

Estrutura Populacional e Variabilidade Genética em Populações Nativas de *Passiflora cristalina* Vanderpl. & Zappi, em Fragmentos Florestais no estado de Mato Grosso***Passiflora cristalina* Vanderpl. & Zappi in forest fragments in the state of Mato Grosso**

DOI:10.34117/bjdv6n11-234

Recebimento dos originais:08/10/2020

Aceitação para publicação:12/11/2020

Greiciele Farias da Silveira

Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas (UNEMAT)

Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT)

Endereço:Av. Perimetral Rogério Silva, Sn, 78.580-000 Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil

E-mail:greicielefarias@hotmail.com

Maicon Douglas de Souza Arenas

Mestre em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos (UNEMAT)

Doutorando em Ciências Biológicas (Botânica) da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Endereço:Av. Pedro Calmon, 550 - Cidade Universitária da Universidade Federal do Rio de Janeiro,

Rio de Janeiro - RJ, 21941-901

E-mail:Maicondouglas_biologia@hotmail.com

Tatiane Lemos Varella

Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas (UNEMAT)

Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT)

Endereço:Av. Perimetral Rogério Silva, Sn, 78.580-000 Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil

E-mail:tatvarella@gmail.com

Kátia Fabiane Medeiros Schmitt

Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas, pela Universidade Estadual do Norte Fluminense

Darcy Ribeiro - UENF (2017)

Doutoranda em Biotecnologia Vegetal pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy

Ribeiro - UENF

Endereço:Av. Alberto Lamego, 875 - Parque California, Campos dos Goytacazes – RJ

E-mail:kmedirosschmitt@gmail.com

Joameson Antunes Lima

Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas (UNEMAT)

Doutorando no Programa de Pós-graduação em Genética e melhoramento de Plantas pela

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Endereço:Av. Alberto Lamego, 875 - Parque California, Campos dos Goytacazes – RJ

E-mail:anjoamerson@gmail.com

Bruna Mezzalira da Silva

Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas (UNEMAT)

Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT)

Endereço:Av. Perimetral Rogério Silva, Sn, 78.580-000 Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil

E-mail;bruna_mezzalira@hotmail.com

Juliana de Freitas Encinas Dardengo

Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia (BIONORTE-MT)

Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT)

Endereço: Av. Perimetral Rogério Silva, Sn, 78.580-000 Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil

E-mail: julianadardengo@outlook.com

Ana Aparecida Bandini Rossi

Doutorado em em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa

Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT)

Endereço: Av. Perimetral Rogério Silva, Sn, 78.580-000 Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil

E-mail: anabanrossi@unemat.br

RESUMO

Passiflora cristalina é uma espécie nativa da Amazônia Meridional com ocorrência natural no Município de Alta Floresta, MT. A espécie por ter sido recentemente descrita apresenta poucos estudos, sendo uma espécie de grande potencial para estudos de conservação e melhoramento genético. O presente estudo objetivou avaliar a diversidade genética de populações nativas de *P. cristalina* por meio de marcador molecular SSR. Para o estudo foram selecionadas duas populações denominadas: ECE (estrada central) e EPA (Estrada Porto de areia) e amostrados um total de 50 indivíduos, sendo 25 provenientes de cada população, dos quais foram coletadas folhas para extração de DNA genômico. As amplificações foram realizadas via PCR com o emprego de 8 *primers* SSR. O número de alelos por loco variou de 3 a 10, com média de 5,62, e um total de 45 alelos para os 8 locos avaliados. A heterozigotidade esperada apresentou média de 0,71, enquanto que o número de alelos efetivos apresentou uma média de 4,05. O GST variou de 0,26 a 1,78, com uma média de 0,83, refletindo um nível de diferenciação entre as populações de *P. cristalina* e o fluxo gênico (Nm) apresentou uma média de 1,16. A AMOVA revelou que a maior parte da variabilidade encontra-se dentro das populações (65%) do que entre as populações (35%). O dendrograma gerado pelo método UPGMA possibilitou a formação de dois grupos distintos, assim como no agrupamento do "Structure", demonstrando que os indivíduos ficaram alocados em suas respectivas populações. Devido aos elevados níveis de diversidade detectados no presente estudo nas duas populações confirmadas pela diversidade genética é de grande importância que sejam realizadas estratégias que visem a caracterização, conservação e prospecção desse material.

Palavras-Chave: Maracujá, Variabilidade Genética, Marcador molecular (SSR).

ABSTRACT

Passiflora cristalina Vanderpl. & Zappi is a native species of the Meridional Amazon with naturally occurring in the municipality of Alta Floresta, MT. The species has few studies for having been recently described, with a sort of great potential for conservation and breeding studies. This study aimed to evaluate the genetic diversity of native populations of *P. cristalina* through SSR molecular marker. For the study we selected two populations denominated: ECE (central road) and EPA (road sand port) and sampled a total of 50 individuals, 25 from each population, of which leaves were collected for genomic DNA extraction. The amplifications were performed by PCR with the use of 8 SSR primers. The number of alleles per locus ranged from 3 to 10, with an average of 5,62, and a total of 45 alleles for the 8 loci evaluated. The expected heterozygosity presented an average of 0,71, while the number of effective alleles reported an average of 4,05. The GST ranged from 0,07 to 0,53, with an average of 0,25, reflecting a level of differentiation between the populations of *P. cristalina* and gene flow (Nm) reported an average of 1,16. The AMOVA revealed that most of the variability is within populations (65%) than among populations (35%). The dendrogram generated by UPGMA method allowed the formation of two distinct groups, as well as in the group of "Structure", showing

that individuals were allocated to their respective populations. Due to high levels of diversity found in this study in both groups confirmed genetic diversity is of great importance that strategies are carried out aimed at the characterization, conservation and exploration of this material.

keywords: Passion fruit, Genetic variability, Molecular markers (SSR).

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* é o mais importante da Família Passifloraceae, por possuir espécies que têm valor econômico e por conter maior número de espécies (Milward-de-Azevedo e Baumgratz, 2004). Cerca de 530 espécies pertencem a este gênero. Destas, aproximadamente 150 são originárias do Brasil, o que o torna um dos maiores centros de diversidade genética (Cervi, 2006) com uma ampla variabilidade intra e interespecífica (Manica, 1981).

Entretanto, as modificações causadas pela ação antrópica tem promovido a destruição do seu ambiente natural, tornando o processo de fragmentação de ecossistemas cada vez mais acentuada, afetando assim, de forma negativa a biodiversidade existente.

Ambientes fragmentados comportam um menor número de espécies, mantendo, por sua vez, menor diversidade genética (Zuidema et al., 1996), o que pode ocasionar o aumento dos níveis de endogamia nas populações e modificações nas interações bióticas como a polinização, dispersão de sementes, predação e na herbivoria (Castellen et al., 2005).

Bellon et al. (2007), relatam que espécies silvestres são alternativas para ampliação da base genética de resistência a diversas doenças, que podem ser combinadas com características de produtividade e qualidade de frutos de espécies cultivadas.

P. cristalina é uma espécie nativa da Amazônia Meridional, recentemente descrita por Vanderplank e Zappi (2011). Esta espécie apresenta potencial ornamental, devido à beleza de suas flores, os frutos são utilizados como fonte de alimento por muitas espécies de animais silvestres, tais como pássaros, macacos e alguns roedores. Podendo ainda, ser fontes de propriedades farmacológicas, fonte de genes de resistência para algumas espécies cultivadas, além de suas propriedades nutricionais para o consumo *in natura*. Sendo assim são de extrema importância que sejam realizados estudos em populações naturais da espécie em estudo visando sua caracterização e conseqüentemente sua utilização e inclusão em programas de melhoramento.

Os marcadores moleculares são ferramentas úteis para a caracterização das espécies, pois essa caracterização pode ser realizada em uma maior velocidade, qualidade e em larga escala (Santos et al., 2020). Além de permitir estimar a alteração na frequência alélica, a perda ou fixação de alelos e a diversidade genética das populações.

Dentre os marcadores disponíveis, os microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) são amplamente utilizados em estudos genéticos e de conservação genética (Santos et al., 2010). Esta

ampla aplicação deve-se ao fato de que os SSR são codominantes e multialélicos, altamente reprodutíveis, têm ampla resolução e são baseados na reação em cadeia da DNA *polimerase* (PCR) (Oliveira et al., 2006).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade genética de duas populações de *P. cristalina* que ocorrem naturalmente no Município de Alta Floresta – MT, por meio de marcador molecular SSR, com o intuito de verificar se o perímetro urbano de Alta floresta constitui uma barreira para o fluxo gênico entre as duas populações da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

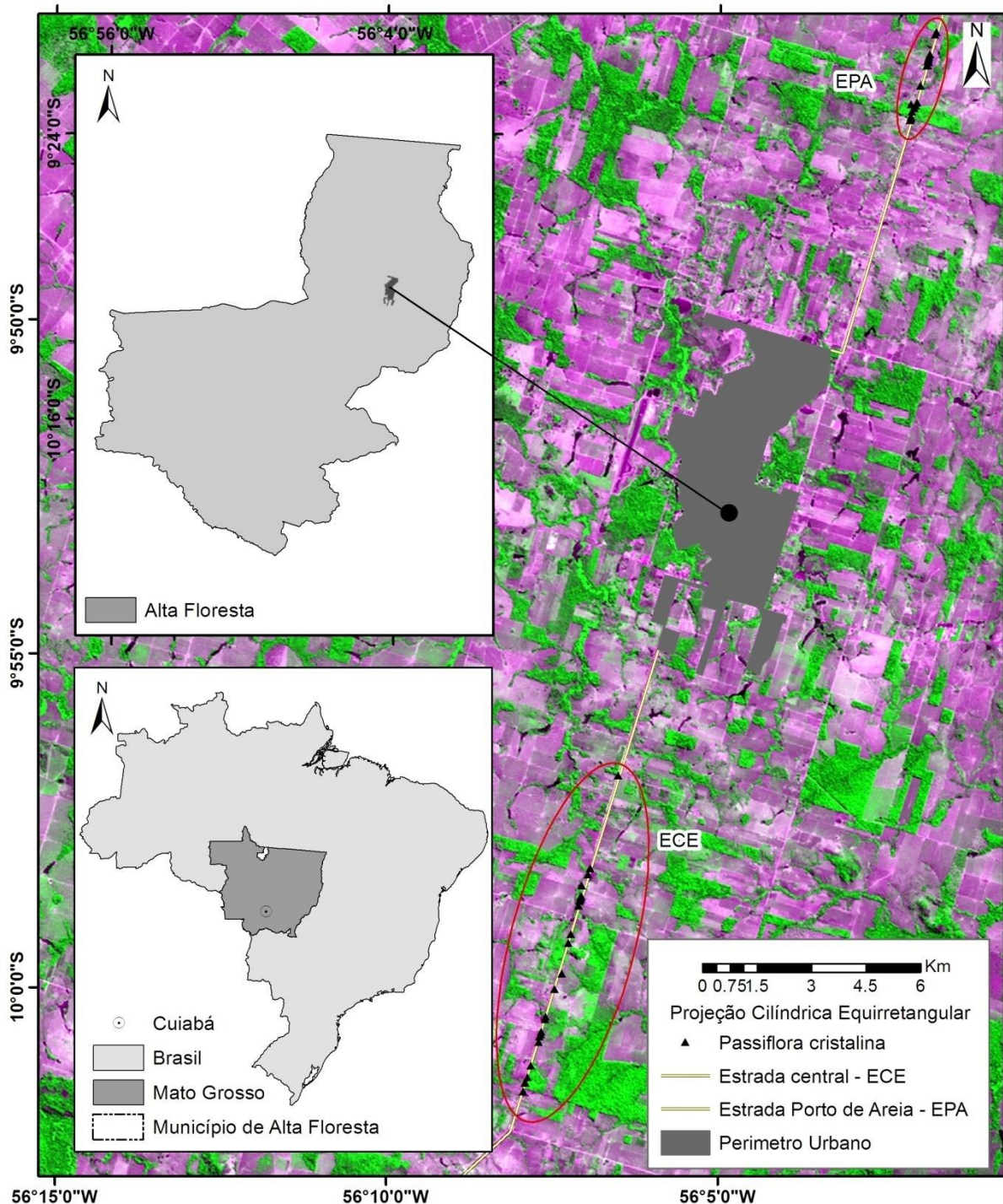
Área de estudo

O presente estudo foi realizado em duas áreas na Amazônia meridional, localizadas no Município de Alta Floresta, região norte do estado de Mato Grosso (Figura 1). As áreas foram selecionadas com base na ocorrência natural de populações de *Passiflora cristalina*. Em cada população foram amostrados 25 indivíduos, os quais foram georreferenciados através das coordenadas UTM com GPS.

A primeira população está localizada na Estrada Porto de areia, na Zona Rural do Município de Alta Floresta e foi denominada população (EPA). Os indivíduos desta população estão predominantemente localizados nas bordas dos fragmentos florestais, alguns genótipos encontram-se isolados em pequenos e esparsos fragmentos devido ao processo de antropização desta região, principalmente para a criação de pastagens.

A segunda população foi denominada Estrada central (ECE), também é uma área localizada na Zona rural de Alta Floresta, e apresenta uma maior quantidade de vegetação se comparado à população anterior. As amostras em sua grande maioria foram coletados indivíduos nas bordas dos fragmentos florestais.

FIGURA 1: Mapa da área de estudo. Com destaque para o município de Alta Floresta, MT e a localização das duas áreas de estudo. Estrada Porto de areia (EPA) e Estrada central (ECE).



Material vegetal

Para a análise da diversidade genética foram coletados 50 genótipos, sendo 25 provenientes de cada uma das populações em estudo. A amostragem foi realizada de maneira aleatória, com o maior espaçamento possível entre indivíduos.

De cada genótipo foi coletado folhas jovens, expandidas e sadias, para extração de DNA. O material coletado foi devidamente identificado e acondicionado ainda em campo em recipientes

contendo sílica gel. Posteriormente, as folhas foram armazenadas em freezer a -20°C no Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), Campus Universitário de Alta Floresta – MT, para posterior extração de DNA.

Extração e quantificação de DNA

O DNA genômico total foi extraído de aproximadamente 100 mg de folhas, usando o método de CTAB descrito por Doyle e Doyle (1990), com modificações adequadas para a espécie em estudo, como o aumento da concentração de polivinilpirrolidona (PVP) de 1% para 2%, aumento do β -mercaptoetanol de 0,2% para 3% no tampão de extração, além da redução do tempo de incubação. A confirmação da qualidade e quantidade do DNA extraído foi realizada por meio da eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA extraído foi comparado com DNA padrão (*lambda*) com amplitude de variação de 10, 20, 50 e 100 ng/ μL . O DNA quantificado foi diluído para a obtenção das soluções de trabalho a 3ng/ μL .

Amplificação via de PCR

Foi testado a transferibilidade de vinte e um pares de *primers* microssatélites (SSR) desenvolvidos para *P. edulis* (Oliveira, 2006) e para *P. alata* (Pádua et al., 2005). A amplificação inicial foi realizada em 04 indivíduos de *P. cristalina* visando à seleção dos iniciadores. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador MJ 96 (Biocycler®) com um volume final de 13 μL , sendo 0,5 μL de DNA; 1,5 μL de tampão 10x (1M KCL; 1M Tris PH 8.3; 10% Tween 20), 3,38 μL de H_2O ; 0,5 μL de MgCl_2 (50 mM); 2 μL de cada primer (0,2 mM); 3 μL dNTP (0,1 mM de cada dNTP) e 0,12 μL de Taq polimerase (5U/ μl).

O programa de amplificação utilizado foi proposto por Oliveira (2006) com um ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 40 segundos, 55°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Entretanto para os iniciadores PE75 e PE41 foi utilizado o programa de amplificação estabelecido por Paiva (2013), uma vez que produziu melhores resultados, com um ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos e uma extensão final 72°C por 7 minutos. Foram realizados vários Testes para adequar à temperatura de cada primer, entretanto, à temperatura que apresentou os melhores resultados para os primers foi à de 55°C , sendo padronizada para todas as reações.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 3% em tampão de corrida TBE 1X, em voltagem aproximada de 90V por cerca de quatro horas. A coloração do gel foi realizada com brometo de etídeo (0,6 ng/mL). Para comparação dos tamanhos dos fragmentos amplificados foi utilizado o DNA Ladder de 100 pb (Invitrogen™). Em seguida o gel foi

fotografado com auxílio de uma câmera digital (Sony®) quando irradiado por luz ultravioleta pelo Transiluminador UVB LTB-21x26 (Iocuss biotecnologia®).

Análise dos dados

Os fragmentos de SSR obtidos dos produtos de amplificação foram analisados no programa GelQuantPro® (DNR, 2006) para a construção de uma matriz com base no tamanho das bandas (pb) encontradas nos géis. Os dados da matriz foram analisados pelo programa GenAlEx 6.5® (Peakall e Smouse 2006, 2012) para a obtenção da análise das coordenadas principais (PCoA) e da análise variância molecular (AMOVA), que foi utilizado para inferir sobre a estrutura genética das populações por meio da decomposição total nos componentes entre e dentro das populações. Através do programa GenAlEx foi realizada também a análise descritiva geral, onde foi inferido a diversidade genética, heterozigosidade esperada, número de alelos e número de alelos efetivos.

O programa Power Marker V.3.25 (Liu e Mouse, 2005), foi aplicado para a determinação da matriz dos valores de distância genética de Nei (1983) entre os indivíduos, foram geradas pelo programa Power Marker V.3.25 e posteriormente importada para o programa MEGA 6.5 (Kumar et al. 2004) para a construção do dendrograma através do método UPGMA.

O programa “Structure” (Pritchard et al., 2000), baseado em estatística bayesiana foi utilizado para inferir o número de grupos (k). Foram realizadas 20 corridas para cada valor de K, 200.000 “burn-ins” e 500.000 simulações de Monte Carlo de Cadeias de Markov (MCMC). Para definição do K mais provável em relação aos propostos foram utilizados os critérios de Pritchard e Wen (2004) e também o critério de Evano et al. (2005), sendo os resultados enviados para o site Structure Harvester (Earl, 2012).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos vinte e um *primers* testados, oito mostraram-se efetivos na amplificação do genoma de *P. cristalina*, desta forma foram utilizados na análise da diversidade genética de *P. cristalina* (Tabela 1).

TABELA 1: *Primers* SSR utilizados para a amplificação dos indivíduos *P. cristalina* amostrados nas duas populações. TA: Temperatura de anelamento.

| Loco | Motivo | TA (°C) | Tamanho esperado (pb) |
|--------|-----------------------|---------|-----------------------|
| AF08P1 | (TG) ₉ | 58 | 105 |
| PE11 | (GT) ₁₁ | 58 | 178 |
| PE37 | (TG) ₈ | 60 | 232 |
| PE38 | (TG) ₈ | 58 | 215 |
| PE41 | (TTAA) ₅ | 60 | 220 |
| PE66 | (AC) ₉ | 60 | 165 |
| PE74 | (ATCACA) ₅ | 58 | 215 |
| PE75 | (TG) ₁₇ | 60 | 178 |

O número de alelos por loco variou de 3 (A08FP1) a 10 (PE75), com média de 5,62, obtendo-se um total de 45 alelos para os 8 locos avaliados (Tabela 2). Variação alélica semelhante foi encontrada por Cazé et al., (2012), ao caracterizarem locos de SSR desenvolvidos para *P. contracta* e por Cerqueira-Silva et al. (2012) ao trabalhar com *P. edulis*, onde foi observado-se que número de alelos por loco variou de 2 a 9, com média igual a 5, para as ambas as espécies. O número efetivo de alelos (N_e) variou de 2,14 (PE74) a 5,94 (PE66) apresentando uma média de 4,05. Castro (2008) ao trabalhar com acessos de *Passiflora* obteve valores relativamente superiores aos observado neste estudo, onde o número efetivo de alelos foi de 7,38 para *P. edulis*; 6,30 para *P. cincinnata*; 10,00 para *P. alata* e 6,92 na espécie *P. setacea*.

TABELA 2: Locus, número de alelos (Na), número de alelos efetivos por locus (N_e) e diversidade genética (H_e)

| Locus | Na | N_e | H_e |
|--------|------|-------|-------|
| AF08P1 | 3 | 2,790 | 0,642 |
| 11 | 3 | 2,989 | 0,665 |
| 37 | 8 | 3,969 | 0,748 |
| 38 | 4 | 3,179 | 0,685 |
| 41 | 5 | 4,392 | 0,772 |
| 66 | 9 | 5,944 | 0,832 |
| 74 | 3 | 2,148 | 0,534 |
| 75 | 10 | 7,003 | 0,857 |
| Total | 45 | - | - |
| Média | 5,62 | 4,05 | 0,71 |

A heterozigotidade esperada ou diversidade gênica apresentou uma média de 0,71, com um mínimo de 0,53 no loco PE74 e um índice máximo de 0,85 para o loco PE75. Na literatura, vários trabalhos de diversidade genética são descritos para espécies de *Passiflora* como os observados por Paiva (2013) ao trabalhar com 56 acessos de espécies do gênero *Passiflora*, onde obteve uma heterozigotidade esperada com uma média de 0,57, que variou de 0,33 (PE37) a 0,69 (PE08). Enquanto, que Oliveira (2005) ao trabalhar com *P. Edulis* obteve $H_e = 0,54$ e Cerqueira-silva (2012) com *P. Cincinnata* $H_e = 0,51$, Já Reis et al. (2011), ao estudar populações de dois ciclos de seleção recorrente de *P.edulis*, obteve $H_e = 0,20$.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) revelou que a maior variabilidade genética encontra-se distribuída dentro (65%) do que entre as populações com (35%). Loss, (2006) ao estudar *Passiflora alata* Curtis observou que a maior parte do total de variação genética foi expressa entre os indivíduos dentro das populações (57,44%), enquanto que o restante (42,56%) foi entre as populações. A alta variabilidade dentro da população pode ser influenciada pelo modo de reprodução, sistema de cruzamento, tamanho da população, distribuição geográfica e fluxo gênico (Hamrick, 1982).

O Dendrograma gerado com todos os indivíduos analisados a partir da distância de NEI pelo método UPGMA (Figura 2), possibilitou a formação de dois grupos, sendo os indivíduos alocados em suas respectivas populações. Revelando que existe uma maior similaridade genética entre os genótipos de cada população.

Figura 2: Dendrograma gerado a partir da distancia de NEI pelo método UPGMA dos indivíduos de *P. cristalina* das duas populações amostradas.



O grupo I foi formado pelos indivíduos da população EPA (genótipos de 1-25). Neste agrupamento pode ser detectado a formação de três subgrupos, sendo o subgrupo IA constituído pelos indivíduos 1,2,3,4,5; o subgrupo IIA pelos indivíduos 6,7 e o subgrupo IIIA 8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19 e 20. Os indivíduos mais similares geneticamente na população EPA são os 17 e 18 e os dissimilares 12,16 e o 10.

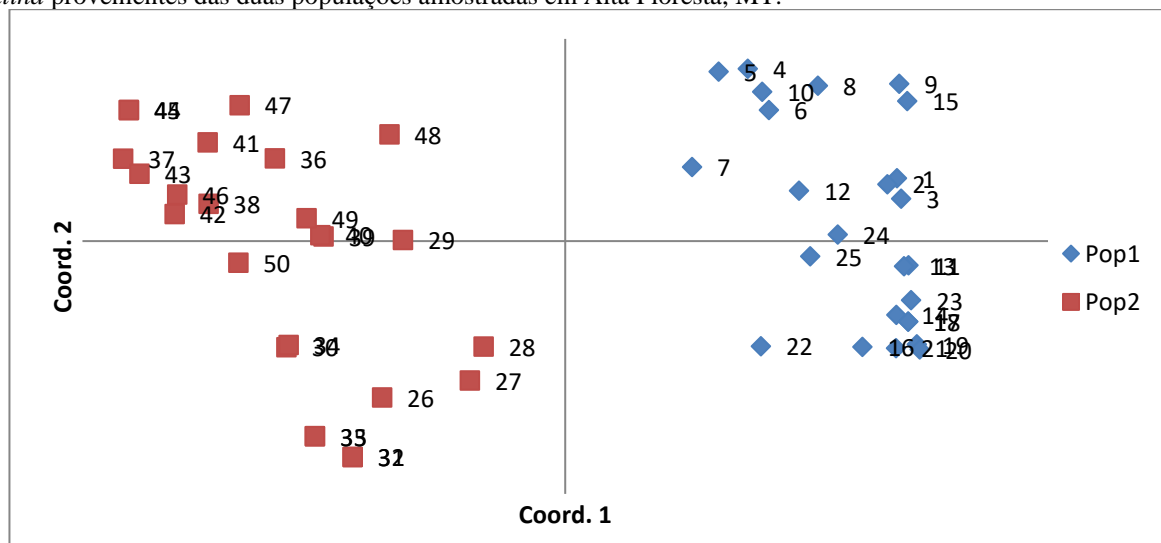
O grupo II foi formado pelos indivíduos da população da ECE (genótipos do 26-50). Neste agrupamento pode ser detectado a formação de quatro subgrupos, sendo o subgrupo IB 26,27, 28, 29

e 48; o subgrupo IIB 39, 40; IIIB 31,32,33,34,35 e o IVB 30, 36,37, 38,42,43,44,45,46, 47, 49 e 50. Nesta população, os resultados revelaram quatro pares de indivíduos similares geneticamente (32-31; 33-35; 41-37 e o 44-45) e mais dissimilar, indivíduo 47.

De acordo com o agrupamento apresentado na Figura 2, a maioria dos genótipos apresentam dissimilaridade genética, sendo recomendados para futuros programas de melhoramento e de conservação genética da espécie. Pois segundo Wagner Júnior, (2011), o uso de medidas da divergência genética, obtidas antes que qualquer cruzamento seja realizado, poderá auxiliar o melhorista a concentrar seus esforços nas combinações mais promissoras, aumentando a eficiência dos programas de melhoramento.

A diversidade genética de *P. cristalina* também foi avaliada por meio da análise de coordenadas principais (PCoA). As coordenadas principais explicaram 69,41% da variação total entre as amostras, sendo que o primeiro componente revelou cerca de 37,59 da variação entre as amostras, o segundo componente explicou 18,83% e o terceiro 12,99 % (Figura 3).

Figura 3: Dispersão gráfica a partir da análise das coordenadas principais (PCoA) dos 50 indivíduos de *Passiflora cristalina* provenientes das duas populações amostradas em Alta Floresta, MT.



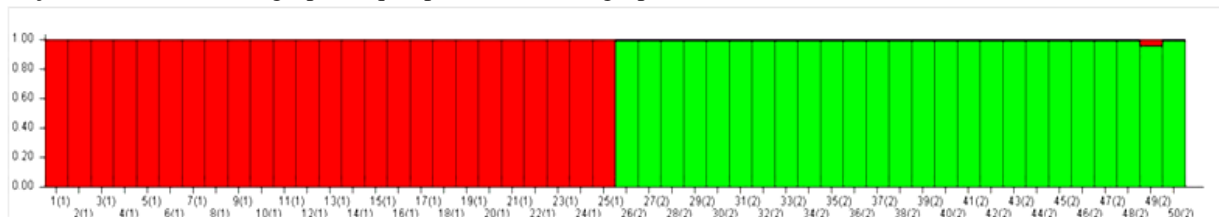
Neste estudo, como as populações encontram-se na Zona rural do Município de Alta Floresta, a cidade pode estar atuando como uma barreira geográfica, fator que pode interromper o fluxo gênico, pois as chances das sementes e polens serem dispersos e alcançar outras populações são menores. Segundo Lutz et al. (2000) as populações podem ser separadas por alguma barreira ou mesmo isoladas pela distância entre elas, favorecendo assim o nível de endocruzamentos e a fixação de alelos deletérios nestas populações.

O Programa “Structure” foi utilizado para representação dos grupos. Segundo Pritchard & Wen (2004) número de grupos formados pode ser pré-determinado, mas são os dados que definem o K (número de grupos), cujo valor mais confiável é estimado pelo menor número com valor negativo de

Ln e pelo menor desvio padrão encontrado durante a análise estatística.

Através do Structure constatou que o melhor k encontrado foi para a representação de dois grupos (k=2), (Figura 4). Sendo o grupo I formado pelos genótipos do 1 ao 25 e o grupo II pelos genótipos do 26 ao 50.

Figura 4: Representação da distribuição dos 50 indivíduos de *Passiflora cristalina* em grupos segundo dados moleculares de 8 primers SSR, utilizando o programa "Structure". Os indivíduos estão representados por barras verticais com colorações de acordo com o grupo ao qual pertencem (dois grupos, K=2).



Os dados obtidos através da análise de Coordenadas principais, dendograma corroboram com os dados apresentados no Structure, demonstrando que os indivíduos ficaram alocadas em suas populações de acordo com o relacionamento genético e a proximidade geográfica.

4 CONCLUSÕES

Os marcadores microsatélites utilizados neste estudo revelaram uma alta diversidade gênica nos indivíduos das populações de *P. cristalina*, porém uma baixa heterozigosidade foi observada, ou seja, há um grande número de alelos diferentes na população, porém os indivíduos apresentam-se em homozigose para os locos estudados.

P. cristalina apresentou uma maior variabilidade genética a nível intrapopulacional do que interpopulacional, o que pode estar correlacionado com o sistema de reprodução da população ou com a distribuição geográfica dessas populações, podendo então, o perímetro urbano de Alta Floresta estar atuando como uma barreira geográfica, interrompendo o fluxo gênico, pois as chances das sementes e polens serem dispersos e alcançar outras populações são menores.

A conservação populações naturais de *P. cristalina* são importantes para subsidiar futuros programas de melhoramento genético e conservação dos recursos genéticos, por possuírem uma grande variação de alelos.

REFERÊNCIAS

- BELLON, G., FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, K.P., JUNQUEIRA, N.T.V.. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 29:124-127.2007.
- CASTELLEN, M. S.; CERVI, A. C.; AMARAL, W. A. N. **O gênero *Passiflora* L. nos Tabuleiros Costeiros**. Recursos genéticos dos tabuleiros e seus ecossistemas associados- fruteiras. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. 2005.32p.
- Castro. J. A. **Conservação dos recursos genéticos de *passiflora* e seleção de descritores mínimos para caracterização de maracujazeiro**. Cruz das Almas, Bahia. da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura 2012.84p.(Dissertação – Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais).
- CAZÉ A.L.R.; KRIEDT, R.A.; Beheregaray, L.B.; Bonatto S.L.; Freitas, L.B. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Passiflora contracta*. **International Journal of Molecular Sciences**.13:11343-11348.2012.
- CERVI, A.C. **O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950**. Adumbrationes ad Summae Editionem.16:1-5. 2006.
- CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; SANTOS, E.S.L.; SOUZA, A.M., MORI, G.M.; OLIVEIRA, E.J.; Corrêa, R.X.; SOUZA, A.P. Development and characterization of microsatellite markers for the wild South American *Passiflora cincinnata* (Passifloraceae). **American journal of botany**.99:170-172.2012.
- DOYLE, J.J; DOYLE, J. L.A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**.19:11–15.1987
- EARL, D. A.; VON H.; BRIDGETT M. **STRUCTURE HARVESTER: A WEBSITE AND PROGRAM FOR VISUALIZING STRUCTURE** output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**.4: 359-361 2012.
- EVANO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**.14: 2611–2620. 2005.
- GELQUANT PRO. **DNR Bio-Imaging Systems**.2006. Disponível em: <http://www.dnr-is.com/Product.asp?Par=3.19&id=81>. Acesso em 14 de dezembro de 2013.
- HAMRICK, J.L. **Distribution of genetic whitin and among natural forest population**. In: CHAMBERS, S.M.; MACBIDE, B. & THOMAS, W.L. (Eds.) Shonewald-cox. 1982.
- HERNAN, L.Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. **Genetic Resources and Crop Evolution**. 56: 277-292.2009.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**. 5: 150-163. 2004.
- LOSS, A.C.C.; LEITE, YLR.; LOURO ID.; BATITUCCI MCP. Diversidade genética de populações de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) no estado do Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line** 4:55-61.2006.

LIU K., MUSE S. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics** 21: 2128–2129.2005.

Lutz E, Schneller J & Holderegger R. Understanding population history for conservation purposes; population genetics of *Saxifraga aizoides* (Saxifragaceae) in the lowlands and lower mountains north of the Alps. **American Journal of Botany**. 87: 583-590.2000.

MANICA, I. Fruticultura tropical: maracujá. São Paulo: **Agronômica Ceres**.1981. 160p.

MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; BAUMGRATZ, J.F.A. *Passiflora* L. subgênero Decaloba (DC.) Rchb.(Passifloraceae) na Região Sudeste do Brasil. **Rodriguésia**, 55:17-54. 2004.

NUNES, T. S. **Estudos sistemáticos em *Passiflora* L. subgênero *Deidamioides* (Harms) Killip (Passifloraceae)**. Feira de Santana, Bahia.Universidade Estadual de Feira de Santana.2009.214p. (Tese-Doutorado em Botânica).

OLIVEIRA, E. J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**.Piracicaba.Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2006.152p.(Tese- Doutorado em Agronomia).

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

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Molecular Ecology Notes**. 5: 331–333.2005.

PÁDUA, J.G.; OLIVEIRA, E.J.; ZUCCHI, M.I.; OLIVEIRA, G.C.X.; CAMARGO, L.E.A.; VIEIRA, M.L.C. Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: Passifloraceae). **Molecular Ecology Notes**. 5: 863-865.2005.

PAIVA, C.L.; **Descritores morfológicos e marcadores microssatélites na caracterização de germoplasma de *Passiflora* spp**. Campos Goytacazes, Universidade estadual do norte Fluminense Darcy Ribeiro.2013.73p. (Dissertação-Mestrado em Genética e melhoramento de plantas).

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

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

PRITCHARD, J.K. & WEN W. **Documentation for structure software: Version 2.1**. 2004.

REIS, R.V.; OLIVEIRA, E.J.; VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.S. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro-amarelo detectada por marcadores microssatélites, **Revista Brasileira de Fruticultura**.46: 51–57.2011.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R.; RODRIGUES, M. A.; RIBEIRO, H. L. C. Caracterização molecular de cultivares de cebola com marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**.45:49-55.2010.

SANTOS, S. K. S.; ORTEGA J. R.; ROCHA, G. P.; MELO, A. F.; OLIVEIRA, D. A.; BRANDÃO, M. M.; ROYO, V. A.; MENEZES, E. V. Transferabilidade de marcadores SSR, diversidade e estrutura genética de *Syagrus oleraceae*. **Brazilian Journal of Development**. 6(8): 59931-59947. 200
DOI:10.34117/bjdv6n8-417

VANDERPLANK. J.; ZAPPI, D. *Passiflora cristalina*, a striking new species of Passiflora (Passifloraceae) from Mato Grosso, Brazil. **Kew Bulletin**. 66: 149-153. 2011.

WAGNER JÚNIOR, A. et al. Avaliação da necessidade de frio de pessegueiro por meio de ramos enxertados. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 31: 1054-1059. 2009.

ZUIDEMA, P. A., SAYER, J. A. & DIJKMAN, W. Forest fragmentation and biodiversity: the case for intermediate-sized conservation areas. **Environmental Conservation**. 23: 290-297.1996.