2010; MARQUES et al., 2010).

De acordo com as análises realizadas neste estudo, *P. edulis* f. *flavicarpa* foi a espécie que sofreu mais alterações anatômicas quando inoculada com o CABMV. Enquanto *P. setacea* foi a espécie que apresentou menores diferenças anatômicas comparando plantas infectadas e sadias. Estes resultados corroboram análises realizadas anteriormente que apontam *P. setacea* como mais resistente ao CABMV (JUNQUEIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2013).

Os resultados obtidos elucidam melhor a interação vírus e a planta hospedeira, identificando estruturas anatômicas que podem estar relacionadas à transmissão do CABMV por afídeos e a maior resistência de campo observada em espécies silvestres de maracujazeiro (JUNQUEIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2013).

5 CONCLUSÕES

As análises microscópicas foram eficazes para o estudo estrutural da interação CABMV x maracujazeiro.

A organização e características das células epidérmicas, alterações no tecido parenquimático, depressões em determinadas regiões do limbo e desorganização dos feixes vasculares foram as alterações anatômicas mais importantes decorrentes da infecção pelo CABMV nas espécies estudadas.

A espécie *P. setacea* foi a que apresentou menores alterações em decorrência da infecção com o CABMV e a *P. edulis* f. *flavicarpa* a que mais foi afetada pelo vírus.

O padrão de deposição da cera epicuticular cristalóide está presente em todas as espécies silvestres analisadas, *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. maliformis* e *P. setacea*, consideradas mais resistentes ao CABMV e pode vir a ser utilizado como um marcador histológico para a seleção precoce de plantas resistentes ao CABMV em programas de melhoramento genético.

6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro à pesquisa e a concessão da bolsa de estudo, ao Centro de Pesquisas Gonçalo-Moniz (Fiocruz), pelo uso da microscopia eletrônica de varredura e ao Laboratório de Anatomia Vegetal e Identificação de Madeiras (LAVIM), do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia pela realização das análises histológicas.

7 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, T.V.; SANT'ANNA-SANTOS, B.F.; AZEVEDO, A.A.; FERREIRA, R.S. 2007. Anati Quanti: Software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. **Planta Daninha**, **25 (4)**: 649-659.
- BARTHLOTT, W.; NEINHUIS, C.; CUTTLER, D.; DITSCH, F.; MEUSEL, I.; THEISEN, I.; WILHELMI, H. 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. **Botanical Journal of the Linnean Society**, **126**: 237-260.
- BERALDO, J.; KATO, E.T.M. 2010. Morfoanatomia de folhas e caules de *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **20 (2)**: 233-239.
- BERGER, P.H. 2001. **Potyviridae**. Encyclopedia of life sciences, doi: 10.1038/npg.els.0000755.
- BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; NUNES, T.S.; IMIG, D.C.; MEZZONATO, A.C. 2016. Passifloraceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12506>>. Acesso em: 09 Mar. 2016.
- BORGES, A. L.; SOUZA, L. D. 2010. Recomendações de calagem e adubação para maracujazeiro. Comunicado Técnico 141. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2010. 4p.
- CARVALHO, M.A.F.; PAIVA, R.; ALVES, E.; NOGUEIRA, R.C.; STEIN, V.C.; CASTRO, E.M.; PAIVA, P.D.O.; VARGAS, D.P. 2013. Morphogenetic potential of native passion fruit (*Passiflora gibertii* N. E. Brown.) calli. **Brazilian Journal of Botany**, **36 (2)**: 141-151.
- CAVICHIOLO, J.C.; CORRÊA, L.S.; NARITA, N.; KASAI, F.S. 2011. Incidência e severidade do vírus do endurecimento dos frutos em maracujazeiros enxertados em pé-franco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **E**: 411-414.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S.; SOUZA, A.P.; CORRÊA, R.X. 2014. A history of passion fruit woodiness disease with emphasis on the current situation in Brazil and prospects for Brazilian passion fruit cultivation. **European Journal of Plant Pathology**, **139**: 261–270.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; MOREIRA, C.N.; FIGUEIRA, A.R.; CORRÊA, R.X.; OLIVEIRA, A.C. 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 (4)**: 1209-1216.

COSTA, E.M.R.; MARCHESE, A.; MALUF, W.R.; SILVA, A.A. 2014. Resistência de genótipos de couve-manteiga ao pulgão-verde e sua relação com a cerosidade foliar. **Revista Ciência Agronômica** **45 (1)**: 146-154.

ELIAS, S.R.M.; ASSIS, R.M.; STACCIARINI-SERAPHIN, E.; REZENDE, M.H. 2003. Anatomia foliar em plantas jovens de *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil. (Solanaceae). **Revista Brasileira de Botânica** **26 (2)**:169-174.

ESAU, K. 1967. Anatomy of plant virus infections. **Annual Review of Phytopathology** **5**: 45-74.

FARIAS, V.; ROCHA, L.D.; PREUSSLER, K.H.; MARANHO, L.T. 2009. Organização estrutural da folha de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, Myrtaceae. **Acta Botanica Brasilica** **23 (2)**: 398-406.

FISCHER, I.H.; KIMATI, H.; REZENDE, J.A.M. 2005. Doenças do maracujazeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM-FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4ª Ed, v. 2, São Paulo: Ceres. pp. 467-474.

FRÓES, T.L.; TUMELERO, A.I.; ABREU, E.F.M.; BARBOSA, C.J. 2014. Dinâmica da interação *Cowpea aphid-borne mosaic virus* vs *Passiflora edulis* (maracujá), *Vigna unguiculata* (Feijão-caupi) e *Canavalia ensiformis* (Feijão-de-Porco). **Anais da 8ª Jornada Científica da Embrapa Mandioca e Fruticultura**, Cruz das Almas, Bahia.

GARCÍA, M.; JÁUREGUI, D.; PÉREZ, D. 2008. Anatomía foliar de *Passiflora guazumaefolia* Juss. y *Passiflora* aff. *tiliaefolia* L. (Passifloraceae) presentes en Venezuela. **Ernstia**, **18 (2)**: 1-10.

GOMES, D.M.S. 1992. **Anatomia foliar de *Gomidesia spectabilis* (DC) Berg e *G. nitida* (Vell) Legr. (Myrtaceae)**. 1992. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 102p.

GOMES, R.T.; KITAJIMA, E.W.; TANAKA, F.A.O.; MARQUES, J.P.R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. 2010. Anatomia de lesões foliares causadas pelo vírus da Mancha Clorótica do *Clerodendrum*, transmitido pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* em diferentes espécies. **Summa Phytopathologica**, **36 (4)**: 291-297.

GONÇALVES, J.S.; SOUZA, S.A.M. 2006. Fruta da paixão: panorama econômico do maracujá no Brasil. **Informações Econômicas - São Paulo**, **36 (12)**: 29-35.

IBGE. Banco de Dados Agregados. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 18 de maio de 2014.

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; BERNACCI, L.C. 2005. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. p. 81-108.

KHAN, M.A.U.; SHAHID, A.A.; RAO, A.Q.; SHAHID, N.; LATIF, A.; DIN, S.; HUSNAIN, T. 2015. Defense strategies of cotton against whitefly transmitted CLCuV and Begomoviruses. **Advancements in Life Sciences**, **2 (2)**: 58-66.

KITAJIMA, E.W.; ALCÂNTARA, B.K.; MADUREIRA, P.M.; ALFENAS-ZERBINI, P.; REZENDE, J.A.; ZERBINI, F.M. 2008. A mosaic of beach bean (*Canavalia rosea*) caused by an isolate of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) in Brazil. **Archives of Virology**, **153 (4)**: 743-747.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: EDUR. 1997.

LIMA-JR, E.C.L.; ALVARENGA, A.A.; CASTRO, E.M.; VIEIRA, C.V.; BARBOSA, J.P.R.A.D.B. 2006. Aspectos fisiológicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore** **30 (1)**: 33-41.

LOVISOLO, O.; CONTI, M. 1966. Identification of an aphid-transmitted cowpea mosaic virus. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, **72 (3)**: 265-269.

MACIEL, S.C., NAKANO, D.H., REZENDE, J.A.M., VIEIRA, M.L.C. 2009. Screening of *Passiflora* species for reaction to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* reveals an immune wild species. **Scientia Agricola**, **66 (3)**: 414-418.

MARQUES, J.P.R.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTUA, J.; APPEZZATO-DAGLÓRIA, B. 2007. Lesões foliares e de ramos de laranjeira-doce causadas pela leprose-dos-citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **42 (11)**: 1531-1536.

MARQUES, J.P.R.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTUA, J.; APPEZZATO-DAGLÓRIA, B. 2010. Comparative morpho-anatomical studies of the lesions caused by citrus leprosis virus on sweet orange. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **82 (2)**: 501-511.

MELETTI, L.M.M. 2011. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **33 (1)**: 83-91.

MERUVIA, M.Y.L.; BONA, C.; CERVI, A.C. 1993a. Anatomia foliar de *Passiflora campanulata* Masters (Passifloraceae). **Acta Biológica Paranaense**, **22 (1, 2, 3, 4)**: 45-62.

MERUVIA, M.Y.L.; PALACIOS, V.; CERVI, A.C. 1993b. Anatomia foliar de *Passiflora capsularis* L. (Passifloraceae). **Acta Biológica Paranaense**, **22 (1,2,3,4)**: 31-44.

MINK, G. I.; SILBERNAGEL, M. J. 1992. Serological and biological relationships among viruses in the bean common mosaic virus subgroup. **Archives of Virology (supplement)** **5**, 397-406.

NASCIMENTO, A.V.S., SANTANA, E.N., BRAZ, A.S.K., ALFENAS, P.F., PIO-RIBEIRO, G., ANDRADE, G.P., CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. 2006. *Cowpea*

aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in Passion fruit in Brazil, and causes Passion fruit woodiness disease. **Archives of Virology**, **151 (9)**: 1797-1809.

NICOLINI, C.; RABELO FILHO, F. A. C.; RESENDE, R. O.; ANDRADE, G. P.; KITAJIMA, E. W.; PIO-RIBEIRO, G.; NAGATA, T. 2012. Possible host adaptation as an evolution factor of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* deduced by coat protein gene analysis. **Journal of Phytopathology**, **160**: 82-87.

NOGUEIRA FILHO, G.C.; RONCATTO, G.; RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J.C.; MALHEIROS, E.B.; DAMIÃO FILHO, C.F. 2010. Aspectos histológicos da união da enxertia hipocotiledonar do maracujazeiro-amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **32 (2)**: 515-521.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, **59**: 368-373.

OLIVEIRA, E.J.; SOARES, T.L.; BARBOSA, C.J.; SANTOS-FILHO, H.P.; JESUS, O.N. 2013. Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de resistência em condições de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **35 (2)**: 485-492.

OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. 2005. Espécies de maracujá com potencial agrônomo. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 143-158.

PASCHOLATI, S.F. 2011. Fisiologia do parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4ª Ed. Agronômica Ceres: São Paulo, pp. 593-636.

PIO-RIBEIRO, G.; PAPPU, S.S.; PAPPU, H.R.; ANDRADE, G.P.; REDDY, D.V.R. 2000. Occurrence of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in peanut in Brazil. **Plant Disease**, **84**: 760-766.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2011. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

SAMPAIO, A.C.; SCUDELLER, N.; FUMIS, T.F.; ALMEIDA, A.M.; PINOTTI, R.N.; GARCIA, M.J.M.; PALLAMIN, M.L. 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**, **30 (2)**: 343-347.

SCATENA, V.L.; SEGECIN, S. 2005. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, **28 (3)**: 635-649.

SHEPHERD, T.; ROBERTSON, G. W.; GRIFFITHS, D. W.; BIRCH, A. N. E. 1999. Epicuticular wax ester and triacylglycerol composition in relation to aphid infestation and resistance in red raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Phytochemistry*, **52**: 1255-1267.

SIDHU, O.P.; ANNARAO, S.; PATHRE, U.; SNEHI, S.K.; RAJ, S.K.; RAJA, R.; TULI, R.; KHETRAPAL, C.L. 2010. Metabolic and histopathological alterations of *Jatropha mosaic begomovirus*-infected *Jatropha curcas* L. by HR-MAS NMR spectroscopy and magnetic resonance imaging. **Planta**, **232 (1)**: 85-93.

SILVA, L.M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V.J. 2005. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasilica**, **19 (1)**: 183-194.

SOFY, A.R.; MOUSA, A.A.; FAHMY, H.; GHAZAL, A.; EL-DOUGDOUG, KH.A. 2007. Anatomical and ultrastructural changes in citrus leaves infected with *Citrus psorosis virus* Egyptian isolate (CPsV-EG). **Journal of Applied Sciences Research**, **3 (6)**: 485-494.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. 2012. **Botânica Sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III, 3ª Ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum.

TAKIMOTO, J.K.; QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; CIA, E. 2009. Alterações anatômicas em algodoeiro infectado pelo vírus da doença azul. **Bragantia**, **68 (1)**: 109-116.

THOMPSON, K.F. 1963. Resistance to the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) in brassica plants. **Nature**, **198**: 209.

TREVISAN, F.; MENDES, B.M.J.; MACIEL, S.C.; VIEIRA, M.L.C.; MELETTI, L.M.M. 2006. Resistance to *Passion fruit woodiness virus* in transgenic Passionflower expressing the virus coat protein gene. **Plant Disease**, **90 (8)**: 1026-1030.

TROMAS, N.; ZWART, M.P.; LAFFORGUE, G.; ELENA, S.F. 2014. Within-host spatiotemporal dynamics of plant virus infection at the cellular level. **Plos Genetics**, **10 (2)**: 1-14.

TSUMUKI, H.; KANEHISA, K.; KAWADA, K. 1989. Leaf surface wax as a possible resistance factor of barley to cereal aphids. **Applied Entomology and Zoology**, **24 (3)**: 295-301.

VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; SOUZA, M.M.; MALDONADO, F.; AMARAL JÚNIOR, A.T. 2003. Diversidade em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e *Passiflora* spp. por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **25 (3)**: 489-493.

VIEIRA, L.M.; RIBEIRO, L.M.; PEREIRA, W.V.S.; MERCADANTE-SIMÕES, M.O. 2011. Avaliações anatômicas em caules de espécies de maracujazeiros utilizados como porta-enxertos na microenxertia. **Revista Unimontes Científica**, **13 (1,2)**: 57-62.

WHITE, C.; EIGENBRODE, S. D. 2000. Effects of surface wax variation in *Pisum sativum* on herbivorous and entomophagous insects in the field. **Environmental Entomology**, **29(4)**:773-780.

WILKINSON, H.P. 1979. The Plant Surface. In: METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. Oxford: Clarendon Press, v. 1. pp. 97-165.

Tabela 1. Valores médios e desvios padrão das seis variáveis anatômicas foliares de *Passiflora* spp. mensuradas, obtidas a partir de plantas sadias e infectadas pelo vírus do endurecimento do fruto do maracujazeiro.

Espécies	Características anatômicas											
	EAd		EAb		PP		PE		EL		DE (est.mm2)	
	Sadias	Infect.	Sadias	Infect.	Sadias	Infect.	Sadias	Infect.	Sadias	Infect.	Sadias	Infect.
<i>P. maliformis</i>	26,73±	21,83±	18,81±	16,78±	49,49±	52,56±	57,24±	54,93±	152,80±	145,26±	215,85±	330,03±
	4,94 ^a	2,86 ^b	2,75 ^a	1,82 ^b	9,85 ^a	10,84 ^a	7,80 ^a	7,96 ^a	13,17 ^a	14,40 ^a	21,56 ^b	51,21 ^a
<i>P. edulis</i>	24,44±	26,97±	18,41±	19,27±	45,47±	60,42±	102,18±	108,52±	180,70±	207,56±	337,45±	297,82±
	3,18 ^b	5,33 ^a	2,36 ^a	3,55 ^a	7,38 ^b	11,99 ^a	11,15 ^b	28,25 ^a	10,31 ^b	35,47 ^a	38,89 ^a	103,09 ^b
<i>P. cincinnata</i>	22,04±	19,27±	16,80±	16,28±	44,15±	45,77±	45,37±	42,38±	118,38±	115,99±	218,98±	243,86±
	2,95 ^a	3,45 ^b	2,19 ^a	3,01 ^a	5,64 ^a	13,33 ^a	9,93 ^a	13,27 ^a	18,66 ^a	31,10 ^a	37,33 ^a	32,66 ^a
<i>P. gibertii</i>	15,90±	13,21±	12,90±	12,64±	51,83±	51,14±	40,94±	47,16±	118,44±	121,23±	336,94±	346,35±
	2,87 ^a	1,59 ^b	2,61 ^a	0,91 ^a	9,89 ^a	3,53 ^a	6,12 ^b	7,10 ^a	12,41 ^a	9,10 ^a	45,87 ^a	43,53 ^a
<i>P. setacea</i>	11,63±	12,13±	8,99±	9,16±	19,11±	21,24±	25,94±	26,90±	62,89±	69,06±	283,57±	289,83±
	1,51 ^a	1,16 ^a	1,59 ^a	0,83 ^a	2,27 ^a	1,96 ^a	4,11 ^a	4,39 ^a	8,41 ^a	8,62 ^a	69,25 ^a	58,95 ^a

Médias seguidas por letras diferentes, na horizontal, indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste T de Student ($p < 0,05$; $n=30$), para cada variável, comparando plantas sadias e infectadas. EAd = espessura da epiderme adaxial; EAb = espessura da epiderme abaxial; PP = espessura do parênquima paliçádico; PE = espessura do parênquima esponjoso; EL = espessura do limbo foliar; DE = densidade estomática.

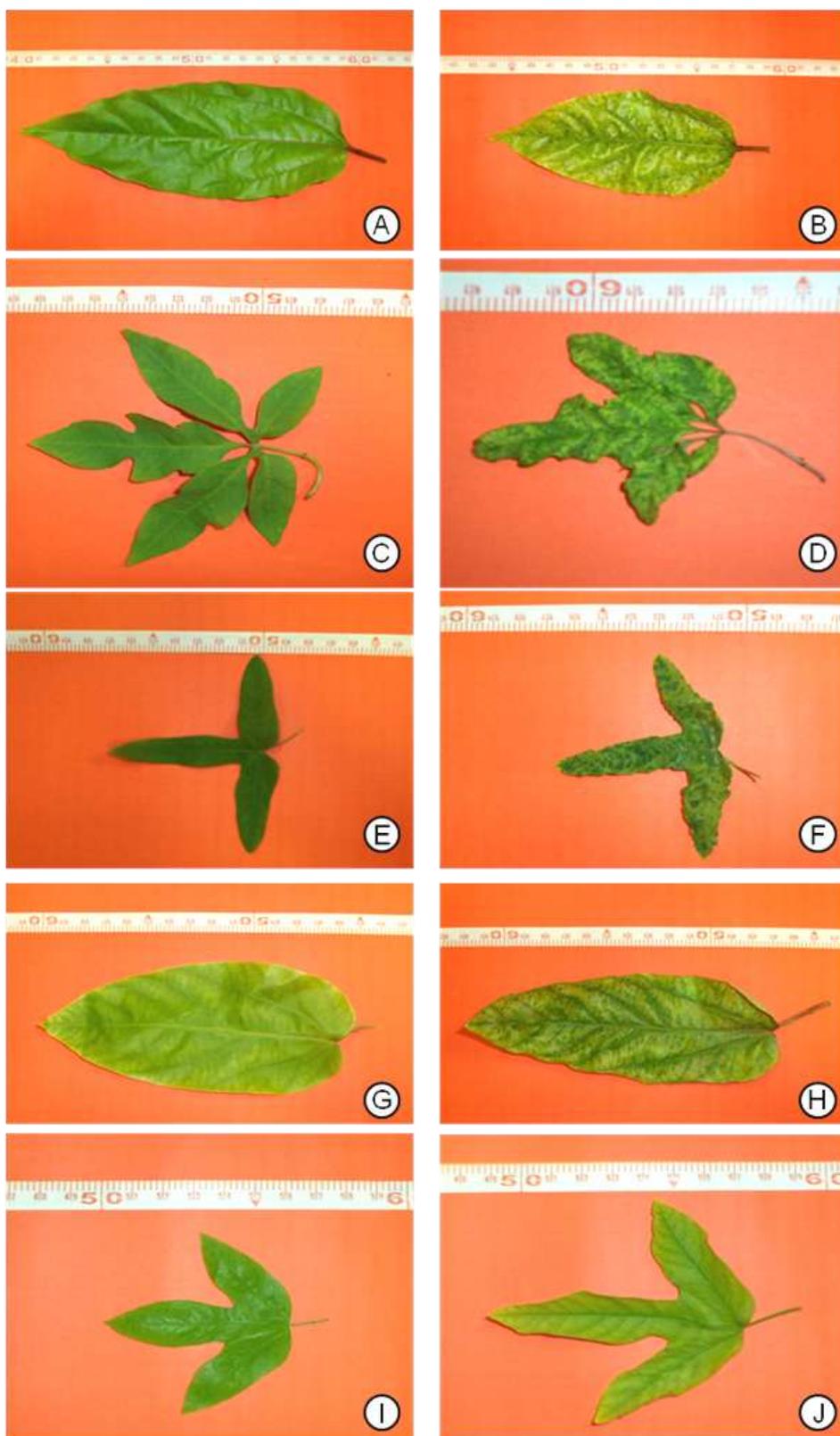


Figura 1. Folhas de *Passiflora* spp., sadias e inoculadas mecanicamente com o CABMV, respectivamente, de plantas cultivadas em casa de vegetação, utilizadas nas análises anatômicas. A-B. *P. edulis* f. *flavicarpa*. C-D. *P. cincinnata*. E-F. *P. gibertii*. G-H. *P. maliformis*. I-J. *P. setacea*.

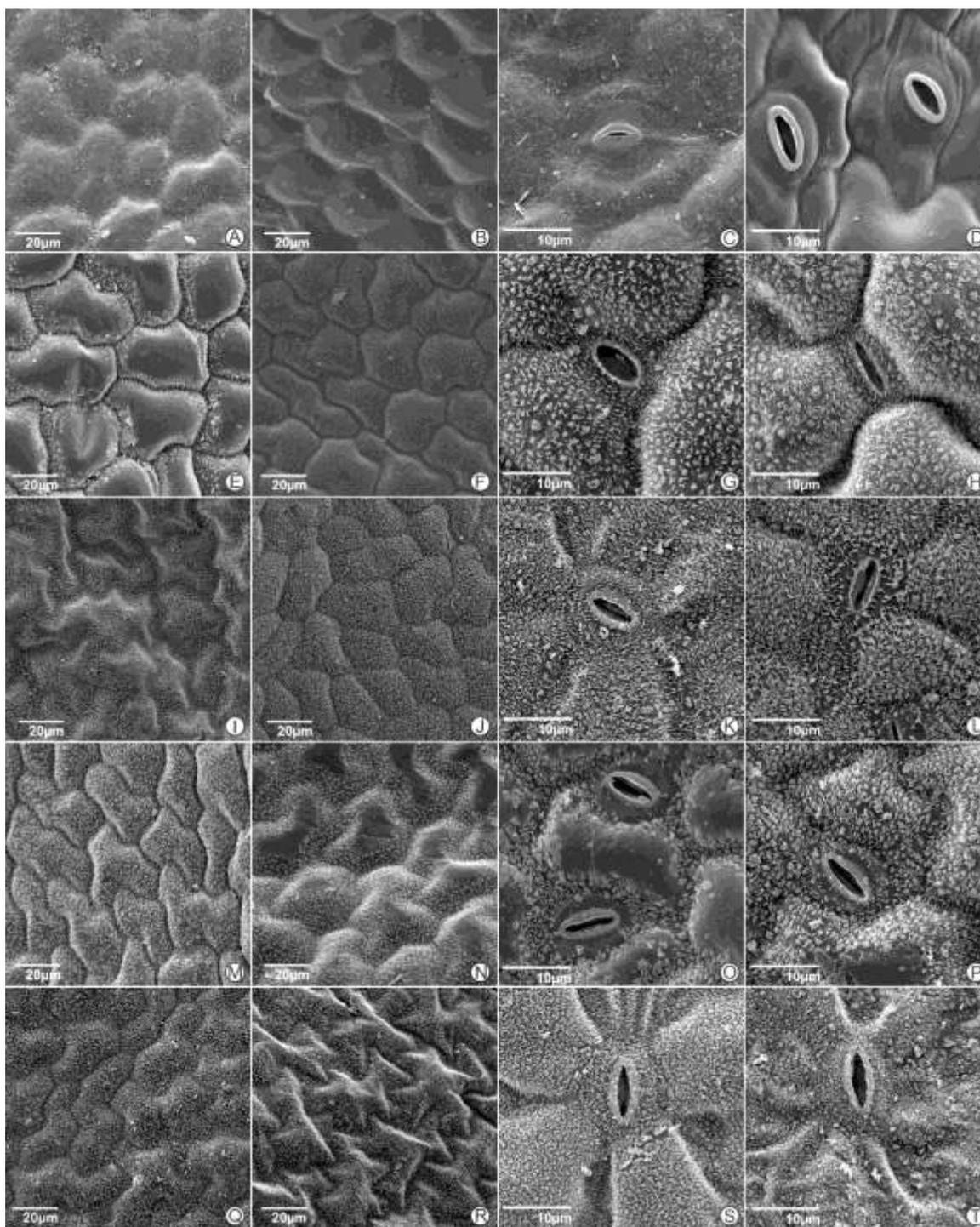


Figura 2. Superfícies das folhas das cinco espécies de *Passiflora*, sadias e infectadas pelo CABMV, em microscopia eletrônica de varredura. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. A. Adaxial de folha sadia. B. Adaxial de folha infectada. C. Abaxial de folha sadia. D. Abaxial de folha infectada. *P. cincinnata*. E. Adaxial de folha sadia. F. Adaxial de folha infectada. G. Abaxial de folha sadia. H. Abaxial de folha infectada. *P. gibertii*. I. Adaxial de folha sadia. J. Adaxial de folha infectada. K. Abaxial de folha sadia. L. Abaxial de folha infectada. *P. maliformis*. M. Adaxial de folha sadia. N. Adaxial de folha infectada. O. Abaxial de folha sadia. P. Abaxial de folha infectada. *P. setacea*. Q. Adaxial de folha sadia. R. Adaxial de folha infectada. S. Abaxial de folha sadia. T. Abaxial de folha infectada.

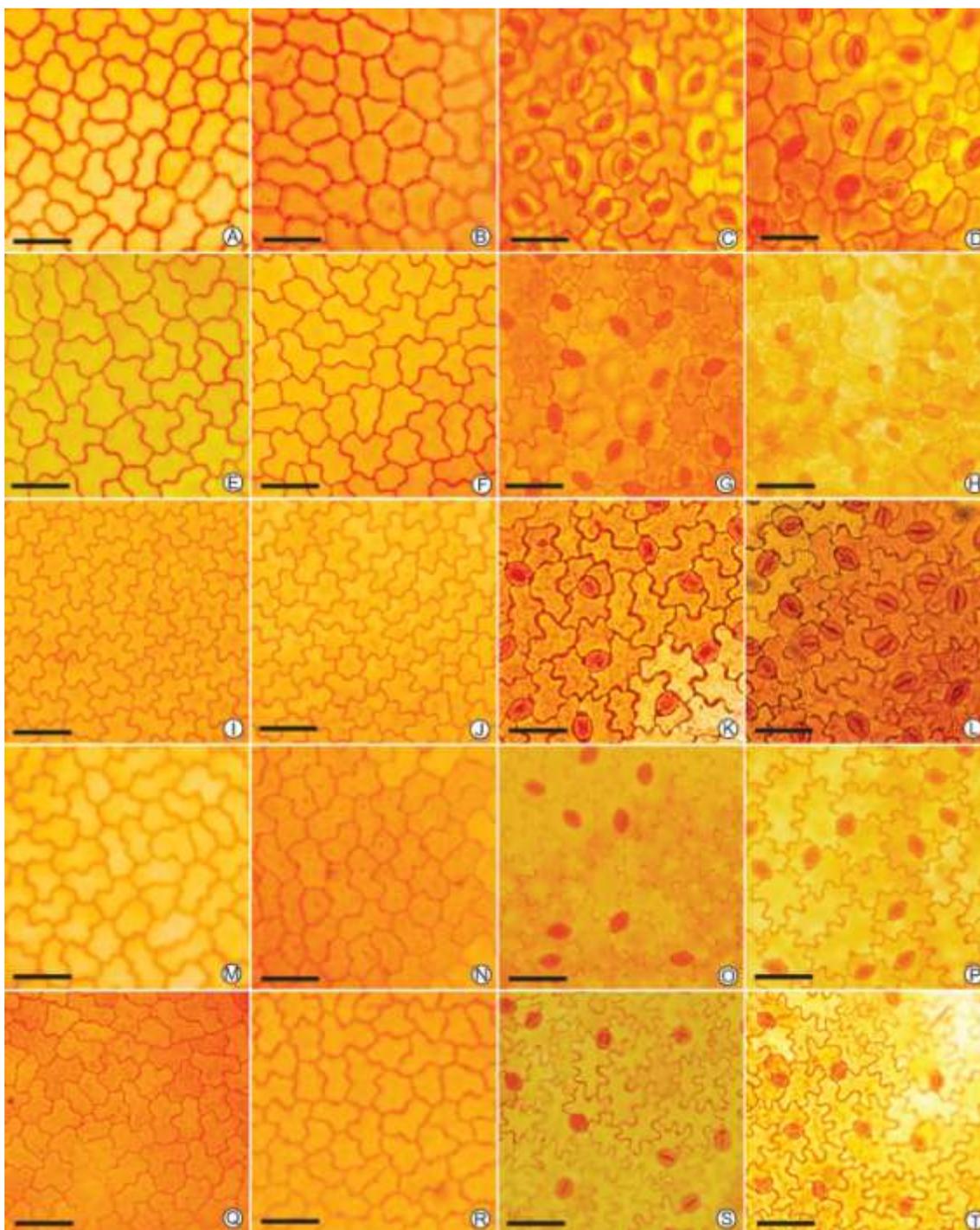


Figura 3. Seções paradérmicas das folhas das cinco espécies de *Passiflora*, saudáveis e infectadas pelo CABMV, em microscopia óptica. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. A. Adaxial de folha saudável. B. Adaxial de folha infectada. C. Abaxial de folha saudável. D. Abaxial de folha infectada. *P. cincinnata*. E. Adaxial de folha saudável. F. Adaxial de folha infectada. G. Abaxial de folha saudável. H. Abaxial de folha infectada. *P. gibertii*. I. Adaxial de folha saudável. J. Adaxial de folha infectada. K. Abaxial de folha saudável. L. Abaxial de folha infectada. *P. maliformis*. M. Adaxial de folha saudável. N. Adaxial de folha infectada. O. Abaxial de folha saudável. P. Abaxial de folha infectada. *P. setacea*. Q. Adaxial de folha saudável. R. Adaxial de folha infectada. S. Abaxial de folha saudável. T. Abaxial de folha infectada. Barra: 50µm.

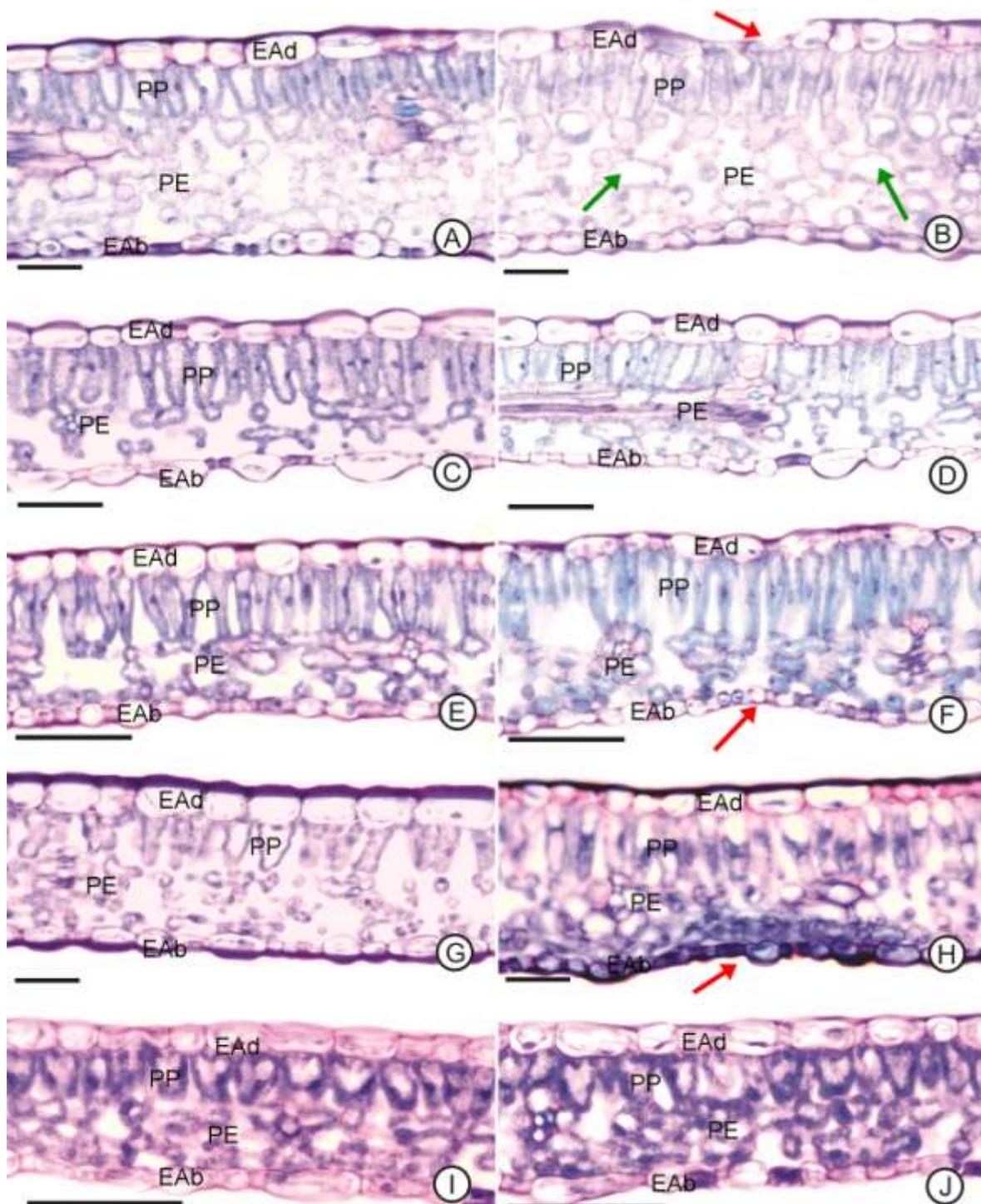


Figura 4. Seções transversais das folhas das cinco espécies de *Passiflora*, saudáveis e infectadas pelo CABMV, em microscopia óptica. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. A. Folha saudável. B. Folha infectada. *P. cincinnata*. C. Folha saudável. D. Folha infectada. *P. gibertii*. E. Folha saudável. F. Folha infectada. *P. maliformis*. G. Folha saudável. H. Folha infectada. *P. setacea*. I. Folha saudável. J. Folha infectada. Barra: 100µm. EAd: epiderme adaxial; EAb: epiderme abaxial; PE: parênquima esponjoso; PP: parênquima paliçádico. Setas indicam alterações nas plantas infectadas: vermelhas = depressões no limbo; verdes = hipertrofia de células parenquimáticas.

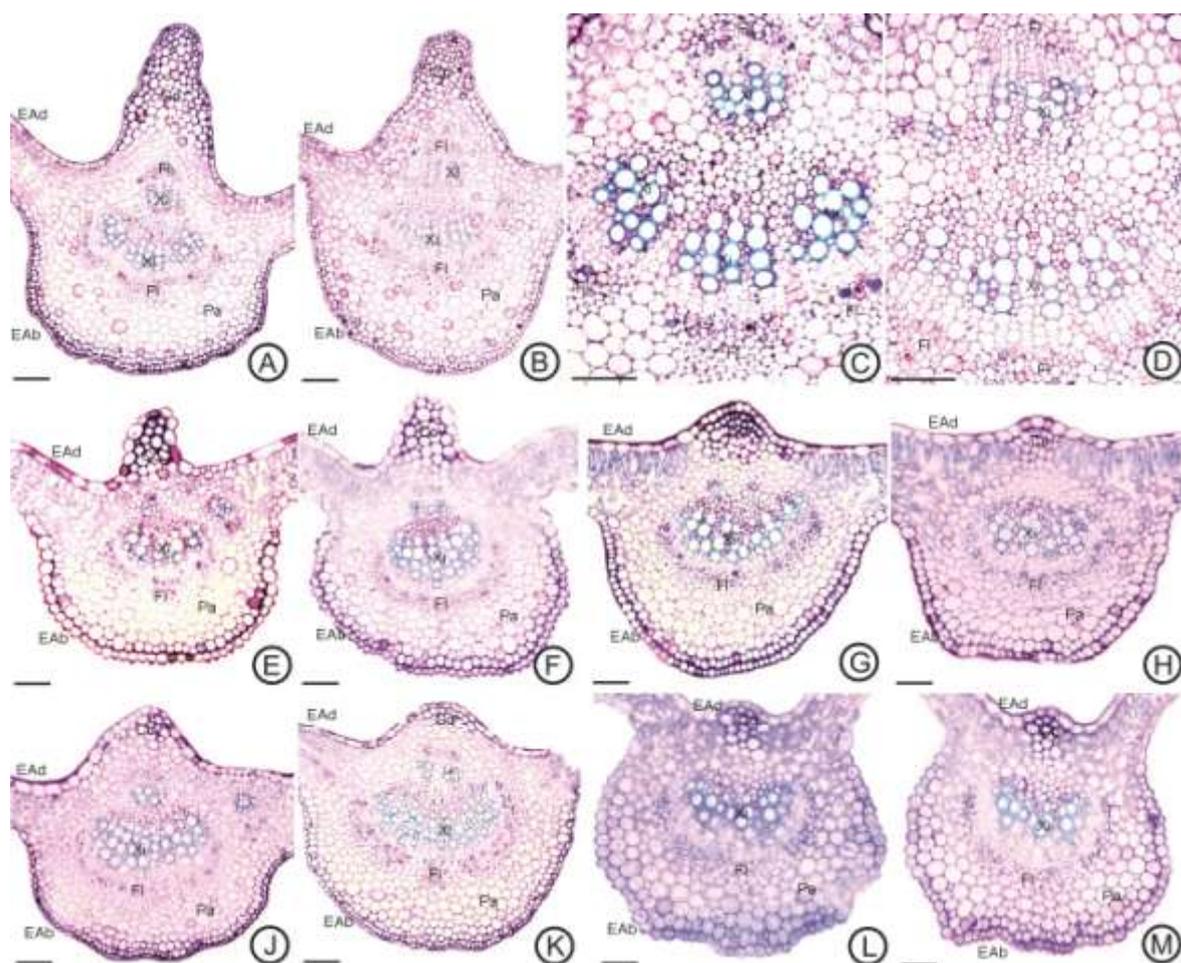


Figura 5. Seções transversais das folhas das cinco espécies de *Passiflora*, sadias e infectadas pelo CABMV, região da nervura central, em microscopia óptica. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. A. Folha sadia. B. Folha infectada. C. Detalhe dos feixes vasculares de folha sadia. D. Detalhe dos feixes vasculares de folha infectada. *P. cincinnata*. E. Folha sadia. F. Folha infectada. *P. gibertii*. G. Folha sadia. H. Folha infectada. *P. maliformis*. J. Folha sadia. K. Folha infectada. *P. setacea*. L. Folha sadia. M. Folha infectada. Barra: 100µm. Co: colênquima; EAb: epiderme abaxial; EAd: epiderme adaxial; Fi: floema; Pa: parênquima; Xi: xilema.

CAPÍTULO II

DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Passiflora setacea* DC. DO ESTADO DA BAHIA UTILIZANDO MARCADORES SSR

RESUMO

Diversidade genética de populações de *Passiflora setacea* DC. do estado da Bahia utilizando marcadores SSR - *Passiflora setacea* DC. é uma espécie nativa e endêmica do Brasil com ampla distribuição no estado da Bahia. Por apresentar resistência ao *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV), causador do endurecimento do fruto, e a outros fitopatógenos, a espécie tem sido apontada como potencial para o melhoramento genético do maracujazeiro. O objetivo deste estudo foi analisar a diversidade genética de populações de *P. setacea* do estado da Bahia utilizando marcadores SSR. Foram coletadas populações de 18 municípios, totalizando 147 indivíduos analisados para seis loci de SSR. As populações apresentaram índices de polimorfismo genético médio moderado. A análise bayesiana de estruturação genética revelou a existência de dois grupos genéticos. Por meio da AMOVA observou-se grande diversidade entre as populações (45%), apesar do maior percentual de variância detectado dentro das populações (55%). O G_{st} médio foi de 0,221 indicando um alto nível de estruturação genética entre as populações. Não houve correlação significativa entre as distâncias genéticas e geográficas. A ausência de padrão de distribuição geográfico pode estar relacionada à redução do fluxo gênico entre as populações e aos efeitos da deriva, ocasionada possivelmente ao efeito fundador em algumas populações de *P. setacea* e pela fragmentação de habitats devido a ação antrópica. As populações com maior diversidade são as dos municípios de Licínio de Almeida e Caetité.

Palavras-chave: maracujá-do-sono, microsatélites, variabilidade, estrutura genética.

ABSTRACT

Genetic diversity of *Passiflora setacea* DC populations from Bahia state using SSR markers - *Passiflora setacea* DC. is a native and endemic species in Brazil with broad distribution in the state of Bahia. To present resistance to the *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV), that causes the passion fruit woodiness disease, and other plant pathogens, the species has been identified as a potential for genetic improvement of passion. The goal of this study was to analyze the genetic diversity of *P. setacea* populations of Bahia using SSR markers. 18 municipalities populations were collected, totaling 147 individuals analyzed for six SSR loci. Populations had rates of moderate average genetic polymorphism. The Bayesian analysis of genetic structure considered most likely the existence of two genetic groups. Through the AMOVA there was great diversity among populations (45%), despite the higher percentage of variance detected within populations (55%). The average G_{st} was 0.221 indicating a high level of genetic structure among populations. The Mantel test showed that there was no correlation between genetic and geographic distances. The absence of geographic distribution pattern may be related to factors that low gene flow between populations, the founder effect in some populations of *P. setacea*, the fragmentation of habitats caused by human action. Populations with greater diversity are located in the municipalities of Licinio de Almeida and Caetité.

Keywords: 'somnus' passion fruit, microsatellites, variability, genetic structure.

1 INTRODUÇÃO

Passiflora L. (Passifloraceae, Malpighiales) (APG III, 2009), constitui um gênero de ampla diversidade e distribuição geográfica no Brasil, com 142 espécies aceitas, das quais 83 são endêmicas, estando presente em quase todos os domínios fitogeográficos do país (BERNACCI et al., 2016).

Sua importância econômica deve-se ao consumo do maracujá, especialmente de *Passiflora edulis* Sims (maracujazeiro-azedo e maracujazeiro-roxo) e *P. alata* Curtis (maracujazeiro-doce). Das fruteiras com grande potencial de cultivo no Brasil, o maracujazeiro tem apresentado acentuada expansão, proporcionando grande popularização no mercado interno, nos diferentes segmentos de consumo (ATAÍDE et al., 2012).

Entretanto, diversos problemas fitossanitários têm afetado o cultivo comercial do maracujá, incluindo a bacteriose, a murcha de *Fusarium*, a antracnose, e o endurecimento dos frutos (JUNQUEIRA et al., 2005; ATAÍDE et al., 2012), sendo este último – causado no Brasil principalmente pelo *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) e pelo *Passion fruit woodiness virus* (PWV) – o responsável pelas perdas de maior impacto econômico (NASCIMENTO et al., 2006; LEÃO et al., 2006; PINTO et al., 2008). Contudo, estudos recentes têm demonstrado que espécies silvestres do gênero possuem diferentes níveis de resistência a estas doenças (Capítulo 1).

A espécie silvestre *P. setacea* DC. (Figura 1) é apontada por vários autores como uma das mais resistentes a doenças e pragas, como a morte precoce, a virose do endurecimento do fruto, a fusariose e a antracnose (FISCHER et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2005; OLIVEIRA e RUGGIEIRO, 2005; SANTOS et al., 2005; BRAGA et al., 2006; Capítulo 1). É, portanto, uma excelente fonte de resistência genética a fitopatógenos que acometem a cultura do maracujazeiro (CERQUEIRA-SILVA, 2012). Assim, cruzamentos entre *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. setacea* constituem uma excelente estratégia para a obtenção de híbridos promissores para o melhoramento genético (CERQUEIRA-SILVA, 2012; SANTOS, 2013), tendo sido realizadas com sucesso (JUNQUEIRA et al., 2005).

A transferência de resistência de *P. setacea* para *P. edulis* foi apontada como promissora, embora devam ser feitos estudos para contornar a esterilidade

dos machos híbridos e as dificuldades das metodologias de avaliação da resistência genética (FALEIRO et al., 2005).



Figura 1. *Passiflora setacea* DC. A. Planta com frutos. B. Flor. C. Visão geral da planta. D-E. Ramos com botões florais. Fotos: Naira C. S. Barbosa.

Embora produção do maracujá-do-sono ou maracujá-sururuca, como é conhecida *P. setacea* (BERNACCI et al., 2016), ainda seja limitada (CERQUEIRA-SILVA, 2012), a espécie apresenta grande potencial para a incorporação no mercado consumidor, devido às suas propriedades medicinais, seu sabor exótico, e também para a produção de doces e sorvetes (ATAÍDE et al., 2012).

P. setacea é uma espécie nativa e endêmica do Brasil, presente nas regiões Nordeste (Alagoas, Bahia), Centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso) e Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro), nos domínios fitogeográficos da Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (BERNACCI et al., 2016). Por ter uma distribuição ampla, em comparação com espécies do gênero de distribuição mais restrita e mais suscetíveis à extinção, *P. setacea* é uma das espécies de *Passiflora* que tende a preservar a história evolutiva do grupo

(SCHERER, 2014). Segundo Nunes (2002), sua distribuição no estado da Bahia é predominante nas regiões do Centro-Sul e Chapada Diamantina.

A caracterização da diversidade genética de populações nativas de *P. setacea* pode contribuir tanto para o desenvolvimento de estratégias de conservação da espécie quanto para subsidiar programas de melhoramento do maracujá, visto que muitas estimativas de diversidade em *Passiflora* derivam de acessos mantidos em bancos de germoplasma (CERQUEIRA-SILVA et al., 2016). Neste contexto, os marcadores moleculares destacam-se como uma ferramenta importante na caracterização dos recursos genéticos, sendo utilizados no melhoramento vegetal e em atividades relacionadas à conservação (DUDLEY, 1993; HENRY, 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

Tendo em vista a importância da caracterização genética das espécies silvestres de maracujazeiro para a sua conservação e para o melhoramento genético do gênero, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade genética de populações nativas de *P. setacea* do estado da Bahia por meio de marcadores SSR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material

Para a determinação dos locais de coleta de *P. setacea* foi realizada uma busca no banco de dados *SpeciesLink* (<http://splink.cria.org.br>) em 11 de agosto de 2014.

Foram realizadas duas expedições de coleta, uma na região do Centro-Sul Baiano, compreendendo os municípios de Amargosa, Jequié, Poções, Vitória da Conquista, Caetité e Contendas do Sincorá, e outra na região da Chapada Diamantina, incluindo os municípios de Jacobina, Morro do Chapéu, Bonito, Utinga, Lençóis, Palmeiras, Seabra, Abaíra, Rio de Contas, Ibicoara e Andaraí, e também uma coleta em Licínio de Almeida, totalizando 147 amostras (Tabela 1, Figura 2).

Um espécime coletado em Licínio de Almeida foi depositado no Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB), do Instituto de Biologia da Universidade Federal da

Bahia, com a numeração ALCB 116823. Folhas jovens de cada indivíduo foram coletadas e armazenadas em sílica gel até a extração do DNA.

Tabela 1. Caracterização das populações de *P. setacea* analisadas no estudo: siglas, município, número de indivíduos por população (N) e coordenadas geográficas.

Sigla	Município	N	Coordenadas geográficas
LIC	Licínio de Almeida	10	S14°34'59.9" W42°31'35.0"
AMA	Amargosa	10	S12°39'28.0" W39°07'25.2"
JEQ	Jequié	10	S13°15'50.7" W39°57'10.6"
POC	Poções	10	S14°30'12.7" W40°21'23.3"
VIT	Vitória da Conquista	10	S14°38'45.8" W40°27'21.3"
CAE	Caetité	9	S14°05'19.2" W42°34'12.5"
CON	Contendas do Sincorá	10	S13°31'36.2" W40°34'09.5"
JAC	Jacobina	10	S11°06'54.5" W40°37'51.1"
MOR	Morro do Chapéu	10	S11°32'15.3" W40°54'48.1"
BON	Bonito	5	S11°58'40.2" W41°24'01.2"
UTI	Utinga	5	S12°04'57.2" W41°08'32.2"
LEN	Lençóis	5	S12°26'55.0" W41°21'03.9"
PAL	Palmeiras	5	S12°25'07.3" W41°30'17.3"
SEA	Seabra	5	S12°26'36.9" W41°49'51.1"
ABA	Abaíra	8	S13°15'10.9" W41°42'09.6"
RIO	Rio de Contas	6	S13°33'10.7" W41°50'51.3"
IBI	Ibicoara	9	S13°25'27.1" W41°16'28.4"
AND	Andaraí	10	S12°54'13.2" W41°13'53.4"
TOTAL		147	

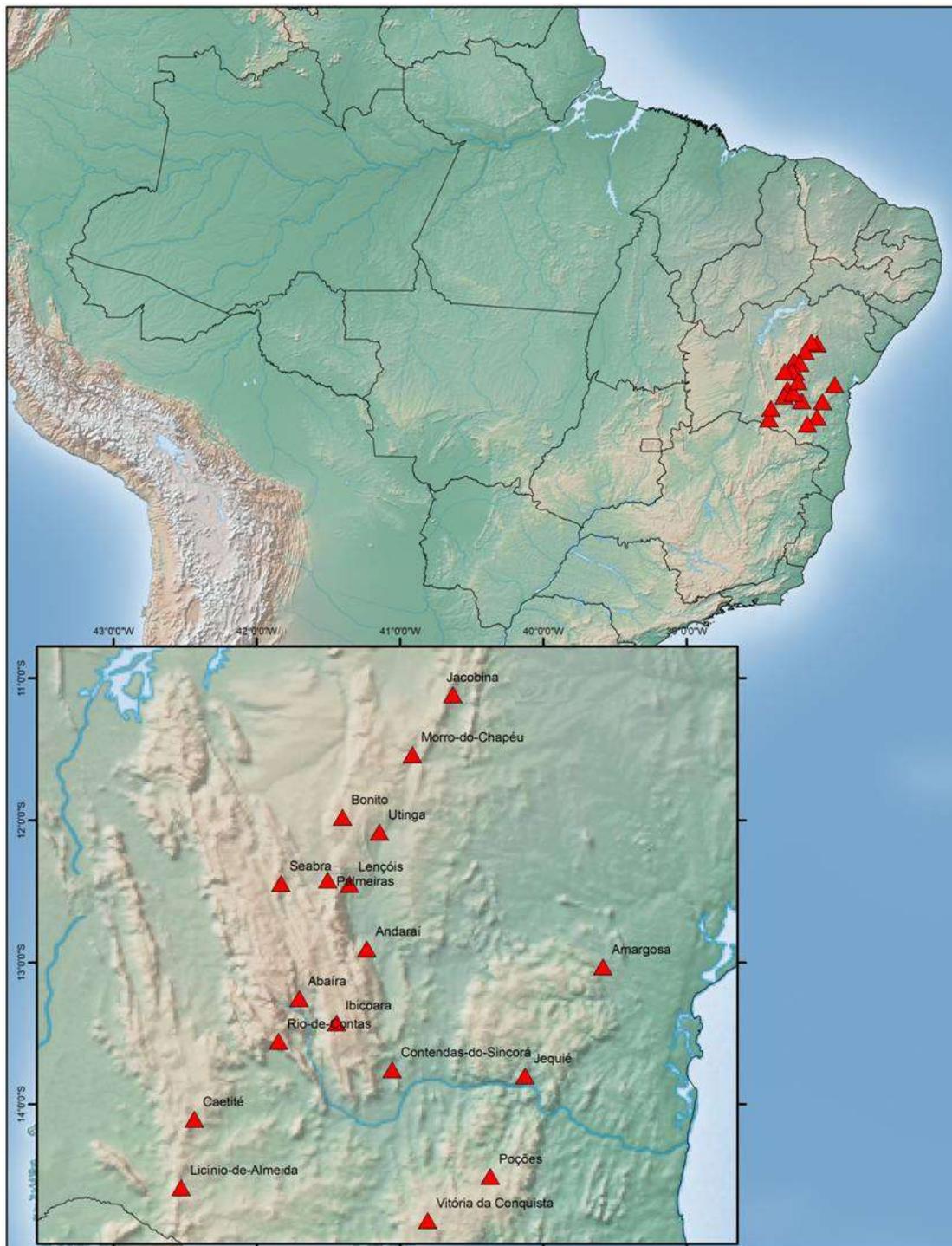


Figura 2. Localização das populações de *Passiflora setacea* coletadas no estado da Bahia.
Autor: Cécil P. Fazolato.

2.2 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1987) adaptado para microtubos. Em seguida, foi realizada a purificação do DNA extraído com protocolo adaptado por Patrocínio (2015, comunicação pessoal) descrito a seguir. Depois da ressuspensão do DNA com tampão TE, adicionou-se 200 μ L de acetato de amônio a 7,5 M. As amostras foram incubadas no gelo por 15 minutos e posteriormente centrifugadas por 15 minutos a 8000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos de 1,5 mL e adicionou-se 800 μ L de etanol absoluto.

As amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 14000 rpm. Posteriormente, foi feita uma lavagem com etanol 70%. O pellet foi ressuspendido em 100 μ L tampão TE e 2 μ L de ribonuclease A e incubado a 37°C por uma hora. O DNA ressuspendido foi armazenado a -20°C. A qualidade e a quantidade do DNA extraído foram avaliadas através de gel de agarose 1% e em espectrofotômetro L-Quant (Loccus Biotecnologia).

2.3 Amplificação do DNA por marcadores SSR

Foram testados 55 *primers*, dos quais seis foram utilizados para análise (Tabela 2) e os demais (Anexo I) não foram utilizados devido ao padrão monomórfico ou à não amplificação satisfatória da região SSR.

Foram realizados testes para a otimização das condições de reação para cada par de primers, incluindo a concentração dos componentes do mix, a temperatura de anelamento dos primers (Tabela 2 e ANEXO I) e o número de ciclos (Tabela 3). As amplificações foram realizadas em um volume final de 15 μ L; para a concentração dos componentes ver Tabela 3. O programa constituiu em uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos e 30-35 ciclos (Tabela 3) de 94°C por 45 segundos, 52-65°C (Tabela 2 e ANEXO I) por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final de 6 minutos a 72°C.

Tabela 2. Identificação dos loci de microssatélites utilizados, sequência dos *primers*, tamanho (em pares de bases), motivo, temperatura de anelamento utilizada (TA) e referência.

Locus	Sequência dos primers	Tamanho (pb)	Motivo	TA	Referência
PE08	F: CCGGATACCCACGCATTA R: TCTAATGAGCGGAGGAAAGC	282	(GTTGTG) ₄	56°C	Oliveira (2006)
PE09	F: GGAAATCCGAAAACCTGGTTG R: GGGCCTTTATCCATGTTTGA	268	(AT) ₅ (AC) ₈	58°C	Oliveira (2006)
PE90	F: TCAGGAAGATTGCATGTTAGT R: CTGGGTTTTGTTTATGTTGC	245	(AGC) ₅	60°C	Oliveira (2006)
mPe-UNICAMP02	F: TCGAGTGAGATTGGCAGTG R: TTGGCTTCGAGGAGAAGAA	165–171	(GT) ₈	58°C	Cerqueira-Silva et al. (2014a)
mPs-UNICAMP05	F: TCGGTCTTCGTATTCAACTCTG R: GAGGAACTGGCATCGCAT	194–218	(CT) ₈	61°C	Cerqueira-Silva et al. (2014a)
mPs-UNICAMP09	F: GGGCCGTTGTCAAAGTAGT R: GAGGTAAAGGCAAGCACTG	250–268	(AC) ₄	61°C	Cerqueira-Silva et al. (2014a)

Tabela 3. Loci de microssatélites analisados e a respectiva concentração dos componentes do mix de amplificação: MgCl₂, *primers*, dNTPs, DNA, Taq Polimerase (U), e o número de ciclos utilizados.

Locus	dNTP (mM)	Tris/KCl (X)	MgCl ₂ (mM)	Taq (U)	Primer (µM)	DNA (ng)	Ciclos
PE08	0,15	1	1,5	1,0	0,3	9	35
PE09	0,2	1	1,5	1,0	0,2	12	35
PE90	0,2	1	2,5	1,0	0,2	12	30
mPe-UNICAMP02	0,2	1	1,5	1,0	0,3	12	35
mPs-UNICAMP05	0,15	1	1,5	1,0	0,3	9	35
mPs-UNICAMP09	0,15	1	1,5	1,0	0,3	9	35

A visualização dos produtos de PCR foi feita em gel de agarose 3%, em tampão TBE 1X (para checagem do padrão de polimorfismo) e após em gel de poliacrilamida 6% a 1600V e 60W, por duas horas, em tampão TBE 1X, para análise. Os fragmentos amplificados foram corados com nitrato de prata (CRESTE et al., 2001).

2.4 Análise dos dados

O perfil genético de todos os indivíduos foi convertido em uma matriz de alelos para marcadores SSR, através de leitura manual, na qual cada forma alélica, em cada locus avaliado, foi codificada como um número.

Através do programa GenAIEx 6.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2012), foi estimada a variabilidade genética dentro e entre as populações a partir dos parâmetros: número de *loci* (N), número de alelos exclusivos (NE), frequência de *loci* polimórficos (P) e heterozigidade média esperada (He), distância genética de Nei e identidade genética de Nei. Também foram calculados os índices de diversidade de Shannon (I), através da fórmula: $-1 \cdot \sum (\pi_i \cdot \ln(\pi_i))$, em que π_i é a frequência de cada alelo para a população, e o índice de fixação (F), através da

fórmula: $(H_e - H_o)/H_e = 1 - (H_o/H_e)$. A estimativa da estruturação genética (F_{st}), e o fluxo gênico estimado a partir do $Nm = [(1 / F_{st}) - 1] / 4$ foram calculados a partir das frequências alélicas, também através do GenAIEx 6.5.

Para observar a ordenação dos dados, foi realizada a análise de Coordenadas Principais (PCoA) a partir das distâncias genotípicas com o mesmo programa. A análise Molecular de Variância (AMOVA) foi baseada na matriz obtida a partir da distância genética de Nei no programa GenAIEx 6.5.

A análise de agrupamento utilizando distância genética de Nei entre as populações e algoritmo Ward foi produzida através do *software* Past (HAMMER et al., 2001).

A estimativa da distância geográfica (em quilômetros) entre as populações foi calculada com base nas coordenadas GPS, através do site do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE, 2016). Através do teste de Mantel (realizado no programa Past), testou-se a correlação entre as matrizes de distância genética não enviesada de Nei e de distância geográfica entre as populações de cada município.

Para analisar a estrutura da população utilizando uma abordagem bayesiana foi utilizado o *software* Structure 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000). Considerou-se K entre 1 e 5, sendo realizadas 10 corridas para cada valor de K, com 500.000 repetições em Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) e período de *burnin* de 100.000. Os resultados foram analisados pelo site Structure Harvester (EARL e HOLDT, 2012) para a obtenção do valor de Δk (EVANNO et al., 2005), para a estimativa do número de grupos. Também foi realizada a análise da estrutura da população pelo programa Structurama (HUELSENBECK et al., 2011), com 500.000 repetições em MCMC.

Para análise da diversidade haplotípica foi construída uma rede de haplótipos com o programa Network 5.0.0.0 (FORSTER et al., 2016), utilizando o método de Median-Joining (MJ), que produz *minimum spanning trees* e introduz vetores médios que podem ser interpretados como haplótipos extintos ou não amostrados (BANDELT et al.; 1999), e pós-processamento utilizando a máxima parcimônia (MP) para eliminar os vetores médios em excesso (POLZIN et al.; 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Variabilidade genética intrapopulacional e específica

Dos 55 loci de SSR testados, 32 foram monomórficos, 17 não foram satisfatoriamente amplificados, e seis foram selecionados para análise por apresentar padrão polimórfico (Tabela 2 e Anexo I). Este baixo número de loci polimórficos de SSR já foi observado em outras espécies do gênero *Passiflora*, a exemplo de *P. cincinnata* Mast. No estudo de variabilidade desta espécie foram testados 25 primers, desenvolvidos para a própria espécie, dos quais apenas sete foram polimórficos (CERQUEIRA-SILVA et al., 2012). Os autores afirmaram que o baixo número de loci de SSR polimórficos parece ser uma característica do gênero *Passiflora* (CERQUEIRA-SILVA et al., 2012).

O número de alelos por loci variou de dois (primers PE08 e mPe-UNICAMP02) a cinco (primer mPs-UNICAMP09 e PE90; Figura 3). Valores semelhantes foram encontrados em outros estudos de diversidade genética no gênero *Passiflora* com marcadores SSR (PÁDUA et al., 2005; CERQUEIRA-SILVA et al., 2012; PAIVA, 2013; CERQUEIRA-SILVA et al., 2014a).

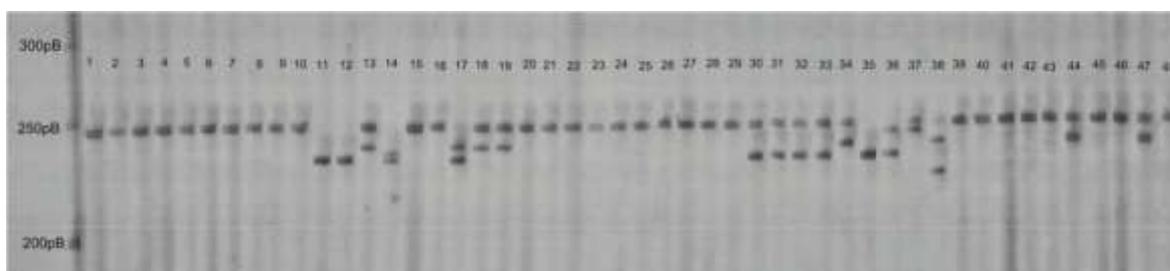


Figura 3. Géis de poliacrilamida 6% mostrando produtos da amplificação das amostras de *Passiflora setacea*. Amostras amplificadas com o *primer* PE 90. Marcador de peso molecular de 50 pares de bases. Aplicações 1 a 10: amostras de Contendas do Sincorá, 11 a 19: amostras de Caetité, 20 a 29: amostras de Jacobina, 30 a 38: amostras de Ibicoara, 39 a 48: amostras de Morro do Chapéu.

No estudo de populações de *P. alata* de São Paulo e Minas Gerais também foram analisados seis loci polimórficos, com variação de dois a sete alelos em cada um (PÁDUA et al., 2005). Paiva (2013) observou uma variação de dois a cinco alelos por locus ao avaliar acessos de bancos de germoplasma de dez espécies de *Passiflora*, dentre as quais *P. setacea*, utilizando 12 marcadores SSR polimórficos, de um total de 28 testados. A autora sugeriu que os loci analisados poderiam estar em regiões bem conservadas, com pequena taxa de mutação,

para explicar o baixo número de alelos por locus observado. Diversos genótipos de *P. edulis*, *P. cincinnata* e *P. setacea* foram avaliados com 31 primers polimórficos, onde o número de número de alelos por loci variou de dois a seis (CERQUEIRA SILVA et al., 2014a).

A espécie apresentou elevado índice de diversidade de Shannon ($I = 0,493$; Tabela 4), também detectado em estudo prévio com marcadores ISSR e RGA ($I = 0,51$ e $I = 0,34$, respectivamente; PEREIRA et al., 2015a) revelando a ocorrência de grande diversidade genética em *P. setacea*.

Tabela 4. Valores médios dos parâmetros de diversidade genética para cada população de *Passiflora setacea* considerando todos os loci de SRR analisados: Número médio de alelos (Na), Número de alelos efetivos (Ne), Percentual de loci polimórficos (P), Heterozigosidade observada (Ho), Heterozigosidade esperada (He), Índice de diversidade de Shannon (I) e Índice de Fixação. LIC = Licínio de Almeida, AMA = Amargosa, JEQ = Jequié, POC = Poções, VIT = Vitória da Conquista, CAE = Caetité, CON = Contendas do Sincorá, JAC = Jacobina, MOR = Morro do Chapéu, BON = Bonito, UTI = Utinga, LEN = Lençóis, PAL = Palmeiras, SEA = Seabra, ABA = Abaíra, RIO = Rio de Contas, IBI = Ibicoara, AND = Andaraí.

Pop	Na	Ne	P	Ho	He	I	F
LIC	2,333	1,933	100,00%	0,600	0,451	0,699	-0,282
AMA	1,833	1,534	50,00%	0,317	0,224	0,368	-0,118
POC	2,500	1,919	83,33%	0,500	0,427	0,694	-0,160
JEQ	2,000	1,703	66,67%	0,400	0,301	0,481	-0,305
VIT	1,500	1,487	50,00%	0,467	0,247	0,343	-0,889
CON	1,667	1,475	50,00%	0,367	0,217	0,341	-0,575
CAE	2,667	1,858	100,00%	0,352	0,385	0,670	0,269
JAC	1,667	1,412	50,00%	0,300	0,193	0,307	-0,415
IBI	2,500	2,071	66,67%	0,519	0,399	0,678	-0,290
MOR	1,833	1,598	50,00%	0,333	0,230	0,383	-0,402
BON	1,667	1,516	50,00%	0,433	0,253	0,377	-0,716
UTI	2,000	1,457	66,67%	0,333	0,237	0,402	-0,317
LEN	1,500	1,397	33,33%	0,333	0,180	0,273	-0,862
PAL	2,167	1,838	83,33%	0,367	0,407	0,621	0,070
SEA	2,333	1,737	83,33%	0,500	0,367	0,610	-0,334
ABA	2,333	1,832	66,67%	0,381	0,329	0,568	-0,162
RIO	2,000	1,717	66,67%	0,500	0,331	0,519	-0,497
AND	2,167	1,734	83,33%	0,350	0,335	0,537	0,058
MÉDIA	2,037	1,679	66,67%	0,408	0,306	0,493	-0,268

As populações de *P. setacea* avaliadas apresentaram heterozigosidade média observada (Ho) média de 0,408 e heterozigosidade esperada média (He)

de 0,306 (Tabela 4). Em outros estudos de diversidade de *P. setacea*, com acessos mantidos em bancos de germoplasma, utilizando marcadores SSR, foram encontrados valores médios de $H_o = 0,25$ e $H_e = 0,36$ (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014a), e $H_o = 0,34$ e $H_e = 0,41$ (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014b), indicando moderada a alta variabilidade.

Os valores de H_o foram superiores aos de H_e na maior parte das populações analisadas, exceto para as populações de Caetité e Palmeiras, indicando um excesso de heterozigotos. Este excesso de heterozigotos indica que estas populações não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, revelando a presença de fatores evolutivos atuando sobre as mesmas, como a recombinação genética resultante de fecundação cruzada. O índice de fixação (F) foi negativo para quase todas as populações e o valor médio foi de $-0,268$. No estudo de 42 acessos de *P. setacea* do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura e UESB, com marcadores SSR (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014b), foram observados valores de F mais elevados ($0,28$). Tal diferença pode ser atribuída ao fato de as amostras analisadas no presente estudo serem provenientes de populações naturais, e as amostras do estudo citado serem provenientes de acessos de bancos de germoplasma.

Estudos utilizando marcadores SSR em outras espécies de *Passiflora* têm relatado altos índices de heterozigosidade – *P. alata* ($H_o=0,37$; $H_e=0,52$; PÁDUA et al., 2005), *P. cincinnata* ($H_o=0,52$; $H_e=0,52$; CERQUEIRA-SILVA et al., 2012), *P. edulis* ($H_o=0,52$; $H_e=0,54$; OLIVEIRA et al., 2005), *Passiflora* spp. ($H_o=0,52$; $H_e=0,57$; PAIVA, 2013) – demonstrando que esta é uma característica do gênero.

Os altos índices de heterozigosidade em *P. setacea* podem estar relacionados à ocorrência de mecanismos de auto-incompatibilidade (PEREIRA et al., 2015a). Estudos visando identificar mecanismos de autoincompatibilidade em maracujazeiros, utilizando *P. edulis* Sims., sugeriram que a autoincompatibilidade que ocorre na espécie é homomórfica esporofítica (BRUCKNER et al., 2005), devido ao fato de o ser estigma seco e a superfície estigmática ser o sítio de reconhecimento do pólen, não havendo modificações florais relacionadas (HO e SHIL, et al., 1986). A rejeição de um grão de pólen incompatível é caracterizada por mudanças estruturais drásticas, tanto no pólen e como no tubo polínico (MADUREIRA et al., 2014). Apesar de o tipo de autoincompatibilidade *P. setacea* ainda não ter sido esclarecido, é possível que seja semelhante ao de *P. edulis*.

As populações de Licínio de Almeida e Caetité apresentaram os valores mais altos de diversidade ($P = 100\%$, $I = 0,699$; $P = 100\%$, $I = 0,67$, respectivamente; Tabela 4), enquanto a população de Lençóis ($P = 33,33\%$, $I = 0,273$) foi a única que apresentou baixos índices de polimorfismo. As demais populações apresentaram níveis de variabilidade que variaram de alto (83,3%) a moderados (50%). O índice médio de polimorfismo entre as populações de *P. setacea* foi 66,67%, considerado moderado.

Estes valores foram mais altos que os detectados para outras populações de *P. setacea* da Bahia analisadas com os marcadores ISSR (*Região entre sequencias simples repetidas*; ZIETKIEWICZ et al., 1994) e RGA (*Análogos de Genes de Resistência*; para marcadores RGA em *Passiflora* ver PAULA et al., 2010), onde os índices de polimorfismo médio foram 59% e 55%, respectivamente, variando entre 46% (37% para marcadores RGA) e 73% entre as populações (PEREIRA et al., 2015a). Marcadores codominantes, como os SSR, têm maior poder de detecção da diversidade genética devido a sua natureza multialélica e alta reprodutibilidade, em relação aos marcadores dominantes (POWELL et al., 1996). Os marcadores RGA, apesar de codominantes e bastante úteis em estudos da estrutura e diversidade genética de plantas cultivadas, podem ter menor poder discriminatório que os marcadores SSR (REN et al., 2013). Além das diferenças entre os tipos de marcadores utilizados, as populações analisadas por Pereira et al (2015a) são todas da região sul do estado, próximas da fronteira com o estado de Minas Gerais, coincidindo com o presente estudo apenas as populações de Vitória da Conquista e Licínio de Almeida.

Os baixos índices de diversidade observados na população de Lençóis não eram esperados, uma vez que esta população encontra-se em uma região bastante preservada, em uma área de preservação ambiental. Desta forma, entre as causas prováveis deste baixo polimorfismo, pode-se inferir o baixo número de indivíduos analisados ($n = 5$) ou aos efeitos da deriva genética, considerando-se a possibilidade desta população ter baixo número de alelos devido ao efeito fundador. Uma população originada a partir de poucas sementes pode ter variabilidade genética inferior à da população original (LOVELESS e HAMRICK, 1984). No entanto, esta possibilidade é apenas hipotética, não tendo sido avaliada em campo no presente estudo. A ação antrópica pode ter influenciado a

diversidade genética de *P. setacea*, uma vez que grande parte das populações coletadas se encontrava em áreas antropizadas, como bordas de estradas. A diminuição do tamanho das populações de *P. setacea* já foi associada a atividades humanas, como a transformação das áreas de ocorrência natural da espécie em pastagens (PEREIRA et al., 2015a). Em pequenas populações de plantas pode haver redução da diversidade genética por deriva gênica, relacionada à perda de heterozigosidade e eventual fixação de alelos (ELLSTRAND e ELAM, 1993).

3.2 Análise de estruturação genética

Pela análise molecular de variância (AMOVA) constatou-se grande diversidade entre as populações (45%), apesar do maior percentual de variância detectado dentro das populações (55%; Figura 5 e Tabela 5). A AMOVA de populações de *P. setacea* analisadas com marcadores ISSR e RGA revelou resultados semelhantes, com índice de variação intrapopulacional de 57 e 56%, respectivamente (PEREIRA et al., 2015a). Um percentual de variação semelhante foi observado em *P. alata*, cujas populações foram avaliadas com marcadores RAPD (42,56% entre populações e 57,44% dentro das populações) e considerou-se que as populações, definidas por localidade, estavam geneticamente estruturadas (LOSS et al., 2006).

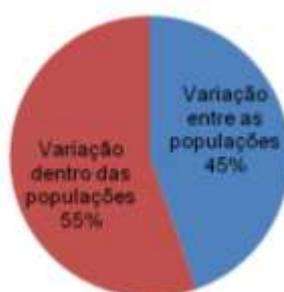


Figura 5. Gráfico mostrando o percentual de variância molecular dentro e entre populações de *P. setacea* do estado da Bahia amplificadas com marcadores SSR.

Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) intra e interpopulacional das populações de *Passiflora setacea*.

Fonte de variação	GL	SQ	Var. est.	Var. (%)	P
Entre Populações	17	187,306	1,175	45%	(<0,001)
Dentro das Populações	129	188,225	1,459	55%	(<0,001)
Total	146	375,531	2,635	100%	

GL= graus de liberdade; SQ= Soma do quadrado dos desvios; Var. est. = variação estimada; Var (%) = percentagem de variação; p = probabilidade (valor baseado em 999 permutações).

O valor obtido do coeficiente de divergência genética médio entre as populações, G_{st} , foi de 0,221, o que indica um alto nível de diferenciação genética, por estar entre 0,151 e 0,250 (YEH, 2000). Altos valores de G_{st} também foram detectados em outros estudos de diversidade de *P. setacea* com marcadores SSR ($G_{st} = 0,36$; CERQUEIRA-SILVA et al., 2014a), e marcadores ISSR e RGA ($G_{st} = 0,38$ e $G_{st} = 0,42$ respectivamente; PEREIRA et al., 2015a). Apesar destes altos índices, não foram observados alelos exclusivos em nenhuma população. Considerando que os estudos relacionados foram realizados com populações do estado da Bahia, pode-se considerar que a espécie apresenta alto nível de estruturação genética no estado.

A variabilidade genética das populações resulta da ação conjunta de fatores como mutação, migração, seleção e deriva gênica, que operam dentro do contexto histórico e biológico de cada espécie de planta. A dispersão de pólen e das sementes determinam o fluxo gênico entre populações (LOVELESS e HAMRICK, 1984), apresentando papel fundamental em relação a estruturação populacional. Em *P. setacea* o fluxo gênico detectado foi moderado (1,179; estimado a partir do F_{st}), condizente com a alta estruturação das populações. Estudos de diversidade de *P. setacea* da Bahia com marcadores ISSR e RGA indicaram baixo nível de fluxo gênico (ISSR = 0,86 e RGA = 0,68 respectivamente; PEREIRA et al., 2015a).

Os principais polinizadores de *P. setacea* são os morcegos, tendo como características relacionadas à síndrome de polinização pétalas alvas e corona de filamentos bandeados de branco e azul, curto período de antese, grande quantidade de pólen associado ao grande número de anteras. No entanto,

ocasionalmente alguns invertebrados também podem ser responsáveis pela transferência de pólen entre indivíduos desta espécie (FERREIRA, 2013). A importância dos morcegos como agentes polinizadores é definida com base na frequência de visitação por inflorescência e na sua capacidade de promover cruzamentos a longa distância (MARTINS e GRIBEL, 2007).

Além de transportar grandes quantidades de pólen de múltiplos genótipos, os morcegos muitas vezes movem pólen através de distâncias substanciais entre as plantas, aumentando o fluxo gênico e reduzindo os níveis de subdivisão genética entre populações de plantas (FLEMING et al., 2009). Desta forma, esperava-se níveis mais altos de fluxo gênico e menor estruturação populacional em *P. setacea*. É possível que estes baixos níveis estejam relacionados ao declínio das populações das espécies de morcegos polinizadoras, no entanto são necessários mais estudos para investigar esta hipótese. Mariposas também foram apontadas como possíveis polinizadores de *P. setacea* (JUNQUEIRA et al., 2005).

Outra possibilidade de fluxo gênico entre populações de plantas se dá através da dispersão das sementes. As sementes de *P. setacea* são de tamanho reduzido em relação a outras espécies do gênero e perdem rapidamente a capacidade de germinação (OLIVEIRA e RUGGIEIRO, 2005). Entretanto, induzindo-se a dormência podendo permanecer viáveis por até três meses (MELETTI et al., 2002; PÁDUA et al., 2011). Devido ao sabor agradável dos frutos é provável que a dispersão de sementes de *P. setacea* seja zoocórica (OLIVEIRA e RUGGIEIRO, 2005), o que favoreceria a ocorrência de um fluxo gênico mais intenso. As passifloras, de forma geral, são consumidas e dispersadas por aves (FEUILLET e MACDOUGAL, 2003; SHIELS e WALKER, 2003; MENDIONDO e GARCÍA, 2006) e pequenos mamíferos (FEUILLET e MACDOUGAL, 2003), a exemplo de gambás (WILLIAMS e BUXTON, 1995; CÁCERES e MONTEIRO-FILHO, 2007; ALVES-COSTA e ETEROVICK, 2007), ratos (WILLIAMS e BUXTON, 1995), saguis e coatis (ALVES-COSTA e ETEROVICK, 2007), e micos leões dourados (LAPENTA et al., 2008). No entanto, devido a ausência de informações mais precisas sobre o agente dispersor de *P. setacea* e que muitas aves e mamíferos silvestres do Brasil têm tido suas populações reduzidas e encontram-se ameaçados de extinção, não é possível inferir sobre sua influência em relação ao fluxo gênico da espécie.

Devido à mobilidade limitada das plantas, a estrutura genética das suas populações pode estar relacionada à estrutura espacial, que, em alguns casos, pode apresentar distribuição aleatória, como resultado de heterogeneidade ambiental e da pressão de seleção diferencial (LOVELESS e HAMRICK, 1984). A fragmentação de hábitat pode apresentar efeitos importantes sobre a diversidade de populações, à medida em que aumenta o isolamento espacial, podendo levar ao aumento da divergência genética interpopulacional (YOUNG et al., 1996), especialmente quando ocasionado por atividades humanas antrópicas (HAO et al., 2006).

3.3 Análise de padrões genéticos

A análise de coordenadas principais (PCoA) foi a primeira a ser realizada para detecção dos padrões de agrupamento das populações de *P. setacea* da Bahia. No entanto, não foi possível observar a formação de grupos distintos (Figura 4), não tendo sido esta análise eficiente em determinar o padrão de agrupamento das populações de *P. setacea*. Os eixos 1 e 2 explicaram a maior parte da variação – 47,29 % e 16,96 %, respectivamente – apesar de não ter sido possível diferenciar grupos. Observou-se que as populações de Poções e de Andaraí foram as que tiveram distribuição mais dispersa.

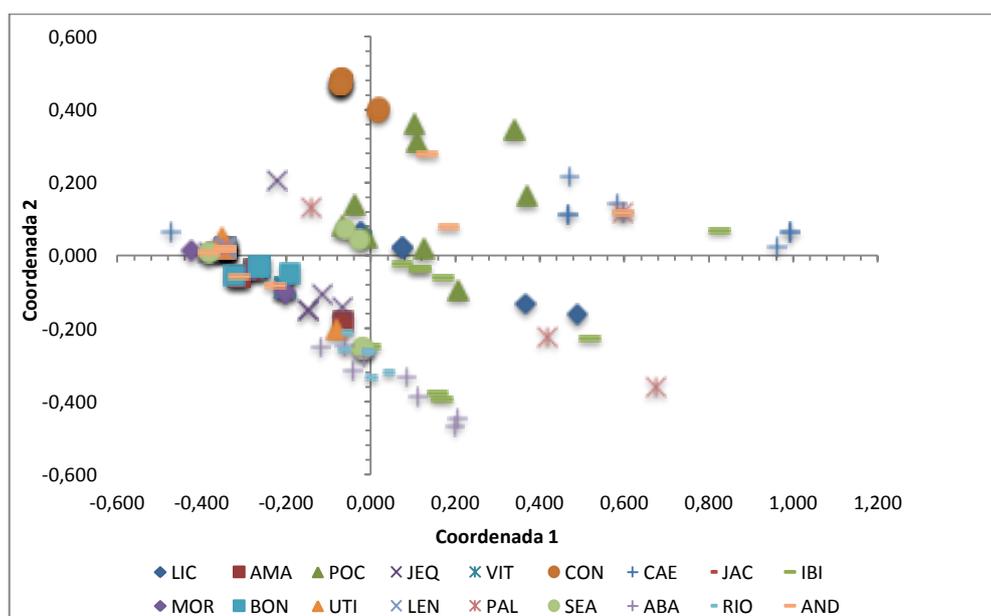


Figura 4. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) dos indivíduos de *P. setacea* analisados, realizada a partir da matriz de distâncias genotípicas, obtida a partir de dados de SSR. Obs.: Para a sigla das populações consulte a Tabela 1.

A PCoA, descrita por Gower (1966), é um método de ordenação em que as distâncias entre os pares de dados são representadas graficamente a partir de alguma medida de distância escolhida. Os valores das coordenadas garantem que os pontos terão o espaçamento desejado (PIELOU, 1984). No entanto, como método exploratório, a PCoA não se mostrou eficiente neste trabalho para a identificação preliminar de grupos a partir da distância genética de Nei.

A segunda análise, de inferência bayesiana, realizada pelo programa Structure revelou que o valor mais provável de $\Delta k = 2$ (Figura 6), sugerindo a existência de dois *pools* gênicos nas populações de *P. setacea* do estado da Bahia.

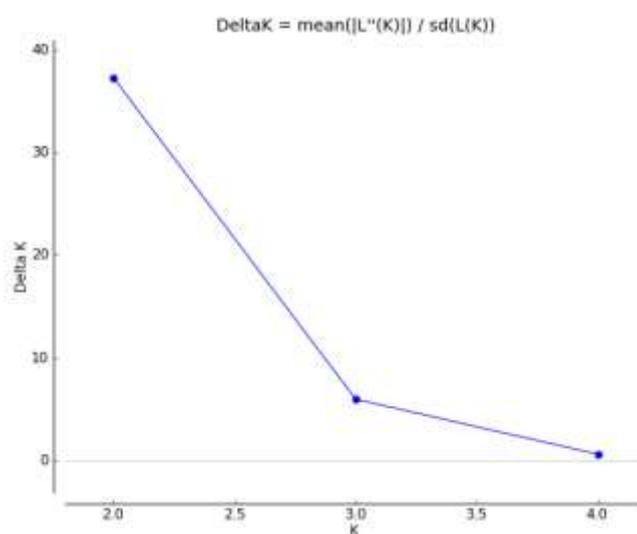


Figura 6. Gráfico de variação do Delta K da estimativa da estruturação genética das populações de *P. setacea* analisadas com marcadores SSR.

Devido aos resultados conflitantes das análises de PCoA e inferência bayesiana, e considerando a limitação técnica do programa Structure, que parte da premissa da existência de dois grupos e não permite a detecção de apenas um único *pool* gênico, foi realizada outra análise no programa Structurama, que possui potencial de análise mais acurado. Esta segunda análise também indicou mais provável a existência de dois grupos genéticos em *P. setacea*, com 57% de probabilidade, sendo a probabilidade de existirem três grupos de 42%, e a de existirem quatro grupos genéticos de apenas 1%, corroborando os resultados prévios obtidos no programa Structure.

Considerou-se, desta forma, como válidos os resultados da análise de inferência bayesiana, que demonstrou a existência de dois *pools* gênicos distintos, um ocorrendo nas populações de Licínio de Almeida, Amargosa, Jequié, Vitória da Conquista, Contendas do Sincorá, Jacobina, Morro do Chapéu, Bonito, Utinga, Lençóis, Seabra e Andaraí, e outro presente nas populações de Poções, Caetité, Ibicoara, Palmeiras, Abaíra e Rio de Contas (Figura 7).

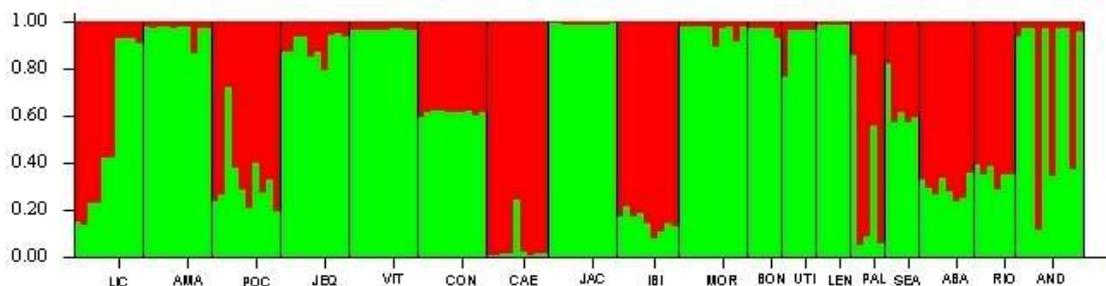


Figura 7. Gráfico da estimativa da estrutura genética das populações de *P. setacea*, estimada a partir de dados de SSR, no software Structure ($K = 2$). As populações estão delimitadas por linhas verticais. LIC = Licínio de Almeida, AMA = Amargosa, JEQ = Jequié, POC = Poções, VIT = Vitória da Conquista, CAE = Caetité, CON = Contendas do Sincorá, JAC = Jacobina, MOR = Morro do Chapéu, BON = Bonito, UTI = Utinga, LEN = Lençóis, PAL = Palmeiras, SEA = Seabra, ABA = Abaíra, RIO = Rio de Contas, IBI = Ibicoara, AND = Andaraí..

Estes grupos coincidiram com os grupos formados pela análise fenética baseada na distância genética de Nei e algoritmo Ward (descrita a seguir), com exceção da população de Contendas do Sincorá, que ocorreu no outro grupo. Os dois grupos serão discutidos a partir das análises a seguir.

3.4 Distância genética e análise fenética

As populações de *P. setacea* apresentaram uma distância genética média de Nei de 0,15, condizente com o esperado para populações coespecíficas. O maior valor de distância observado foi de 0,620 entre as populações de Caetité e Lençóis, e o menor valor de distância observado foi igual a zero, entre as populações de Jequié e Bonito, Utinga e Lençóis, Utinga e Jacobina, Poções e Palmeiras, Morro do Chapéu e Lençóis, Morro do Chapéu e Utinga, Jacobina e Lençóis, Jacobina e Morro do Chapéu, Amargosa e Andaraí (Tabela 6).

Tabela 6. Matriz de Distância genética de Nei (abaixo da linha diagonal) e Identidade genética de Nei (acima da linha diagonal) para cada população de *Passiflora setacea* considerando todos os loci de SSR analisados. LIC = Licínio de Almeida, AMA = Amargosa, JEQ = Jequié, POC = Poções, VIT = Vitória da Conquista, CAE = Caetitê, CON = Contendas do Sincorá, JAC = Jacobina, MOR = Morro do Chapéu, BON = Bonito, UTI = Utinga, LEN = Lençóis, PAL = Palmeiras, SEA = Seabra, ABA = Abaíra, RIO = Rio de Contas, IBI = Ibicoara, AND = Andaraí.

	LIC	AMA	POC	JEQ	VIT	CON	CAE	JAC	IBI	MOR	BON	UTI	LEN	PAL	SEA	ABA	RIO	AND
LIC	****	0,934	0,971	0,929	0,954	0,836	0,811	0,951	0,883	0,939	0,921	0,965	0,946	0,950	0,957	0,897	0,881	0,975
AMA	0,068	****	0,854	0,977	0,951	0,782	0,566	0,972	0,763	0,993	0,999	0,992	0,984	0,838	0,951	0,826	0,827	1,001
POC	0,030	0,157	****	0,838	0,884	0,923	0,913	0,869	0,902	0,856	0,831	0,878	0,846	1,003	0,941	0,856	0,851	0,943
JEQ	0,074	0,023	0,176	****	0,941	0,768	0,619	0,926	0,790	0,942	1,004	0,956	0,940	0,820	0,921	0,798	0,798	0,981
VIT	0,047	0,051	0,123	0,061	****	0,734	0,621	0,958	0,775	0,940	0,955	0,977	0,942	0,850	0,921	0,885	0,903	0,946
CON	0,179	0,245	0,080	0,264	0,309	****	0,741	0,782	0,670	0,786	0,772	0,793	0,797	0,802	0,784	0,548	0,579	0,866
CAE	0,210	0,570	0,091	0,479	0,477	0,300	****	0,584	0,930	0,553	0,576	0,595	0,538	0,952	0,747	0,750	0,695	0,717
JAC	0,050	0,028	0,140	0,077	0,043	0,246	0,538	****	0,750	1,003	0,944	1,000	1,001	0,833	0,960	0,823	0,849	0,966
IBI	0,124	0,270	0,103	0,236	0,255	0,401	0,073	0,288	****	0,739	0,769	0,766	0,702	0,996	0,923	0,943	0,894	0,851
MOR	0,063	0,007	0,156	0,060	0,062	0,241	0,593	0,000	0,302	****	0,962	1,000	1,003	0,829	0,970	0,816	0,843	0,978
BON	0,082	0,001	0,185	0,000	0,046	0,259	0,551	0,058	0,263	0,039	****	0,978	0,958	0,805	0,917	0,795	0,816	0,988
UTI	0,035	0,008	0,130	0,045	0,023	0,232	0,518	0,000	0,266	0,000	0,022	****	1,018	0,842	0,951	0,832	0,868	0,983
LEN	0,056	0,016	0,167	0,062	0,060	0,226	0,620	0,000	0,354	0,000	0,042	0,000	****	0,795	0,939	0,775	0,806	0,968
PAL	0,051	0,176	0,000	0,199	0,162	0,221	0,049	0,182	0,004	0,188	0,217	0,172	0,229	****	0,974	0,955	0,915	0,931
SEA	0,044	0,050	0,060	0,083	0,082	0,244	0,292	0,041	0,080	0,031	0,087	0,051	0,063	0,027	****	0,947	0,932	0,982
ABA	0,108	0,191	0,156	0,225	0,122	0,601	0,287	0,195	0,059	0,204	0,230	0,184	0,254	0,046	0,054	****	0,997	0,850
RIO	0,127	0,190	0,162	0,226	0,102	0,546	0,364	0,163	0,112	0,170	0,204	0,141	0,215	0,088	0,070	0,003	****	0,835
AND	0,025	0,000	0,059	0,020	0,055	0,144	0,332	0,035	0,162	0,023	0,012	0,017	0,032	0,071	0,018	0,163	0,180	****

A análise fenética utilizando a distância genética não enviesada de Nei entre as populações e o método de Ward mostrou a existência de dois grandes grupos, um formado pelas populações de Abaíra, Rio de Contas, Ibicoara, Poções, Palmeiras, Contendas do Sincorá e Caetité (grupo I) e o grupo II pelas populações de Andaraí, Licínio de Almeida, Seabra, Lençóis, Amargosa, Utinga, Jacobina, Morro do Chapéu, Vitória da Conquista, Jequié e Bonito (Figura 8). Estes grupos coincidiram com os grupos indicados pela análise de *pools* gênicos realizada no programa Structure, com uma única exceção, a população de Contendas do Sincorá que mudou de grupo.

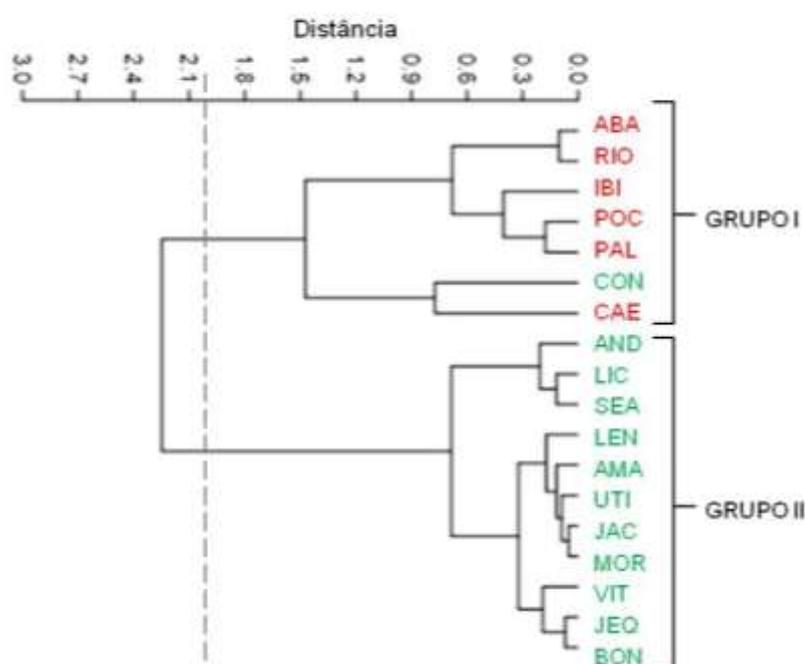


Figura 8. Dendrograma produzido pelo método de Ward, obtido a partir da distância genética não enviesada de Nei entre as populações de *P. setacea*, utilizando dados de marcadores SSR. As cores das siglas das populações indicam o grupo genético detectado pela análise de inferência bayesiana no programa Structure. LIC = Licínio de Almeida, AMA = Amargosa, JEQ = Jequié, POC = Poções, VIT = Vitória da Conquista, CAE = Caetité, CON = Contendas do Sincorá, JAC = Jacobina, MOR = Morro do Chapéu, BON = Bonito, UTI = Utinga, LEN = Lençóis, PAL = Palmeiras, SEA = Seabra, ABA = Abaíra, RIO = Rio de Contas, IBI = Ibicoara, AND = Andaraí.

Não foi observada uma forte estruturação geográfica no agrupamento das populações de *P. setacea*, embora a maior parte das populações do grupo I se localize na porção sul da distribuição no estado.

O teste de Mantel realizado a partir da matriz de distância genética de Nei não enviesada e distâncias geográficas entre os municípios, resultou em um coeficiente de correlação de Pearson (R) = 0,1067, com p = 0,1848, indicando que não há correlação entre as distâncias genética e geográfica entre as populações de *P. setacea*. Um estudo de diversidade populacional em *P. setacea* com marcadores ISSR e RGA no estado da Bahia realizado anteriormente também detectou ausência de correlação entre as distâncias genéticas e geográficas (PEREIRA et al., 2015a).

A maior parte das populações estudadas localizam-se na região do Espinhaço (SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE DO ESTADO DA BAHIA, 2014), uma cadeia de serras que se estende desde o estado de Minas Gerais até a Bahia numa extensão de 1200 km longitudinalmente (ABREU, 1995), compreendendo a região da Chapada Diamantina. Nesta região podem ser encontradas barreiras geográficas que podem impedir o fluxo gênico, promovendo a diferenciação entre as populações (PEREIRA et al., 2015a). Em regiões montanhosas, como a Cadeia do Espinhaço, é provável que vários grupos tenham um padrão de diferenciação semelhante, influenciado principalmente pela sazonalidade climática (RIBEIRO, 2011).

Entretanto, neste estudo não foi possível observar um padrão de distribuição das populações em relação aos tipos climáticos, pois populações localizadas em áreas com padrão climático semelhante não apresentaram maior semelhança genética. De acordo com a Classificação de Köppen-Geiger (ÁLVARES et al., 2013), no grupo I, quatro populações (Palmeiras, Abaíra, Rio de Contas e Ibicoara) ocorrem em clima Aw (tropical com verão seco), duas (Contendas do Sincorá e Poções) são encontradas em clima BSh (seco, semi-árido de baixa latitude e altitude) e uma (Caetité) em clima As (tropical com inverno seco). Igualmente no grupo II, a maior parte das populações também encontra-se em clima Aw (Jacobina, Seabra, Andaraí, Lençóis, Jequié, Vitória da Conquista e Amargosa), seguida por três populações em clima BSh (Utinga, Bonito e Morro do Chapéu), e uma em clima As (Licínio de Almeida). Um aspecto a ser ressaltado em relação a esta observação é que as duas populações com maior diversidade genética são as únicas encontradas em clima As.

3.5 Diversidade haplotípica

Foram identificados 73 haplótipos, sendo 51 perfis haplotípicos únicos e oito compartilhados por indivíduos de populações distintas (Figura 9).

O grupo II (identificado nas análises fenética e de inferência bayesiana) apresentou mais haplótipos compartilhados por populações distintas (H48, H59, H68, H69), que o grupo I, e isso pode estar relacionado ao fato de as populações do grupo II apresentarem distâncias genéticas menores entre si (Figura 8 e Tabela 6).

A distribuição dos haplótipos tende a um maior agrupamento das populações com base nas distâncias genéticas, a partir dos grupos definidos previamente a partir das análises fenética (Figura 8) e de estruturação genética, pois se observa maior concentração das populações do grupo I a esquerda e do grupo II a direita (Figura 9).

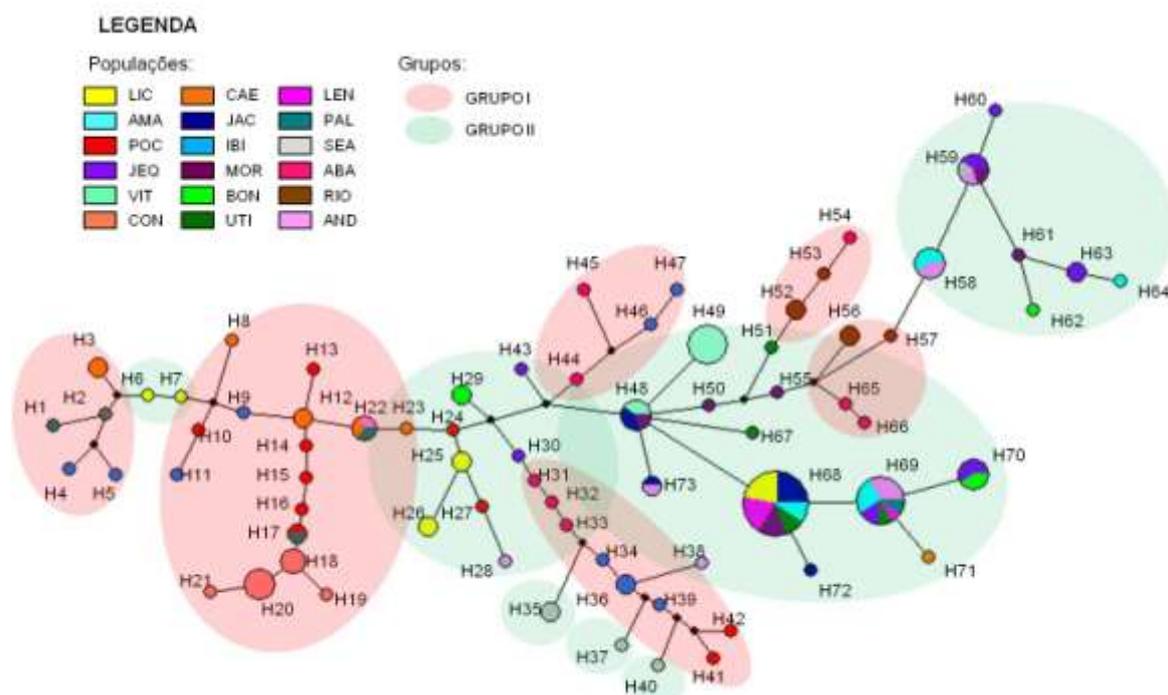


Figura 9. Rede de haplótipos obtida com base no método de Median-Joining para as populações de *Passiflora setacea*, a partir de dados de SSR. Os grupos foram definidos com base na análise de agrupamento a partir das distâncias genéticas de Nei. Populações com a mesma cor encontram-se nos mesmos grupos mínimos determinados pela análise fenética. LIC = Licínio de Almeida, AMA = Amargosa, JEQ = Jequié, POC = Poções, VIT = Vitória da Conquista, CAE = Caetité, CON = Contendas do Sincorá, JAC = Jacobina, MOR = Morro do Chapéu, BON = Bonito,

UTI = Utinga, LEN = Lençóis, PAL = Palmeiras, SEA = Seabra, ABA = Abaíra, RIO = Rio de Contas, IBI = Ibicoara, AND = Andaraí.

O elevado número de haplótipos exclusivos e o baixo número compartilhado por populações distintas está relacionado a grande estruturação detectada entre as populações de *P. setacea*, possivelmente devido a mecanismos que dificultam o fluxo gênico entre as populações, como abordado anteriormente, tais como as barreiras geográficas (PEREIRA et al., 2015a) e fragmentação de habitats pela ação antrópica (HAO et al., 2006).

Os haplótipos que ocorrem nas populações do grupo II apresentaram, de forma geral, mais interações que os haplótipos que ocorreram nas populações do grupo I, sendo o haplótipo H48 com maior número de interações. Essas observações nos permitem sugerir um possível surgimento anterior do grupo II, que posteriormente teria se diversificado e originado o grupo I.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Passiflora setacea do estado da Bahia apresenta grande diversidade genética e significativa diferenciação interpopulacional, o que somado às suas diversas características de interesse agrônômico a caracteriza como um importante recurso genético nativo do estado. As suas populações, de forma geral, apresentam polimorfismo moderado, se dividindo em dois grandes grupos genéticos, um que abrange as populações ao sul da área de ocorrência no estado e o outro as demais populações. Apesar desta aparente separação geográfica, não foi observada correlação entre as distâncias genéticas e geográficas, sendo provavelmente a deriva genética o fator evolutivo mais atuante, neste momento, sobre as populações da espécie.

Desta forma, recomenda-se que para uma efetiva preservação dos recursos genéticos de *P. setacea* sejam selecionados acessos de diferentes populações, pertencentes aos dois grupos genéticos, para o incremento de bancos de germoplasma da espécie. Neste sentido, sugere-se coletas especialmente nas populações de Licínio de Almeida e Caetitê, de grupos distintos e que apresentaram os maiores níveis de variabilidade genética. Outra

população apontada em outros estudos como fonte de recursos genéticos para a espécie é Vitória da Conquista (PEREIRA et al., 2015a,b). Esta população foi a única a apresentar alelo único, em um estudo com ISSR, o que indica a necessidade de se empreender esforços para a sua conservação, uma vez que se encontra em região bastante antropizada (PEREIRA et al., 2015a). Os frutos desta população também apresentaram características apropriadas para utilização industrial, como o rendimento da polpa e a proporção de sólidos solúveis totais (PEREIRA et al., 2015b).

Tais populações, e também outras populações com alto polimorfismo genético, a exemplo de Poções, Seabra e Andaraí, também podem ser utilizadas tanto em programas de melhoramento genético das espécies comercialmente exploradas, *P. edulis* e *P. alata*, como fonte de resistência a pragas (FISCHER et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2005; OLIVEIRA e RUGGIEIRO, 2005; SANTOS et al., 2005; BRAGA et al., 2006; Capítulo 1).

5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB (Projetos PRONEM 0020/2011 e RED 0040/2011), ao Centro Tecnológico de Agropecuária da Bahia – CETAB pela disponibilização do laboratório de Biologia Molecular, e à CAPES pela bolsa de mestrado de NCSB.

6 REFERÊNCIAS

ABREU, P.A.A. 1995. O supergrupo espinhaço da serra do espinhaço meridional (Minas Gerais): o rifte, a bacia e o orógeno. **Geonomos**, **3 (1)**: 1-18.

ÁLVARES, C.A.; STAPE, J.L.; SENTELHAS, P.C.; MORAES GONÇALVES, J.L.; SPAROVEK, G. 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, **22 (6)**: 711-728.

ALVES-COSTA, C.P.; ETEROVICK, P.C. 2007. Seed dispersal services by coatis (*Nasua nasua* Procyonidae) and their redundancy with other frugivores in southeastern Brazil. **Acta oecologica**, **32**: 77-92.

APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, **161**: 105–121.

ATAÍDE, E.M.; OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. 2012. Florescimento e frutificação do maracujazeiro silvestre *Passiflora setacea* D.C. cultivado em Jaboticabal, SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **34 (2)**: 377-381.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, **16 (1)**: 37-48.

BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; NUNES, T.S.; IMIG, D.C.; MEZZONATO, A.C. 2016. Passifloraceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12506>>. Acesso em: 13 Fev. 2016.

BRAGA, M.F.; SANTOS, E.C.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SOUSA, A.A.T.C.; FALEIRO, F.G.; REZENDE, L.N.; JUNQUEIRA, K.P. 2006. Enraizamento de estacas de três espécies silvestres de *Passiflora*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **28 (1)**: 284-288.

BRUCKNER, C.H.; SUASSUNA, T.M.F.; RÊGO, M.M.; NUNES, E.S. 2005. Auto-incompatibilidade do maracujá - implicações no melhoramento genético. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 317-338.

CÁCERES, N.C.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A. 2007. Germination in Seed Species Ingested by Opossums: Implications for Seed Dispersal and Forest Conservation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, **50 (6)**:921-928.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; FALEIRO, F.G.; JESUS, O.N.; SANTOS, E.S.L.; SOUZA, A.P. 2016. The Genetic Diversity, Conservation, and Use of Passion Fruit (*Passiflora* spp.). In: AHUJA, M.R.; JAIN, S.M. (Eds.) **Genetic Diversity and Erosion in Plants - Case Histories**. v. 2. Springer International Publishing: Switzerland. pp. 215-231.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; SANTOS, E.S.L.; VIEIRA, J.G.P.; MORI, G.M.; JESUS, O.N.; CORRÊA, R.X.; SOUZA, A.P. 2014a. New Microsatellite Markers for Wild and Commercial Species of *Passiflora* (Passifloraceae) and Cross-Amplification. **Applications in Plant Sciences**, **2 (2)**: 1300061.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; SANTOS, E.S.L.; JESUS, O.N.; MORI, G.M., CORRÊA, R. X.; SOUZA, A. P. 2014b. Molecular genetic variability of commercial and wild accessions of passion fruit (*Passiflora* spp.) targeting *ex situ* conservation and breeding. **International Journal of Molecular Sciences**, **15**: 22933-22959.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; SANTOS, E.S.L.; CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S.; CARDOSO-SILVA, C.B.; PEREIRA, A.S.; OLIVEIRA, A.C.; CORRÊA, R.X. 2012. Genetic variation in a wild population of the 'sleep' passion fruit (*Passiflora setacea*) based on molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, **11 (1)**: 731-738.

CRESTE, S; TULMANN, A.; FIGUEIRA, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, **19 (4)**: 299-306.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, **19**: 11-15.

DUDLEY, J.W. 1993. Molecular Markers in Plant Improvement: Manipulation of Genes Affecting Quantitative Traits. **Crop Science**, **33**: 660-668.

EARL, D.A.; HOLDT, B.M. 2012 STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, **4 (2)**: 359-361.

ELLSTRAND, N.C.; ELAM, D.R. 1993. Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **24**: 217-242.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology** **14**: 2611-2620.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. 2005. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro - Desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 187-209.

FERREIRA, J.B. 2013. **Determinação do polinizador efetivo de *Passiflora setacea* D.C. (Passifloraceae)**. Monografia (Graduação) - Centro Universitário de Brasília, Brasília, Brasil.

FERREIRA, M.E.; RANGEL, P.H.N. 2005. Emprego de espécies silvestres no melhoramento genético vegetal: experiência em outras espécies com análise de retrocruzamento avançado de QTLs (AB-QTL). In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 111-140.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J.M. 2003. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Passiflora** **14(1)**: 34-38.

FISCHER, I.H.; KIMATI, H.; REZENDE, J.A.M. 2005. Doenças do maracujazeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM-FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4 ed, v. 2, São Paulo: Ceres. p. 467-474.

FLEMING, T. H.; GEISELMAN, C.; KRESS, W. J. 2009. The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. **Annals of Botany**, **104 (6)**: 1017-1043.

FORSTER, M.; FORSTER, P.; WATSON, J. 2016. **Network version 5.0.0.0: A software for population genetics data analysis**. 5.0.0.0 ed: Fluxus Technology Ltd 2004–2016. Disponível em: <http://www.fluxus-engineering.com/>. Acesso em 26 de janeiro de 2016.

GOWER, J.C. 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**, **53 (3-4)**: 325-338.

HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, **4 (1)**: 9pp.

HAO, B.; LI, W.; LINCHUN, M.; LI, Y.; RUI, Z.; MINGXIA, T.; WEIKAI, B. 2006. A study of conservation genetics in *Cupressus chengiana*, an endangered endemic of China, using ISSR markers. **Biochemical Genetics**, **44**: 31-45.

HENRY, R.J. 2012. Evolution of DNA Marker Technology in Plants. In: HENRY, R.J. **Molecular Markers in Plants**. Oxford: Blackwell Publishing. pp. 3-20.

HO, W.F.; SHII, C.T. 1986. Incompatibility system in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Acta Horticulturae**, **194**: 31-38.

HUELSENBECK, J. P.; ANDOLFATTO, P.; HUELSENBECK, E. T. 2011. Structurama: Bayesian Inference of Population Structure. **Evolutionary Bioinformatics**, **7**: 55-59.

INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. 2016. Divisão de Processamento de Imagens - **Calculadora Geográfica**. Disponível em: <http://www.dpi.inpe.br/calcula/>. Acesso em 21 de janeiro de 2016.

JIANG, G. L. 2013. **Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants**. In: ANDERSEN, S.V. Plant Breeding from Laboratories to Fields. USA: Brookings. pp. 45-83.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; SEITEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. 2009. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed. 612 p.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; BERNACCI, L.C. 2005. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 81-108.

LAPENTA, M.J.; PROCÓPIO-DE-OLIVEIRA, P.; KIERULFF, M.C.M.; MOTTA-JUNIOR, J.C. 2008. Frugivory and seed dispersal of golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia* (Linnaeus, 1766) in a forest fragment in the Atlantic Forest, Brazil. **Braz. J. Biol.**, **68(2)**: 241-249.

LEÃO, R.M.K.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; RESENDE, R.O.; MATTOS, J.K.A.; MELO, B. 2006. Reação de progênies de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus-CABMV*) em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, **22 (2)**: 87-92.

LOSS, A.C.C.; LEITE, Y.L.R.; LOURO, I.D.; BATITUCCI, M.C.P. 2006. Diversidade genética de populações de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) no estado do Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line**, **4(2)**: 55-61.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, **15**: 65-95.

MADUREIRA, H.C.; PEREIRA, T.N.; CUNHA, M.; KLEIN, D.E.; OLIVEIRA, M.V.V.; MATTOS, L.; SOUZA FILHO, G.A. 2014. Self-incompatibility in passion fruit: cellular responses in incompatible pollinations. **Biologia**, **69 (5)**: 574-584.

MARIM, B. G.; SILVA, D.J.H.; CARNEIRO, P.C.S.; MIRANDA, G.V.; MATTEDI, A.P.; CALIMAN, F.R.B. 2009. Variabilidade genética e importância relativa de caracteres em acessos de germoplasma de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **44 (10)**: 1283-1290.

MARTINS, K.; CHAVES, L. J.; VENCOVSKY, R.; KAGEYAMA, P. Y. 2011. Genetic structure based on nuclear and chloroplast microsatellite loci of *Solanum lycocarpum* A. St. Hil. (Solanaceae) in Central Brazil. **Genetics and Molecular Research, 10 (2):** 665-677.

MARTINS, R.L.; GRIBEL, R. 2007. Polinização de *Caryocar villosum* (Aubl.) Pers. (Caryocaraceae) uma árvore emergente da Amazônia Central. **Revista Brasileira de Botânica, 30 (1):** 37-45.

MELETTI, L. M. M.; FURLANI, P. R.; ÁLVARES, V.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; AZEVEDO FILHO, J. A. 2002. Novas tecnologias melhoram a produção de mudas de maracujá. **O Agrônomo, 54 (1):** 30-33.

MENDIONDO, G.M.; GARCÍA, M.T.A. 2006. Emergence of *Passiflora caerulea* seeds simulating possible natural destinies. **Fruits, 61:** 251-258.

NASCIMENTO, A.V.S., SANTANA, E.N., BRAZ, A.S.K., ALFENAS, P.F., PIO-RIBEIRO, G., ANDRADE, G.P., CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. 2006. Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in Passion fruit in Brazil, and causes Passion fruit woodiness disease. **Archives of Virology, 151 (9):** 1797-1809.

NOGUEIRA FILHO, G.C.; RONCATTO, G.; RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J.C.; MALHEIROS, E.B. 2005. Propagação vegetativa do maracujazeiro - conquista de novas adesões. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 341-358.

NUNES, T.S. 2002. **A família Passifloraceae no estado da Bahia, Brasil**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia. 190 p.

OLIVEIRA, E.J. 2006. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. 2005. Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Molecular Ecology Notes**, **5**: 331–333.

OLIVEIRA, G.A.F.; PÁDUA, J.G.; COSTA, J.L.; JESUS, O.N.; CARVALHO, F.M.; OLIVEIRA, E.J. 2013. Cross-species amplification of microsatellite loci developed for *Passiflora edulis* Sims. in related *Passiflora* Species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, **56 (5)**: 785-792.

OLIVEIRA, J.C.; RUGGIEIRO, C. 2005. Espécies de maracujá com potencial agrônômico. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 143-158.

PÁDUA, J.G.; OLIVEIRA, E.J.; ZUCCHI, M.I.; OLIVEIRA, G.C.X.; CAMARGO, L.E.A.; VIEIRA, M.L.C. 2005. Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: Passifloraceae). **Molecular Ecology Notes**, **5(4)**: 863-865.

PÁDUA, J.G.; SCHWINGEL, L.C.; MUNDIM, R. C.; SALOMÃO, A. N.; ROVERIJOSÉ, S. C. B. 2011. Germinação de sementes de *Passiflora setacea* e dormência induzida pelo armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, **33 (1)**: 80-85.

PAIVA, C.L. 2013. **Descritores morfológicos e marcadores microssatélites na caracterização de germoplasma de *Passiflora* spp.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. 73p.

PAULA, M.S., FONSECA, M.E.N., BOITEUX, L.S., PEIXOTO, J.R., 2010. Caracterização genética de espécies de *Passiflora* por marcadores moleculares análogos a genes de resistência. **Revista Brasileira de Fruticultura** **32**: 222-229.

PEAKALL, R; SMOUSE, P.E. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, **28**: 2537-2539.

PEREIRA, D.A.; CORRÊA, R.X.; OLIVEIRA, A.C. 2015a. Molecular genetic diversity and differentiation of populations of 'somnus' passion fruit trees (*Passiflora setacea* DC): Implications for conservation and pre-breeding. **Biochemical Systematics and Ecology**, **59**: 12-21.

PEREIRA, D.A.; CORRÊA, R.X.; OLIVEIRA, A.C. 2015b. 'Do-sono' passion fruit: ecogeographical prospecting and phenotypic dispersion in transition areas between the *caatinga* and *cerrado* of Brazil. **African Journal of Biotechnology**, **14 (3)**: 206-211.

PIELOU, E.C. 1984. **The Interpretation of Ecological Data: A Primer on Classification and Ordination**. John Wiley&Sons, Inc., New York. 288p.

PINTO, P.H.D.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; RESENDE, R.O.; MATTOS, J.K.A.; MELO, B. 2008. Reação de genótipos de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV). **Bioscience Journal**, **24 (2)**: 19-26.

POLZIN, T.; DANESCHMAND, S. V. 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. **Operations Research Letters**, **31**: 12-20.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A.1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, **2**: 225-238.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** **155**: 945-959.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2008. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em <http://www.R-project.org>. Acesso em 05 de fevereiro de 2016.

RAJWANT, K. K.; MANOJ, K.R.; SANJAY, K.; ROHTAS, S.; DHAWAN, A.K. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, **177**: 309-334.

REN, J.; YU, Y.; GAO, F.; ZENG, L.; LU, X.; WU, X.; YAN, W.; REN, G. 2013. Application of resistance gene analog markers to analyses of genetic structure and diversity in rice. **Genome**, **56(7)**: 377-387.

RIBEIRO, P.L. 2011. **Filogenia e variabilidade genética de *Minaria* (Apocynaceae): implicações para biogeografia e conservação da Cadeia do Espinhaço**. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil.

SANTOS, E.A. 2013. **Melhoramento do maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) visando à resistência ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus***. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

SANTOS, F.C.; RAMOS, J.D.; SANTOS, F.C.; LIMA, L.C.O. DE; JUNQUEIRA, K. P.; REZENDE, J.C. 2005. Características físico-químicas do maracujazeiro silvestre *Passiflora setacea*. In: **Reunião Técnica de Pesquisas em Maracujazeiro**. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 143-146.

SCHERER, C.C. 2014. **Conservação filogenética de nicho climático para espécies do gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) com ocorrência no Brasil**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

SCHLÖTTERER, C. 2004. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, **5**: 63-69.

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE, GOVERNO DA BAHIA. 2014. **ZEE - Zoneamento Ecológico-Econômico Preliminar**. Secretaria do Planejamento. Disponível em: <http://www.zee.ba.gov.br/zee/wp-content/uploads/2013/10/zonapdf2014/Zona9.pdf>. Acesso em 04 de fevereiro de 2016.

SHIELS, A.B.; WALKER, L.R. 2003. Bird Perches Increase Forest Seeds on Puerto Rican Landslides. **Restoration Ecology**, **11 (4)**: 457-465.

VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; SOUZA, M.M.; MALDONADO, F.; AMARAL JÚNIOR, A.T. 2003. Diversidade entre genótipos de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras

determinada por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura 25 (3):** 489-493.

WILLIAMS, P.A.; BUXTON, R.P. 1995. Aspects of the ecology of two species of *Passiflora* (*P. mollissima* (Kunth) L Bailey and *P. pinnatistipula* Cav.) as weeds in South Island, New Zealand. **New Zealand Journal of Botany, 33:** 315-323.

YEH, F.C. 2000. Population genetics. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Eds.). **Forest conservation Genetics: Principles and Practice**. CSIRO Publishing, Collingwood, pp. 21-37.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation of plants. **Tree, 11(10):** 413-418.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics, 20:** 176-183.

ANEXO I

Identificação dos loci de microssatélites testados, não utilizados, sequência dos *primers*, tamanho (em pares de bases), motivo, temperatura de anelamento utilizada (TA) e referência bibliográfica.

Locus	Sequência dos primers	Tamanho (pb)	Motivo	TA	Polimorfismo	Referência
PE02	F: GGGACGACAATCAAGTGAGG R: CCCAAACTATGCAACACCAA	215	(TG) ₇	60°C	Monomórfico	Oliveira (2006)
PE04	F: ATGCTTTTGGAAATCCGTTT R: TGCTCATGCAAAGTCACTGG	235	(TG) ₉	60°C	Não amplificou	Oliveira (2006)
PE10	F: AACCTTGATCTCCAGCCTAT R: GTTTTCGCCCGCGTATT	234	(GA) ₃₄	60°C	Monomórfico	Oliveira (2006)
PE13	F: AAGCACCCCAATCGTTGA R: CCCCTGCCACCTGAGTA	172	(GT) ₆	56°C	Não amplificou	Oliveira (2006)
PE14	F: TGGTGTTGCTGAATTTTCAATTT R: TACGCGCCTAGCGTATTCTT	245	(GA) ₂₁	60°C	Não amplificou	Oliveira (2006)
PE15	F: ACCGTAAATCCAAGCAAGT R: AAATGCAAAAAGAATGATATGTTA	204	(CTTTAGC) ₅	60°C	Monomórfico	Oliveira (2006)

PE16	F: CGCATGTTGTTTTCTTCTG R: CAGTCCAAAGCTCGTTCTCC	240	(TG) ₂₃	60°C	Monomórfico	Oliveira (2006)
PE17	F: ACTTCGTTGGTATGCACTTG R: CATAGAATGCAAGGGTTCACA	295	(AC) ₂₂	56°C	Monomórfico	Oliveira (2006)
PE18	F: CCGTGAACCAACCATTCTC R: CCGTGAACCAACCATTCTC	220	(TG) ₉	56°C	Não amplificou	Oliveira (2006)
PE19	F: TTAACAGGACTTAGCACTTGA R: CTCATCCTTCCATCTTTG	245	(CA) ₁₄	52°C	Monomórfico	Oliveira (2006)
PE20	F: AGGATCACCATAGAAAACCAT R: GTTAGGTTGGCATTGCTCTT	242	(AAAC) ₄	58°C	Monomórfico	Oliveira (2006)
PE21	F: CCCGGAAGATTGGTCGTA R: ATCCAATGGCAGGAAGGTC	237	(GT) ₁₅	60°C	Não amplificou	Oliveira (2006)
PE23	F: CAATCCCTTGACCCATAGA R: CGTCCATCCTTCTCCTTT	206	(GA) ₁₉	56°C	Não amplificou	Oliveira (2006)
PE26	F: GCTTTTCATATTTGGGGTTG R: TTGCTTGAGTTTGGAGGAGGAAG	277	(TG) ₁₇	60°C	Monomórfico	Oliveira (2006)

PE28	F: GCCACTAACGTTAATGTGCT R: CAAGCTCTTATTATTAGGCATCCA	243	(CT) ₁₆	60°C	Não amplificou	Oliveira (2006)
PE29	F: CGGATGAAGGCTCGTCTTT R: CGGCACACTCACCTCTCC	314	(AG) ₁₃	60°C	Monomórfico	Oliveira (2006)
PE35	F: ATTATGCCTAAAAACCCAAA R: TGATCCAGAGGTTGAGAGG	225	(CA) ₉	60°C	Não amplificou	Oliveira (2006)
PE37	F: CAAAAGGATAGGCCTGATGTC R: TGCTTGGTCATCCACTGAAG	232	(TG) ₈	58°C	Monomórfico	Oliveira (2006)
PE38	F: GATCGGTCCTCGGTTAGAC R: AGTCACACAGCATGAGAAATC	215	(TG) ₈	60°C	Monomórfico	Oliveira (2006)
PE41	F: ATCGGGGTTGCTTATTTG R: CGTTCATCCTTTAGTGGGCTA	220	(TTAA) ₅	61°C	Monomórfico	Oliveira (2006)
PE42	F: GTCACTTCATTCTTCCTTTCC R: TTAGCCCACTCAAACACAA	216	(GT) ₈	60°C	Não amplificou	Oliveira (2006)
PE58	F: GCAATTTACCATCTTCTGCT R: GCAATTTACCATCTTCTGCT	243	(AC) ₁₁	56°C	Monomórfico	Oliveira (2006)

PE59	F: GAACACTTCGCATGGCTAGA R: TTCCGAATCAAACCGTAACT	276	(ATCTA) ₃	59°C	Monomórfico	Oliveira (2006)
PE64	F: ATCAATTACGCACCCCAAAC R: GGAACGTCAATCAAGTGAGGA	228	(AC) ₈	56°C	Monomórfico	Oliveira (2006)
PE74	F: CCCTCTTATCAATAGCGTTGG R: GCACGAGCACGAGTATTTATT	215	(ATCACA) ₅	56°C	Não amplificou	Oliveira (2006)
PE88	F: CTTCAGGGTCACACACATT R: GTTCATCCTTTAGTGGGCT	293	(TTAA) ₆	60°C	Monomórfico	Oliveira (2006)
A07FP1	F: GGAAGTGAAGGAGAAGAAGA R: CCCTCTGGTTGTCTACCTAC	153–159	(AAG) ₉	56°C	Monomórfico	Pádua et al. (2005)
A08FP1	F: CACATTTGCCGTCACTGG R: CGGCATACGATAAAATCTCCTG	190–205	(TG) ₉	58°C	Monomórfico	Pádua et al. (2005)
mPc-UNICAMP02	F: CATTTCAAAGCGTGGTTCT R: AAGCGCCATGGTTTACAG	180 – 184	(TCC) ₄	62°C	Monomórfico	Cerqueira-Silva et al. (2012)
mPc-UNICAMP04	F: ATGACAACGTGGTTAGGGAA R: CACGCGTGTGTGGAAATAC	270 – 340	(AC) ₁₆ (AT) ₄	58°C	Não amplificou	Cerqueira-Silva et al. (2012)

mPc-UNICAMP06	F: AAGCACCGTAGCAGACTCAAC R: TTCTCAGGTGACAGGGGAAC	230 – 252	(TG) ₈ (TG) ₆ (TG) ₇	57°C	Monomórfico	Cerqueira-Silva et al. (2012)
mPc-UNICAMP10	F: GGCGATCAACCAGCACTAC R: CCTGAGAAACCGGATGAAG	230	(GAG) ₆	58°C	Não amplificou	Cerqueira-Silva et al. (2012)
mPc-UNICAMP15	F: GCACGTCAGTGGGTTTTACA R: AGTCCTGTGCTGGGCAGTT	161	(AC) ₄	58°C	Monomórfico	Cerqueira-Silva et al. (2012)
mPc-UNICAMP19	F: ACGAGACAGAATTTACCCGG R: AAGCTCAGATCTCCATGGACA	109	(GAGC) ₃	59°C	Monomórfico	Cerqueira-Silva et al. (2012)
mPc-UNICAMP20	F: CGAGAAGATTCTGTAAGCAGGC R: GCATTATCTCGGTGTGATGGT	141	(TG) ₄	60°C	Monomórfico	Cerqueira-Silva et al. (2012)
mPe-UNICAMP15	F: CATTCTCACCCCTCACGAA R: TGGTTGTGTGGTTTGTGCTT	253	(AC) ₅	58°C	Não amplificou	Cerqueira-Silva et al. (2014b)
mPs-UNICAMP01	F: TAGCTTAACACAATGCAACAGA R: CAACGGAGAACGATGTCAG	153–154	(TG) ₅ (TG) ₅	55°C	Monomórfico	Cerqueira-Silva et al. (2014b)
mPs-UNICAMP02	F: TAGCTTAACACAATGCAACAGA R: CAACGGAGAACGATGTCAG	154–156	(TG) ₅ (TG) ₅	58°C	Monomórfico	Cerqueira-Silva et al. (2014b)

mPs-UNICAMP06	F: GTTGGATCAAAGGGTCACA R: CAACTACTGGATCGAACTGGTA	218–224	(CGTG) ₃ (ATGA) ₃	63°C	Não amplificou	Cerqueira- Silva et al. (2014b)
mPs-UNICAMP10	F: ACTCTCACCTCAATCGACC R: AATTGTTACTCCGTTTCTCTGA	256–260	(AG) ₄ (GT) ₅ (GT) ₄	60°C	Monomórfico	Cerqueira- Silva et al. (2014b)
mPs-UNICAMP11	F: CAGACGTTGTGTTTTGGTAAT R: TCAGGTTAGGAAGCTGCATC	232–270	(CA) ₄ (CA) ₄ (AT) ₄	58°C	Monomórfico	Cerqueira- Silva et al. (2014b)
mPs-UNICAMP12	F: ACAGGGGTGAGGCACATACA R: GTAGTGCGTGGCTTGGGTAG	201–204	(CA) ₄	59°C	Monomórfico	Cerqueira- Silva et al. (2014b)
mPs-UNICAMP13	F: CCTATACCTGCCAGTCAGC R: ACTTAAGCACCCCAATCGTT	146–148	(CA) ₄	58°C	Monomórfico	Cerqueira- Silva et al. (2014b)
mPs-UNICAMP14	F: CGTTCATAAGTGAATCAGTCAA R: GGATCGACAAACAAAGGTAGA	112–116	(CA) ₄	59°C	Não amplificou	Cerqueira- Silva et al. (2014b)
mPs-UNICAMP15	F: TATGGAGTTGCGAGGCTTTAG R: CGGGCAACGAACACTTTATT	145–148	(GT) ₄	58°C	Não amplificou	Cerqueira- Silva et al. (2014b)
mPs-UNICAMP16	F: GAGAAAGCGAGTCAGCGAGA R: GACTCCAATATCGGCACTTCA	157–165	(GAG) ₆ (CAA) ₄	65°C	Monomórfico	Cerqueira- Silva et al. (2014b)

mPs-UNICAMP17	F: CATCCAACCTCCGAACCTTA R: TACCCAGTCCGGTCCATTAG	142–148	(AC) ₅	60°C	Monomórfico	Cerqueira-Silva et al. (2014b)
mPs-UNICAMP18	F: GGGGTTCTTCACTCATCCAC R: TGACGACTAGGGGATTCAGG	262–278	(CA) ₁₀ (AT) ₆	57°C	Não amplificou	Cerqueira-Silva et al. (2014b)
mPs-UNICAMP19	F: CTGTGGCAAGTGGCTAACAA R: CCACCCTACTCGACCAACTC	290–294	(TG) ₄	55°C	Monomórfico	Cerqueira-Silva et al. (2014b)

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização das espécies silvestres de *Passiflora* sob vários aspectos é de fundamental importância para o melhoramento genético do maracujá comercial, visando a obtenção de plantas mais resistentes a pragas que afetam as culturas (JUNQUEIRA et al., 2005; CERQUEIRA-SILVA et al., 2016). Neste contexto, o presente trabalho fornece informações úteis para o desenvolvimento dessas estratégias de melhoramento.

A análise de anatomia foliar (Capítulo 1) realizada com as espécies *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. maliformis* e *P. setacea*, infectadas com o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), permitiu identificar a espécie *P. setacea* como a que sofreu menores alterações anatômicas em decorrência da infecção, sendo este resultado um indicativo de maior resistência ao vírus, já descrita, para esta espécie, também em avaliações de campo (JUNQUEIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2013).

Por outro lado, a espécie *P. edulis* f. *flavicarpa* foi a que apresentou maiores alterações anatômicas ao ser infectada com o vírus, como a maior desorganização do sistema vascular, a hiperplasia e hipertrofia de células parenquimáticas e depressões no limbo.

A presença de cera epicuticular cristalóide nas superfícies foliares de todas as espécies silvestres de *Passiflora* analisadas (*P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. maliformis* e *P. setacea*) e sua ausência na espécie de maracujá amarelo cultivado (*P. edulis* f. *flavicarpa*), pode ser resultante da domesticação desta última espécie.

A cera epicuticular presente nas folhas das espécies silvestres pode estar relacionada à resistência de campo ao CABMV já descrita para estas espécies (JUNQUEIRA, 2005; OLIVEIRA et al., 2013), visto que poderia afetar o processo de aquisição e transmissão do vírus pelos vetores. Estudos futuros devem ser conduzidos para elucidar essa questão e, se a cera epicuticular estiver relacionada à resistência, sua presença poderia constituir um marcador histológico importante para a seleção precoce de híbridos resistentes a este importante patógeno.

Sendo *P. setacea* a espécie com menores alterações decorrentes da infecção com o CABMV, foi analisada a diversidade de 18 populações da espécie

do estado da Bahia (Capítulo 2). Os padrões de seis loci de SSR revelaram grande diversidade genética em *P. setacea*, cujas populações apresentam moderada variabilidade e grande diferenciação interpopulacional, agrupando-se em dois grandes grupos genéticos.

Para o melhoramento genético vegetal, a existência de variabilidade genética na coleção de trabalho é fundamental para ganho genético contínuo, sendo que a ausência de diversidade simplesmente não permite que a seleção artificial possa ser desenvolvida (FERREIRA e RANGEL, 2005). Assim, a alta variabilidade observada em algumas populações de *P. setacea*, como Licínio de Almeida e Caetité, pertencentes a grupos genéticos distintos, constitui uma fonte em potencial para utilização no melhoramento genético do maracujazeiro. Estas e outras populações que apresentaram características genéticas e agrônômicas de interesse em outros estudos, a exemplo de Vitória da Conquista (PEREIRA et al., 2015a,b), devem ser priorizadas tanto em programas de melhoramento genético quanto em ações de conservação e incremento de bancos de germoplasma da espécie.

A transferência de resistência de *P. setacea* para *P. edulis*, através de cruzamentos, é considerada promissora, embora ainda devam ser feitos estudos para contornar a esterilidade dos machos híbridos e as dificuldades das metodologias de avaliação da resistência genética (FALEIRO et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2005).

Apesar da riqueza de espécies e distribuição ampla do gênero *Passiflora* em todas as regiões tropicais, a falta de pesquisas ecológicas e genéticas relativa à maioria das espécies de maracujá tornou-se um fator de risco para a conservação da sua biodiversidade (CERQUEIRA-SILVA et al., 2016). Os estudos de diversidade genética em *Passiflora*, na sua maioria, têm sido realizados com acessos mantidos em bancos de germoplasma (OLIVEIRA, 2006; PAIVA, 2013; CERQUEIRA-SILVA et al., 2012; 2014a; 2014b; entre outros). Deste modo ressalta-se a importância da realização de estudos populacionais como este, que permitam a avaliação dos padrões de diversidade natural das populações de *Passiflora* (CERQUEIRA-SILVA et al., 2016).

8 REFERÊNCIAS

CARVALHO, M.A.F.; PAIVA, R.; ALVES, E.; NOGUEIRA, R.C.; STEIN, V.C.; CASTRO, E.M.; PAIVA, P.D.O.; VARGAS, D.P. 2013. Morphogenetic potential of native passion fruit (*Passiflora gibertii* N. E. Brown.) calli. **Brazilian Journal of Botany**, **36 (2)**: 141-151.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; SANTOS, E.S.L.; CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S.; CARDOSO-SILVA, C.B.; PEREIRA, A.S.; OLIVEIRA, A.C.; CORRÊA, R.X. 2012. Genetic variation in a wild population of the 'sleep' passion fruit (*Passiflora setacea*) based on molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, **11 (1)**: 731-738.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; SANTOS, E.S.L.; VIEIRA, J.G.P.; MORI, G.M.; JESUS, O.N.; CORRÊA, R.X.; SOUZA, A.P. 2014a. New Microsatellite Markers for Wild and Commercial Species of *Passiflora* (Passifloraceae) and Cross-Amplification. **Applications in Plant Sciences**, **2 (2)**: 1300061.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; SANTOS, E. S. L.; JESUS, O. N.; MORI, G. M., CORRÊA, R. X.; SOUZA, A. P. 2014b. Molecular genetic variability of commercial and wild accessions of passion fruit (*Passiflora* spp.) targeting ex situ conservation and breeding. **International Journal of Molecular Sciences**, **15**: 22933-22959.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; FALEIRO, F.G.; JESUS, O.N.; SANTOS, E.S.L.; SOUZA, A.P. 2016. The Genetic Diversity, Conservation, and Use of Passion Fruit (*Passiflora* spp.). In: AHUJA, M.R.; JAIN, S.M. (Eds.) **Genetic Diversity and Erosion in Plants - Case Histories**. v. 2. Springer International Publishing: Switzerland. pp. 215-231.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. 2005. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro - Desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 187-209.

FERREIRA, M.E.; RANGEL, P.H.N. 2005. Emprego de espécies silvestres no melhoramento genético vegetal: experiência em outras espécies com análise de retrocruzamento avançado de QTLs (AB-QTL). In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA,

N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 111-140.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; BERNACCI, L.C. 2005. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 81-108.

MELETTI, L.M.M., SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R.S. 2005. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, pp.55-78.

OLIVEIRA, E.J.; SOARES, T.L.; BARBOSA, C.J.; SANTOS-FILHO, H.P.; JESUS, O.N. 2013. Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de resistência em condições de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **35(2)**: 485-492.

OLIVEIRA, E.J. 2006. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

OLIVEIRA, J.C.; RUGGIEIRO, C. 2005. Espécies de maracujá com potencial agrônomico. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 143-158.

PAIVA, C.L. 2013. **Descritores morfológicos e marcadores microssatélites na caracterização de germoplasma de *Passiflora* spp**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

PAULA, M.S.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S.; PEIXOTO, J.R. 2010. Caracterização genética de espécies de *Passiflora* por marcadores moleculares

análogos a genes de resistência. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **32 (1)**: 222-229.

PEREIRA, D.A.; CORRÊA, R.X.; OLIVEIRA, A.C. 2015a. Molecular genetic diversity and differentiation of populations of 'somnus' passion fruit trees (*Passiflora setacea* DC): Implications for conservation and pre-breeding. **Biochemical Systematics and Ecology**, **59**: 12-21.

PEREIRA, D.A.; CORRÊA, R.X.; OLIVEIRA, A.C. 2015b. 'Do-sono' passion fruit: ecogeographical prospecting and phenotypic dispersion in transition areas between the *caatinga* and *cerrado* of Brazil. **African Journal of Biotechnology**, **14 (3)**: 206-211.