



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA– UESB**  
**PROGRAMA MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA**  
**E BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM**



**LUCAS AMORIM SILVEIRA**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM ACESSOS DE**  
***Passiflora edulis* SIMS. PRESENTES EM BANCOS DE**  
**GERMOPLASMA POR MEIO DE MARCADORES**  
**MOLECULARES**

**ITAPETINGA-BA**  
**ABRIL – 2019**

**LUCAS AMORIM SILVEIRA**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM  
ACESSOS DE *Passiflora edulis* SIMS. PRESENTES  
EM BANCOS DE GERMOPLASMA POR MEIO  
DE MARCADORES MOLECULARES**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

**Orientador:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elisa Susilene Lisboa dos Santos

**Co-orientador:** Prof. Dr. Marcos Antonio Machado

**ITAPETINGA-BA  
ABRIL – 2019**

634.425 Silveira, Lucas Amorim

S589d Diversidade e estrutura genética em acessos de *Passiflora edulis* Sims. presentes em bancos de germoplasma por meio de marcadores moleculares. / Lucas Amorim Silveira. - Itapetinga: UESB, 2019.  
66p.

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre. Sob a orientação da Profª. D.Sc. Elisa Susilene Lisboa dos Santos e coorientação do Prof. D.Sc. Marcos Antonio Machado.

1. Maracujazeiro - Variabilidade Genética. 2. Maracujazeiro - Marcadores moleculares. 3. *Passiflora edulis* Sims - Bancos de germoplasma. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular. II. Santos, Elisa Susilene Lisboa dos. III. Machado, Marcos Antonio. IV. Título.

CDD(21): **634.425**

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Maracujazeiro - Variabilidade Genética
2. Maracujazeiro - Marcadores moleculares
3. *Passiflora edulis* Sims - Bancos de germoplasma



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB  
Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular-  
PMBqBM



## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título:** “Diversidade e estrutura genética em acessos de *Passiflora edulis* Sims. presentes em bancos de germoplasma por meio de marcadores moleculares”.

**Autor (a):** Lucas Amorim Silveira.

**Orientador (a):** Professora Dra. Elisa Susilene Lisboa dos Santos

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, pela Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Susilene Lisboa dos Santos – UESB/ Itapetinga - BA

---

Prof. Dr. Carlos Bernard Moreno C. Silva – UESB/ Itapetinga - BA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Melina Cristina Mancini – UNICAMP/ Campinas - SP

Data de realização: 04 de abril de 2019.

*A minha esposa, Ana Flávia Souto Barbosa, pelo total apoio,  
incentivo e cumplicidade em todos os momentos e dificuldades.  
Aos meus pais, Laércio e Glória, pela minha criação e dedicação,  
fornecendo todo o necessário para a minha educação e formação.  
Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A minha esposa Ana Flávia, pela incrível pessoa que é na minha vida, parceira e cúmplice em todos os momentos, sempre me tranquilizando nos difíceis, participando ativamente de todos os planos e projetos que decidimos seguir;

Aos meus pais, por sempre acreditar que a educação é o melhor caminho, sempre estimulando a busca de novos conhecimentos e formações;

Ao meu grande amigo Daniel, que sempre me ajudou quando precisei, discutindo sobre as nossas pesquisas e estudos, além do suporte exemplar nas traduções;

A orientadora, professora doutora Elisa Susilene Lisboa dos Santos, por aceitar a missão de me orientar em um programa novo na instituição, fornecendo o exemplo de profissionalismo, com todo o apoio e suporte necessário, autonomia para atuar no desenvolvimento das atividades, direcionando o conhecimento para atingir os objetivos e obter os resultados da melhor maneira;

Ao professor doutor Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva, pelo conhecimento adquirido em reuniões, discutindo sobre as passifloras, problemáticas e resultados obtidos, sobre como utilizar as ferramentas necessárias para o desenvolvimento do projeto e no processamento dos dados, importantes para o total entendimento das informações e sua importância;

Aos colegas do LGMA – Laboratório de Genética Molecular Aplicada da UESB de Itapetinga-Ba: Larissa e Nátilla nos primeiros momentos, transmitindo todos os protocolos e conhecimentos sobre a passiflora; Luiz, Thayse e Cibelle, por trabalharmos juntos sempre buscando fornecer total apoio e suporte para todos do grupo; aos alunos de Iniciação Científica, Anderson, por permitir ensiná-lo e receber atenção e suporte em troca. Em um grupo forte e unido como este, todos ganham!

Aos professores membros do programa, pelo conhecimento passado em sala de aula, de grande importância na formação acadêmica, e que apesar de todos os entraves e problemas que um programa de pós-graduação traz, mantém o mesmo funcionando, dando oportunidades para todos os estudantes da região que querem fazer uma pós-graduação sem necessitar se deslocar para outras cidades mais distantes;

Ao doutorando Zanon Santana Gonçalves, o pesquisador da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas – Ba) doutor Onildo Nunes de Jesus e os outros membros da Rede de Estudos Genético Moleculares em *Passiflora* spp., pelo suporte fornecido, conhecimento transmitido e ajuda durante as coletas do material genômico utilizado no estudo;

Ao técnico do Laboratório de Biologia Molecular da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas – Ba), Vanderson Rodrigues de Sousa, pelo suporte e ajuda durante as extrações de material genômico utilizado no estudo;

Ao programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular e a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) pela oportunidade de realizar uma pós-graduação, e a bolsa de estudos concedida pela UESB, que fomentou estes anos de estudo no mestrado;

As agências de fomento à pesquisa, a FAPESB, que forneceu recursos financeiros necessários para equipar e possibilitar a execução deste e de outros projetos do grupo.

## RESUMO

A família *Passifloraceae* é amplamente distribuída nos trópicos e regiões temperadas quentes, sendo o Brasil um dos mais importantes mercados de maracujás, além de ser um dos centros de diversidade do gênero. *Passiflora* ssp. possui importância comercial sendo o fruto amplamente consumido, além de serem utilizadas como medicamentos, cosméticos e ornamentação. O foco da produção de maracujá no Brasil está em espécies cujos frutos são comestíveis, especialmente *P. edulis* Sims. Alguns fatores contribuem para a baixa produtividade do maracujazeiro, como os patógenos. O objetivo com este estudo foi realizar uma análise da diversidade genética de acessos de *P. edulis* Sims. presentes em bancos de germoplasma, a fim de contribuir com programas de melhoramento genético. A metodologia consistiu no emprego de nove marcadores RGAs (*Resistance Gene Analogs*) para a análise da diversidade genética em 163 genótipos de *P. edulis* Sims., entre acessos e cultivares obtidos em dois bancos de germoplasma (BAG) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA): Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA; e Cerrados, Brasília, DF. Foram realizadas análise da estrutura genética por meio de estatística Bayesiana, distribuição em gráfico de coordenadas principais (PCoA), média da heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e a análise da variância molecular (AMOVA). Foram obtidos um total de 157 marcadores, com média de 18,1 marcadores por primer. Os valores das médias obtidas para  $H_e$  e PIC foram de 0,18 e 0,15. Os acessos avaliados se estruturaram em três *pools* gênicos, trazendo consigo informações relevantes sobre a composição dos BAGs de origem das amostras. Os genótipos do BAG Cerrados se estruturaram em dois *pools* gênicos mais homogêneos, onde um é referente aos acessos e o outro as cultivares, diferente do banco da Mandioca e Fruticultura que possui um grupo de acessos mais heterogêneo. Esta estruturação foi observada no STRUCTURE, juntamente com as informações da análise discriminante quanto a variabilidade por meio do PCoA, nos quais caracteriza os germoplasmas existentes nos BAGs. Foi possível verificar a semelhança genética entre alguns acessos dos BAGs, porém ao se avaliar separadamente cada um observamos subestruturas formadas, identificando uma alta diversidade entre os acessos. Sobre as cultivares, é observado uma distância genética com o germoplasma dos acessos, sendo estes acessos uma fonte de genótipos para melhoramento. Esta alta variabilidade observada entre as cultivares e os acessos é resultado do melhoramento, onde cada cultivar passou por uma seleção de alelos específicos para obter o fenótipo melhorado. A AMOVA evidenciou a diversidade existente

dentro dos BAGs, sendo o banco Mandioca e Fruticultura possuidor da maior porcentagem de marcadores exclusivos. Ao ser observado os índices e gráficos gerados, temos uma alta variabilidade dentro dos bancos, mesmo com acessos geneticamente parecidos existentes entre os bancos. Estes dados são interessantes ao se buscar marcadores exclusivos em acessos específicos da espécie, visando a manutenção e redução dos custos dos BAGs. Porém, faz-se necessário maiores estudos para relacionar estes com características de interesse comercial. Assim, os resultados obtidos possuem potencial para uso na gestão dos BAGs, buscando inserir maiores informações sobre os acessos existentes, reduzir os custos de manutenção, e procurando relacionar os dados moleculares com os morfo-agronômicos, necessárias para possibilitar a seleção de genótipos de referência, tanto para preservação quanto para o melhoramento da espécie.

Palavras-chave: Maracujazeiro; RGA; Variabilidade Genética.

## ABSTRACT

The *Passifloraceae* family is widely distributed in the tropics and warm temperate regions. Beside this, Brazil is one of the most important markets of passion fruit, besides being one of the centers of genus diversity. It has not only great commercial importance, due to the high consumption, but also a medical, cosmetical and ornamental usage. The passion fruit production in Brazil is mainly focused on species whose fruits are edible, especially *P. edulis* Sims. Some factors may contribute to low productivity of passion fruit, such as pathogen. In order to contribute to genetic improvement programs, this work aims to analyze the genetic diversity of accessions of *P. edulis* Sims. within germplasm banks. As methodology, RGAs (Resistance Gene Analogs) were used for analyse the genetic diversity that was carried out in 163 *P. edulis* Sims genotypes from two Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) germplasm banks (BAG): The Cassava and Fruticulture, Cruz das Almas - BA and Cerrados, Brasília - Federal District, Brazil. Genetic structure analysis was performed using Bayesian statistics, distribution in a main coordinate graph (PCoA), expected heterozygosity (HE), polymorphism information content (PIC) and analysis of molecular variance (AMOVA). A total of 157 markers were obtained and on average 18.1 markers, we used per primer. The obtained mean values for HE and PIC were 0.18 and 0.15, respectively. The evaluated accesses were structured in three gene *pools*, containing relevant information of the BAG composition from the samples. The Cerrado's genotype bank are distributed in two more homogenous gene *pools*, in which one is referring to the accessions and the other the cultivars, unlike the bank of Cassava and Fruticulture that has a more heterogeneous plant. The structure observed in STRUCTURE, together with the information of variability of PCoA, characterizes germplasm in BAGs. It was possible to verify the genetic similarity between some accesses of the banks, but when evaluating each separately, the substructures formed indicates a high diversity between the accesses. Concerning the cultivars, it is observed no genetic similarity with the access germplasm, even this material being a source of material for breeding. This high variability observed between the cultivars and the accessions is a result of the improvement, where each cultivar underwent a selection of specific alleles to obtain the improved phenotype. AMOVA evidenced the great diversity that exists within the BAGs, where The Cassava and Fruticulture bank have a higher percentage of exclusive alleles. Regarding the indexes and graphs generated, we have a low genetic variability within the species, even with different accesses analyzed. These data are specially intriguing when we look for exclusive alleles in specific

accesses, aiming at the maintenance and reduction of the BAGs costs. However, it is necessary to further studies to relate these alleles with commercially interested characteristics. Thus, the results have shown a great potential for BAGs usage, seeking lower maintenance costs, and relate the molecular data to the morphological and agronomic data, that might allow the selection of reference genotypes, both for preservation and for breeding of the species.

**Keywords:** Passion fruit; RGA; Genetic variability

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	16
OBJETIVOS .....	18
Objetivo geral .....	18
Objetivos específicos .....	18
DESENVOLVIMENTO .....	19
CAPITULO I .....	19
REVISÃO DA LITERATURA .....	19
A espécie <i>Passiflora edulis</i> Sims. ....	19
Importância econômica e social .....	21
Estratégias de conservação e melhoramento.....	22
Melhoramento genético do gênero <i>Passiflora</i> .....	24
Diversidade genética do maracujazeiro .....	26
Marcadores Moleculares.....	28
Regiões Análogas a Genes de Resistência – RGA ( <i>Resistance Gene Analogs</i> ) .....	30
CAPÍTULO II .....	32
VARIABILIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE <i>Passiflora edulis</i> Sims. COM BASE EM MARCADORES ANÁLOGOS A GENES DE RESISTÊNCIA .....	32
INTRODUÇÃO .....	33
MATERIAL E MÉTODOS .....	34
RESULTADOS.....	37
DISCUSSÃO .....	44
CONCLUSÃO .....	49
REFERENCIAS .....	49
APÊNDICES .....	60
ANEXOS.....	61

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

<b>Tabela 01</b> – Combinações de nove iniciadores RGA ( <i>Resistance Gene Analogs</i> ) utilizados para caracterização de <i>P. edulis</i> Sims., e suas respectivas sequências de nucleotídeos. _____	<b>35</b>
<b>Tabela 02</b> – Análise descritiva e diversidade genética obtida a partir de 9 combinações de iniciadores RGAs e 163 genótipos de <i>Passiflora edulis</i> Sims. oriundos de Bancos Ativos de Germoplasmas das EMBRAPAs Cerrados e EMBRAPA Mandioca e Fruticultura. _____	<b>38</b>
<b>Figura 01</b> – Variações da <i>Passiflora edulis</i> Sims. _____	<b>19</b>
<b>Figura 02</b> – Flor da <i>Passiflora edulis</i> Sims. _____	<b>20</b>
<b>Figura 03</b> – A Abelha Mamangava, polinizador natural da <i>Passiflora edulis</i> Sims. RGA. _____	<b>21</b>
<b>Figura 04</b> – Linha temporal de lançamentos das cultivares desenvolvidas pela EMBRAPA, utilizando a <i>Passiflora edulis</i> Sims. no desenvolvimento. _____	<b>26</b>
<b>Figura 05</b> – Diversidade de flores e frutos de diferentes espécies do gênero <i>Passiflora spp.</i> _____	<b>26</b>
<b>Figura 06</b> – Bancos Ativos de Germoplasma de Maracujazeiros – EMBRAPA Cerrados e EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, respectivamente. _____	<b>27</b>
<b>Figura 07</b> – Esquema cronológico ilustrando os principais marcadores moleculares no gênero <i>Passiflora</i> e sua referência inicial e o número total de artigos. _____	<b>30</b>
<b>Figura 08</b> – Histograma de estruturação dos <i>pools</i> gênicos, para os acessos de <i>Passiflora edulis</i> Sims. mantidos em Bancos de Germoplasma das unidades da EMBRAPA Cerrados e EMBRAPA Mandioca e Fruticultura. _____	<b>40</b>
<b>Figura 09</b> – A) Análises de Coordenadas Principais (PCoA) para dispersão dos acessos e cultivares de <i>Passiflora edulis</i> Sims. obtidos nos Bancos de Germoplasma das unidades da EMBRAPA Cerrados e EMBRAPA Mandioca e Fruticultura; B) PCoA para os acessos da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura; C) PCoA para os acessos da EMBRAPA Cerrados; D) PCoA para dispersão dos cultivares da EMBRAPA Cerrados. _____	<b>41</b>
<b>Figura 10</b> – A) Análise de variância molecular entre e dentro dos Bancos de Germoplasma (BAG) das unidades da EMBRAPA Cerrados e EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, desconsiderando e considerando as cultivares melhoradas; B) Classificação dos 136 marcadores encontrados para os acessos dos dois Bancos Ativos de Germoplasma do estudo, utilizando 9 pares de primers RGA. _____	<b>43</b>

**LISTA DE ANEXOS**

**Anexo 01** – Descritivo com identificação de cada planta utilizada no estudo, com respectivo código do acesso no BAG, qual BAG de origem, e qual a origem de coleta da planta. \_\_\_\_\_ **61**

**LISTA DE APÊNDICES**

<b>Apêndice 01</b> - Número de <i>pools</i> gênicos mais provável obtido através do <i>software</i> Structure Harvester ( <a href="http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/">http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/</a> )	<b>60</b>
---	-----------

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**AFLP** – *Amplified Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado)

**AMOVA** – *Analysis of molecular variance* (Análise da Variância Molecular)

**BAG** – Banco Ativo de Germoplasma

**BRS** – Identificação de materiais provenientes de programas de melhoramento genético liderados pela EMBRAPA

**CABMV** – *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (“vírus do endurecimento dos frutos”)

**CPAC** – Centro de Pesquisa Agropecuária do Cerrado

**CTAB** – Brometo de Cetiltrimetilamônio

**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico

**dNTP** – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

**EMBRAPA** – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**He** – Heterozigosidade Esperada

**IAC** – Instituto Agronômico de Campinas

**IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**ISSR** – *Inter-simple sequence repeats* (Repetições de sequência inter-simples)

**LGMA** – Laboratório de Genética Molecular Aplicada

**LLR-TM** – Regiões transmembranares ricas em leucina

**LRR** – Proteínas ricas em leucina

**MAPA** – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**NBS** – Sítios de ligação a nucleotídeos

**PCoA** – *Principal Coordinates Analysis* (Análises de Coordenadas Principais)

**PCR** – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

**PIC** – Conteúdo de Informação de Polimorfismo (*Polymorphism Information Content*)

**QTL** – *Quantitative trait locus* (Locus de característica quantitativa)

**RAPD** – *Random Amplified Polymorphic DNA* (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso)

**RFLP** – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição)

**RGA** – *Resistance Gene Analogs* (Análogos a genes de resistência)

**RNA** – Ácido Ribonucleico

**RNC** – Registro Nacional de Cultivares

**SCAR** – *Sequence Characterized Amplified Regions* (Regiões amplificadas caracterizadas em sequência)

**SSR** – *Single Sequence Repeat* (Sequências Simples Repetidas)

**STS** – *Sequence Tagged Sites* (Locais marcados por sequencias)

**TBE** – Tampão de Tris/Borato/EDTA

**VNTR** – *Variable Number of Tandem Repeats* (Números variáveis de repetições em tandem)

## INTRODUÇÃO

A família *Passifloraceae* está presente nos trópicos e regiões temperadas quentes, sendo o Brasil um dos centros de diversidade, com 150 espécies. O foco da produção brasileira é o consumo do fruto, sendo a espécie *Passiflora edulis* Sims. a mais utilizada. Além disso, o maracujazeiro também é utilizado na indústria farmacêutica, cosmética e ornamental (BERNACCI et al., 2014).

A produção brasileira de maracujá é uma das mais importantes dentro da fruticultura tropical por se tratar de uma cultura com valor agregado. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, a região nordeste possui destaque nacional, com uma produção de 27.868 hectares plantados. Dentre os estados dessa região, a Bahia é a maior produtora, com 16.283 hectares de área plantada (IBGE, 2017). Entretanto, a sua produtividade sofre com a ocorrência de patógenos que afetam diretamente o potencial da cultura.

Os estudos para adquirir conhecimento da variabilidade genética de *P. edulis* são de importância dentro dos programas de conservação e melhoramento da espécie. A variabilidade existente na espécie, bem como a possibilidade de cruzamentos intra e interespecíficos reforçam o uso do germoplasma caracterizado nos bancos de germoplasma como material para aplicação em programas de melhoramento genético (JUNQUEIRA et al., 2007; CERQUEIRA-SILVA et al., 2012; COSTA et al., 2012; ORTIZ et al., 2012).

O avanço das técnicas de biologia molecular voltado aos estudos do DNA deu suporte ao surgimento dos marcadores moleculares, uma ferramenta com alta aplicabilidade em diferentes áreas. Dentre os diferentes tipos de marcadores, os RGAs (*Resistance Gene Analogs*) se destacam por estar diretamente relacionados com regiões conservadas relacionadas a resistência das plantas aos patógenos. O uso desta ferramenta se torna útil na identificação da variabilidade genética entre genótipos no que tange a regiões relacionadas à resistência, podendo auxiliar na seleção de genótipos de interesse, economizando custo e tempo dentro dos programas de melhoramento. Os marcadores RGAs foram utilizados em diferentes estudos, tanto para identificar genes de resistência em arroz, feijão comum e pimenta (PFLIEGER et al., 2001; LÓPEZ et al., 2003; SELVARAJ et al., 2011), bem como em estudos de diversidade genética com espécies silvestres de passifloras (PEREIRA et al., 2015).

A conservação da espécie é uma etapa importante dentro do processo de melhoramento genético vegetal. O processo clássico de investigação e caracterização das espécies para o

melhoramento demanda tempo e alto custo (NASS, 2011). Os marcadores moleculares são uma ferramenta importante para obtenção de grande quantidade de informações em tempo reduzido. Estas informações são aplicáveis nos programas de melhoramento genético vegetal e conservação da espécie (PAULA et al., 2010; FERREIRA & RANGEL, 2011).

As análises aqui apresentadas fazendo uso de genótipos de *P. edulis* Sims. por meio de marcadores moleculares RGAs constitui uma ferramenta diagnóstica acerca da variação existente entre acessos que compõem dois importantes bancos de germoplasma de maracujazeiros mantidos nas unidades da EMBRAPA Cerrados em Brasília, Distrito Federal e Mandioca e Fruticultura em Cruz das Almas, Bahia, contribuindo para a caracterização molecular da espécie.

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Contribuir com a Rede de Estudos Genético Moleculares em *Passiflora* spp., por meio da análise da diversidade e estrutura genética da espécie *Passiflora edulis* Sims., presentes em bancos de germoplasma a partir de marcadores RGAs, gerando subsídio para estratégias de conservação e melhoramento genético.

### Objetivos específicos

- ✓ Coletar os diferentes cultivares e acessos de *Passiflora edulis* Sims. presentes nos Bancos Ativos de Germoplasma da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, na cidade de Cruz das Almas, BA, e da EMBRAPA Cerrados, Brasília, DF;
- ✓ Caracterizar a diversidade genética dos cultivares e acessos de *Passiflora edulis* Sims., a partir de marcadores moleculares análogos a regiões de resistência – RGAs;
- ✓ Realizar uma análise descritiva, de estruturação e de dispersão em gráfico de coordenadas principais – PcoA, a partir da genotipagem utilizando os marcadores RGAs;
- ✓ Analisar a relação genética existente entre acessos e cultivares da espécie dentro dos BAGs analisados, evidenciado pela estruturação e diversidade.

## DESENVOLVIMENTO

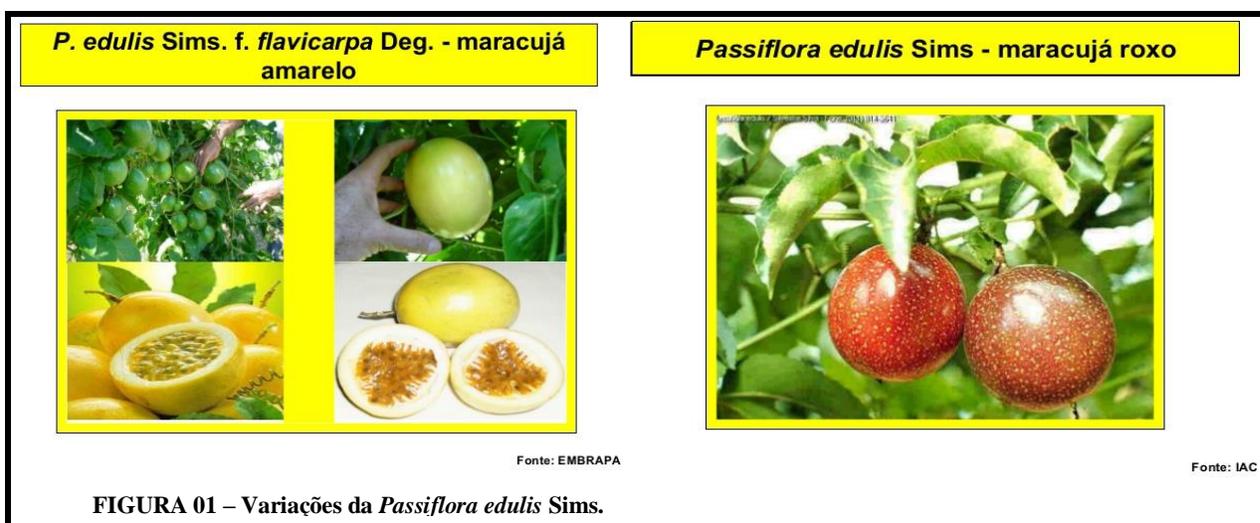
### CAPITULO I

#### REVISÃO DA LITERATURA

##### A espécie *Passiflora edulis* Sims.

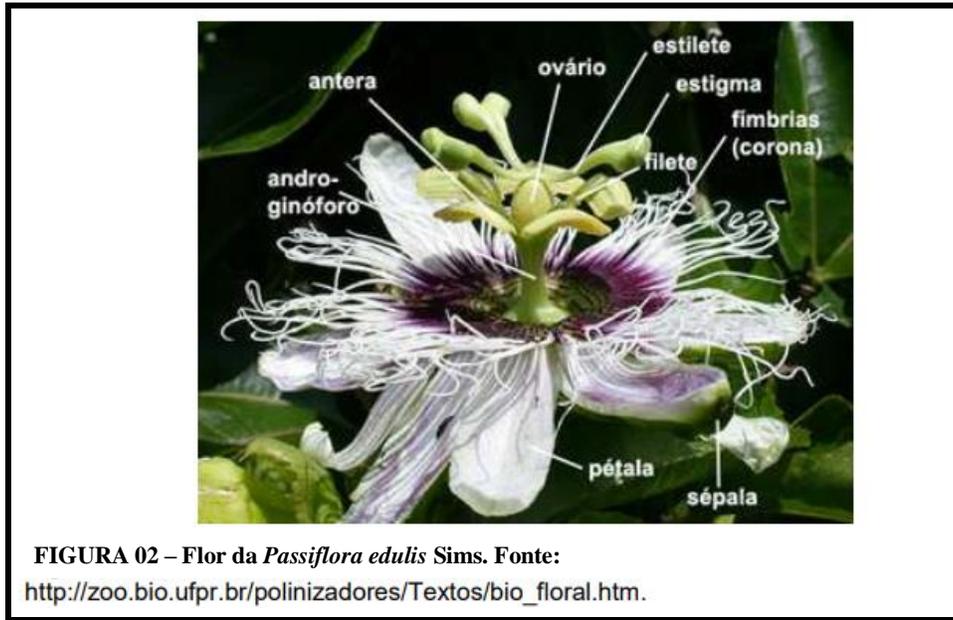
Os maracujazeiros (gênero *Passiflora* L.) pertencem à tribo *Passiflorae*, família *Passifloraceae* e ordem *Passiflorales*. Este gênero é importante, pois possui diferentes espécies com potencial comercial, tanto na alimentação quanto em outros setores como o ornamental, cosmético e farmacêutico. O número certo de gêneros e espécies presentes na família *Passifloraceae* possui divergências entre os autores, havendo entre 17 a 20 gêneros e 600 a 750 espécies, sendo o gênero *Passiflora* importante comercialmente, com mais de 500 espécies (BERNACCI et al., 2005; PEIXOTO, 2005; FEUILLET & MACDOUGAL, 2007; SOUZA & LORENZI, 2012).

Na produção brasileira, os cultivos comerciais da espécie *Passiflora edulis* Sims., conhecida por maracujazeiro azedo ou amarelo, são os maiores dentro do gênero, atendendo o setor industrial, principalmente de beneficiamento de suco, além do mercado *in natura* do fruto (MATTA, 2005). De acordo com JUNQUEIRA et al. (2007), *P. edulis* f. *edulis* apresenta fruto roxo e o *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* apresenta fruto geralmente amarelo, sendo estas as variações existentes de *P. edulis* Sims. (Figura 01).



As flores da *P. edulis* Sims. são hermafroditas, apresentando um sistema de autoincompatibilidade homomórfica gametofítica controlados por um loco multialélico (loco S). Elas são vistosas, de tamanho grande e, com brácteas foliares protegendo a base. A corona é

formada por vários filamentos ou fímbrias, sendo esta uma marca característica de todo o gênero (Figura 01). O fruto possui forma de baga, globoso. A parte externa do fruto do maracujá é formada pelo pericarpo e a interna pela polpa mucilagínosa, com sementes providas de arilos (Figura 02) (SUASSUNA et al. 2003; JESUS & FALEIRO, 2016).



Sobre a biologia reprodutiva, pela necessidade de uma fecundação cruzada, os agentes polinizadores são importantes para a manutenção da *P. edulis* Sims. em um ambiente natural. A falta destes agentes é um dos fatores que podem resultar em baixa formação de frutos e novas plantas (BENEVIDES, 2009; SIQUEIRA et al., 2009).

Em pomares comerciais, apenas a polinização natural das flores não é suficiente para obter alta produtividade, uma vez que depende da existência destes agentes polinizadores. O processo de polinização manual, realizada de forma correta, contribui diretamente no aumento da produtividade do maracujazeiro (JUNQUEIRA et al., 2001)

De acordo a espécie, as flores da *Passiflora* spp. possuem diferenças que interferem no tipo de polinizador. *P. edulis* Sims. possui as flores de hábito diurno, iniciando sua abertura por volta do meio-dia e atingindo o total de flores abertas próximo às 13 horas. Depois elas iniciam sua diminuição, progressivamente, até às 20 horas. Por possuir flores com cores fortes, essas são atrativas de aves e insetos (PEREIRA VIEIRA et al., 2010; ARAUJO et al., 2016).

O maracujazeiro não consegue obter sucesso na polinização pelo vento, pois o pólen tem alto peso e é viscoso, necessitando do agente polinizador. Para esta espécie, um dos polinizadores

são as mamangavas, abelhas de grande a médio porte, pertencentes ao gênero *Xylocopa* (Figura 03) (SAZIMA & SAZIMA, 1989). O seu hábito de percorrer regiões próximas ao ninho, com autonomia de voo em um raio de 12 km de circunferência, onde se estabelece por gerações, justifica sua introdução em áreas de cultivo (FREITAS & OLIVEIRA-FILHO, 2001).



FIGURA 03 – Abelha Mamangava, polinizador natural da *Passiflora edulis* Sims.  
Fonte: 1ª imagem: Diogo Luiz – Repertório ambiental / 2ª imagem: acervo próprio

### Importância econômica e social da Passicultura

A cultura do maracujá possui importância social e econômica, uma vez que movimentava todos os setores da cadeia produtiva, desde a produção de polpas e extratos até a comercialização tanto do fruto *in natura* quanto seus derivados, bem como da área vegetativa, não importa se em larga escala ou pelo pequeno produtor rural. A cultura do maracujazeiro é uma fonte de renda contínua para os fruticultores, devido a sua produção independente da sazonalidade. Assim, agregando valor ao produto advindo da cultura da espécie, atingindo diferentes mercados (FALEIRO & JUNQUEIRA, 2016). O seu amplo cultivo no país se deve às suas características como a qualidade dos frutos e rendimento industrial, além de encontrar no país condições para sua produção e o incentivo agroindustrial (BERNACCI et al., 2003; FALEIRO et al., 2016).

Em diferentes países, a cultura do maracujazeiro atua como fonte de renda, com produção e exportação do fruto e seus subprodutos, bem como as folhas para a indústria farmacêutica, na produção de fitoterápicos. Países como o Equador, Colômbia, Peru, Bolívia, Venezuela, África do Sul e Austrália, outras espécies do gênero *Passiflora* se destacam comercialmente, visto a produtividade da cultura. Na Europa e América do Norte, o maracujá é considerado exótico, com menor mercado para o fruto, mantendo sua importância dentro do paisagismo. O consumo menor nesses países, pode ser em função da falta de conhecimento, sendo esse um mercado promissor a

ser alcançado. (FALEIRO et al., 2016).

A cultura do maracujazeiro iniciou no Brasil na década de 70, apresentado crescimento exponencial, sendo ampliada com surgimento de novos mercados consumidores (MELETTI, 2011). Segundo o IBGE (2017), no levantamento realizado no Brasil sobre a produção agrícola municipal, a área total plantada foi de 41.216 hectares, sendo a área colhida de 41.090 hectares e o rendimento médio de 13.497 Kg.ha<sup>-1</sup>. Com a crescente produção científica e apoio financeiro, as pesquisas auxiliaram a cultura do maracujá, possibilitando ao fruticultor aplicar novos conhecimentos que diminuem os riscos existentes dentro da atividade produtiva, o que favorece ainda mais as adequações à demanda do mercado cada vez mais exigente (GRECO, 2014).

O Nordeste se destaca de outras regiões do Brasil, com uma produção de 27.901 hectares plantados destinados a colheita. Destes, o estado da Bahia é considerado o maior produtor, com 16.299 hectares de área plantada destinada a colheita (IBGE, 2017). Ainda assim, o rendimento brasileiro por hectare é baixo (10,5 ton.ha<sup>-1</sup>), considerando que o potencial da cultura é superior a 50 ton.ha<sup>-1</sup> (FALEIRO & JUNQUEIRA, 2016).

A cultura do maracujazeiro tem sido comprometida por diferentes fatores. Alguns destes são as técnicas inadequadas de manejo; falta de tecnologia aplicada aos sistemas de produção; bem como da ocorrência de fatores bióticos e abióticos que interferem diretamente na produção e a longevidade das plantas. Dentre estes casos, merece destaque o ataque de pragas e patógenos que afetam as plantas e os frutos (LIMA & BORGES, 2002; CAMPOS et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014).

### **Estratégias de conservação e melhoramento**

*P. edulis* Sims., mesmo sendo altamente susceptível ao ataque de doenças, predomina nos pomares do país (BORGES et al., 2005). Estudos demonstram a alta resistência das espécies silvestres de *Passiflora* spp. ao ataque de doenças, causadas principalmente pelos vírus. Visto que estas características de resistência, encontradas em espécies silvestres, são de interesse comercial, e sendo *P. edulis* Sims. susceptível ao ataque destes patógenos e com uma baixa variabilidade de acessos, temos então uma importante fonte de resistência a ser explorada. As espécies de *Passiflora* permitem cruzamentos interespecíficos, o que reforça o uso da diversidade genética silvestre do gênero como material-fonte em programas de melhoramento genético (JUNQUEIRA et al., 2007; CERQUEIRA-SILVA et al., 2012; COSTA et al., 2012; ORTIZ et al., 2012).

As estratégias para conservação da diversidade da *Passiflora* se dividem em dois tipos: a *in*

*situ*, no próprio local onde a espécie é encontrada, e *ex situ*, em bancos ativos de germoplasma, por exemplo. A conservação *in situ* é a estratégia que garante a maior variabilidade, uma vez que é *in loco*. Porém, em função da perda da vegetação nativa, onde estão os recursos genéticos de passifloras, considerando os avanços das fronteiras agrícolas e a atividade do homem, este sistema sofre perdas. Sendo assim, a conservação *ex situ* se torna uma alternativa para conservação da espécie. Existem diferentes estratégias, sendo elas *in vitro* (micropropagação), banco de sementes e/ou germoplasma (FALEIRO & JUNQUEIRA, 2016).

Os programas de melhoramento em passifloras possuem diferentes etapas de pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento, utilizando o germoplasma obtido. As plantas são caracterizadas morfológicamente e agronomicamente, buscando características de interesse comercial. Estudos moleculares também são importantes para fornecer maiores informações, e buscar relacionar o fenótipo de interesse com o genótipo. As informações referentes à esta caracterização são usadas pelos programas de melhoramento genético visando agregação de valor, diversificação de uso, e o desenvolvimento de novas cultivares de maracujazeiro. Os marcadores moleculares possuem diferentes aplicações práticas dentro de todas as etapas do melhoramento. O mapeamento gênico, a seleção assistida por marcadores, e a predição de desempenho de híbridos simples são algumas destas etapas, que dependem de um aporte anterior (FALEIRO, 2011; FALEIRO & JUNQUEIRA, 2016).

Dentro das etapas de pré-melhoramento, a estimativa da variabilidade genética possui importância, tendo em vista que a chave para a realização do melhoramento são as diferentes características que é possível obter. Por isto, a variabilidade genética mensurada é usada como fonte de características de interesse comercial (NASS & PATERNIANI, 2000).

Estudos com espécies silvestres demonstraram que estas são uma fonte de interesse a ser explorado, graças as características observadas como vigor, precocidade e resistência a doenças. Dentre as espécies silvestres com maior potencial, está a *P. cincinnata* Mast., que se destaca pela sua alta resistência tanto às doenças quanto a seca (OLIVEIRA, G.A.F. et al., 2013).

Os programas de melhoramento genético para as espécies de *Passiflora* utilizam de cruzamentos inter e intraespecíficos, sendo necessário prospecção, caracterização e conservação de germoplasma das espécies de maracujazeiro, cujas etapas são cruciais ao pré-melhoramento (FALEIRO et al., 2005). Objetivando a conservação e suporte aos estudos de melhoramento genético, os Bancos Ativos de Germoplasma (BAG) de passifloras implantados no Brasil são

importantes. A partir da variabilidade genética preservada nos BAGs, é possível o uso destes germoplasmas em programas de melhoramento, uma vez que este material está sendo avaliado e caracterizado tanto morfológico quanto geneticamente. Além disso, os BAGs possibilitam um intercâmbio deste material para diferentes estudos, que visam a conservação e melhoramento da espécie (JESUS et al., 2013).

### **Melhoramento genético do gênero *Passiflora***

As primeiras cultivares híbridas de *Passiflora* ssp. foram obtidas em 1999 pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em estudos voltados a aplicação no melhoramento genético do gênero. O *P. edulis* Sims. foi a espécie melhorada na época, visando atender o mercado que buscava características específicas de frutos, como menor espessura da casca e homogeneidade desses (MELETTI, 2011). Após isto, o melhoramento mudou seu foco devido à alta ocorrência de doenças na cultura do maracujazeiro, que resultavam em perdas relacionadas à qualidade do fruto, o que diminui o valor comercial e, conseqüentemente, redução da produção (FALEIRO et al., 2015).

As técnicas de melhoramento têm por objetivo a busca e seleção de diferentes genótipos superiores que fossem resistentes às doenças que acometem a cultura do maracujazeiro. Estudos e pesquisas foram realizadas com a *P. edulis* Sims., utilizando de hibridações intra e interespecíficas, além dos retrocruzamentos, técnica utilizada com sucesso na incorporação de genes de resistência e outros genes de interesse (JUNQUEIRA et al., 2007; FALEIRO et al., 2008; FALEIRO & JUNQUEIRA, 2009; FONSECA et al., 2009).

O Brasil, sendo o principal centro de diversidade do gênero, possui variabilidade genética, sendo esta suficiente para o desenvolvimento de novas variedades com características de interesse comercial (REIS et al., 2011; FREITAS et al., 2012). Esta diversidade de espécies de passifloras., tanto silvestres quanto comerciais, constitui uma fonte de genes de resistência a doenças (PAULA et al., 2010). Existem registros de alguns acessos, dentro das várias espécies silvestres de maracujazeiro, com resistência a distintas doenças, como antracnose, bacteriose, virose do endurecimento dos frutos e fusariose (MELETTI et al., 2005; PAULA et al., 2010; CARVALHO et al., 2013; OLIVEIRA, E.J. et al., 2013). Torna-se necessária a caracterização e a exploração da variabilidade genética destas espécies, como também das espécies comerciais (a exemplo de *P. edulis* Sims.), buscando revelar diferentes fontes de resistência as doenças no campo, além da utilização em programas de melhoramento genético (FALEIRO et al., 2005).

A resistência ao vírus CABMV também foi estudada e avaliada em diferentes espécies de

passifloras e híbridos interespecíficos, tomando como base os sintomas apresentados nas folhas. Verificou-se a susceptibilidade de *P. edulis* Sims., enquanto outras espécies, principalmente silvestres, como *P. gibertii* N.E.Br., *P. setacea* DC. e um híbrido de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. setacea* foram consideradas resistentes ao vírus. Em outras avaliações, estas espécies também apresentaram maior resistência ao vírus CABMV, especialmente *P. setacea*, na qual não foi observado sintoma da doença nos frutos, embora constatado folhas com deformações e mosaico leve. Estes resultados comprovam o potencial do uso de espécies silvestres para o melhoramento genético do maracujá na busca de resistência a patógenos, principalmente o CABMV (PAULA et al., 2010; OLIVEIRA, G.A.F. et al., 2013).

Para aplicação dos programas de melhoramento é importante e necessário o conhecimento da variabilidade genética conservada, caracterizando os genótipos e identificando indivíduos promissores que possam ser utilizados (FREITAS et al., 2011; MORALES et al., 2011; PAIVA et al., 2014). Neste contexto, os marcadores moleculares são uma ferramenta útil 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 da seleção de plantas melhoradas (DUDLEY, 1993; FALEIRO et al., 2005; HENRY, 2012; OLIVEIRA, E.J. et al., 2013).

Visto a importância dos estudos fenotípicos para o melhoramento da espécie, outras formas de melhoramento vêm sendo aplicadas, objetivando o desenvolvimento de plantas melhoradas, com características de destaque, como resistência e produtividade. As cultivares são desenvolvidas por técnicas de seleção e cruzamentos, a fim de se obter uma planta com características uniformes e de interesse comercial (JUNQUEIRA et al., 2016).

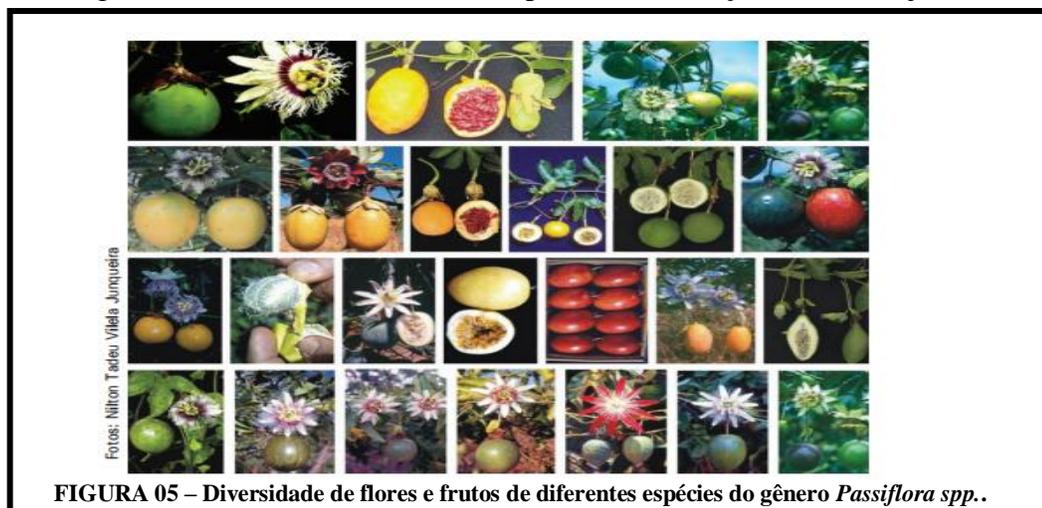
A primeira cultivar comercial de maracujá foi registrada no MAPA em 1999, pela empresa Feltrin Sementes Ltda., denominada de Amarelo. Em seguida, outras cultivares começaram a serem desenvolvidas e registradas por empresas privadas e institutos de pesquisa, como o Instituto Agrônomo (IAC). Em 2008, a EMBRAPA trabalhando em parceria com a Universidade de Brasília (UnB), lançou os três primeiros híbridos de maracujá-azedo: BRS GA1 (BRS Gigante-Amarelo); BRS SC1 (BRS Sol do Cerrado); e BRS OV1 (BRS Ouro-Vermelho). Em 2012, lançou o BRS RC (Rubi do Cerrado), também um híbrido da *P. edulis* Sims. A última cultivar foi lançada em 2016, um híbrido interespecífico ornamental, cruzamento de *P. edulis* Sims. com *P. incarnata* (Figura 04). Cada cultivar citada possui características específicas visando aumento da

produtividade, porém outros cultivares foram lançadas com o objetivo de atingir mercados diferentes, como ornamental e medicinal, utilizando outras espécies. Posteriormente, a EMBRAPA também lançou cultivares com outras espécies que vem se destacando, principalmente em relação a resistência, como o BRS Pérola do Cerrado (2013), que utilizou a *Passiflora setacea*, e em 2015, a cultivar BRS Sertão Forte, utilizando a *Passiflora cincinnata* (FALEIRO et al., 2008; JUNQUEIRA et al., 2016).



### Diversidade genética do maracujazeiro

O gênero *Passiflora* possui um grande número de espécies, principalmente na América do Sul, sendo o Brasil e a Colômbia os centros de diversidade. Mesmo possuindo esta alta diversidade de espécies (Figura 05), estudos são necessários para a conservação do maracujazeiro.



De acordo o local de ocorrência de determinada espécie, devido as características da região e a ação humana sobre os biomas causando essa erosão genética. Portanto as informações de variabilidade e estrutura genética são importantes para a conservação da diversidade do maracujazeiro (OCAMPO et al., 2010; FALEIRO et al., 2011). Estudos com 58 espécies de maracujazeiro indicou que a maioria destas estavam distribuídas em dois ou apenas um bioma dos existentes no Brasil. Porém, a *P. edulis* Sims. está distribuída amplamente em todos os biomas brasileiros, sendo uma das espécies mais adaptadas no território nacional (SCHERER, 2014).

Os materiais genéticos são fontes de variabilidade tanto para programas de melhoramento quanto para apoiar estratégias de conservação. Entretanto, mesmo a *Passiflora* spp. possuindo uma diversidade de espécies dispersos em diferentes biomas tropicais, as informações de diversidade genética são escassas para a maioria das espécies. A maioria dos estudos de diversidade do maracujazeiro teve início com o estabelecimento e uso de descritores morfológicos e agrônômicos, objetivando ações de pré-melhoramento (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014; 2016).

Os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) (Figura 06) são uma das estratégias de conservação da biodiversidade utilizada, visto que diferentes acessos são armazenados e caracterizados. Porém, os BAGs de maracujazeiro existentes são considerados incipientes tanto no Brasil quanto no mundo. É estimado que, pelo menos 1200 acessos de *Passiflora* spp. são preservados em 50 coleções de germoplasma, distribuídas em aproximadamente 32 países. Entre esses, destacam-se o Brasil, Equador, Peru e Colômbia, com aproximadamente 84% de sua totalidade (FERREIRA, 2005; FALEIRO et al., 2011).



O Brasil, mesmo sendo um importante centro de diversidade do maracujazeiro, possui em

suas coleções menos de 70 espécies do gênero, ou aproximadamente 50% das espécies brasileiras (FERREIRA, 2005). Os BAGs de maracujazeiro estão presentes em centros de pesquisa espalhados no país, sendo estimado que aproximadamente 25% dos acessos existentes nestes bancos sejam das espécies de maracujá com maior interesse comercial, *P. edulis* Sims. e *P. alata* (WETZEL et al., 2011). Além disso, a maioria dos acessos nos BAGs carece de caracterizações biológicas, genéticas e moleculares. Os estudos de diversidade utilizando os marcadores moleculares como ferramenta, surgiram com a evolução das técnicas de biologia molecular, as quais fornecem informações aplicáveis à conservação e manipulação da biodiversidade (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014).

A caracterização de BAGs utilizando as ferramentas moleculares, análises e índices de diversidade alélica são essenciais para programas de melhoramento da espécie, além de uma estratégia de conservação da diversidade. Estes estudos de variabilidade genética orientam a escolha de progênies para melhoristas, auxiliando também como ferramenta na seleção de descritores morfo-agronômicos que caracterizam os acessos em bancos de germoplasma (JESUS et al., 2017).

### **Marcadores Moleculares**

Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998). A evolução das técnicas em biologia molecular sobre os estudos do DNA possibilitou o surgimento dos marcadores moleculares na década de 1980 passando a integrar a rotina de análises de diferentes espécies. Com a evolução da ferramenta, o seu aperfeiçoamento é resultante dos avanços tecnológicos no sequenciamento em larga escala (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Os primeiros marcadores moleculares desenvolvidos foram os marcadores isoenzimáticos ou bioquímicos, tendo como fonte a comparação das diferentes formas moleculares (variantes) de uma enzima, apresentando função idêntica ou similar, presente em um mesmo indivíduo. Com o aprimoramento das técnicas de biologia molecular, o DNA passou a ser o foco para o desenvolvimento de novos marcadores, caracterizando variações genômicas naturais entre indivíduos e as heranças genéticas. O custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade, são pontos importantes que diferenciam os tipos de marcador molecular. A técnica e metodologia utilizada classificam os marcadores em grupos, sendo esses baseados na amplificação do DNA via “PCR” (*Polymerase Chain Reaction*) e mais recentemente, em sequenciamento, sendo este último

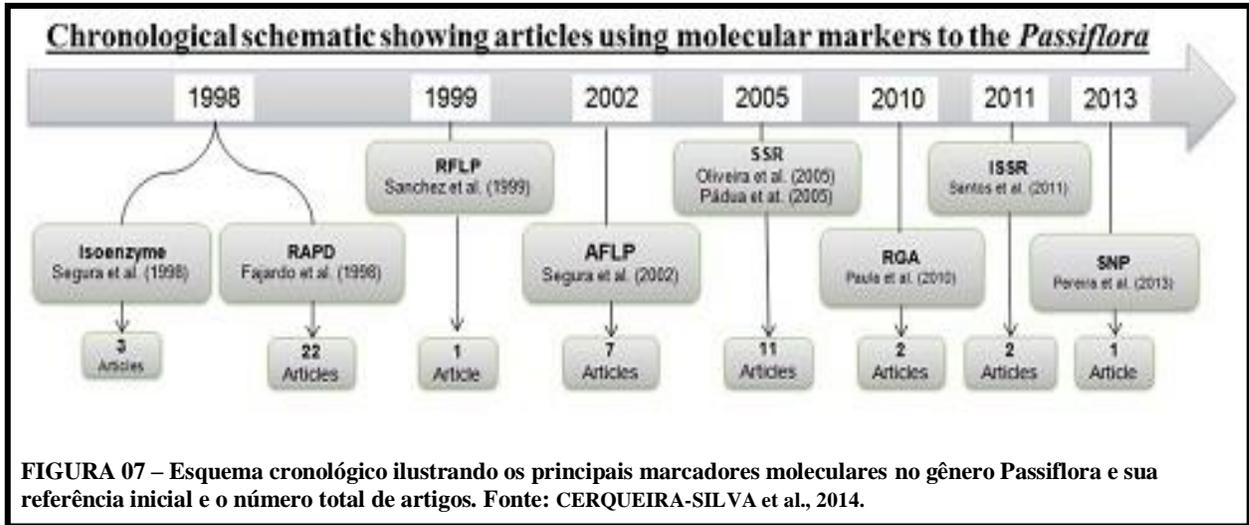
os mais utilizados (BORÉM & CAIXETA, 2009; TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Levando em consideração os principais marcadores, estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*); minissatélites ou locus VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), ISSR (*Inter-simple Sequence repeats*), Microsatélites ou SSR (*Single Sequence Repeat*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) STS (*Sequence Tagged Sites*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), e os RGAs (*Resistance gene Analogs*) (GUIMARÃES et al., 2009; TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

No melhoramento vegetal diferentes técnicas são importantes para identificar e selecionar genótipos superiores. Estas podem variar desde a seleção fenotípica até as complexas metodologias e ferramentas moleculares (DENIS & BOUVET, 2013). A alta disponibilidade de diferentes marcadores moleculares é muito importante para o melhoramento de plantas, cuja disponibilidade garante uma bagagem informacional, a fim de caracterizar e selecionar indivíduos para o etapas de melhoramento, bem como avaliar e analisar as diversidades genéticas (KALIA et al., 2011; JIANG, 2013; PEREIRA et al., 2005).

Devido à alta diversidade e importância econômica, inúmeros estudos de caracterização genética no gênero *Passiflora* têm sido elaborados com diferentes marcadores moleculares, sendo os estudos pioneiros realizados com marcadores RAPD (WILLIAMS et al., 1990). Existem outros marcadores baseados em PCR que utilizam um ou dois iniciadores na amplificação das sequências alvo, e que são utilizados em pesquisas com melhoramento vegetal dentro do gênero *Passiflora*. Exemplo desse tipo de marcador, é o RGA – *Resistance Gene Analogs* (PFLIEGER et al., 2001; VALLAD et al., 2001; LÓPEZ et al., 2003; VAN DER LINDEN et al., 2004).

Diferentes estudos genéticos estão sendo mais rotineiros para espécies do gênero *Passiflora*. Dentre esses têm-se utilizado diferentes tipos de espécies, nas quais são submetidas à estudos intra ou interespecíficos, utilizando marcadores dominantes e até mesmo desenvolvimento de marcadores codominantes específicos à espécie alvo do estudo. A maioria dos estudos são voltados para a diversidade genética baseada em marcadores dominantes. Embora este tipo de marcador seja útil, possui limitação, como a baixa repetibilidade por exemplo. Para estudos voltados para as passifloras, têm-se o uso dos marcadores RAPD, RFLP, AFLP, SSR, RGA, ISSR e SNP, em ordem cronológica, respectivamente (Figura 07) (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014).



Os marcadores moleculares têm acompanhado os avanços da era genômica, beneficiando-se do volume de informações de sequências de DNA disponíveis. Este avanço foi acompanhado pelo desenvolvimento nas áreas da bioinformática, da estatística e da genética quantitativa. A aplicação de estudos de diversidade genética, e fornece suporte para os programas de melhoramento genético, os quais resultam em avanços para o desenvolvimento de variedades melhoradas (GUIMARÃES et al., 2009).

### **Regiões Análogas a Genes de Resistência – RGA (*Resistance Gene Analogs*)**

Os marcadores moleculares atuam como uma importante ferramenta, tendo em vista que o processo clássico gera um alto custo e demanda tempo para a obtenção dos resultados de estimativa da diversidade. Portanto, esses marcadores atuam como um facilitador para estudos de diversidade, pois reduz o tempo para obter grande quantidade de informações genéticas (FERREIRA & RANGEL, 2011; NASS, 2011). Dentre os diferentes marcadores moleculares existentes, os RGAs associados a genes de resistência, têm sido uma ótima ferramenta aplicada nos programas de melhoramento genético vegetal. Assim, diminuindo cada vez mais as dificuldades em identificar os diferentes fenótipos relacionados à resistência das plantas (TULLU et al., 2006).

Os genes de resistência existentes em plantas possuem regiões filogeneticamente conservadas, sendo estas denominadas “motivos”. Estas regiões possuem características diferenciadas como proteínas ricas em leucina (LRR), sítios de ligação a nucleotídeos (NBS), estruturas complexas de NBS-LRR e proteínas quinases, além de regiões transmembranares ricas em leucina (LRR-TM) (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1997; JONES, 2001; MEYERS et al., 1999). Esta estrutura conservada possui interesse do ponto de vista genético, sendo elas regiões

conservadas que podem representar a existência de sítios importantes na expressão fenotípica de genes de resistência (BENT, 1996). Em diferentes estudos, foram observados que os marcadores do tipo RGAs são fortemente conectados a estes genes de resistência ou a segmentos de genes de resistência funcionais (COLLINS et al., 2001).

É sabido que, os fenótipos de resistência são de difícil identificação. Logo, os marcadores moleculares do tipo RGAs representam uma importante ferramenta para selecionar genótipos de interesse, principalmente na identificação de genes de resistência em plantas. Estes marcadores podem ser utilizados na construção de mapas genéticos e em seleção assistida dentro de programas de melhoramento vegetal (GEFFROY et al., 1999; TULLU et al., 2006).

Outros estudos demonstram o potencial do marcador RGA em estudos de diversidade genética de populações de diferentes espécies de passifloras. Pesquisas realizadas com espécies de populações nativas de *P. setacea* do estado da Bahia apontaram a eficiência do uso de marcadores do tipo RGA para estudos de diversidade genética. Neste estudo os autores destacaram quatro pares de primers RGAs (PEREIRA et al., 2015), com variação na porcentagem de locos polimórficos e alta diferenciação genética entre as populações desta espécie. Contudo, estudos dessa natureza são importantes e úteis para aplicação no melhoramento genético bem como para o desenvolvimento das estratégias de preservação.

## CAPÍTULO II

### VARIABILIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE *Passiflora edulis* Sims. COM BASE EM MARCADORES ANÁLOGOS A GENES DE RESISTÊNCIA

Lucas Amorim Silveira<sup>1</sup>, Thayse Karollyne dos Santos Fonseca<sup>2</sup>, Nátilla Deyse Souza Costa Dias<sup>2</sup>, Larissa Neres Barbosa de Souza<sup>2</sup>, Onildo Nunes de Jesus<sup>3</sup>, Fabio Gelape Faleiro<sup>4</sup>, Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva<sup>1,5</sup>, Elisa Susilene Lisboa dos Santos<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 45700-000;

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 45700-000;

<sup>3</sup>EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 44380-000;

<sup>4</sup>EMBRAPA Cerrados, Brasília, DF, 73310-970;

<sup>5</sup>Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 45700-000

Autor para correspondência: E. S. L. Santos

E-mail: elisa.lisboa@uesb.edu.br

**RESUMO:** O Brasil é um dos centros de diversidade do gênero *Passiflora*, sendo *P. edulis* Sims. a espécie mais cultivada. A crescente evolução da área de plantio é resultante da demanda dos diferentes setores industriais, principalmente do mercado *in natura*. A cultura brasileira do maracujazeiro sofre perdas consideráveis causadas pelos patógenos que acometem o maracujazeiro. A variabilidade genética existente dentro do gênero *Passiflora*, disponíveis em Bancos Ativos de Germoplasma, é importante para subsidiar programas de melhoramento. Os estudos genético-moleculares utilizando como ferramenta os marcadores moleculares ganharam destaque, permitindo a obtenção de informações de interesse para a utilização no melhoramento da espécie, com menor custo e tempo. Este estudo teve por finalidade avaliar a diversidade genética de 163 plantas de *P. edulis* Sims., totalizando 71 acessos e 5 cultivares, existentes na coleção das Embrapa Cerrados e Mandioca & Fruticultura, utilizando marcador molecular análogo a genes de resistência – RGA. Foram utilizadas 9 combinações de *primers* RGAs, sendo obtido um total de 157 marcadores, com média de 18,1 marcadores por combinação de primers. A Heterozigosidade esperada média, considerando o Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi de 0,18. A média do conteúdo médio de informação polimórfica foi de 0,15. A porcentagem de variância molecular evidenciou 82% de diversidade existente dentro dos BAGs. Os genótipos foram estruturados em três *pools* gênicos, sendo um subgrupo mais heterogêneo formado por acessos de ambos os bancos, um outro homogêneo com acessos apenas do BAG Cerrados, e o último predominando as cultivares do mesmo banco. O PCoA demonstrou distribuição com agrupamentos de acordo a estruturação encontrada, além de trazer informações da distribuição dos acessos e cultivares. As estruturações dos genótipos, juntamente com o PCoA, mostraram que mesmo os bancos possuindo materiais parecidos geneticamente entre eles, existe variabilidade entre os acessos de cada BAG, no qual é importante para a manutenção do germoplasma da espécie. Além disso, ainda existe material genômico passivo para ser utilizado no desenvolvimento de novas cultivares. A partir desse estudo, foi possível observar que a diversidade genética existente na espécie dentro dos BAGs, fornecem informações importantes para a manutenção desses bancos de germoplasma, além do uso em programas de melhoramento genético.

**Palavras-chave:** Recursos genético, marcadores moleculares, maracujazeiro, germoplasma.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* possui entre 150 a 170 espécies distribuídas nas zonas tropicais, sendo o Brasil e a Colômbia os principais centros de diversidade. Esta riqueza de espécies possibilita a ocorrência de alta variabilidade genética do gênero, tanto interespecífica quanto intraespecífica (NUNES & QUEIROZ, 2006; BERNACCI et al., 2014).

Entre as diferentes espécies de maracujazeiros, a *P. edulis* Sims. é a predominante nos campos de produção de maracujá no Brasil. Entretanto, a produtividade média da espécie está abaixo do esperado, considerando o potencial estimado da cultura. Os ataques de patógenos, a seca existente em algumas regiões do Brasil, além do manejo incorreto são fatores determinantes na baixa produtividade do maracujá no país (CERQUEIRA-SILVA et al., 2018).

A *P. edulis* Sims., mesmo com uma produtividade considerada baixa, ainda é uma cultura importante, tanto para o grande quanto o pequeno produtor rural. A cultura do maracujá gera renda durante o ano, com diferentes opções de mercado, além da possibilidade de agregar valor ao fruto, com o processamento e manufatura de outros produtos à base do maracujá. Visando a importância social e econômica dessa cultura, a disponibilidade de um material melhorado e o uso de técnicas corretas de manejo reduzem custos de produção, otimizando a cultura e gerando mais renda aos pequenos, médios e grandes fruticultores (FALEIRO & JUNQUEIRA, 2016).

A diversidade genética de passifloras existentes no Brasil levou ao desenvolvimento de estudos a fim de se obter informações genéticas sobre as características de interesse comercial, como produtividade e resistência à fatores bióticos, como pragas e patógenos (PAULA et al. 2010).

Os melhoristas buscam aumentar a produtividade da cultura por meio da seleção de genótipos superiores que possuem resistência às doenças que afetam o maracujazeiro. Para se obter sucesso dentro dos programas de melhoramento, é necessário realizar etapas de pré-melhoramento, como a prospecção, caracterização e conservação de germoplasma (FALEIRO et al., 2005; MELETTI, 2011).

O Brasil possui um amplo acervo de espécies distribuídas e conservadas em Bancos Ativos de Germoplasma – BAG, onde diferentes genótipos de espécies do gênero *Passiflora* são estudados e conservados. O germoplasma conservado em BAGs no Brasil está concentrado em institutos de pesquisa por todo o país, sendo que, dentre os acessos de diferentes espécies armazenados, a *P. edulis* Sims. prevalece. Esta proporção se deve ao fato destas espécies serem aquelas que são mais cultivadas no Brasil (FERREIRA et al., 2005; WETZEL et al., 2011). É necessária a busca e a

manutenção de números cada vez maiores de espécies para fomentar estes bancos, a fim de buscar informações de diversidade genética do maracujazeiro, visando contribuir com os programas de melhoramento genético (CERQUEIRA-SILVA et al., 2018).

Os BAGs são importantes para a manutenção da diversidade do maracujazeiro. Além do objetivo de conservação da diversidade existente, as espécies presentes nos bancos ficam disponíveis para descrição e caracterização utilizando ferramentas genético-moleculares que possibilita obter o maior conteúdo de informações sobre cada acesso. Uma destas ferramentas são os marcadores moleculares, importantes no mapeamento de genes de interesse e em estudos de diversidade e conservação (KALIA et al., 2011).

Entre os marcadores moleculares utilizados em pesquisas com melhoramento vegetal, os marcadores análogos a genes de resistência – RGA (*Resistance Gene Analogs*) são úteis para esta finalidade, uma vez que permite acessar variações genéticas diretamente relacionadas aos genes de resistência à doenças em diferentes espécies de plantas. Estes genes possuem regiões conservadas nas plantas que representam sítios importantes no que diz respeito à expressão da resistência genética (COLLINS et al., 2001; SELVARAJ et al., 2011).

Visto a necessidade de se identificar as características de resistência em plantas, e caracterizar geneticamente os acessos existentes em diferentes bancos de germoplasma, de forma rápida objetivou-se avaliar a diversidade genética e a estruturação de acessos de *Passiflora edulis* Sims. existentes nos bancos ativos de germoplasma das unidades da Embrapa Cerrados (Brasília – DF) e Mandioca & Fruticultura (Cruz das Almas – BA) por meio de marcadores moleculares RGAs.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material Vegetal**

Para viabilizar o estudo, coletou-se amostras de folhas jovens e sadias de 163 plantas (Anexo 01), totalizando 71 acessos e 5 cultivares (BRS Céu do Cerrado, BRS Gigante Amarelo, BRS Rubi do Cerrado, BRS Sol do Cerrado e BRS Maracujá Jaboticaba), localizadas nos Bancos Ativos de Germoplasma de *Passiflora* ssp. das duas unidades da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura (Cruz da Almas, BA) e EMBRAPA Cerrados (Brasília, DF). Destes, 34 acessos (99 plantas) do BAG da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 37 acessos (37 plantas) e 5 cultivares (27 plantas) da EMBRAPA Cerrados, BAG Flor da Paixão.

O DNA genômico foi isolado a partir do material vegetal utilizando o método do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (DOYLE & DOYLE, 1990) e armazenado a -20 °C, no Laboratório de Genética Molecular Aplicada (LGMA) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga, Bahia.

### Genotipagem das Amostras

Para a caracterização da diversidade genética utilizou-se 9 pares de primers RGAs (Tabela 01), utilizados por PAULA et al., (2010), PEREIRA (2012) e SOUSA et al. (2015), em estudos de diversidade genética de passifloras. As reações de amplificação via PCR foram conduzidas em termociclador Veriti™ 96-Well ThermalCycler (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA) realizadas com volume final de 16 µL contendo 8ng de DNA genômico, tampão de PCR 10X (20 mM Tris-HCl [pH 8,4] e 50 mM de KCl), 1,2 mM de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 2mM de cada de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs), 0,2 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1,2 µM de cada primer. O programa de amplificação incluiu desnaturação inicial por 5 minutos a 95 °C; seguido por 34 ciclos (95 °C por 30 segundos, 37°C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e 20 segundos); e extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% (m/v) em solução TBE 0,5X, com intercalante de DNA GelRed® (Biotium Inc.) por aproximadamente 2 horas, a 120 V. A visualização dos produtos de amplificação foi realizada em sistema de fotodocumentação Kodak, sob incidência de luz ultravioleta.

**Tabela 01** – Combinações de nove iniciadores RGA (*Resistance Gene Analogs*) utilizados para caracterização de *P. edulis* Sims., e suas respectivas sequências de nucleotídeos.

INICIADORES	SEQUÊNCIA 5' - 3'
S1 + NBSr1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG
	GGTGGGGTTGGGAAGACAACGYCT
S2 + As1	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC
	CAAGGCTAGTGGCAATCC
S1 + As1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG
	CAAGGCTAGTGGCAATCC
S1 + As2	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG
	IAAIGCIAGIGGIAAICC
NBSf1 + NBSr1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC
	GGTGGGGTTGGGAAGACAACGYCT

NBSf1 + As1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC
	CAAGGCTAGTGGCAATCC
RGA1f + RGA2r	AGTTTATTATTYSATTGCT
	CACACGGTTTAAAATTCTCA
S1+ As3	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG
	IAGIGCIAGIGGIAGICC
As1 + As3	CAAGGCTAGTGGCAATCC
	IAGIGCIAGIGGIAGICC

Bases degeneradas: Y=C ou T; R=A ou G; N= A, T, C ou G; S=G ou C

### Análises Descritivas e Estatísticas

O padrão de amplificação presente nos géis foi avaliado por dois pesquisadores, sendo convertido em dados binários, onde foi atribuído 1 para presença e 0 para ausência de marcadores (amplicon). As análises descritivas associadas às amplificações permitiram avaliar e obter dados sobre os polimorfismos: quantidade de marcadores obtidos por combinação de primers; médias da quantidade de marcadores considerando o total de pares de primers; porcentagem de polimorfismo; quantidade de marcadores compartilhados; exclusivos de cada BAG; e porcentagem de marcadores raros (ocorrência em até 5% das plantas avaliadas).

As estimativas de diversidade genética foram calculadas utilizando *software* GenALEX v.6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012) foi utilizado para análise descritiva dos dados e avaliar a distribuição dos genótipos em espaço bidimensional, levando em consideração a diversidade genética. A fim de visualizar esta distribuição, a análise discriminante pelas Análises de Coordenadas Principais (PCoA) foram geradas, além da análise da Variância Molecular (AMOVA). Foram analisados ambos os BAGs, de forma individual, quanto em conjunto, verificando a diversidade existente entre eles, e dentro dos mesmos.

Análise Bayesiana da estrutura populacional foi realizada pelo *software* STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000), assumindo como parâmetros a avaliação do número de *pools* gênicos (K) de 1 a 10, com 10 simulações para cada K. O período de *burn-in* aplicado foi de 100.000 interações e o número de repetições MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) foi de 1.000.000. A escolha do valor de Delta K com melhor representatividade da estrutura genética dos genótipos avaliados foi baseado no método descrito por EVANNO et al. (2005), implementado na ferramenta *online Structure Harvester* (EARL & VONHOLDT, 2012). Para efeito de análise, uma planta foi

considerada como pertencente a um *pool* gênico apresentam uma identidade mínima de 70% com este *pool* ( $Q \geq 0,7$ ). Valores inferiores a 70% indicam misturas de *pools* gênicos e serão tratadas como heterogêneas.

Foram estimadas as frequências alélicas, a heterozigiosidade esperada ( $H_e$ ), considerando o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, e o conteúdo médio de informação polimórfica (PIC), com o *software* GENES (CRUZ, 2013). A  $H_e$  do locus foi calculada pela fórmula abaixo, proposta por NEI (1973), onde é considerada que as populações estudadas estão em equilíbrio.

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2$$

Onde:  
 $x_i$  = frequência de alelo  $i$   
 $k$  = número de alelos

O PIC quantifica a informação do locus polimórfico, sendo assim um parâmetro diretamente relacionado com os marcadores e sua frequência. Estes são classificados de acordo o valor, onde índices abaixo de 0,25 são levemente informativos; entre 0,25 e 0,50, razoavelmente informativos; e acima de 0,50 altamente informativos (BOTSTEIN et al., 1980). O PIC foi calculado de acordo a seguinte fórmula:

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^k x_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2x_i^2 x_j^2$$

FONTE: BOTSTEIN et al. (1980).

## RESULTADOS

Do total de 157 marcadores foram obtidos uma média de 17,4 marcadores por combinação de primers (Tabela 02). Ao analisar os BAGs de forma separada, as plantas obtidas a partir do BAG da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura apresentaram total de 124 marcadores, com média de 13,8 marcadores por combinação de primers. Os acessos do BAG da EMBRAPA Cerrados apresentaram total de 72 marcadores, com média de 8 marcadores por combinação de primers. Em relação às cultivares observou-se um total de 61 marcadores, com média de 6,8, com 100% de polimorfismo para os marcadores obtidos.

**Tabela 02** – Análise descritiva e diversidade genética obtida a partir de 9 combinações de iniciadores RGAs e 163 genótipos de *Passiflora edulis* Sims. oriundos de Bancos Ativos de Germoplasmas das EMBRAPAs Cerrados e EMBRAPA Mandioca e Fruticultura.

COMBINAÇÃO PRIMERS RGA	MARCADORES	MARCADORES RAROS	MARCADORES EXCLUSIVOS Mandioca e Fruticultura	MARCADORES EXCLUSIVOS Cerrados	MARCADORES EXCLUSIVOS Cultivares	He	PIC
S2 + As1	18	6	5	1	0	0.21	0.17
S1 + As2	18	13	1	3	3	0.16	0.13
S1 + As1	19	8	3	2	3	0.13	0.11
As1 + As3	14	3	0	1	3	0.27	0.22
S1 + NBSr1	17	5	2	0	1	0.17	0.15
S1 + As3	29	18	7	0	3	0.12	0.10
RGA1f + RGA2r	14	4	1	0	2	0.28	0.23
NBSf1 + As1	16	7	0	2	4	0.16	0.14
NBSf1 + NBSr1	12	3	0	0	2	0.13	0.12
<b>TOTAL</b>	157	39	19	9	21	<b>MÉDIA</b>	
						0,18	0,15

HE: Heterozigidade esperada; PIC: Conteúdo de Informação Polimórfica

Em relação aos marcadores raros, foram encontrados total de 39 marcadores (24,8%). Avaliando os BAGs de forma separada, o BAG Mandioca e Fruticultura obteve 33,1% de marcadores raros do total observado neste banco. Os acessos oriundos do BAG Cerrados apresentaram um total de 33,3% de marcadores raros e as cultivares, 2,8%. Observou-se também a presença de marcadores exclusivos em ambos os BAGs, sendo que o BAG Mandioca e Fruticultura apresentou maior número de marcadores exclusivos, com 19. Os pares de primers As1+As3 e NBSf1+As1 evidenciaram alguns marcadores existentes apenas nos acessos do BAG Cerrados. A combinação de primers NBSf1+NBSr1 não evidenciaram nenhum marcador exclusivo entre os acessos.

A heterozigidade esperada (He), considerando o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, na população de ambos os bancos de germoplasma variou de 0,12 para os marcadores revelados pela combinação de primers S1+As3, até 0,28 para os primers RGA1f + RGA2r. A média de HE para os 9 pares de primers foi de 0,18. O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,10 a 0,23, para os mesmos pares de primers, e a média do PIC, foi de 0,15, respectivamente.

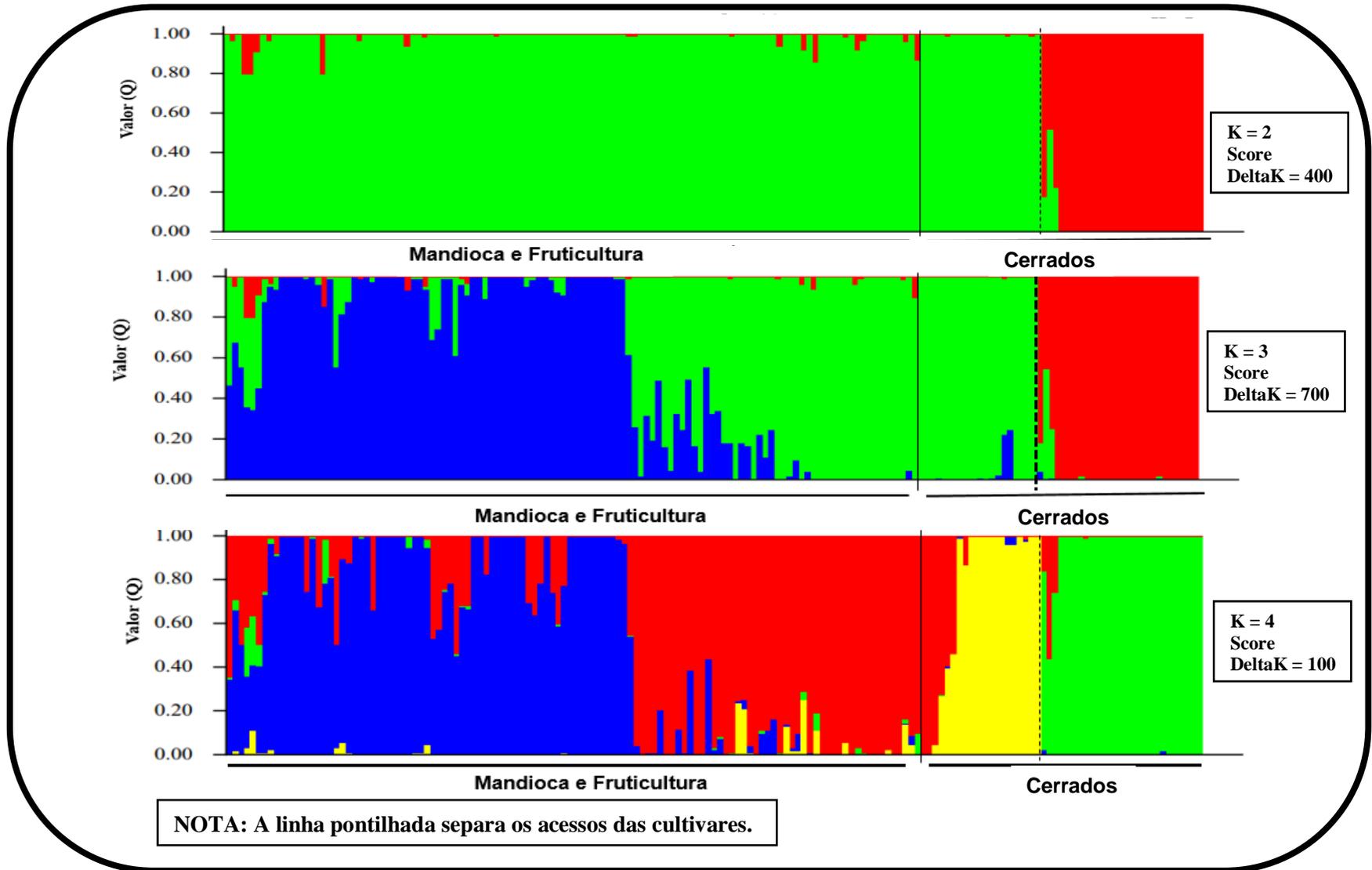
A inferência Bayesiana indicou o número de três *pools* gênicos (K=3), sendo este o número mais provável existente para os 71 acessos e 5 cultivares pertencentes às 163 plantas avaliadas

(Figura 08). O histograma com  $K=3$  ilustra a estruturação dos genótipos avaliados. A distribuição dos acessos nesses três *pools* gênicos, estão representados pelas cores azul, verde e vermelha. Dessa forma, o BAG Mandioca e Fruticultura apresenta genótipos de *P. edulis* homogêneas para dois *pools* gênicos, representados pelas cores azul e verde. Por outro lado, é possível observar também genótipos heterogêneos neste BAG, possuindo de dois até três *pools* gênicos na constituição genética. Este banco possui 55 plantas características do *pool* azul, 30 plantas características do *pool* verde, e 14 plantas heterogêneas. Os acessos de *P. edulis* coletados na EMBRAPA Cerrados apresentaram maior homogeneidade para o *pool* representado pela cor verde. Neste, existem um total de 37 acessos, todas pertencentes ao *pool* verde. O terceiro *pool*, representado pela cor vermelha, abriga exclusivamente as cultivares. Das 27 plantas, apenas 1 é heterogênea. Embora seja do mesmo banco, as cultivares são plantas melhoradas, obtidas por meio de cruzamentos intra e interespecíficos. Esses resultados registraram que o *P. edulis* Sims. mantida nesses BAGs possui sua própria estruturação, com genótipos homogêneos, em maioria.

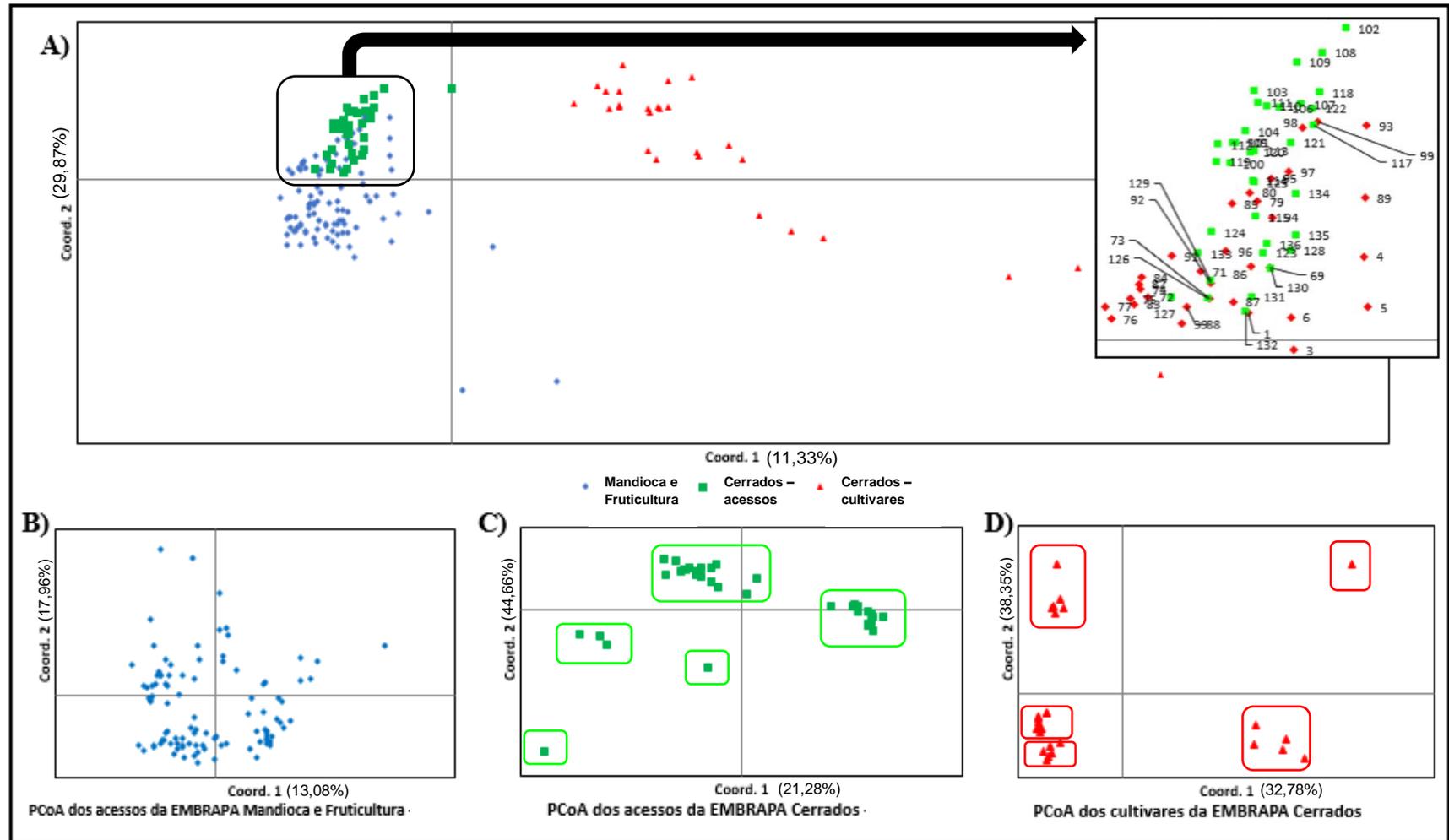
O apêndice 01 reporta os valores de Delta K, visto que para o  $K=2$  e  $K=4$  (Figura 08) os valores podem ser considerados para uma avaliação mais detalhada desta estruturação. A estruturação  $K=2$  separa os acessos e as cultivares, e o  $K=4$  traz subestruturas que representam os acessos únicos em cada banco, aqueles que possuem relação alélica e as cultivares.

Buscando avaliar a diversidade genética existente entre os acessos de *P. edulis* Sims. coletadas em ambos os BAGs, os gráficos da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foram gerados quatro gráficos de PCoA, sendo um relacionando todas as 163 plantas, e outros três, representativos dos acessos de cada BAG e das cultivares (Figura 09).

**Figura 08** – Histograma de estruturação dos *pools* gênicos, para os acessos de *Passiflora edulis* Sims. mantidos em Bancos de Germoplasma das unidades da EMBRAPA Cerrados e EMBRAPA Mandioca e Fruticultura.



**Figura 09** –A) Análises de Coordenadas Principais (PCoA) para dispersão dos acessos e cultivares de *Passiflora edulis* Sims. obtidos nos Bancos de Germoplasma das unidades da EMBRAPA Cerrados e EMBRAPA Mandioca e Fruticultura; B) PCoA para os acessos da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura; C) PCoA para os acessos da EMBRAPA Cerrados; D) PCoA para dispersão dos cultivares da EMBRAPA Cerrados.



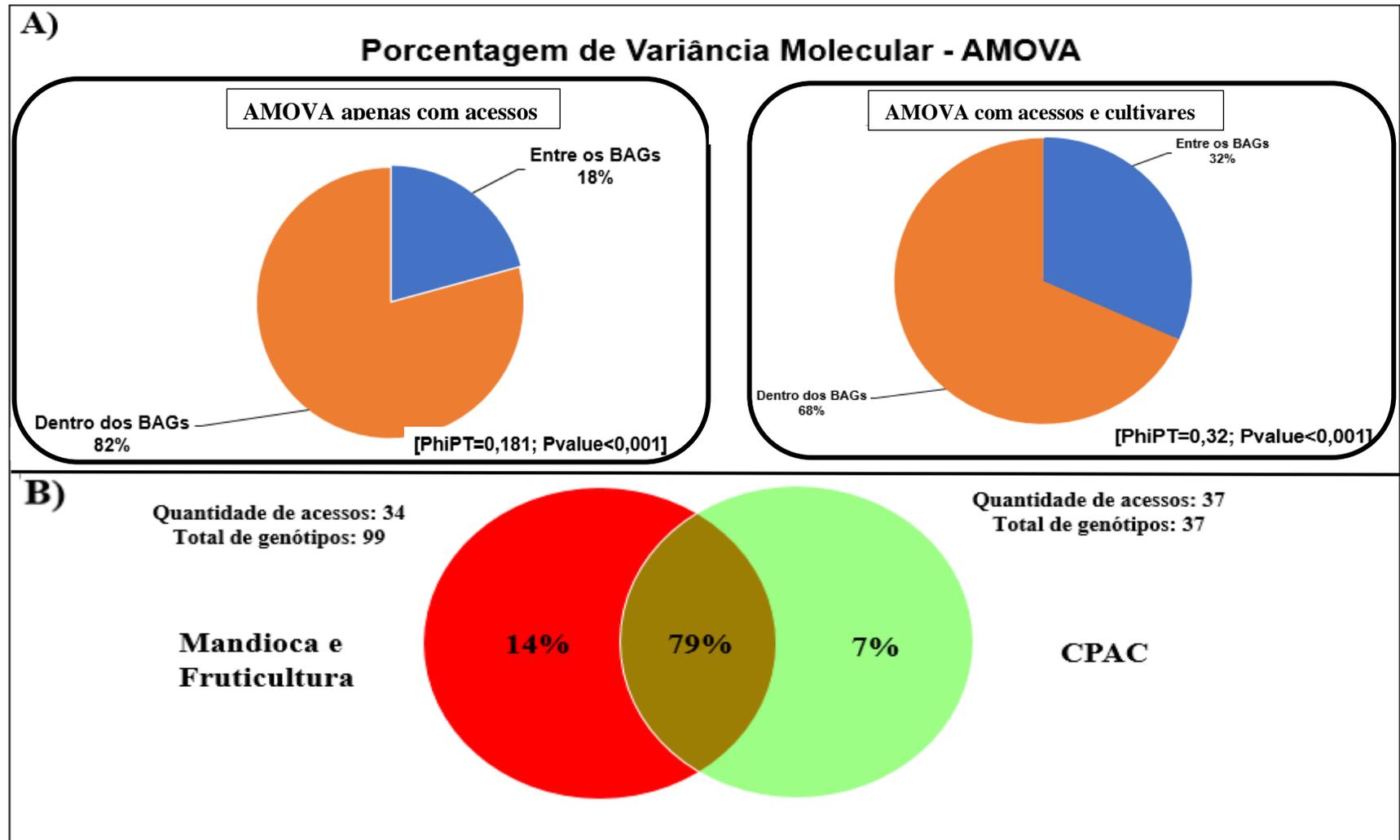
Observando o PCoA foi possível identificar a separação clara entre os acessos e as cultivares. Assim como observado na estruturação (Figura 08), houve sobreposição de parte da informação genética dos acessos presente nos dois BAGs, o que é representado pelo *pool* gênico marcado em verde no histograma. Ainda em relação a dispersão dos acessos, foi possível verificar maior dispersão das plantas dos acessos do BAG da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura (genótipos em azul) do que do BAG Cerrados (genótipos em verde) (Figura 09A). Essa observação foi confirmada a partir da análise discriminatória individual pelo PCoA. A representação gráfica indicou maior variabilidade entre os acessos do banco da Mandioca e Fruticultura.

No PCoA (Figura 09A), foi possível observar a relação genética existente entre acessos de ambos os bancos, onde quatro pontos que se sobrepõem. Os componentes principais individualmente gerados para cada grupo (Figura 09), apresentou a dispersão existente dentro de cada BAG e entre as cultivares. O BAG Mandioca e Fruticultura (Figura 09B) possui uma alta dispersão no gráfico. Para o BAG Cerrados, observou-se pelo menos cinco grupos (Figura 09C), e no gráfico dos cultivares (Figura 09D), quatro grupos distintos, sendo dois mais próximos, distribuídos em um dos quadrantes do PCoA.

Os genótipos referentes às cultivares se distribuíram nos outros quadrantes, possuindo assim uma relação mais distante com os acessos de ambos os bancos (Figura 09A). A distribuição dos cultivares nos quatro quadrantes (Figura 09D) indicando a variabilidade genética destas amostras, sendo a distribuição relacionada as cultivares e a origem das matrizes utilizadas no desenvolvimento destas.

A Análise de variância molecular – AMOVA, considerando apenas os acessos dos dois BAGs, além de um diagrama de Venn, trouxe informação de como está os BAGs em relação aos seus marcadores, quantos são únicos de cada BAG e quantos são compartilhados (Figura 10). Essa análise indicou elevada diversidade genética dentro dos BAGs (82%), e menor entre, com 18%, evidenciando assim a diversidade genética (Figura 10A). Para a classificação dos marcadores, foi observado a porcentagem de marcadores exclusivos e compartilhados de cada banco, sendo observado que do total de 136 marcadores encontrados, 79% dos marcadores ocorrem nos dois bancos. Sendo o banco Mandioca e Fruticultura o que detém a maior parte, com 14% desses marcadores exclusivos.

**Figura 10** – A) Análise de variância molecular entre e dentro dos Bancos de Germoplasma (BAG) das unidades da EMBRAPA Cerrados e EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, desconsiderando e considerando as cultivares melhoradas; B) Classificação dos 136 marcadores encontrados para os acessos dos dois Bancos Ativos de Germoplasma do estudo, utilizando 9 pares de primers RGA.



## DISCUSSÃO

A utilização das ferramentas moleculares, especialmente os marcadores RGAs para estudos com o gênero *Passiflora* possui menos de 10 anos, sendo o estudo de PAULA et al. (2010) o primeiro publicado neste sentido (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014). Os estudos com os RGAs apresentaram potencial descritivo sobre as espécies de *Passiflora*, acessando alta porcentagem de regiões polimórficas, informação importante para estudos intraespecíficos de variabilidade genética (PAULA et al, 2010; PEREIRA, 2012). Além disso, estas informações subsidiam programas de seleção e melhoramento, uma vez que este tipo de marcador molecular possui relação com regiões de resistência potencialmente expressas (KANAZIN et al., 1996).

A análise descritiva dos dados indicou que a combinação de primer S1+As3 se destacou quanto ao número de marcadores gerados, seguido pelos pares de primers S1+As1, S2+As1 e S1+As2, com média de 21 marcadores por combinação de primers. A combinação NBSf1+NBSr1 foi a que obteve menor número de marcadores, com apenas 12 marcações. Médias parecidas foram encontradas no estudo de PEREIRA (2012), onde o autor, utilizando cinco pares de primers RGAs em 98 plantas de *P. edulis* Sims., entre elas cultivares, plantas de seleção regional e nativas, obteve 97 marcadores e média de 18,6 marcadores por combinação de primers, com 83% de polimorfismo. Os pares de primers s1+LM637 e S1+As3, utilizados pelo autor se destacaram, com 27 e 18 marcadores, respectivamente. Apenas os pares de primers S1+As2 e RGA1f+RGA2r não apresentaram marcas, diferente do atual estudo, onde foram obtidas 18 e 14 marcadores para estes mesmos pares de primers.

Trabalhos de estudos interespecíficos com diferentes espécies do gênero *Passiflora*, como o de PAULA et al. (2010), também observaram médias próximas destas apresentadas. Neste estudo, os autores utilizaram seis pares de primers RGA em diferentes acessos de oito espécies diferentes e um híbrido, do gênero *Passiflora*, no qual resultou em 99 marcadores, com média de 16,5 marcadores por combinação de primer, sendo 96,9% desses polimórficos. Notou-se que algumas combinações de pares de primers RGAs, apresentaram mais interessantes para estudos intraespecíficos, como é o caso da S1+As3 e, outras para estudos tanto intra quanto interespecíficos, como é o caso da S2+As1. Estes estudos demonstram o potencial uso deste tipo de marcador em estudos inter e intraespecíficos no gênero *Passiflora*, gerando dados importantes para avaliações de diversidade genética custo relativamente baixo.

A análise descritiva dos marcadores encontrados foi importante para agregar uma maior

quantidade de informações aos bancos, no sentido de caracterizar a diversidade existente no BAG e auxiliar a escolha de progenitores para programas de melhoramento. Ao se realizar uma análise do total de marcadores raros e exclusivos de cada BAG, foi possível observar que o BAG da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura possui 41 marcadores raros e o BAG da EMBRAPA Cerrados possui 24 marcadores raros. Os pares de primers S1+As3 e S1+As2 foram os que encontraram a maior quantidade destes marcadores raros. Portanto, faz-se necessário observar a ocorrência destes marcadores, e se esses se relacionam com características de interesse.

Além dos marcadores raros, foram também encontrados aqueles exclusivos a cada um dos BAGs, ou seja, marcador presente apenas nos acessos de cada banco. O BAG da Mandioca e Fruticultura possui maior número de marcadores exclusivos que o do Cerrados, podendo ser resultado do maior número de plantas avaliadas. Porém, ao incluir as cultivares, estes possuem maior número de marcadores exclusivos, uma vez que estas amostras são de materiais melhorados, advindos de cruzamentos intra e interespecíficos, desenvolvidos pela EMBRAPA. Os pares de primers RGAs que se destacaram foram as combinações S2+As3 no BAG Mandioca e Fruticultura, S1+As2, no BAG Cerrados, e NBSf1+As1 analisando as cultivares. Esta informação é interessante para a otimização da manutenção dos BAGs, visando a redução de custos.

A gestão de um banco de germoplasma demanda investimento e recursos humanos capacitados, buscando manter a maior variabilidade de alelos, o que é interessante aos programas de melhoramento. No PCoA foi observado quatro pontos com sobreposição de dois germoplasmas de acessos e bancos distintos. São eles: o BGP-222 com o CPAC MJ-21-07; o BGP-165 com o CPAC MJ-M-01-L1P3 PL4; o BGP-AU com o CPAC MJ-M-01-L2P5 PL2; e o BGP-226 com o CPAC MJ-M-01-L4P2 MA (Anexo 01). Visto a existência de material genético nos bancos molecularmente parecidos, caso seja necessário eliminar material de um dos BAGs, a fim de reduzir os custos de manutenção, é possível utilizar destas informações. Os BAGs necessitam de maiores informações sobre acessos de diferentes espécies, fonte de variabilidade genética, uma vez que, do total de acessos existentes nos BAGs existentes em centros de pesquisa no Brasil, aproximadamente 25% são de espécies comerciais. As estimativas de diversidade possuem como base dados moleculares, que podem ser relacionados com a caracterização morfo-agronômica (WETZEL et al., 2011; CERQUEIRA-SILVA et al., 2018).

A diversidade genética observada no PCoA (Figura 09) foi comprovada pela análise de variância molecular – AMOVA (Figura 10) resultando numa porcentagem maior de variabilidade

dentro dos BAGs (82%). Entretanto pode-se afirmar existência de diversidade genética intraespecífica entre os acessos de *P. edulis* Sims. presentes nos BAGs da EMBRAPA Cerrados, e Mandioca e Fruticultura. Também foi observado como os indivíduos melhorados (cultivares) possuem um genótipo melhorado, uma vez que foram desenvolvidas buscando os alelos de interesse comercial, a partir do processo de melhoramento. Embora esta informação seja importante na seleção de acessos para os programas de melhoramento, ainda não é possível indicar indivíduos para uso como progênie desses, pois é necessária realizar uma avaliação fenotípica em conjunto, observando a relação fenótipo-genótipo (FALEIRO & JUNQUEIRA, 2016).

Estudos utilizando marcadores microssatélites em um estudo intraespecífico com 66 progênies de dois ciclos de seleção de *P. edulis* Sims., obteve médias de  $H_e$  para as progênies de 0,18 a 0,20. O atual estudo, mesmo utilizando de outro tipo de marcador, obteve também média de  $H_e=0,18$  (REIS et al., 2011). Os estudos reportados enfatizam que os acessos e cultivares de *P. edulis* mantidos em BAGs, apresentaram baixa variabilidade genética, as quais foram apontadas e observadas neste estudo, pelas heterozigosidade esperada e informação polimórfica ( $H_e$  e PIC) (Tabela 02). Ainda que este estudo aborde outros com diferentes espécies de passifloras, além da *P. edulis*, é esperado maiores índices em estudos interespecíficos do que intraespecíficos.

Os baixos índices de  $H_e$  e PIC são resultantes do tipo de estudo e marcador utilizado, uma vez que este foi intraespecífico com um marcador dominante. Analisando os bancos de forma separada, observou-se uma diversidade alta, com formação de subgrupos específicos. A baixa porcentagem de diversidade existente entre os grupos também foi observada em um outro estudo, onde realizaram a caracterização e seleção de acessos de *P. edulis* Sims. e uma cultivar (BRS Gigante Amarelo) utilizando marcadores microssatélites, observando apenas 1% de diversidade genética existente entre os grupos avaliados (CERQUEIRA-SILVA et al., 2015).

Não obstante, espécies do gênero *Passiflora* parecem possuir a baixa variabilidade molecular em locos microssatélites (CERQUEIRA-SILVA et al., 2012; 2014). Com isso a caracterização dos BAGs é essencial para verificar se a baixa variação está representada nos acessos mantidos, visando evitar a perda desta variabilidade genética ou ainda das características de maior interesse para a cultura do maracujazeiro. O uso das ferramentas moleculares, de diferentes tipos de marcadores e, até as análises fenotípicas são necessárias, pois busca explicar o comportamento dentro dos acessos mantidos em BAGs.

Em relação ao PIC, levando em consideração marcadores codominantes, com obtenção de

poucas marcações polimórficas, observou-se PIC elevado ( $\geq 0,5$ ). Neste caso, quanto maior este índice, mais eficiente é o marcador (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). Trabalhos utilizando marcadores microssatélites obtiveram valores de até 0,81 (OLIVEIRA et al., 2005). Já estudos utilizando passifloras oriundas de cruzamentos intraespecíficos como o de REIS et al. (2011) obtiveram variação entre os indivíduos avaliados. A média do PIC para as populações avaliadas foi de 0,16 e 0,18, respectivamente, corroborando com o estudo atual, que obteve média de 0,15. Este PIC é considerado levemente baixo, segundo classificação de BOTSTEIN et al. (1980). Para os autores, as médias mais baixas encontradas, podem ser resultado de uma redução da base genética entre suas populações estudadas.

A formação de um *pool* exclusivo para as cultivares é resultante do processo de seleção e desenvolvimento, conservando apenas os alelos de interesse nestes, o que forma uma estruturação homogênea, porém com alta variabilidade genética entre eles (Figura 09D) e os demais acessos (Figura 09A). O BAG da Mandioca e Fruticultura possui uma maior variabilidade, mantendo uma relação de seus acessos com alguns germoplasmas do BAG Cerrados. Esta proximidade genética é visível tanto na estruturação quanto na dispersão da PCoA., na qual deve ser avaliada e levada em consideração.

Sobre a estruturação obtida (Figura 08), obteve-se um Delta K=3, ou seja, uma estruturação de todo o amostral em 3 *pools* gênicos. Observamos que, mesmo se tratando de acessos de dois BAGs distintos, existe uma relação entre genótipos da EMBRAPA Cerrados, um grupo menos estruturado, com alguns da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, mais estruturado. As cultivares se comportam como uma estruturação única entre os acessos de ambos os BAGs, uma vez que são produtos do melhoramento, após cruzamentos e seleção de alelos específicos para características de interesse comercial. Este comportamento estrutural de cada banco tem relação com a forma de manutenção de cada.

O BAG Cerrados utiliza de técnica de reprodução vegetativa, com geração de clones das mesmas plantas, mantendo o grupo mais homogêneo, com menor variabilidade genética entre os acessos. Já o BAG Mandioca e Fruticultura realiza a renovação de suas plantas e acessos através de polinização induzida por meio de reprodução cruzada entre plantas do mesmo acesso, de forma a gerar um fruto e sementes específicas de cada acesso que compõe o BAG. Essa reprodução orientada e de forma cruzada aumenta a variabilidade genética existente, favorecendo a uma estruturação mais heterogênea.

Podemos observar também, dentro dos histogramas gerados para o  $K=2$  e  $K=4$  (Figura 08), maiores informações de como as cultivares são geneticamente diferentes dos acessos avaliados, e quais acessos possuem essa relação alélica. A estruturação em dois *pools* demonstra a proximidade existente entre os acessos dos bancos em relação às cultivares. Mesmo com um índice de Delta  $K$  menor, a estruturação em quatro *pools* traz informações mais específicas sobre as subestruturas genéticas existentes entre os acessos dos BAGs, sendo possível identificar quais acessos são mais distantes geneticamente. A partir disso, observamos quais acessos possuem genótipos únicos de um dos BAGs, e quais possuem semelhanças genéticas entre os dois BAGs.

Ao se avaliar os resultados obtidos, é possível observar ampla variabilidade genética existente dentro dos BAGs e a relação existente entre eles. Os cultivares estão muito dispersos no gráfico, agrupados de acordo com a cultivar específica, sendo possível observar a sobreposição de algumas. Embora praticamente cada cultivar possua suas características específicas, estabelecidas pelo processo de melhoramento, as cultivares BRS Sol do Cerrado, BRS Gigante Amarelo e a BRS Rubi do Cerrado foram distribuídas no mesmo quadrante dentro da PCoA. Ao se avaliar as matrizes utilizadas para o desenvolvimento destas, foi possível observar matrizes com proximidade genética. A BRS Sol do Cerrado foi desenvolvida com uma seleção recorrente com as matrizes GA-2 X MA, sendo esta última derivada da seleção Redondão. A BRS Gigante Amarelo utilizou da seleção Redondão X seleção Sul Brasil (MSC). A seleção e utilização desta matriz em comum durante o desenvolvimento destas cultivares explica a proximidade genética destes germoplasmas (Figura 09D). As cultivares analisadas no estudo são resultantes de etapas de melhoramento e cruzamentos inter e intraespecíficos, com acessos de diferentes origens. Com isso, as características presentes em cada cultivar são bastante específicas, sendo que cada uma possui suas especificidades, como maior fruto, maior produtividade ou resistência aos patógenos, por exemplo.

Os marcadores moleculares análogos a genes de resistência – RGAs são uma ferramenta importante para a realização da caracterização molecular de acessos existentes em BAGs. Como o gênero possui alta diversidade, estudos de diversidade genética são necessários para caracterizar tanto os materiais existentes nos BAGs quanto novos. A partir de novos estudos os bancos poderão ser caracterizados, disponibilizando informações relevantes para os programas de melhoramento e conservação do maracujazeiro. Embora ainda se faz necessária maiores estudos para relacionar genótipo com fenótipo, estes dados fornecem suporte para iniciar uma seleção de genótipos de

maior interesse, buscando a composição de coleções-núcleo com alta diversidade genética, dando suporte a manutenção do germoplasma dos bancos e em programas de melhoramento da espécie.

## CONCLUSÃO

Os marcadores RGAs são uma ferramenta útil para estudos genético-moleculares, buscando maiores informações para uso em programas de melhoramento e conservação. A sua aplicação na caracterização genética de Bancos ativos de germoplasma de passifloras é eficiente. Visto a sua aplicabilidade, foi possível observar a existência de um compartilhamento de alelos entre os BAGs das EMBRAPAs Mandioca e Fruticultura, e Cerrados. Entretanto, a diversidade existente em cada um é alta, fator importante para a conservação da espécie, favorecendo a chance de se obter novos alelos responsáveis a características de interesse.

Avaliando as cultivares, observamos que não existe relação com os acessos dos BAGs, o que demonstra a importância do germoplasma armazenado, reforçando os estudos para relacionar os genótipos com as características morfo-agronômicas. Através destes novos estudos, os BAGs vão possuir informações importantes no desenvolvimento de novas cultivares melhoradas.

## REFERENCIAS

ARAUJO, F.P. de; MELO, N.F. de; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. *In*: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. (Ed. téc.). **Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

BENEVIDES, C.R.; GAGLIANONE, M.C.; HOFFMANN, M.. Visitantes florais do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. *Passifloraceae*) em áreas de cultivo com diferentes proximidades a fragmentos florestais na região Norte Fluminense, RJ. **Revista Brasileira de entomologia**, São Paulo, v. 53, n.3, p. 415–421, 2009.

BENT, A.F. Plant disease resistance genes: function meets structure. **Plant Cell**, v. 8, p. 1757-1771. 1996.

BERNACCI, L.C., SOARES-SCOTT, M.D., JUNQUEIRA, N.T.V., PASSOS, I.R.S., MELETTI, L.M.M. *Passiflora edulis* Sims: a maneira taxonômica correta de referir-se ao maracujá-amarelo (e aos de outras cores). **Revista Brasileira de Fruticultura**. 30:566-576. 2008.

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

BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; PASSOS, I.R.S. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da diversidade. In: FALEIRO, FG., JUNQUEIRA, NTV., BRAGA, MF. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p. 559-586. 2005.

BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C. MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; NUNES, T.S.; IMIG, D.C.; MEZZONATO, A.C. *Passifloraceae* in lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2014.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. 2ª Ed. Viçosa: Editora UFV. 532 p. 2009.

BORGES, R.S.; SCARANARI, C.; NICOLI, A.M.; COELHO, R.R. Novas variedades: validação e transferência de tecnologia. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p. 618-640, 2005.

CAMPOS, V. B.; FOGAÇA, T. da S.; ALMEIDA, W. L. de; BARBOSA, J. A.; OLIVEIRA, M. R. T. de; GONDIM, S. C.; CAVALCANTE, L. F. Caracterização física e química de frutos de maracujá-amarelo comercializados em Macapá, Amapá. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.15, p.27-33, 2013.

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

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. Genetic variation in a wild population of the 'sleep' passionfruit (*Passiflora setacea*) based on molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 1, p. 731-738, 2012.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M., JESUS, O.N., SANTOS, E.S.L., CORRÊA, R.X., SOUZA, A.P. Genetic breeding and diversity of the genus *passiflora*: progress and perspectives in molecular and genetic studies. **International Journal of Molecular Sciences** 15, 14122-14152, 2014.

- CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J.; SANTOS, E.S.L.; SOUZA, A.P. Characterization and selection of passion fruit (yellow and purple) accessions based on molecular markers and disease reactions for use in breeding programs. **Euphytica**, v. 202, n. 3, p. 345-359, 2015.
- CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; FALEIRO, F.G.; DE JESUS, O.N.; DOS SANTOS, E.S.L.; DE SOUZA, A.P. The genetic diversity, conservation, and use of passion fruit (*Passiflora* spp.) In: AHUJA, M.R. & MOHAN JAIN, S. **Sustainable Development and Biodiversity**, p 215-231. 2016.
- CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; FALEIRO, F.G.; DE JESUS, O.N.; DOS SANTOS, E.S.L.; DE SOUZA, A.P. PassionFruit (*Passiflora* spp.) Breeding. In: *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits*. **Springer**, Cham, p. 929-951. 2018.
- COLLINS, N.; PARK, R.; SPIELMEYER, W.; ELLIS, J.; PRYOR, A.J. Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance. **Gene**, v. 44, p. 375-381. 2001.
- COSTA, J.L.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, G.A.F.; OLIVEIRA, E.J. Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 253-260. 2012.
- CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.
- DENIS, M.; BOUVET, J.M. Efficiency of genomic selection with models including dominance effect in the context of Eucalyptus breeding. **Tree Genetics & Genomes**, v. 9, p. 37-51, 2013.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.
- DUDLEY, J.W. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. **Crop Science**, v. 33, n. 4, p. 660-668. 1993.
- EARL, D.A. & VONHOLDT, B.M. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation genetics resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. **Molecular ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

FALEIRO, F.G. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M. de; REIS JUNIOR, F.B. dos. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 729 p. il. Color. p. 55-118. 2011.

FALEIRO, F.G. & JUNQUEIRA, N.T.V. Passion fruit (*Passiflora* spp.) improvement using wild species. In: MARIANTE, A.S.; SAMPAIO, M.J.S.; INGLIS, M.C. **The state of Brazil's plant genetic resources. Second National Report. Conservation and Sustainable Utilization for food and agriculture**. Brasília, DF: Embrapa Technological Information. p. 101-106. 2009.

FALEIRO, F.G. & JUNQUEIRA, N.T.V. (Ed.). **Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. 341 p. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. 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, DF: Embrapa Cerrados. p. 187-209, 2005.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. Caracterização de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares: resultados de pesquisa 2005-2008. Embrapa Cerrados. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n°. 207, p. 59. 2008.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. Pré-melhoramento do maracujá. In: LOPES, M.A.; FÁVERO, A.P.; FERREIRA, M.A.J.F.; FALEIRO, F.G.; FOLLE, S.M.; GUIMARÃES, E.P. (eds) **Pré-Melhoramento de Plantas. Estado da Arte e Experiências de Sucesso**; Embrapa Informações Tecnológicas: Brasília, Brazil, p. 549-570. 2011.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; COSTA, A.M. Ações de Pesquisa e Desenvolvimento para o Uso Diversificado de Espécies Comerciais e Silvestres de Maracujá (*Passiflora* spp.). **Documentos n°. 329**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2015.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; COSTA, A.M. Importância Socioeconômica e Cultural do Maracujá. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. (Ed.). **Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. 341 p. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

FERREIRA, F.R. Recursos genéticos de *Passiflora*. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**, Embrapa Cerrados, Planaltina, pp 41-50. 2005.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al Uso de Marcadores moleculares em el Análisis Genético**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220 p. 1998.

FERREIRA, M.E. & RANGEL, P.H.N. Aporte biotecnológico ao pré-melhoramento vegetal. In: LOPES, M.A.; FÁVERO, A.P.; FERREIRA, M.A.J.F.; FALEIRO, F.G.; FOLLE, S.M.; GUIMARÃES, E.P. **Pré-melhoramento de plantas. Estado da arte e experiências de sucesso**. Embrapa Informações Tecnológicas, Brasília. p. 59–84. 2011.

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

FONSECA, G.K.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SILVA, M.S.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, K.P.; VAZ, C.F. Análise da recuperação do genitor recorrente em maracujazeiro-azedo por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 145–153. 2009.

FREITAS, B.M.; OLIVEIRA-FILHO, J.H. **Criação racional de mamangavas para polinização em áreas agrícolas**. Banco do Nordeste, Fortaleza. 2001.

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

GEFFROY, V.; SICARD, D.; OLIVEIRA, J.C.; SEVIGNAC, M.; COHEN, S.; GEPTS, P.; NEEMA, C.; LANGIN, T.; DRON, M. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 9, p.774-784. 1999.

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

GUIMARÃES, C.T; MAGALHÃES, J.V.; LANZA, M.A.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 253, p. 86-95. 2009.

HAMMOND-KOSACK, K.E. & JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 575-607. 1997.

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

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção agrícola municipal 2016. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=resultados>>. Acesso em 15 de abril de 2019.

JESUS, O.N. de; FALEIRO, F.G. Classificação botânica e biodiversidade. *In*: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. (Ed.). **Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. 341 p. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

JESUS, O.N. de; DE OLIVEIRA, E.J.; FALEIRO, F.G.; TL, S.; GIRARDI, E. A. Illustrated morpho-agronomic descriptors for *Passiflora* spp. **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Livro científico** (ALICE), 122p. 2017.

JESUS, O.N. de; MACHADO, C. de F.; SOARES, T. L.; JUNGHANS, T. G.; OLIVEIRA, E. J. de; FALEIRO, F. G. Recursos genéticos de *Passiflora* em Embrapa Mandioca e Fruticultura. *In*: CONGRESO LATINOAMERICANO DE PASSIFLORA, 1., 2013, Neiva, Colombia. **Libro de Memorias**. CEPASS HUILA, 2013.

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

JONES, J.D.G. Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, n. 4, p. 281-287. 2001.

JUNQUEIRA, K.P.; FALEIRO, F.G.; RAMOS, J.D.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Genetic variability of wild Passionfruit determined by molecular markers. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 571-575. 2007.

JUNQUEIRA, K.P.; JUNQUEIRA, L.P.; ZACHARIAS, A.O.; SCARANARI, C.; FALEIRO, F.G. Cultivares. *In*: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. (Ed.). **Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. 341 p. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

JUNQUEIRA, N.T.V.; VERAS, M.C.M.; NASCIMENTO, A.D.; CHAVES, R.D.C.; MATOS, A.P.; JUNQUEIRA, K.P. A importância da polinização manual para aumentar a produtividade do maracujazeiro. **Documentos 41**, Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001.

KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 309-334. 2011.

- KANAZIN, V.; MAREK, L.F.; SHOEMAKER, R.C. Resistance genes analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.93, p.11746-11750, 1996.
- LIMA, A.A. & BORGES, A.L. Solo e clima. In: LIMA, A.A. **Maracujá: produção, aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa-SPI. p. 25–28. 2002.
- LÓPEZ, C.E.; ACOSTA, I.F.; JARA, C.; PREZADA, F.; GAITÁN-SOLÍS, E.; GALLEGO, G.; BEEBE, S.; TOHME, J. Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. **Phytopathology**, v. 93, n. 1, p. 88–95. 2003.
- MANICA, I. Maracujazeiro: Taxionomia-anatomia-morfologia. In: **Maracujá: Temas selecionados 1) melhoramento, morte prematura, polinização, taxionomia**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p.7-24, 1997.
- MATTA, F.P. **Mapeamento de QRL para *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em maracujá-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. 230p. Tese de Doutorado - Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz - USP, Piracicaba, 2005.
- MELETTI, L.M.M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 83–91. 2011.
- MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R.S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p. 55-78. 2005.
- MEYERS, B.C.; DICKERMAN, A.W.; MICHELMORE, R.W.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; SOBRAL, B.W.; YOUNG, N.D. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide binding superfamily. **The Plant Journal**, v. 20, n. 3, p. 317-332. 1999.
- MORALES, R.G.F.; RESENDE, J.T.V.; FARIA, M.V.; SILVA, P.R.; FIGUEIREDO, A.S.T.; CARMINATTI, R. Divergência genética em cultivares de morangueiro, baseada em caracteres morfoagronômicos. **Revista Ceres**, v. 58, p. 323- 329, 2011.
- NASS, L.L. & PATERNIANI, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, p. 581-587. 2000.

NASS, L.L. Pré-melhoramento vegetal. In: LOPES, M.A.; FÁVERO, A.P.; FERREIRA, M.A.J.F.; FALEIRO, F.G.; FOLLE, S.M.; GUIMARÃES, E.P. **Pré-melhoramento de plantas. Estado da arte e experiências de sucesso**. Embrapa Informações Tecnológicas, Brasília. p. 23–38. 2011.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.70, p.3321-3323, 1973.

NUNES, T.S.; QUEIROZ, L.P. FLORA DA BAHIA: *PASSIFLORACEAE*. **Sitientibus**, v.6, n.3, p.194-226, 2006.

OCAMPO J.; D'EECKENBRUGGE, J.C., JARVIS, A. Distribution of the genus *Passiflora* L. diversity in Colombia and its potential as an indicator for biodiversity management in the coffee growing zone. **Diversity** 2:1158–1180. 2010.

OLIVEIRA, E.J.; FREITAS, J.P.X.; JESUS, O.N. Adaptability and stability analysis of the juice yield of yellow passion fruit varieties. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 6512-6527, 2014.

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

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

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 passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Molecular Ecology Notes**, v.5, p.331-333, 2005.

ORTIZ, D.C.; BOHÓRQUEZ, A.; DUQUE, M.C.; TOHME, J.; CUÉLLAR, D.; VÁSQUEZ, T.M. Evaluating purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) genetic variability in individuals from commercial plantations in Colombia. **Genetic resources and crop evolution**, v. 59, n. 6, p. 1089-1099. 2012.

PAIVA, C.L.; VIANA, A.P.; SANTOS, E.A.; SILVA, R.N.O.; OLIVEIRA, E.J. Diversidade genética de espécies do gênero *Passiflora* com o uso da estratégia Ward MLM. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 381-390, 2014.

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

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

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 457-467, 2005.

PEREIRA VIEIRA, P.F.; CRUZ, D.O.; GOMES, M.F.M.; CAMPOS, L.A.O.; LIMA, J.E. Valor econômico da polinização por abelhas mamangavas no cultivo do maracujá-amarelo. **Revista Iberoamericana de Economía Ecológica**, Morélia, v. 15, p. 43-53, 2010.

PEREIRA, A.S. Genética e pós-melhoramento em cultivares de maracujazeiro amarelo: variabilidade acessada por ferramentas biométricas e moleculares. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual Santa Cruz (UESC), Ilhéus – BA, 2012.

PEREIRA, D.A.; CORRÊA, R.X.; OLIVEIRA, A.C. 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**, v. 59, p. 12-21. 2015.

PEREIRA, M.G.; PEREIRA, T.N.S.; VIANA, A.P. 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, DF: Embrapa Cerrados. p. 277-292. 2005.

PFLIEGER, S.; PALLOIX, A.; CARANTA, C.; BLATTES, A.; LEFEBVRE, V. Defense response genes co-localize with quantitative disease resistance loci in pepper. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, n. 6–7, p. 920–929. 2001.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

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

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

SAZIMA, I.; SAZIMA, M. Mamangavas e irapuás (*Hymenoptera, Apoidea*): visitas, interações e consequências para a polinização do maracujá (*Passifloraceae*). **Revista Brasileira de Entomologia**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 109-118, 1989.

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

SELVARAJ, C.I; BABU, S.; SANKAR, P.D.; NAGARAJAN, P.; SABESAN, M. Genome scanning for identification of resistance gene analogs (RGAs) in a highly durable blast resistance rice (*Oryza sativa* L.) cultivar, Moroberekan. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 34, p. 6418-6433, 2011.

SIQUEIRA, K.M.M.; KIILL, L.H.P.; MARTINS, C.F.; LEMOS, I.B.; MONTEIRO, S.P.; FEITOSA, E.A. Ecologia da polinização do maracujá-amarelo, na região do vale do submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, p. 1-12, 2009.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. **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. 2012.

SOUSA, A.G.R.; SOUZA, M.M.; MELO, C.A.F.; SODRÉ, G.A. ISSR markers in wild species of *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) as a tool for taxon selection in ornamental breeding. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 18534-18545, 2015.

SUASSUNA, T.M.F.; BRUCKNER, C.H.; CARVALHO, C.R.; BORÉM, A. Self-incompatibility in passion fruit: evidence of gametophytic-sporophytic control. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 298-302, 2003.

TURCHETTO-ZOLET, A.C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C.M.; PASSAIA, G. Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações –Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, 2017.181 p.

TULLU, A.; TAR'AN, B.; BREITKREUTZ, C.; BUCHWALDT, L.; BANNIZA, S.; WARKENTIN, TD.; VANDENBERG, A. A quantitative-trait locus for resistance to ascochyta blight (*Ascochyta lentis*) map close to a gene for resistance to anthracnose (*Colletotrichum truncatum*) in lentil. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 28, n. 4, p. 588-595. 2006.

VALLAD, G.; RIVKIN, M.; VALLEJOS, C.; MCCLEAN, P. Cloning and homology modelling of a Pto-like protein kinase family of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, n. 6–7, p. 1046–1058. 2001.

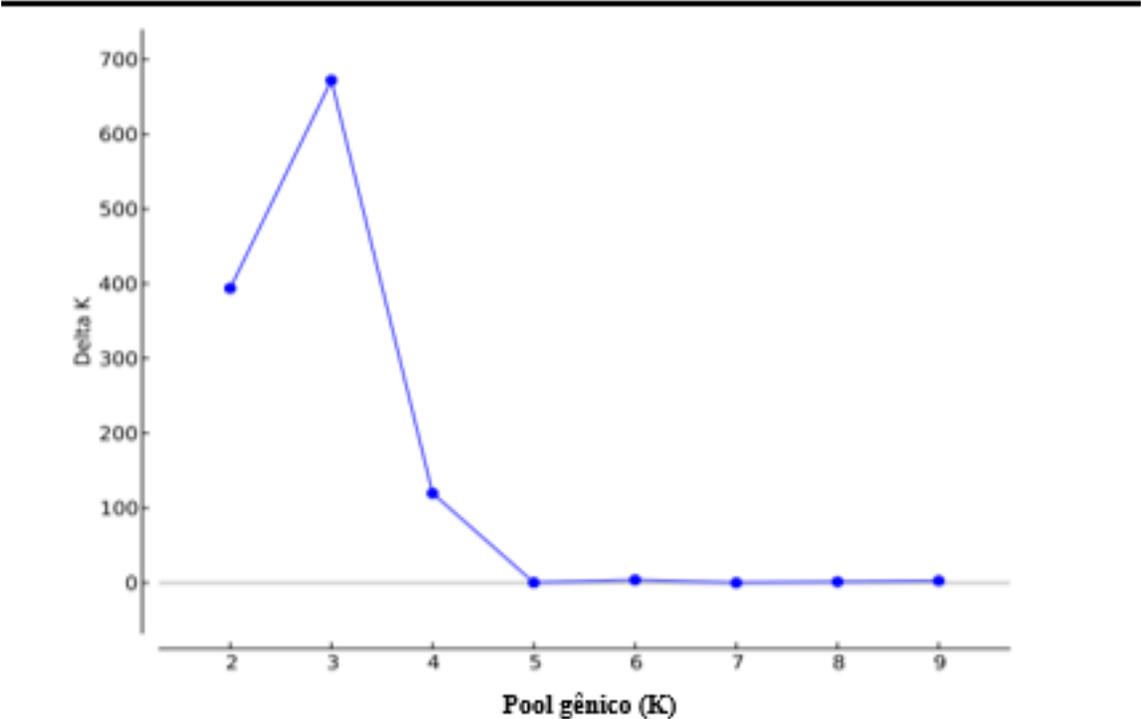
VAN DER LINDEN, C.G.; WOUTERS, D.C.A.E.; MHALKA, V.; KOCHIEVA, E.Z.; SMULDERS, M.J.M.; VOSMAN, B. Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, n. 2, p. 384–393. 2004.

WETZEL, M.M.V.S.; GIMENES, M.A.; PÁDUA, J.G.; JOSÉ, S.C.B.R.; NETO, L.G.P. Conservação de espécies silvestres com potencial de utilização em programas de pré-melhoramento na coleção base da Embrapa. *In*: LOPES, M.A.; FÁVERO, A.P.; FERREIRA, M.A.J.F.; FALEIRO, F.G.; FOLLE, S.M.; GUIMARÃES, E.P. **Pré-melhoramento de Plantas. Estado da Arte e Experiências de Sucesso**; Eds.; Embrapa Informações Tecnológicas: Brasília, Brasil, p. 99–122. 2011.

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

# APÊNDICES

Apêndice 01 - Número de *pools* gênicos mais provável obtido.



## ANEXOS

**Anexo 01** – Descritivo com identificação de cada planta utilizada no estudo, com respectivo código do acesso no BAG, qual BAG de origem, e qual a origem de coleta da planta.

n°	ACESSO	BAG	ORIGEM									
1	BGP-225	<b>EMBRAPA Mandioca e Fruticultura</b>	---									
2												
3												
4	BGP-221		<b>EMBRAPA Mandioca e Fruticultura</b>	---								
5												
6												
7	BGP-427			<b>EMBRAPA Mandioca e Fruticultura</b>	---							
8												
9												
10	BGP-330				<b>EMBRAPA Mandioca e Fruticultura</b>	---						
11												
12												
13	BGP-445					<b>EMBRAPA Mandioca e Fruticultura</b>	---					
14												
15												
16	BGP-424						<b>EMBRAPA Mandioca e Fruticultura</b>	---				
17												
18												
19	BGP-DG							<b>EMBRAPA Mandioca e Fruticultura</b>	---			
20												
21												
22	BGP-324								<b>EMBRAPA Mandioca e Fruticultura</b>	---		
23												
24												
25	BGP-185									<b>EMBRAPA Mandioca e Fruticultura</b>	---	
26												
27												
28	BGP-224										<b>EMBRAPA Mandioca e Fruticultura</b>	---
29												
30												
												---

31	BGP-225	<b>EMBRAPA Mandioca e Fruticultura</b>		
32				
33				
34	BGP-DD			---
35				
36				
37	BGP-418			---
38				
39				
40	BGP-CP			---
41				
42				
43	BGP-DA			---
44				
45				
46	BGP-BE			---
47				
48				
49	BGP-AE			---
50				
51				
52	BGP-CU			---
53				
54				
55	BGP-AP			---
56				
57				
58	BGP-425			---
59				
60				
61	BGP-051			---
62				
63				
			---	

64	BGP-182	<b>EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA</b>		
65				
66				
67	BGP-AC			---
68				
69				
70	LM-15			---
71				
72				
73	BGP-AU			---
74				
75				
76	BGP-CJ			---
77				
78				
79	BGP-BO			---
80				
81				
82	BGP-328			---
83				
84				
85	BGP-400			---
86				
87				
88	BGP-401			---
89				
90				
91	BGP-165			---
92				
93				
94	<i>FLOR BRANCA</i>			---
95				
96				
97	BGP-038		---	
98	BGP-222		---	

99	BGP-222		
100	CPAC MJ-21-12	<b>EMBRAPA CERRADOS - "FLOR DA PAIXÃO"</b>	roxo, Colômbia
101	CPAC MJ-21-07		Serra da mesa
102	CPAC MJ-21-07		Serra da mesa
103	CPAC MJ-21-07		Serra da mesa
104	CPAC MJ-21-06		Oliveira, MG
105	CPAC MJ-21-07		Oliveira, MG
106	CPAC MJ-21-08		Oliveira, MG
107	CPAC MJ-21-01		---
108	CPAC MJ-21-02		---
109	CPAC P2 X LD4		PMGP CPAC
110	CPAC P4 X LD3		PMGP CPAC
111	CPAC P3		PMGP CPAC
112	Longão 1		PMGP CPAC
113	BRS MJ		PMGP CPAC
114	CPAC MJ-21-07 PL3		PMGP CPAC
115	CPAC MJ-21-09		Maguary
116	CPAC MJ-21-10		Santa Catarina
117	CPAC MJ-21-07		Búzios, RJ
118	CPAC MJ-21-02		---
119	P. edulis Sims L1P21		PMGP CPAC
120	P. edulis Sims L1P17		PMGP CPAC
121	P. edulis Sims L3P8a		PMGP CPAC
122	CPAC MJ-M-01-PL5 L2P1		PMGP CPAC
123	CPAC MJ-M-01-PL2 ou 5 L2P2		PMGP CPAC
124	CPAC MJ-M-01-PL2 L2P3		PMGP CPAC
125	CPAC MJ-M-01-PL2 L2P4		PMGP CPAC
126	CPAC MJ-M-01-L2 P5 PL2?		PMGP CPAC
127	CPAC MJ-M-01-L1P1 PL4?		PMGP CPAC
128	CPAC MJ-M-01-L1P2 PL4?		PMGP CPAC
129	CPAC MJ-M-01-L1P3 PL4		PMGP CPAC
130	CPAC MJ-M-01-L1P4 PL3?		PMGP CPAC
131	CPAC MJ-M-01-L1P5 PL3?		PMGP CPAC
132	CPAC MJ-M-01-L4P2 MA		PMGP CPAC
133	CPAC MJ-M-01-L4P3 MA?	PMGP CPAC	

134	CPAC MJ-M-01-L1P1 PL6	PMGP CPAC
135	CPAC MJ-M-01-L1P2 PL6	PMGP CPAC
136	CPAC MJ-M-01-L1P3 PL6	PMGP CPAC
137	BRS CC	PMGP CPAC
138	BRS CC	PMGP CPAC
139	BRS CC	PMGP CPAC
140	BRS GA	PMGP CPAC
141	BRS GA	PMGP CPAC
142	BRS GA	PMGP CPAC
143	BRS GA	PMGP CPAC
144	BRS GA	PMGP CPAC
145	BRS GA	PMGP CPAC
146	BRS GA	PMGP CPAC
147	BRS RC (amarelo)	PMGP CPAC
148	BRS RC (roxo)	PMGP CPAC
149	BRS RC	PMGP CPAC
150	BRS RB (amarelo)	PMGP CPAC
151	BRS RB (amarelo)	PMGP CPAC
152	BRS RB (roxo)	PMGP CPAC
153	BRS RB (roxo)	PMGP CPAC
154	BRS SC	PMGP CPAC
155	BRS SC	PMGP CPAC
156	BRS SC	PMGP CPAC
157	BRS MJ	PMGP CPAC
158	BRS MJ-1a	PMGP CPAC
159	BRS MJ	PMGP CPAC
160	BRS MJ	PMGP CPAC
161	BRS MJ-P17. 3	PMGP CPAC
162	BRS MJ	PMGP CPAC
163	BRS MJ	PMGP CPAC

**EMBRAPA  
CERRADOS -  
"FLOR DA  
PAIXÃO"**

