

## Diversidad genética en seis especies de *Passiflora* spp utilizando RAPD

### Genetic diversity in six species of *Passiflora* spp. using RAPD

I. Pérez-Almeida, S. Vásquez, D. Pérez y E. Salazar

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Apartado postal 4653  
Maracay-2101-A Estado Aragua, Venezuela.

#### Resumen

Se utilizaron marcadores RAPD para estudiar la diversidad genética de algunas especies de *Passiflora* presentes en el banco de germoplasma del INIA-CENIAP en Venezuela. Se caracterizaron molecularmente seis genotipos: una especie cultivada y cinco especies silvestres de *Passiflora* spp colectados en diversas regiones del país. La extracción de ADN se realizó utilizando el método modificado del CIAT. Sesenta (60) iniciadores decaméricos RAPD generaron un total de 763 posiciones de bandas polimórficas discriminantes, revelando altos niveles de diversidad entre las especies estudiadas. En el estudio interespecífico por análisis de conglomerados obtenido por el coeficiente de asociación de Ward (distancia Dice para datos no estandarizados), se encontró una correlación cofenética de 0,858 y la formación de 3 grupos discriminantes. El grupo I separó al genotipo cultivado de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* del resto de *Passifloras* silvestres reflejando una diferencia significativa; el grupo II conformado por *P. foetida* y *P. maliformis* y el grupo III conformado por *P. subpeltata*, *P. cincinnata* y *P. giberti*. Estos dos grupos con genotipos de *Passiflora* silvestre, se encuentran distanciados en más de 82% de *P. edulis*. Cada especie posee su patrón molecular específico. El análisis para las seis especies de *Passiflora* reflejó diferencias entre ellas, existiendo una alta diversidad basada en la presencia de patrones de bandas distintas. La variabilidad encontrada en el género puede deberse al hecho de que algunas especies son alógamas, auto-incompatibles y se cruzan con facilidad.

**Palabras clave:** *Passiflora* spp, marcadores moleculares, RAPD, diversidad genética.

## Abstract

RAPD markers were used to study the genetic diversity in the *Passiflora* germplasm bank of INIA-CENIAP in Venezuela. Six genotypes were molecularly characterized: one cultivated species and five wild type species, collected in diverse regions of the country. DNA extraction was performed according to the modified CIAT method. Sixty 10-mer RAPD primers were used and generated 763 polymorphic discriminating bands revealing high levels of diversity among the studied species. A cluster analysis was made using the Ward linkage method (Dice distance for non standardized data). A cophenetic correlation of 0.858 was found and all the species were associated into three discriminating groups. Group I separated *P. edulis f flavicarpa* from the wild type *Passiflora* with a statistical significant difference. Group II was formed by *P. foetida* and *P. maliformis*, and group III was conformed by *P. subpeltata*, *P. cincinnata* and *P. giberti*. These last two groups contained the wild type *Passiflora*, and they differed in more than 82% from *P. edulis*. Each species had its specific molecular patterns. The analysis showed differences among the six species indicating high genetic diversity based on the presence of distinct band patterns. Variability encountered in the genera could be probably due to being allogamic, autoincompatible species and amenable to intercross.

**Key words:** *Passiflora* spp, molecular markers, RAPD, genetic diversity.

## Introducción

La familia Passifloraceae posee 18 géneros y 630 especies (Vanderplank, 1991) distribuidas principalmente en la América tropical. En Venezuela existe una amplia diversidad de *Passifloras* que crecen desde el nivel del mar hasta altitudes cercanas a los 3000 msnm. Se estima que existen alrededor de 90 especies de *Passiflora* en el país (Pérez *et al.*, 2001), basado en los datos de herbarios nacionales y en las colectas realizadas por INIA con apoyo del IPGRI (actualmente Bioersity International) a partir del año 1995. En su mayoría son especies silvestres, poco conocidas, a pesar de ser Venezuela uno de los centros de diversidad de la familia (Pérez *et al.*, 2001).

## Introduction

Passifloraceae family has 18 genera and 630 species (Vanderplank, 1991) mainly distributed in the Tropical America. In Venezuela there is a wide diversity of *Passifloras* grown from sea level to altitude close to 3000 masl. There are around 90 species of *Passiflora* in country (Pérez *et al.*, 2001), based on national herbaria data and in the collections made by INIA with support of IPGRI (Biodiversity International) since 1995. They are mainly wild species, little known, despite being Venezuela one of centers of family diversity (Pérez *et al.*, 2001).

The genetic investigation in these species is recent in Venezuela. Nowadays, characterization and

La investigación genética en estas especies es incipiente en Venezuela. Actualmente la caracterización y evaluación de poblaciones silvestres y cultivadas de *Passifloras* tiene una alta prioridad en los países andinos debido a su potencial para el desarrollo y diversificación de cultivos (Vanderplank, 1991). De esta forma se incrementa la importancia estratégica de preservar especies silvestres en los bancos de germoplasma debido a su uso potencial en el mejoramiento de las especies cultivadas y la posible generación de nuevos usos al aumentar el conocimiento sobre las especies conservadas.

Adicionalmente, el conocimiento de la diversidad genética, permite minimizar el riesgo de pérdida de germoplasma debido a enfermedades epifíticas, asegurando la estabilidad de los rendimientos de las especies cultivadas por su resistencia a insectos plagas, enfermedades y presiones ambientales (Bourlaug, 1994). De esta manera, se contribuye a generar una agricultura sustentable y sostenible (Browning, 1995).

Dada la importancia económica, social y florística del género *Passiflora* en Venezuela, en el INIA-CENIAP Maracay, estado Aragua, se cuenta con una colección de germoplasma, donde se caracterizan los materiales morfológica, agronómica y molecularmente.

En el caso de la caracterización molecular, se aplican marcadores moleculares basados en el ADN debido a su estabilidad y poca dependencia del ambiente. Varios estudios reportan el uso de fragmentos de ADN polimórficos amplificados al azar

evaluation of wild and cultivated populations of *Passifloras* has a high priority in the Andean countries because of its potential for crop developing and diversification (Vanderplank, 1991). In this way, increases the strategic importance increases to preserve wild species in germplasm banks because its potential use in breeding cultivated species and the possible generation of new uses when increasing knowledge about the preserved species.

Additionally, knowledge of genetic diversity permit to reduce the risk of germplasm losses due to epiphytic diseases, ensuring yield stability of cultivated species yield because its resistance to pests insects, diseases and environmental pressures (Bourlaug, 1994). In this way, there is a contribution to generate a sustainable agriculture (Browning, 1995).

Due to the economic, social and floristic importance of *Passiflora* genus in Venezuela, in the INIA-CENIAP Maracay, Aragua state, there is a germplasm collection where the morphological, agronomic and molecular materials are characterized.

In case of molecular characterization, molecular primers based on the DNA due to its stability and little environmental dependence is applied. Several studies report the use of Random amplified polymorphic DNA fragments (RAPD, by its English abbreviation) in characterization of genetic diversity of *Passiflora* (De Andrade *et al.*, 2002; Fajardo *et al.*, 1998; Viana *et al.*, 2003) and in genetic mapping for

(RAPD, por sus siglas en inglés) en la caracterización de la diversidad genética de *Passiflora* (De Andrade *et al.*, 2002; Fajardo *et al.*, 1998; Viana *et al.*, 2003) y en el mapeo genético para mejoramiento (Carneiro *et al.*, 2002). El estudio de las especies *Passiflora edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. amethystina*, *P. caerulea*, *P. cincinnata*, *P. coccinea*, *P. serrato-digitata*, *P. foetida*, *P. maliformis*, *P. alata*, *P. giberti*, *P. laurifolia*, *P. macrocarpa*, *P. nitida*, *P. setacea*, *P. suberosa*, *P. coriacea*, *P. ligularis*, *P. capsularis* por medio de marcadores RAPD (Cassiano *et al.*, 1998) demostró la validez de la técnica para estimar la diversidad genética además de la posibilidad de caracterizar híbridos, permitiendo la caracterización del género y el establecimiento de relaciones entre las especies.

La aplicación de la técnica RAPD es simple, rápida, de relativo bajo costo y accesible, que permite obtener marcadores genéticos para estudios de mapeo genético, genética de poblaciones, sistemática molecular, huella genética y selección asistida (Azofeifa, 2006; Carneiro *et al.*, 2002).

El objetivo de este trabajo consistió en el análisis de la diversidad genética presente en seis genotipos del género *Passiflora*, incluyendo una variedad comercial de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* y cinco especies silvestres (*P. cincinnata*, *P. foetida*, *P. giberti*, *P. maliformis* y *P. subpeltata*), utilizando para ello sesenta iniciadores RAPD de las series OPA, OPB, OPF y OPM.

improvement (Carneiro *et al.*, 2002). The study of *Passiflora edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. amethystina*, *P. caerulea*, *P. cincinnata*, *P. coccinea*, *P. serrato-digitata*, *P. foetida*, *P. maliformis*, *P. alata*, *P. giberti*, *P. laurifolia*, *P. macrocarpa*, *P. nitida*, *P. setacea*, *P. suberosa*, *P. coriacea*, *P. ligularis*, *P. capsularis* species by using RAPD primers (Cassiano *et al.*, 1998) showed the validity of technique to estimate genetic diversity besides of possibility of characterizing hybrids, permitting the genera characterization and the establishment of relations between the species.

The application of RAPD technique is simple, rapid, inexpensive and accessible, permitting to obtain genetic markers for genetic mapping studies, population genetics, molecular systematic, fingerprinting and assisted selection (Azofeifa, 2006; Carneiro *et al.*, 2002).

The objective of this work was to analyze the genetic diversity present in six genotypes of *Passiflora* genus, including a commercial variety of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* and five wild species (*P. cincinnata*, *P. foetida*, *P. giberti*, *P. maliformis* and *P. subpeltata*), using sixty RAPD primers of OPA, OPB, OPF and OPM series.

## Materials and methods

**Plant Material.** Six species of *Passiflora* were used consisting of: 1 genotype of *P. edulis* f. *flavicarpa* cultivated and five genotypes of *P. sil-*

## Materiales y métodos

**Material vegetal.** Se utilizaron 6 especies de *Passiflora* conformadas de la siguiente manera: 1 genotipo de *P. edulis* f *flavicarpa* cultivada y 5 genotipos de *P. silvestres* (cuadro 1), los cuales fueron colectados en diversas regiones de Venezuela y conservados *ex situ* en el Banco de Germoplasma ubicado en el INIA-CENIAP, Maracay, Estado Aragua.

**Caracterización molecular vía RAPD.** La extracción de ADN y los análisis moleculares utilizando RAPD se realizaron en las instalaciones de la Unidad de Biotecnología Vegetal del INIA-CENIAP ubicada en Maracay, Estado Aragua.

**Aislamiento de ADN y condiciones de amplificación.** Se tomaron 0,2g de los tejidos foliares colectados en plantas individuales representando cada genotipo, los cuales fueron macerados con N<sub>2</sub> líquido. La extracción de ADN genómico (ADN<sub>g</sub>) se realizó siguiendo el método modificado en el CIAT (González *et al.*, 1995). Las amplificaciones al azar de ADN se llevaron a cabo en un volumen final de 15 µL por reacción conteniendo: 1 µL ADN a 10 ng.µL<sup>-1</sup>, 1,5 µL solución tampón (Buffer 10X), 0,8 µL MgCl<sub>2</sub> (1,3 mM) 0,34 µL d-Nucleótidos (dNTP's) 10 mM 2 µL iniciadores (10uM), 0,2 µL *Taq* polimerasa (5U.µL<sup>-1</sup>), 0,5 µL BSA (Suero de Albumina Bovina) 10 mM y 8,66 µL de H<sub>2</sub>O. Posteriormente, el proceso de amplificación se realizó en un termociclador PTC 100 marca MJ Research Inc., utilizando un programa con una desnaturalización inicial de 3 min, seguida por 45 ciclos a 93°C

vestres (table 1), which were collected in diverse regions of Venezuela and preserved *ex situ* in the Germplasm Bank located in the INIA-CENIAP, Maracay, Aragua state.

**Molecular characterization via RAPD.** DNA extraction and molecular analysis were carried out by using RAPD in the Vegetal Biotechnology Unit of the INIA-CENIAP located in Maracay, Aragua state.

**ADN isolation and amplification conditions.** 0.2g foliar tissues of collected individually plants, representing each genotype, were grounded with liquid N<sub>2</sub>. Genomic DNA extraction (ADN<sub>g</sub>) was done by following the modified method in CIAT (González *et al.*, 1995). Random amplifications of DNA were accomplished in a final volume of 15 µL by reaction having: 1 µL DNA at 10 ng.µL<sup>-1</sup>, 1.5 µL buffer solution (Buffer 10X), 0.8 µL MgCl<sub>2</sub> (1.3 mM) 0.34 µL d-nucleotides (dNTP's) 10 mM 2 µL primers (10uM), 0.2 µL *Taq* polymerase (5U.µL<sup>-1</sup>), 0.5 µL BSA (Bovine serum albumin) 10 mM and 8.66 µL of H<sub>2</sub>O. Therefore, the amplification process was performed on a thermal cycler PTC 100 brand MJ Research Inc., using a program with an initial denaturation of 3 min, followed by 45 cycles at 93°C, 30s, 36°C, 30s and 72°C for 1 min. When cycles are finished, a final extension at 72°C was done during 7 min.

Sixty (60) RAPDs primers were used: OPA (from OPA01 to OPA20), OPB (from OPB01 to OPB10), OPF (from OPF01 to OPF 20) and OPM (from OPM01 to OPM10) of decameric series of OPERON Technologies.

**Cuadro 1. Materiales de *Passiflora* spp caracterizados en este estudio y localidad de procedencia.**  
**Table 1. *Passiflora* spp materials characterized in this study and location of origin.**

Genotipo	N° BG	Nombre Científico	Nombre común	Procedencia
1	152	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Parchita maracuyá	Semilla comercial comprada en Agroisleña, Cagua Edo. Aragua Tucacas. Edo. Falcón
2	122	<i>Passiflora foetida</i>	Parcha hedionda	
3	176	<i>Passiflora maitiformis</i>	Granadilla de piedra Calabacito de indio	Sector La Trilla, Sta. Rosa del Sur. Edo. Carabobo.
4	180	<i>Passiflora subpeltata</i>	Granada cimarrona	Monte Carmelo Edo. Lara
5	181	<i>Passiflora cincinnata</i>	Parchita andina	Recolectado en la vía Barquisimeto-Duaca Edo. Lara
6	182	<i>Passiflora giberti</i>	Burucuyá	Donación hecha por la UCLA (Edo. Lara)

N° BG = Número accesión en el Banco de germoplasma del INIA-CENIAP.

por 30s, 36°C por 30s y 72°C por 1 min. Al finalizar los ciclos se realizó una extensión final a 72°C por 7 min.

Se utilizaron sesenta (60) iniciadores RAPD comprendiendo OPA (del OPA01 al OPA20), OPB (del OPB01 al OPB10), OPF (del OPF01 al OPF 20) y OPM (del OPM01 al OPM10) de las series decaméricas de OPERON Technologies.

Los productos amplificados al azar se separaron en geles de agarosa al 1,5% colocando el marcador de peso molecular *pBR322* digerido con *Bst* 01 (Promega) durante 1 h y 30 min, a 90 mA, 85 V. Los fragmentos RAPDs se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio al 0,00002% y se registraron en un digitalizador de imágenes marca BIORAD, modelo CHEMIDOC, utilizando el programa Quantity One v. 4.2.

#### **Análisis de los datos**

Para la evaluación de las ampli-ficaciones de ADN de cada uno de los materiales obtenidos en los geles de agarosa, se generó una matriz de presencia ( $p = 1$ ) y ausencia ( $a = 0$ ) por cada banda detectada en los genotipos estudiados, para cada marcador RAPD utilizado. La matriz obtenida con los sesenta (60) iniciadores fue analizada con el programa estadístico Infostat versión 1.1 (Di Rienzo *et al.*, 2002), mediante análisis multivariado de conglomerados jerárquicos. Se realizó un análisis de conglomerados con la matriz de ausencia y presencia, generando un árbol de clasificación jerárquica ascendente utilizando el coeficiente de asociación de Ward y la distancia Dice ( $\sqrt{(1-S)}$ ) para datos no estandarizados.

Random amplified products were separated in agarose gels at 1.5% placing the molecular weight marker *pBR322* digested with *Bst* 01 (Promega) during 1 h and 30 min, at 90 mA, 85 V. RAPD fragments were visualized with ethidium bromide staining to 0.00002% and they were registered using image brand BIORAD, model CHEMIDOC, using the Quantity One program v. 4.2.

#### **Data analysis**

For evaluating DNA amplifications obtained in agarose gels, for each material a presence ( $p = 1$ ) and absence ( $a = 0$ ) matrix was generated for each band detected in genotypes studied, for each marker RAPD used. Matrix obtained with sixty (60) primers was analyzed with the statistical program Infostat version 1.1 (Di Rienzo *et al.*, 2002), through multivariate analysis of hierarchical conglomerates. A conglomerate analysis was done with the absence and presence matrix, generating a tree of ascendant hierarchical classification using the association coefficient of Ward and the Dice distance ( $\sqrt{(1-S)}$ ) for standardized data.

### **Results and discussion**

Sixty (60) decameric primers RAPDs generated a total of 763 discriminant polymorph bands showing high variability levels between the species studied. The moderate polymorphism showed by 60 primers for each 6 species was determined by patterns of bands generated (table 2), thus, 2 primers



## Resultados y discusión

Los sesenta (60) iniciadores decaméricos RAPDs generaron un total de 763 bandas polimórficas discriminantes revelando altos niveles de variabilidad entre las especies estudiadas. El polimorfismo mostrado por los 60 iniciadores para cada una de las 6 especies fue determinado por los patrones de bandas generados (cuadro 2), obteniéndose así que 2 iniciadores presentaron un polimorfismo que se clasificó como bajo (2 - 3 patrones de bandas), 25 iniciadores un polimorfismo intermedio (4 - 5 patrones de bandas) y un grupo de 33 iniciadores mostraron alto polimorfismo (6 patrones de bandas), de acuerdo al criterio de evaluación establecido para este trabajo. Los iniciadores de alto polimorfismo y considerados con el mayor potencial discriminante son OPA 11, OPA 01, OPA 02, OPA 03, OPA 04, OPA 05, OPA 06, OPA 07, OPA 08, OPA 09, OPA 10, OPA 17, OPA 18, OPA 19, OPB 01, OPB 02, OPB 03, OPB 04, OPB 05, OPB 07, OPB 08, OPB 10, OPF 10, OPF 12, OPF 15, OPF 17, OPF 20, OPM 02, OPM 03, OPM 04, OPM 06, OPM 07, OPM 10. El iniciador con polimorfismo más bajo correspondió al OPF 13 con sólo 2 patrones.

El análisis de conglomerados estableció una correlación cofenética de 0,858 (figura 1). En base al análisis de la diversidad genética, las 6 especies de *Passiflora* son diferentes entre ellas, existiendo una alta variabilidad interespecífica. Se formaron 3 grupos discriminantes: el grupo I separó al genotipo cultivado de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* de los

showed a polymorphism classified as low (2 - 3 bands patterns), 25 primers an intermediate polymorphism (4 - 5 bands patterns) and a group of 33 primers showed high polymorphism (6 bands patterns), according to the evaluation criterion established for this work. The high polymorphism primers considered with higher discriminant potential are OPA 11, OPA 01, OPA 02, OPA 03, OPA 04, OPA 05, OPA 06, OPA 07, OPA 08, OPA 09, OPA 10, OPA 17, OPA 18, OPA 19, OPB 01, OPB 02, OPB 03, OPB 04, OPB 05, OPB 07, OPB 08, OPB 10, OPF 10, OPF 12, OPF 15, OPF 17, OPF 20, OPM 02, OPM 03, OPM 04, OPM 06, OPM 07, OPM 10. The primer with lower polymorphism corresponded to OPF 13 with only 2 patterns.

The conglomerates analysis established a cophenetic correlation of 0.858 (figure 1). Based on the analysis of genetic diversity, the 6 species of *Passiflora* are different among them; there is also a high inter specific variability. Three discriminant groups were formed: group I separated the genotype cultivated of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* of five genotypes of wild *Passiflora* with a difference of 89%; group II is formed by *P. foetida* and *P. maliformis*, and group III by *P. subpeltata*, *P. cincinnata* and *P. giberti*. In group II there is a dissimilarity of 65% between genotypes and in group III, *P. cincinnata* shows a dissimilarity of 63% respect to *P. giberti* and 70% with *P. subpeltata*. These two groups with genotypes of wild *Passiflora*, are separated in more than 82%, being



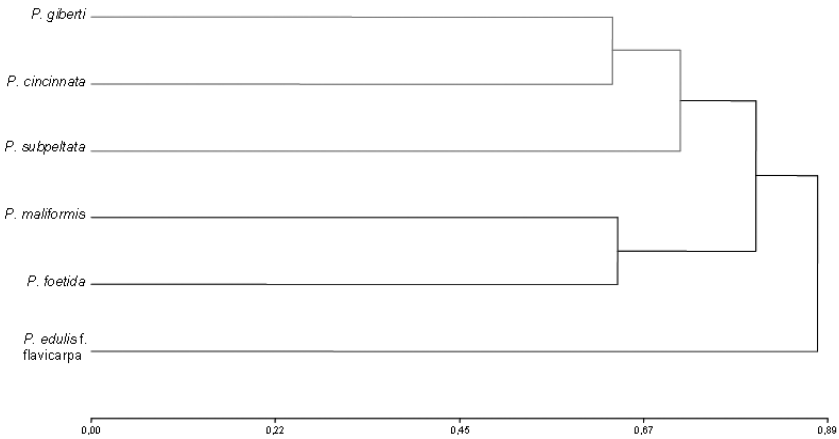
**Cuadro 2. Patrones de bandas generados por cada iniciador en relación a las 6 especies de *Passiflora* estudiados.****Table 2. Band patterns generated by each primer in relationship with the six *Passiflora* species studied.**

Nro.	Iniciador	Patrones de bandas	Nro.	Iniciador	Patrones de bandas
1	OPF 13	2	31	OPA 04	6
2	OPA 15	3	32	OPA 05	6
3	OPA 12	4	33	OPA 06	6
4	OPF 03	4	34	OPA 07	6
5	OPF 04	4	35	OPA 08	6
6	OPF 06	4	36	OPA 09	6
7	OPF 18	4	37	OPA 10	6
8	OPF 19	4	38	OPA 11	6
9	OPM 01	4	39	OPA 17	6
10	OPM 05	4	40	OPA 18	6
11	OPM 08	4	41	OPA 19	6
12	OPA 13	5	42	OPB 01	6
13	OPA 14	5	43	OPB 02	6
14	OPA 16	5	44	OPB 03	6
15	OPA 20	5	45	OPB 04	6
16	OPB 06	5	46	OPB 05	6
17	OPB 09	5	47	OPB 07	6
18	OPF 01	5	48	OPB 08	6
19	OPF 02	5	49	OPB 10	6
20	OPF 05	5	50	OPF 10	6
21	OPF 07	5	51	OPF 12	6
22	OPF 08	5	52	OPF 15	6
23	OPF 09	5	53	OPF 17	6
24	OPF 11	5	54	OPF 20	6
25	OPF 14	5	55	OPM 02	6
26	OPF 16	5	56	OPM 03	6
27	OPM 09	5	57	OPM 04	6
28	OPA 01	6	58	OPM 06	6
29	OPA 02	6	59	OPM 07	6
30	OPA 03	6	60	OPM 10	6

cinco genotipos de *Passiflora* silvestres con una diferencia del 89%; el grupo II está conformado por *P. foetida* y *P. maliformis*, y el grupo III

differenced from *P. edulis* (figure 1). Each specie have its specific molecular pattern.

These results agree with other



**Figura 1. Dendrograma de similaridad genética entre *Passiflora edulis f. flavicarpa* y cinco genotipos silvestres de *Passiflora*, obtenido mediante el coeficiente de asociación de Ward. Distancia Dice (sqrt(1-S)).**

**Figure 1. Dendrogram of genetic similarities between *Passiflora edulis f. flavicarpa* and five wild *Passiflora* genotypes, obtained through Ward association coefficient. Dice distance (sqrt(1-S)).**

por *P. subpeltata*, *P. cincinnata* y *P. giberti*. En el grupo II encontramos una disimilitud del 65% entre los genotipos y en el grupo III *P. cincinnata* muestra una disimilitud del 63% con respecto a *P. giberti* y del 70% con *P. subpeltata*. Estos dos grupos con genotipos de *Passiflora* silvestres, se encuentran distanciados en más de un 82%, diferenciándolos de *P. edulis* (figura 1). Cada especie posee su patrón molecular específico.

Estos resultados coinciden con otros estudios (Aukar *et al.*, 2002; Fajardo *et al.*, 1998) donde observaron gran variación genética entre especies utilizando el mismo tipo de marcadores moleculares. El estudio de 17 genotipos de *Passiflora* (Aukar *et al.*, 2002) coloca a *P. foetida* y *P. maliformis*

studies (Aukar *et al.*, 2002; Fajardo *et al.*, 1998) where high genetic variation was observed between species using the same type of molecular primers. The study of 17 *Passiflora* genotypes (Aukar *et al.*, 2002) place to *P. foetida* and *P. maliformis* in the same group which agrees with our study, while *P. cincinnata*, *P. giberti* and *P. edulis* are in other group, although separated in different sub-groups. A general similarity of 17.3% between genotypes; this study do not includes *P. subpeltata*. However, other authors found *P. maliformis* and *P. edulis* showed little variability (Fajardo *et al.*, 1998), in contrast to these results which establish high differences between both species. In other

en el mismo grupo lo cual coincide con nuestro estudio, mientras que *P. cincinnata*, *P. giberti* y *P. edulis* quedan en otro grupo aunque separadas en distintos subgrupos. Señalan una similitud general de 17,3% entre genotipos; tal estudio no incluyó a *P. subpeltata*. Sin embargo, otros autores encontraron que *P. maliformis* y *P. edulis* poseían poca variabilidad (Fajardo *et al.*, 1998), contrastando con los presentes resultados, los cuales establecen grandes diferencias entre ambas especies. En otro trabajo (Crochemore *et al.*, 2003) utilizaron 70 accesiones representativas de 11 especies de *Passiflora*, obteniendo la formación de tres grupos bien separados, diferenciando claramente a *P. edulis* fv *flavicarpa*, *P. giberti*, y *P. foetida*, coincidiendo con nuestros resultados. Sin embargo utilizaron sólo 5 iniciadores RAPD en su análisis.

La diversidad y variabilidad encontradas en el género puede deberse al hecho de que las especies son alógamas, auto-incompatibles y se cruzan con facilidad. Las diferencias observadas a nivel molecular pueden servir de apoyo al estudio de la variabilidad en *Passiflora*, permitiendo además monitorear las hibridaciones interespecíficas, el ingreso de genes de las especies silvestres para las cultivadas, además de contribuir a definir cuáles poblaciones y especies podrán ser utilizadas en programas de mejoramiento genético (Crochemore *et al.*, 2003).

## Conclusión

Los patrones RAPD son eficientes para la caracterización molecular

research (Crochemore *et al.*, 2003) used 70 representative accessions of 11 *Passiflora* species, obtaining formation of three well separated, by differencing in a clear way to *P. edulis* fv *flavicarpa*, *P. giberti*, and *P. foetida*, in agreement with our results. Nevertheless, they only used 5 RAPD primers in their analysis.

The diversity and variability found in genus can be caused by allogamous species, self-incompatible and easily to be crossed. Differences observed at molecular level can function as support to the study of *Passiflora* variability, also permitting to check the Inter.-specific hybridizations, the entrance of wild species genus for those cultivated, besides of contributing to define the populations and species that could be used in genetic breeding programs (Crochemore *et al.*, 2003).

## Conclusion

The RAPD patterns are efficient for the molecular characterization of *Passiflora* genus. The six species of *Passiflora* studied showed high inter-specific genetic diversity. The RAPDs patterns established that *P. edulis* fv *flavicarpa* is a specie separated from wild group studied. These studies offer a support for further establishment of efficient strategies in species breeding of *Passiflora* genus and development of a markers system to analyze the population's genetic structure.

de especies del género *Passiflora*. Las seis especies de *Passiflora* estudiadas presentaron una alta diversidad genética interespecífica. Los patrones RAPDs establecieron que *P. edulis* f. *flavicarpa* es una especie separada del grupo de las silvestres estudiadas. Estos estudios sirven de base para el futuro establecimiento de estrategias eficientes en la mejora de las especie del genero *Passiflora* y el desarrollo de un sistema de marcadores para analizar la estructura genética de poblaciones.

## Agradecimiento

Los autores desean expresar su especial agradecimiento al INIA Subproyecto Código ID-ARA-05-01003 "Seguimiento y evaluación de la uniformidad genética de plantas frutales propagadas in vitro mediante el uso de técnicas moleculares" por su apoyo financiero para llevar a cabo esta investigación.

## Literatura citada

Aukar, A., E. Lemos y J. Oliveira. 2002. Genetic variations among passion fruit species using RAPD markers. *Rev. Bras. Frutic.* 24(3):738-740.

Azofeifa, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas. Aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana* 17(2): 221-242.

Bourlaug, N. 1994. Agricultural research for sustainable development. Testimony before U.S. House of Representatives Committee on Agriculture, Subcommittee on Foreign Agriculture and Hunger. March 1.

## Acknowledgement

Authors want to express their thanks to the INIA sub-project Code ID-ARA-05-01003 "Monitoring and evaluation of genetic uniformity of fruit trees in vitro propagated through the use of molecular techniques" by the financial support offered to this research.

*End of english version*

---

Browning, J.A. 1995. Genetic diversity. A management option to help protect crop plant populations from epidemics and achieve sustainability. En: *Memorias IV Congreso Nacional Sociedad Colombiana de Fitomejoramiento y Producción de Cultivos*. Chinchiná. Colombia. Mayo 8, 9 y 10. 171 pp.

Carneiro, M., L. Camargo, A. Coelho, R. Vencovsky, R. Leite, M. Stenzel, y M. Vieira. 2002. RAPD-based genetic linkage maps of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg). *Genome* 45:670-678.

Cassiano, A., E. Lemos, y J. Oliveira. 1998. Avaliação de espécies de *Passiflora* através de marcadores moleculares RAPD. *Genetics and Molecular Biology* 21(3): 214 (Suplemento).

Crochemore, M., H. Molinari, y H. Vieira. 2003. Genetic diversity in passion fruit (*Passiflora* spp.) evaluated by RAPD markers. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 46(4):521-527.

De Andrade, A., L. De Macedo, y J. Oliveira. 2002. Genetic variations among passion fruit species using RAPD markers. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24 (3):738-740.

Di Rienzo, J., M.G. Balzarini, I. González, M. Tablada, W. Guzmán, C.W. Robledo y F. Casanoves. 2002. Software INFOSTAT Versión 1.1.

Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

estados Aragua y Miranda. Región Centro-norte de Venezuela. Plant Genetic Resources Newsletter 125:11-15.

Fajardo, D, F. Angel, M. Grum, J. Tohme, M. Lobo, W. Roca e I. Sanchez. 1998. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. *Euphytica* 101:341-347.

Vanderplank, J. 1991. *Passion Flower and Passion Fruit*. MIT Press, Cambridge, MA, USA. 176 pp.

González, D., N. Palácios, G. Gallego y J. Tohme. 1995. Protocolos para marcadores moleculares. Unidad de Investigación en Biotecnología. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, 82 pp.

Viana, A., T. Pereira, M. Pereira, M. Souza, F. Maldonado, y A. Amaral Júnior. 2003. Diversidade em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e *Passiflora* spp. por marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25:489-493.

Pérez, D., Mazzani, E. y W. Pacheco. 2001. Colecta de *Passifloras* silvestres y cultivadas en zonas altas de los