



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

**Diversidade e estrutura genética em acessos de maracujazeiros
(*Passiflora* spp.) por meio de Regiões Análogas a Genes de
Resistência**

Thayse Karollyne dos Santos Fonsêca

Itapetinga-Bahia
Maio – 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

**Diversidade e estrutura genética em acessos de maracujazeiros
(*Passiflora* spp.) por meio de Regiões Análogas a Genes de
Resistência**

Autora: Thayse Karollyne dos Santos Fonsêca
Orientador: Prof. Dr. Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva
Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Elisa Susilene Lisboa dos Santos

“Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, no Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento”

Itapetinga-Bahia
Maio – 2019

Além da opulência das boas colheitas
Do gênero *passiflora* de tudo aproveita.
Das raízes profundas às folhas derradeiras
Porque é nutritiva, cosmética e milagreira.
Ninguém sabe contar a origem desta planta
Milênios se passaram como o vento que canta.
E o maracujá se espalha em contorcidas rotas.
Sofrendo mutações desde épocas remotas.

Capítulo 13, IV Reunião Técnica de pesquisa em Maracujazeiros

AGRADECIMENTOS

À Deus, por essa conquista e todas as bênçãos concedidas, por nunca me deixar desamparada nos momentos mais difíceis, e, à Nossa Senhora pela intercessão à Deus nas minhas orações, pois “Nada é impossível aos olhos que crê” Marcos, 9:23.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Bernard por todos os ensinamentos, paciência e compreensão na realização deste trabalho, e à minha coorientadora, a prof^a Dr. Elisa Lisboa pela participação e todo conhecimento compartilhado.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura e ao pesquisador Dr. Onildo, pela concessão do espaço para realização das primeiras etapas do trabalho. Ao técnico Vanderson, pelos ensinamentos vivenciados, à Zanon, pelo apoio, amizade e sempre disposto a ajudar, e à Sidnara pela disponibilidade e ajuda nas coletas, vocês foram essenciais.

À minha família, meus pais Sizonete e Altemar pela compreensão e confiar que no fim tudo daria certo, e, ao meu Amor Pedro, por todo incentivo, apoio e carinho sempre.

Aos meus amigos que estiveram comigo nessa etapa, sobretudo às minhas companheiras desde a graduação, Renata e Cibelle, pela amizade e apoio sempre que precisei.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular Aplicada (LGMA), por todos os momentos e experiências que aprendemos juntos, em especial à Lucas, companheiro de todas as atividades laboratoriais.

Aos colegas do mestrado, professores e funcionários pelos ensinamentos, convívio e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao programa de pós-graduação em Ciências Ambientais (PPGCA) pela concessão da bolsa de estudo.

À todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
INTRODUÇÃO GERAL	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
Características gerais do gênero <i>Passiflora</i> , família Passifloraceae	6
Aspectos econômicos da cultura do maracujazeiro	7
Diversidade genética	10
Aplicação de marcadores moleculares para a caracterização da diversidade de <i>passiflora</i> .	12
Marcadores RGA (<i>Resistance Gene Analog</i>)	14
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO I	27
Estimativas de diversidade e estrutura genética em maracujazeiros (<i>Passiflora</i> spp.) por meio de marcadores análogos a genes de resistência	27
RESUMO	27
INTRODUÇÃO	28
MATERIAL E MÉTODOS	29
Coleta e extração de DNA	29
Reações de amplificação	30
Genotipagem e estimativa da diversidade genética	31
RESULTADOS	32
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÃO	49
AGRADECIMENTOS	49
REFERÊNCIAS	49

LISTA DE ABREVIACÕES

- AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado)
- AMOVA - Análise de variância molecular
- BAG - Banco Ativo de Germoplasma
- CABMV- *Cowpea aphid-borne mosaic virus*
- CPAC - Centro de Pesquisa Agropecuária do Cerrado
- CTAB - Cetyl trimethylammonium bromide
- DNA- Designa Ribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucleico)
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- H' – Índice de Shannon
- He – Heterozigose esperada
- IAPAR – Instituto Agrônomo do Paraná
- ISSR - Inter Simple Sequence Repeats (inter repetições de sequências simples)
- LGMA - Laboratório de Genética Molecular Aplicada
- LRR – Leucine-rich repeats (Repetições ricas em leucina)
- MgCl₂ - Cloreto de magnésio
- NBS- Nucleotide Binding Sites (Sítios de ligação a nucleotídeos)
- NGS - Sequenciamento de Nova Geração
- PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia Polimerase)
- PIC - Conteúdo de Informação Polimórfica
- PCoA - Principal Coordinates Analysis (Análise de Coordenadas Principais)
- RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso)
- RGA - Resistance for Genes Analogs (Genes análogos de resistência)
- SNIP - Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de nucleotídeo único)
- SSR - Simple Sequence Repeats (Sequências Simples Repetidas)
- UESB - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
- UNESP - Universidade Estadual Paulista
- UPGMA - Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages (Método de agrupamentos hierárquicos)

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Combinações de iniciadores RGA (<i>Resistance Genes Analog</i>) selecionadas para uso no gênero <i>Passiflora</i>	30
Tabela 2. Análise de polimorfismo obtida a partir de combinações de primers RGA para genótipos de quatro espécies de <i>Passiflora</i> : <i>P. alata</i> , <i>P. setaceae</i> , <i>P. maliformis</i> e <i>P. quadrangularis</i>	34
Tabela 3. Análise de diversidade obtida a partir de combinações de primers RGA para genótipos de quatro espécies de <i>Passiflora</i> : <i>P. alata</i> , <i>P. setaceae</i> , <i>P. maliformis</i> e <i>P. quadrangularis</i> . He Heterozigosidade esperada, PIC Informação de Conteúdo Polimórfico, H' índice de Shannon.....	35
Tabela 4. Matriz de distância genética de Nei (1972) (abaixo da linha diagonal) e identidade genética (acima da linha diagonal) referente a análise com marcadores RGA entre genótipos de quatro espécies de <i>Passiflora</i> provenientes de Bancos Ativos de Germoplasma.....	38
Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) em acessos de <i>Passiflora</i> spp. provenientes de Bancos de Germoplasma da Embrapa.....	44

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Análise de estrutura e diversidade genética obtidas a partir de regiões análogas a genes de resistência para as espécies de *Passiflora* - *P. alata*, *P. setaceae*, *P. maliformis* e *P. quadrangularis* presentes em Bancos de Germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Mandioca e Fruticultura e Cerrados. A) Número mais provável de pools gênicos em *Passiflora* sp. (K); B) Histograma (baseado nos valores de Delta K) representando a estruturação interespecífica dos prováveis pools gênicos em *Passiflora* sp, separando *P. alata*, espécie comercial, das outras três espécies, consideradas como silvestres; C) Análise de coordenadas principais (PCoA).37
- Figura 2.** Análise de agrupamento de interespecífico do gênero *Passiflora* obtidos pelo UPGMA com o Coeficiente de Similaridade de Jaccar. As cores das linhas correspondem àquelas utilizadas para representar os pools gênicos predominantes no histograma obtido. ...39
- Figura 3.** Número mais provável de pools gênicos (K) e Histogramas (baseado nos valores de Delta K) gerados a partir de análise de regiões análogas a genes de resistência, representando a distribuição dos prováveis pools gênicos em quatro espécies de *Passiflora* presentes em Bancos de Germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Mandioca e Fruticultura e Cerrados. A) *P. alata*, B) *P. setaceae*, C) *P. maliformes* e D) *P. quadrangularis*.40
- Figura 4.** Análise de coordenadas principais (PCoA), gerados a partir de análise de regiões análogas a genes de resistência para espécies de *Passiflora* spp. obtidas em de Bancos de Germoplasma da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura e Cerrados. A) *P. alata*, B) *P. setaceae*, C) *P. maliformes* e D) *P. quadrangularis*. As cores das linhas tracejadas correspondem ao banco onde os genótipos foram obtidos; vermelho = Embrapa Mandioca e Fruticultura, verde = Embrapa Cerrados.42
- Figura 5.** Análise de agrupamentos para quatro espécies do gênero *Passiflora* obtidos a partir de regiões análogas a genes de resistência pelo método UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) e Coeficiente de Similaridade de Jaccard. As cores das linhas laterais esquerda correspondem aos Bancos de Germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Mandioca e Fruticultura (representado pela cor vermelha) e Cerrados (cor verde) onde os genótipos foram amostrados. A) *P. alata*, B) *P. setacea*, C) *P. maliformes* e D) *P. quadrangularis*.43

Figura 6. Diagramas de Ven ilustrando a distribuição de alelos privados entre os bancos de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura e Cerrados, para *Passiflora* spp. em geral a esquerda e por espécie a direita. N= número total de alelos.44

RESUMO

O gênero *Passiflora* compõe aproximadamente 600 espécies descritas na família Passifloraceae e sua diversidade tem destaque na Colômbia e no Brasil que são considerados centros de diversidade para o gênero. O conhecimento acerca da diversidade genética é fundamental para a conservação de qualquer espécie e também para os maracujazeiros, esse conhecimento fornece subsídios essenciais para a conservação e para o melhoramento genético. O gênero *Passiflora* possui uma ampla variabilidade genética intra e interespecífica a ser explorado. Neste contexto, espécies silvestres são potencialmente favoráveis para diversificar os sistemas de produção, além de fornecerem genes úteis ao melhoramento das atuais espécies cultivadas. Dessa forma, objetivou-se caracterizar acessos de *Passiflora* presentes em Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) utilizando marcadores moleculares análogos a genes de resistência em 55 plantas, representando 35 acessos de quatro espécies - *P. alata*, *P. setaceae*, *P. maliformes* e *P. quadrangularis* oriundos do Centro de Pesquisa Agropecuária do Cerrados (CPAC), Embrapa Cerrados, Brasília, DF, e da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA. Esses foram genotipados com até onze combinações de iniciadores que acessam RGAs. As análises descritivas demonstraram elevada percentagem de marcas polimórficas variando de 84,4% para *P. quadrangularis* a 92,5% para *P. maliformes* e a identificação de alelos exclusivos perfizeram um total de 4 alelos privados presentes nos acessos: três da Embrapa Mandioca e Fruticultura e um da Embrapa Cerrados, indicando alta variabilidade genética existente na maioria dos acessos de *Passiflora* spp. A média da Heterozigosidade esperada e o Conteúdo de Informação Polimórfica foram de 0,00 a 0,46 e de 0,00 a 0,36. A média do índice de Shannon foi de 0,44 variando de 0,40 a 0,48. Na análise bayesiana interespecífica houve separação dos acessos em dois grupos principais, onde *P. alata* formou o primeiro grupo e as demais espécies silvestres de *Passiflora* spp. formaram o segundo grupo. Os grupos foram identificados pela origem dos BAGs, o PCoA permitiu uma ampla distribuição dos genótipos identificando dois grupos de acordo às origens de BAGs onde foram coletadas. A diversidade genética apresentada evidencia regiões que são conservadas nas quatro espécies.

Palavras-chave: Marcadores moleculares, diversidade genética; RGA

ABSTRACT

The genus *Passiflora* is composed of approximately 600 species described in the family Passifloraceae and its diversity is prominent in Colombia and Brazil, which are considered centers of diversity for the genus. Knowledge about genetic diversity is fundamental for the conservation of any species and also for passion fruit, this knowledge provides essential subsidies for conservation and genetic improvement. The genus *Passiflora* has a wide intra and interspecific genetic variability to be explored. In this context, wild species are potentially favorable for diversifying production systems, as well as providing useful genes for the improvement of cultivated species. Thus, we aimed to characterize *Passiflora* accessions present in Active Germplasm Banks (BAGs) using resistance-like molecular markers in 55 plants, displaying 35 accessions of four species - *P. alata*, *P. setaceae*, *P. maliformes* and *P. quadrangularis* from the Cerrados Agricultural Research Center (CPAC), Embrapa Cerrados, Brasília, DF, and from Embrapa Cassava and Fruit, Cruz das Almas-BA. These have been genotyped with up to a combination of beginners accessing RGAs. Descriptive statistics show a high percentage of polymorphic marks ranging from 84.4% for *P. quadrangularis* to 92.5% for *P. maliformes* and identification of exclusive alleles pierced by a total of 4 particular alleles present in the accessories: three from Embrapa Cassava and Fruit and one from Embrapa Cerrados, presented high genetic variability existing in most accessions to *Passiflora* spp. The expected average heterozygosity and polymorphic information content were from 0.00 to 0.46 and from 0.00 to 0.36. The average Shannon index was 0.44 ranging from 0.40 to 0.48. In the interspecific Bayesian analysis there was variation of accessions in two main groups, where *P. alata* formed the first group and the other wild species of *Passiflora* spp. formed the second group. The groups were created by the origin of the BAGs, or PCoA allowed a wide distribution of genotypes by identifying two groups according to the origins of the BAGs where they were collected. Genetic diversity Receive evidence of regions that are conserved in four species.

Keywords: Molecular markers, genetic diversity; RGA

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Passiflora* é o maior da família Passifloraceae, com aproximadamente 600 espécies conhecidas (Meletti et al., 2005; Yockteng et al., 2011). A maior diversidade é encontrada na Colômbia e no Brasil com mais de 170 e 150 espécies de *Passiflora*, respectivamente (Ferreira et al., 1991; Ocampo et al., 2010; Bernacci et al., 2015).

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de maracujás (Gonçalves; Souza, 2006). Sua principal relevância econômica decorre de sua comercialização no mercado de frutos *in natura* ou na produção do suco, e na produção de fitoterápicos (Faleiro et al., 2006; Faleiro et al., 2008). A principal espécie cultivada é *P. edulis*, conhecida popularmente como maracujá azedo ou maracujá amarelo (Matta, 2005; Bellon et al., 2007). A segunda mais cultivada é *P. alata*, conhecida como maracujá doce e utilizada sobretudo no consumo *in natura* (Junqueira et al., 2005; Peixoto, 2005).

Na Colômbia, o cultivo comercial se dá a partir de seis espécies de maracujá: *P. edulis* Sims., *P. edulis* f. *edulis* Sims. (gulupa, maracujá roxo), *P. ligularis* A. Juss, *P. maliformis* L., *P. tripartita* (Juss.) Poir. (curuba, tumbo) e *P. quadrangularis* L, sendo a espécie *P. ligularis* A. Juss. (popularmente denominada de granadilla) a mais relevante (Oliveira et al., 2017).

A cultura do maracujazeiro é apontada como uma alternativa agrícola para produtores de agricultura familiar pelo rápido retorno econômico (Meletti, 2011). Esta possui também uma ampla variabilidade genética a ser explorada, tanto no setor alimentício, medicinal e ornamental, com potencial para a comercialização e para o avanço de programas de melhoramento genético (Meletti et al., 2000; Faleiro, 2005).

Apesar do elevado potencial econômico e social de maracujazeiros, há poucos estudos sobre sua caracterização genética, em grande parte das espécies silvestres. O estudo de diversidade genética é base fundamental para o avanço de programas de melhoramento (Barbosa, 2016). O uso de marcadores moleculares é uma ferramenta eficiente na detecção do polimorfismo de DNA e amplamente utilizada em estudos ecológicos, filogenéticos, filogeográficos e de genética populacional (Ferreira; Grattapaglia, 1998; Ferreira, 2001). O conhecimento da variabilidade genética fornece informações quanto a resistência das plantas à

patógenos, indicando exemplares promissores para cultivo, além de nortear estratégias para conservação (Meletti et al., 2005).

As espécies silvestres de *Passiflora* apresentam grande potencial para uso em programas de melhoramento genético. Esse fato se deve a genes de interesse como: resistência a pragas e doenças, maior longevidade, período amplo de florescimento e maior adaptação a condições climáticas adversas nestes espécimes (Junqueira et. al., 2005; Meletti et al., 2005; Peixoto, 2005), em que todas essas características são objeto de pesquisa dos melhoristas que buscam obter cultivares mais produtivas e resistentes por meio de genes expressos em espécies silvestres (Junqueira et. al, 2005; Fonseca, 2008; Faleiro; Junqueira 2009, Fuhrmann, 2011).

Tendo em vista o grande potencial a ser explorado no gênero *Passiflora*, estudos prévios como avaliação e caracterização da variabilidade genética faz se necessário como base para estudos futuros, sendo estes essenciais na caracterização de genótipos de interesse (Ganga et al., 2004).

Diante da importância econômica do maracujá, objetivou-se caracterizar a diversidade genética em acessos de *Passiflora* sp. mantidos em Bancos de Germoplasma (BAG). Para melhor apresentação dos resultados obtidos, a presente dissertação foi estruturada em capítulo, antecedido de resumo, introdução geral e referencial bibliográfico. O capítulo I foi intitulado “Estimativas de diversidade e estrutura genética em maracujazeiros (*Passiflora* sp.) por meio de marcadores análogos à genes de resistência”, conforme normas estabelecidas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PPGCA) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia/*Campus* de Itapetinga.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Gênero *Passiflora*

O gênero *Passiflora*, pertence à família Passifloraceae, é o mais representativo da família com aproximadamente 96% das espécies distribuídas nas Américas (Ulmer; Macdougall, 2004; Cervi; Imig, 2013). As espécies de *Passiflora* também podem ser encontradas na Índia, na China, no Sudeste Asiático, na Austrália, nas ilhas do Pacífico e nas regiões vizinhas. A exemplo pode-se citar *P. aurantia*, *P. cinnabarina*, *P. herbertiana*, *P. cupiformis*, *P. henryi*, *P. jugorum*, *P. moluccana* e *P. siamica*. O Brasil e a Colômbia são os países representantes, com o maior número de espécies. Portanto, são considerados como os maiores centros de diversidade, uma vez que 30% das espécies do gênero *Passiflora* são encontradas nesses países, 150 no Brasil e 170 na Colômbia, em que das espécies presentes, cerca de 89 são endêmicas do Brasil (Fajardo et. al., 1998; Viana, et. al., 2003; Ocampo et. al., 2010; Bernacci et. al., 2015).

Os maracujazeiros são plantas trepadeiras herbáceas ou arbustivas, raramente eretas (Nunes, Queiroz, 2006; Souza, Lorenzi, 2008). São espécies alógamas e com auto-incompatibilidade, o que leva ao aumento de grau de heterozigose, necessitando de agentes polinizadores para o sucesso produtivo (Vanderplank, 2000; Cunha, 2013). Possuem caule cilíndrico ou quadrangular, ramificado, anguloso, suberificado, glabro ou piloso (Vanderplank, 2000). As folhas podem ser alternadas, simples ou compostas, inteiras ou lobadas e de forma versátil, com margem inteira ou serrilhada (Souza; Lorenzi, 2008). Em sua maioria, apresentam glândulas nectaríferas, no pecíolo, na margem da bráctea ou na parte dorsal da folha (Feuillet; Macdougall, 2007; Nunes; Queiroz, 2007; Cervi et al., 2010). A existência de brácteas é uma característica relevante para a caracterização taxonômica na maioria das espécies, com exceção de algumas do subgênero *Decaloba*. Aspectos como posição, tamanho e formato das brácteas são consideráveis para a separação taxonômica de gêneros (Vanderplank, 2000).

As flores do maracujazeiro são hermafroditas, cujas formas e cores podem variar do branco a vermelho intenso. Têm simetria radial com o cálice tubuloso herbáceo ou subcarnoso, e cinco sépalas (Ulmer e Macdougall, 2004) A corola apresenta cinco pétalas membranáceas, alternadas a sépalas. A corona geralmente é colorida e soldada ao androginóforo, que se apresentam elevados (Vanderplank, 2000; Cunha, et. al., 2004; Ulmer; Macdougall, 2004). O androceu, em geral é formado por cinco anteras, e o gineceu, formado por um ovário súpero, geralmente afiliado no ápice, e, apresenta três estiletos. O ovário localiza-se no topo do androginóforo, contendo de 20 a 200 óvulos (Cunha et. al., 2004).

Os frutos comumente são bagas indeiscentes ou cápsulas deiscentes de forma ovoide ou globosa e variam de coloração amarela, vermelha ou roxa, e, a sua formação depende de uma polinização eficiente. As sementes apresentam forma oval, sendo extensas e abundantes (Vanderplank, 2000; Ulmer e Macdougall, 2004). A casca tem textura coriácea, quebradiça e lisa, a qual protege as sementes envolvidas pelo mesocarpo (Bernacci et al., 2008; Nunes; Queiroz, 2007).

Aspectos econômicos da cultura do maracujazeiro

Diante de vários usos atribuído ao gênero, as diferentes espécies do maracujá têm recebido destaque na fruticultura tropical nos últimos 30 anos. A família é cultivada em todos os estados do território nacional, por isso é o maior produtor para consumo local (Meletti et. al, 1996; Vasconcellos et al., 2001; Brignani, 2002; Gonçalves, Souza, 2006; Meletti et. al, 2010). A produção de maracujá no Brasil em 2017 foi de 824.000 toneladas em 57.000 hectares de área cultivada. A maior região produtora de maracujazeiro no Brasil é o Nordeste, sendo a Bahia o estado mais produtivo (IBGE, 2016; AGRIANUAL, 2017). O cultivo das passifloras exerce um papel socioeconômico importante, pois além da geração de empregos no campo, também aquece a economia com a venda dos insumos para a agroindústria (Faleiro; Junqueira, 2016). As variedades de maracujá são alternativas para fruticultores que buscam opções diferentes de mercado, garantindo renda para todo o ano (Oliveira, et. al, 2017).

No Brasil, as espécies com maior valor comercial são a *P. edulis* (maracujá-azedo) e a *P. alata* Curtis (maracujá-doce) (Vasconcellos et al., 2001; Faleiro, et. al. 2005; Fraife Filho et. al., 2011). *P. edulis* é a mais conhecida, cultivada e comercializada devido à qualidade de seus frutos e maior rendimento industrial (Faleiro, et. al, 2005), cuja abrangência cobre mais de 90% dos pomares brasileiros de maracujá e sua produção anual já alcança

aproximadamente 1 mi. ton. ano⁻¹ (Faleiro, Junqueira, 2016; Oliveira, et. al., 2017). *P. alata* é originária da Mata Atlântica e sua comercialização é exclusiva para consumo *in natura* e uso na indústria farmacêutica, sendo esta espécie uma alternativa de renda para os pequenos produtores (Montero, 2017).

As espécies do gênero *Passiflora* se destacam pelas propriedades alimentícias, ornamentais e medicinais, mas, sobretudo pela qualidade de seus frutos (Souza; Meletti, 1997; Tocchini et al., 1995). Além da possibilidade de utilização *in natura*, são recomendados na produção de sucos, refrescos, doces, sorvetes etc. A casca do maracujá constitui boa matéria-prima para produção de doce em calda (Oliveira et al., 2002; Costa, et al, 2008) e barras de cereais (Urbano, 2003). Já o óleo extraído das sementes, pode ser aproveitado na alimentação humana, animal e indústria cosmética, e o farelo resultante da extração do óleo é rico em proteínas e carboidratos e exibe elevado teor de fibras (Ferrari et al., 2004).

No que se refere o aspecto medicinal em espécies silvestres e comerciais de maracujá, suas folhas, flores, raízes e frutos extraídos são usados para combater diversas enfermidades. Existem registros para as espécies *P. sidifolia*, *P. bahiensis*, *P. coccinea*, *P. vitifolia* e *P. incarnata*, as quais são ricas em flavonoides apresentando atividade ansiolítica, sedativa e analgésica (Sakalem et al., 2012). Seu uso também se refere aos fitoconstituintes de *P. edulis* e *P. incarnata* (Patel et al., 2011). Outras propriedades também são concedidas à espécie *P. mucronata* Lam., como a sua utilidade medicinal sedativa e seu uso popular para insônia, calmante, vermes e hemorroidas (Boscolo; Valle, 2008). *P. alata* Curtis é empregada em preparações farmacêuticas como infusões e comprimidos sozinha ou em associação com *P. edulis* e *P. incarnata* (Mendez et al., 2011), na qual é para tratamentos da ansiedade, espasmos e nervosismo (Soares et al., 2004). Já *P. foetida* L. é utilizada por inteira no uso terapêutico medicinal, na forma fresca ou desidratada (Rasool et al., 2011).

Considerando o uso ornamental, as passifloras se destacam pela beleza característica de suas flores com formato e cores diversas, revelando grande potencial para o agronegócio de plantas ornamentais. Já foram apontados mais de 685 híbridos com uso ornamental exibindo flores para todos os estilos e ambientes (Vanderplank et al., 2003; Peixoto, 2005; Faleiro et al., 2007; Junqueira et al., 2008; Abreu et al., 2009; Santos et al., 2012).

Quanto à exportação, o Brasil apresenta números relativamente pequenos devido a elevada demanda do mercado interno, que absorve quase o total da produção, como frutos para suco e polpas. O pouco que o país exporta é representado pelos sucos concentrados, cuja comercialização é por meio de países como a Holanda, Estados Unidos, Porto Rico,

Japão e Alemanha, os quais importam 76% do suco concentrado produzido no Brasil (Meletti, 2011, Pires, 2011). Contudo, a produtividade média dos pomares brasileiros de maracujá não expressa o potencial produtivo. Vários fatores contribuem para tal, como a coleta extrativista em populações naturais em que o tamanho e a qualidade da produção é variável. Além disso, por falta de controle e conhecimento dos cultivos comerciais, muitas plantas apresentam patógenos de resistência os quais trazem consigo a perda de safras (Anselmo; Junqueira, 1997; Stenzel; Sera, 1999; Lima; Borges, 2002; Junqueira et al, 2003, Meletti, 2010).

Para aumento da produtividade, algumas características devem atender para fins de melhoramento, como o desenvolvimento de variedades de maracujazeiro com peso e boa qualidade de frutos, menor espessura de casca, alto teor de sólidos solúveis e tolerância às principais pragas e doenças. Assim, assegurando a oferta do produto para comercialização (Viana et. al, 2004, Oliveira, 2006).

Coleções e bancos de germoplasma

Os Bancos de Germoplasma são ferramentas de conservação dos recursos genéticos vegetais *ex situ*. A avaliação da diversidade genética entre os acessos de um banco de germoplasma é necessária para o seu efetivo uso, pois resultam em dados sobre possíveis genitores a serem utilizados em programas de melhoramento, além da identificação de acessos duplicados e o intercâmbio de germoplasma entre pesquisadores (Costa et. al, 2011; Freitas, 2011).

Os países que tiveram maior desenvolvimento nos acervos de germoplasma de *Passiflora* foram o Brasil, a Colômbia, o Equador e o Peru. O principal uso do banco de germoplasma do gênero *Passiflora*, além de salvaguardar a variabilidade genética das espécies, se refere à aquisição de variedades para produção de frutos de maracujá, em que essas envolvem as formas azeda ou ácida e a doce de baixa acidez (Faleiro et. al., 2006).

No Brasil, a manutenção de germoplasma tem sido feita em BAGs (Bancos Ativos de germoplasma), a maioria deles instaladas e mantidas por instituições públicas de pesquisa. Os principais BAGs nacionais de Passifloras estão localizados na UNESP, em Jaboticabal (SP); no Instituto Agrônômico, em Campinas (SP); no IAPAR, em Londrina (PR); na Embrapa Cerrados/UnB, em Planaltina (DF); na Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas (BA), na UESB, em Vitória da Conquista (BA) e no Instituto Plantarum, em Nova Odessa

(SP) em que todos os BAGs enfrentam a dificuldade na sua manutenção devido à escassez de recursos (Meletti, et. al., 2005).

A conservação de germoplasma de *Passiflora* em sua maioria é feita por meio de coleções de plantas no campo em telados ou em casas de vegetação (Nick et al., 2010). O armazenamento pode ser mantido através da germinação de sementes, substituindo as plantas de cada acesso que forem perdidas, por diversas causas naturais ou por pragas e doenças; pela propagação de estacas, conservadas em forma de clone, esta é uma forma mais restrita de diversidade, pois todos os indivíduos de um mesmo acesso (clone) são geneticamente idênticos. Também há outras estratégias como a criopreservação (em nitrogênio líquido), conservação *in vitro* (cultura de tecidos).

A criopreservação é eficiente e prática no sentido de conservar a longo prazo os recursos filogenéticos, sobretudo acerca de espécies que possuem sementes recalcitrantes ou intermediárias (Santos, 2000). As técnicas de micropropagação possibilitam a propagação rápida e em larga escala de mudas com alta qualidade fitossanitária e genética (Dal Vesco et al., 2001; Dias et al., 2014). Nessas circunstâncias, os protocolos de conservação devem ser otimizados e ajustados, de acordo com as características de cada espécie (Faleiro; Junqueira, 2016).

A principal dificuldade de manutenção dos BAGs é no controle de patógenos, visto que muitas espécies de banco se encontram em condições diferentes de seu ambiente natural, quer seja em forma de sementes, mudas ou *in vitro* (Meletti et. al 2007). Ainda há muito a ser estudado quanto à germinação e ao armazenamento de espécies de diferentes espécies de maracujazeiro (Faleiro, et, al, 2017). Além disso, é importante que ocorra a introdução de novos acessos para o enriquecimento e manutenção dos BAGs.

Diversidade genética

A diversidade genética se refere a toda variação biológica hereditária acumulada durante o processo evolutivo, ocorre por migração, especiação e por mutações nas sequências nucleotídicas do DNA (Santos et. al., 2009; Turchetto-zolet et. al., 2013). Esta variação pode ocorrer por pleiotropia ou por epistasia, cujos fenômenos gênicos podem ocorrer entre e dentro das espécies dos diferentes organismos. O conhecimento da diversidade genética nos níveis intra e interespecíficos, dos pontos de vista genotípico e fenotípico, é essencial para o conhecimento da biodiversidade (Santos, et. al. 2009).

São vários os aspectos que influenciam na disposição da variabilidade genética em espécies vegetais, dentre esses, podem-se citar os fatores evolutivos, ecológicos e geográficos (Rao; Hodgkin, 2002; Smithson, 2006; Vieira et al., 2012). Em muitas espécies nativas é comum o comportamento ecológico de metapopulação, cuja diversidade pode ser observada entre indivíduos de populações isoladas por fragmentação de habitats (Rao; Rodgkin, 2002).

A diversidade genética pode ser mensurada através de descritores de variabilidade, tais como: descritores morfológicos, agrônômico, enzimáticos (bioquímicos) e moleculares (Mohammadi; Prasanna, 2003; Vicente, 2005; Cruz; Carneiro, 2006).

Os descritores morfológicos são baseados em caracteres de fácil detecção e mensuração, com pouca influência do ambiente (Paiva et al., 2014). Esta é a forma mais acessível e mais utilizada para caracterizar a diversidade genética dos recursos vegetais mantidos em Bancos de Germoplasma (BAG) (Daros et al., 2002). Entretanto, essa caracterização morfológica é considerada limitada por utilizar descritores baseados em poucos caracteres, podendo muitas vezes, não distinguir corretamente os genótipos elite (Smith; Smith, 1992; Pecchioni et al., 1996).

Os descritores agrônômicos consistem fundamentalmente de caracteres com baixa herdabilidade, concebem de forma preliminar a adaptação e o potencial produtivo dos genótipos, pondo em evidencia os mais promissores indicados para recomendação direta ao produtor e/ou utilização em programas de hibridações (Fukuda; Guevara, 1998). Esses descritores apesar de mais robustos e contributivos, sofrem maior influência ambiental e, portanto, necessitam de repetibilidade (Cruz et al., 2011).

Os descritores bioquímicos são baseados em proteínas e enzimas, requer baixos custos e é de fácil execução, no entanto, proporciona pequena cobertura do genoma (Borém, 1997; Ferreira; Grattapaglia, 1998). O desenvolvimento das técnicas de marcadores de DNA trouxe novos avanços para o melhoramento genético vegetal. Os marcadores moleculares são segmentos de DNA que estão fisicamente ligados a locos que determinam características de interesse (Toppa; Jadoski, 2013) e, se destacam pelo grande potencial na obtenção de dados genéticos das espécies (Gasques et al., 2013). Os estudos moleculares permitem avaliar a diversidade genética diretamente a nível de DNA, livre de influências ambientais ou do estágio de desenvolvimento do organismo estudado (Lacerda et al., 2002).

O gênero *Passiflora* têm distribuição abrangente nos diferentes biomas tropicais. Todavia, os dados de diversidade intra e interespecífica são limitados. Estimativas de publicação científica indicam que apenas 15% dos estudos de caracterização de diversidade

genética de maracujazeiros são baseados em marcadores moleculares (Cerqueira-Silva et al., 2014a). Estudos mais detalhados e precisos acerca da diversidade genética de maracujazeiros são fundamentais para o desenvolvimento de linhagens nos sistemas de produção como opções complementares ao maracujazeiro-doce, em busca de genes de espécies silvestres úteis ao melhoramento das atuais espécies cultivadas no Brasil, como *P. edulis* e *P. alata* (Cunha, 1998; Faleiro et. al, 2005).

Estudos genéticos em populações naturais buscam avaliar como a variabilidade genética está difundida no tempo e no espaço, sua dispersão dentro e entre populações, permitindo melhor concepção de como a seleção atua em função da adaptabilidade (Estopa et al., 2006). Esse entendimento é essencial para uso em programas de conservação e melhoramento, colaborando na compreensão da taxonomia, origem e evolução de espécies de plantas de interesse biológico e econômico (Rao; Hodgkin, 2002).

As atividades de pré-melhoramento, como o conhecimento de genes potencialmente úteis de espécies silvestres e sua incorporação em variedades comerciais, são importantes para subsidiar a utilização prática dos recursos genéticos e ampliar a base genética dos programas de melhoramento, visando a seleção de genótipos de maracujá-azedo e maracujá doce mais produtivos, mais resistentes a doenças e com melhor qualidade física e química dos frutos (Faleiro et al., 2011).

Aplicação de marcadores moleculares para a caracterização da diversidade de passiflora

O uso de técnicas moleculares relacionadas à caracterização da variabilidade genética tem avançado exponencialmente nas últimas décadas, especialmente com o uso de marcadores moleculares (Pereira et al., 2005). Marcador molecular pode ser classificado como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA capazes de detectar o polimorfismo genético dos indivíduos relacionados. (Ferreira; Grattapaglia, 1998).

O crescente desenvolvimento de equipamentos automatizados e da bioinformática tem beneficiado a geração de uma quantidade ilimitada de marcadores moleculares, potencializando sua inclusão em programas de melhoramento genético (Pereira et al., 2005; Semagn et. al., 2006). Os marcadores de DNA baseiam-se na análise de diferenças em pequenas sequências de DNA entre indivíduos. As técnicas utilizadas são diversas e dão nome

aos diferentes tipos de marcadores, que podem ser dominantes ou codominantes (Karp; Edwards, 1998).

Os marcadores codominantes possibilitam diferenciar indivíduos homozigotos e heterozigotos, o que não é possível com marcadores dominantes, para os quais apenas é possível identificar a presença ou ausência de um determinado alelo (Turchetto-zolet, et al., 2017). São marcadores moleculares codominantes: os isoenzimáticos ou bioquímicos e os microssatélites, a exemplo dos SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Entre os marcadores com expressão dominante podem se citar, a exemplos, o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amlified Fragment Length Polymorphism*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), e os marcadores RGA (*Resistance Gene Analogs*) em amplificação em cadeia de polimerase via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Reddy et al., 2002; Oliveira et al., 2008; Lopez et. al., 2003).

As técnicas para estudos com marcadores moleculares têm sido aprimoradas com os progressos das metodologias que permitem a identificação de marcadores em escala genômica. Assim como o surgimento de diversas plataformas de sequenciamento de alto desempenho (plataformas de Next Generation Sequencing – NGS) (Turchetto-zolet, et al., 2017). Estas novas abordagens são uma combinação das características vantajosas de diversas técnicas básicas. Dentre as técnicas estão a metodologia para aumentar a sensibilidade e resolução na identificação de ajustes e genotipagem (Abdelkrim et al., 2009; Castoe et al., 2010; Csencsics et. al., 2010; Silva et al., 2013; Turchetto-zolet, et al., 2017). A exemplo de ajustes metodológicos está a técnica NGS, usada no sequenciamento do genoma de *P. edulis* na qual detectou altos níveis de polimorfismo (Salas, 2016).

A escolha do marcador molecular depende de sua reprodutibilidade, simplicidade e custo (Borém; Caixeta, 2009). As principais vantagens do uso de marcadores moleculares em plantas são: não sofrer interferência do ambiente, detectar altos índices de polimorfismos e não necessita de conhecimento prévio do genoma (Resende et. al., 2014). As principais aplicações para marcadores moleculares para a família Passifloraceae são destacadas por Cerqueira-Silva et al. (2014a, b) e Faleiro (2007) sendo: A estimativa da diversidade genética intraespecífica e interespecífica; a determinação de relações evolutivas e classificações filogenéticas; e a identificação, caracterização e mapeamento de genes. Essas aplicações podem colaborar para a caracterização, conservação e uso da biodiversidade. Trabalhos acerca da variabilidade genética de maracujazeiros mediante ferramentas moleculares foram

realizados nos últimos anos, a exemplos do uso de RAPD (Viana et al., 2003; Faleiro et al., 2005; Bellon et al., 2005; Cerqueira-Silva et al., 2010; Bellon, 2014), de AFLP (Devos et al., 2004; Ortiz, et al 2011), de SSR (Reis et al., 2011; Araújo, 2018), de ISSR (Costa, 2010; Santos et al. 2011; Pereira, 2012a), e de RGA (Paula, 2010; Pereira, 2012; Pereira, 2012b; Barbosa, 2016; Souza, 2018).

Marcadores RGA (*Resistance Gene Analog*)

Os marcadores RGA (*Resistance Gene Analogs*) são classificados como marcadores do tipo dominante e são marcadores associados à genes de resistência (Laperuta, 2011). Os RGAs de plantas são um grande grupo de genes- *R* potenciais que conservaram domínios e características estruturais que têm papéis específicos nas interações hospedeiro-patógeno (Sekhwal et al., 2015). A clonagem de genes de resistência proporcionou o desenvolvimento desta classe de marcadores no qual contribui efetivamente para a construção de mapas genéticos e seleção assistida em programas de melhoramento genético vegetal (Hammond-Kosack; Jones, 1997; Tullu et al., 2006).

Essa classe de marcadores associados à genes análogos de resistência, acessa áreas do genoma que são filogeneticamente conservadas e que estão presentes em plantas envolvendo repetições ricas em leucina (LRR), sítios de ligação a nucleotídeos (NBS), estruturas complexas de NBS-LRR e proteínas quinases (Staskawicz et al., 1995; Hammond-Hosack; Jones, 1997). Estes genes atribuem resistência contra vários patógenos e têm sido isolados de diversas espécies de plantas. Foram identificados em torno de 50 genes NBS-LRR em mamão (*Carica papaya* L.) e em pepino (*Cucumis sativus* L.) (Porter et al., 2009, Wan et al., 2013), enquanto em *Arabidopsis thaliana* (L.) foram identificados 159 (Guo et al., 2011).

Marcadores RGAs podem ser relevantes na seleção de genótipos de interesse, construção de mapas genéticos e na identificação de genes de resistência em plantas (Hammond-Kosack; Jones, 1997; Geffroy et al., 1999; Tullu et al., 2006). Na caracterização genética de acessos e cultivares, podem revelar alto grau de polimorfismo (Hammond-Kosack; Jones, 1997). Nos últimos 10 anos, por exemplo, têm-se registros que os RGAs evidenciaram a caracterização genética de diferentes espécies da família Passifloraceae (Paula, 2010; Pereira, 2012; Pereira, 2012b; Barbosa, 2016; Souza, 2018).

REFERÊNCIAS

- ABDELKRIM, J.; ROBERTSON, B. C.; STANTON, J.; GEMMELL, N. Fast, costeffective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. **BioTechniques**, v. 46, n. 3, p. 185–92, 2009.
- ABREU, P. P.; SOUZA, M. M.; SANTOS, E. A.; PIRES, M. V.; PIRES, M. M.; ALMEIDA, A. F. Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**, v. 166, n. 3, p. 307-315, 2009.
- AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP, 2006. p. 359-365. 2017.
- ANSELMO, R.M.; JUNQUEIRA N.T.V. Doenças de Maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryander) em pós-colheita. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 30. 1997, Poços de Caldas-MG. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v.22, suplemento, 1997.
- ARAÚJO. W. A., **Caracterização molecular de cultivares e progênies de maracujazeiro azedo**. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa -Viçosa, MG, 2018.
- BARBOSA, N. C. S. **Anatomia foliar e diversidade genética em *Passiflora* spp.** (Passifloraceae L.) resistentes ao Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). Programa de Mestrado (Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade). Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA, 2016
- BELLON, G., FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, K. P., JUNQUEIRA, N. T. V., SANTOS, E. C., BRAGA, M. F., GUIMARÃES, C. T. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 1, p. 124-127, 2007
- BELLON, G.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, K.P.; PAULA, M.S.; BRAGA, M.F.; JUNQUEIRA, N.T.V.; PEIXOTO, J.R. Diversidade genética de acessos comerciais e silvestres de maracujazeiro-doce com base nos marcadores RAPD. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISAS EM MARACUJAZEIRO, 4., 2005. Planaltina Distrito Federal: **Embrapa Cerrados**, 2005. p.118-121.
- BELLON,G. **Filogenia,variabilidade genética e caracterização de *Passifloras* silvestres, comerciais e híbridos interespecíficos como fontes de resistência à doenças**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, 151 p. Tese de Doutorado.
- BERNACCI, L. C.; SOARES-SCOTT, M. D.; JUNQUEIRA, N. T. V.; PASSOS, I. R. S.; MELETTI, L. M. M. *Passiflora edulis* Sims: The correct taxonomic way to cite the yellow

passion fruit (and of others colors). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 566-576, 2008.

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, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB182>>.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa : UFV, 1997. 547p.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2009. 374 p.

BOSCOLO, O.H.; VALLE, L. S. Planta de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. *Iheringia. Série Botânica*, 63: 263-277, 2008.

BRIGNANI, F.N. Produção integrada de maracujá. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.195-197, jul./dez., 2002.

CASTOE, T. A.; POOLE, A. W.; KONING, A. P. J.; JONES, K.; TOMBACK, D. F.; OYLER-MCCANCE, S. J.; FIKE, J. A.; LANCE, S. L.; STREICHER, J. W.; SMITH, E. N.; POLLOCK, D. D. Rapid identification of thousands of copperhead snake (*Agkistrodon contortrix*) microsatellite loci from modest amounts of 454 shotgun genome sequence. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 2, p. 341–7, 2010.

CERQUEIRA-SILVA CBM, JESUS ON, SANTOS ESL, CORRÊA RX, SOUZA AP Genetic breeding and diversity of the genus *Passiflora*: progress and perspectives in molecular and genetic studies. **Int J Mol Sci** 15:14122–14152, 2014a

CERQUEIRA-SILVA et al. Genetic diversity of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) based on RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 10, p. 154-159, 2010.

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

CERVI, A. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; BERNACCI, C. *Passifloraceae*. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>.

CERVI, A.C.; IMIG, D.C. A new species of *Passiflora* (Passifloraceae) from Mato Grosso do Sul, Brazil. **Phytotaxa**, p. 46 - 50, 2013.

COSTA, A. M. N. M., CHAVES, C. G., FREITAS, R. M., ROCHA, E. M. F. F., MOURA, L. B.; MARQUES, L. F., COSTA, T. L.; MOURA, R. L. **Análise sensorial de doce em calda a partir da casca do maracujá amarelo com diferentes concentrações de açúcar**. III Jornada nacional da agroindústria, Bananeiras. ISSN 1980- 1122. ago. 2008.

COSTA, J. L. **Marcadores ISSR: diversidade genética e correlação com heterose em genótipos de *Passiflora edulis* Sims.** Monografia - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2010.

COSTA, T. S., SILVA, A. V. C., LÉDO, A. S., SANTOS, A. R. F., SILVA JÚNIOR, J. F. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.46, n.5, p.499-508, maio 2011.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** 2.ed. Viçosa: UFV, pag. 585, 2006.

CRUZ, C.D.; FERREIRA, F.M.; PESSONI, L.A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética.** Viçosa: Editora UFV, 620p, 2011.

CSENCISICS, D.; BRODBECK, S.; HOLDEREGGER, R. Cost-Effective, SpeciesSpecific Microsatellite Development for the Endangered Dwarf Bulrush (*Typha minima*) Using Next-Generation Sequencing Technology. **Journal of Heredity**, v. 101, n. 6, p. 789–793, 2010.

CUNHA, M. A. P. Prioridades de pesquisa por subárea e objetivo. In: **Anais da REUNIÃO - TÉCNICA: PESQUISA EM MARACUJAZEIRO NO BRASIL.** Cruz das Almas, Brasil. p.11-14, 1998.

CUNHA, M. A. P., BARBOSA, L. V. & FARIA, G. A. **Maracujá: produção e qualidade na Passicultura.** Embrapa, 2004

CUNHA, M. **Produtividade e características de frutos de pomares de maracujá implantados com sementes originais e reaproveitadas do híbrido BRS gigante amarelo.** Brasília: Universidade de Brasília, 2013. 55p. (Dissertação-Mestrado em Agronomia).

DAL VESCO. L. L., PINTO. A. A., ZAFFARI. G. R., NODARI. R. O., REIS. M. S., GUERRA. M. P. Improving pineapple micropropagation protocol trough explant size and medium composition manipulation. **Fruits** 56: 143– 154. 2001

DAROS, M.; AMARAL JR., A.T.; PEREIRA, T.N.S.; LEAL, N.R.; FREITAS, S.P.; SEDIYAMA, T. Caracterização morfológica de acessos de batata-doce. **Horticultura Brasileira.** Vol. 20, p. 43-47, 2002.

DEVOS et al. Diversidad genética em maracujazeiro-’amarelo’ utilizando marcadores moleculares AFLP. **RevBrasFrutic.** 26:494–498, 2004

DIAS, M. S. C. et al. Cultivares. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte - Mg, v. 35, n. 279, p.39-47, 2014

ESTOPA, R. A.; SOUZA, A.M.; MOURA, M.C.O.; BOTREL, M.C.G.; MENDONÇA, E.G.; CARVALHO, D. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropapus* (DC.) MacLeish). **Scientia Florestalis**, no.70, p.97-106, 2006.

FAJARDO, D.; ANGEL, F.; GRUM, M.; TOHME, J.; LOBO, M.; ROCA, W. M. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. **Euphytica**, v. 101, p. 341–347, 1998.

FALEIRO F. G., JUNQUEIRA, N. T. V., BRAGA, M. F., **Maracujá: demandas para a pesquisa**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006

FALEIRO F. G., JUNQUEIRA, N. T.V. Passion fruit (*Passiflora* spp.) improvement using wild species. In: Mariante AS, Sampaio MJA, Inglis MCV (eds) The state of Brazil's plant genetic resources. **Second National Report**. Conservation and Sustainable Utilization for food and agriculture. Embrapa Technological Information: Brasília, DF. 2009. pág 101–106, 2009

FALEIRO, F. G. **Marcadores genéticos-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. (Ed.). **Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa. 2016. p. 235-246 (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro** – desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 187-210.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. Pré-melhoramento do maracujá. In: LOPES, M. A.; FAVERO, 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**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. 550-570p.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JESUS, O. N.; MACHADO, C. F.; FERREIRA, M. E.; JUNQUEIRA, K. P.; SCARANARI, C.; WRUCK, D. S. M.; HADDAD, F.; GUIMARAES, T. G.; BRAGA, M. F. Caracterização de Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro Assistidos por Marcadores Moleculares – Fase III: resultados de pesquisa e desenvolvimento 2012-2016. **Documentos 341**. Embrapa Cerrados, 2017

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Caracterização de germoplasma e melhoramento genético assistidos por marcadores moleculares: resultados da pesquisa 2005-2008. **Boletim de Pesquisa e desenvolvimento**. Embrapa Cerrados, v. 1, p. 7, 2008.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá: aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.1, p. 101-102, 2004.

FERREIRA, F. R. Germoplasma de *Passiflora* no Brasil. In: **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. São Jose, ed. São Jose. 1991. p. 24–26.

FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 1998.

FERREIRA, M. E.. Técnicas e estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos. In: GARRAY, I.; DIAS, B. F. S. (Ed.). **Conservação da Biodiversidade em ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento**. Petrópolis: Vozes, 2001.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: Embrapa/Cenargen, 1998. 220p.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. Passifloraceae. In: KUBITZI, K. **The Families and Genera of Vascular Plants**. Berlin: Springer, v. IX, p. 270-281, 2007.

FONSECA, K. G. da. **Retrocruzamentos visando à obtenção de resistência do maracujazeiroazedo à virose do endurecimento dos frutos, auxiliados por marcadores moleculares**. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)-Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

FRAIFE FILHO, G. A., LEITE, J. B. V., RAMOS, J. V. **Maracujá**. Cruzeiro, DF: Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC, 2011. Disponível em :. Acesso em 09 de setembro de 2018.

FREITAS, J. P. X., OLIVEIRA, E. J., CRUZ NETO, A. J., SANTOS, L. R. Avaliação de recursos genéticos de maracujazeiro-amarelo. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.46, n.9, p.1013-1020, set. 2011

FUHRMANN, E. **Reação de híbridos interespecíficos de maracujazeiro à bacteriose e características físico-químicas de frutos**. Dissertação (Mestrado Agronomia) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2011. 95p.

FUKUDA, W. M. G.; GUEVARA, C.L. Descritores morfológicos e agronômicos para a caracterização de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, 38 f. 1998.

GANGA, R. M. D. et al. Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares fAFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 494-498, 2004.

GASQUES, L. S.; BELONI, K. P.; OLIVEIRA, J. R. de. Os marcadores moleculares em peixes e suas aplicações em publicações da base de dados do scielo. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 16, n. 1, p. 47-50, jan./jun. 2013

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, p.774-784, 1999.

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

GUO, Y. L., FITZ, J., SCHNEEBERGER, K., OSSOWSKI, S., CAO, J., WEIGEL, D. Genomewide comparison of nucleotide-binding site-leucine-rich-repeat-encoding genes in *Arabidopsis*. **Plant Physiol** 157:757–769, 2011

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

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**. 2016. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/pam/>.

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

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

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

KARP, A.; EDWARDS, K. 1998. DNA markers: a global overview. In: G. Caetano- Anollés, P.M. eds. DNA markers: protocols, applications and overviews. **Gresshoff**. New York. p. 1-13.

LACERDA, D. R., ACEDO, M. D. P., LEMOS FILHO, J. P. LOVATO, M. B. **A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas**. Lundiana 3(2):87-92., 2002.

LAPERUTA, L. D. C. **Estudo de uma população segregante (F¹) de maracujá doce: enriquecimento do mapa de ligação e mapeamento de QTL para produção e qualidade de frutos**. Piracicaba, SP: ESALQ, 2011. 134p. (Tese de doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, Piracicaba.

LIMA, A.A.; BORGES, A.L. Solo e clima. In: LIMA, A. A. **Maracujá produção: aspectos técnicos**. Brasília: EMBRAPA, 2002. p. 25-28.

LÓPEZ, C. E.; ACOSTA, I. F.; JARA, C.; PREZADA, F.; GAITÁN-SOLÍS, E.; GALLEGU, 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.

MATTA, F. P. **Mapeamento de QRL para *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em maracujá-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. 2005. 230p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2005.

MELETTI, L. M. M. AVANÇOS NA CULTURA DO MARACUJÁ NO BRASIL. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Volume Especial:83-91, 2011.

MELETTI, L.M. & MAIA, M.L. MARACUJÁ: PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO. Campinas, **Instituto Agrônomo**, 64p, 1996.

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. (Org.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: EMBRAPA CERRADOS, 2005. v. 1, p. 55-78

MELETTI, L.M.M.; BARBOSA, W.; VEIGA, R.F.A.; PIO, R. Crioconservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. **Revista Scientia Agraria Paranaensis**, v.6, p.13-20, 2007

MELETTI, L.M.M.; OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. **Maracujá**. Jaboticabal: FUNEP, (Série Frutas Nativas, 6.) 2010.

MELETTI, L.M.M.; SANTOS, R.R.; MINAMI, K. Melhoramento do maracujazeiro-amarelo: obtenção do cultivar „composto IAC-27“. **Scientia Agricola**, v.57, n.3, p.491-498, 2000.

MENDEZ, A.S.L.; SIMIONATO, N.O.; VALDUGA, A.T.; REGINATTO, F.H. Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n.1, p. 105-111, 2011.

MOHAMMADI, A. S.; PRASANNA, B. M. Analysis of genetic diversity in crop plants: salient statistical tools and considerations. **Crop Science** 43: 1235-1248, 2003.

MONTERO, D. A. V. Etnobotânica de *Passiflora* L. **Uma aproximação na biogeografia, agroecologia e conservação dos maracujazeiros**. Faculdade de Ciências Agrônomicas – UNESP, Tese de doutorado, Botucatu, 2017

NICK, C.; SILVA, D. J. H.; MATTEDI, A. P.; PEDROSA, D. A. Conservação ex situ dos recursos fitogenéticos. In: PEREIRA, T. N. S. (Ed). Germoplasma: conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas. Viçosa: Arca, 2010, p.59- 87.

NUNES, T. S., QUEIROZ, L. P. Uma nova espécie de *Passiflora* L. (Passifloraceae) para o Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 21, n. 2, p. 499-502, 2007.

NUNES, T.S., QUEIROZ, L.P. Flora da Bahia: Passifloraceae. **Sitientibus**. Série Ciências Biológicas, 6(3):194-226, 2006.

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

OLIVEIRA, E. J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. Tese (Doutorado em Agronomia – Área de concentração: Genética e melhoramento de plantas). Escola Superior de Agricultura Luíz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006

OLIVEIRA, J. S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. Importância dos maracujás (*Passiflora* L. spp.) e seu uso comercial. Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos. **Revista RG News** 3 (3) 2017

OLIVEIRA, L. F.; NASCIMENTO, M. R. F.; BORGES, S. V.; RIBEIRO, P. C. N.; RUBACH, V. R.; Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) para produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. vol.22 no.3 Campinas Sept./Dec. 2002.

OLIVEIRA, M. S. P.; SILVA, K. J. D. Diferenciação genética entre procedências de açaizeiro por marcadores moleculares RAPD e SSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.2, p.438-3, 2008.

ORTIZ et al. Evaluating Purple PassionFruit (*Passiflora edulis* Sims F. *edulis*). Genetic Variability in Individuals from Commercial Plantations in Colombia. **Genet. Resour. Crop. Evol.**, 2011.

PAIVA, C. L.; VIANA, A. P.; SANTOS, A. E.; FREITAS, J. C. DE O.; SILVA, R. N. O.; OLIVEIRA, E. J. DE. Genetic variability assessment in the genus *Passiflora* by SSR markers. **Chilean Journal Of Agricultural Research**, v. 74, n. 3, p355-360, 2014.

PATEL, S. S.; MISHRA, H. S. K.; SINGHAI, A. K. Recent updates on the genus *Passiflora*: A review. **Research in Phytochemistry and Pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 1-16, 2011.

PAULA, M.D.S.; FONSECA, M.D.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, p. 222-229, 2010.

PECCHIONI, N.; FACCIOLI, P.; MONETTI, A.; STANCA, A.M.; TERZI, V. Molecular markers for genotype identification in small grain cereals. **Journal of Genetics and Breeding**, Roma, v.50, n.3, p.203-219, 1996.

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 457-463.

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

PEREIRA, A. S. **Genética e pós-melhoramento em cultivares de maracujazeiro ‘amarelo’: variabilidade acessada por ferramentas biométricas e moleculares**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus-BA, 2012a.

PEREIRA, D. A. **Conservação e pré-melhoramento de maracujazeiro ‘do-sono’ (*passiflora setacea* dc): prospecção ecogeográfica, diversidade e estruturação genéticas baseadas em locus moleculares e repetibilidade de caracteres dos frutos**. Dissertação

(Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Jequié-BA, 2012b

PIRES et al. Caracterização do Mercado de Maracujá. In: PIRES, M.M.; SÃO JOSÉ, A.R.; CONCEIÇÃO, A.O. (Eds.) **Maracujá: Avanços Tecnológicos e Sustentabilidade**. Ilhéus, BA: Editus. P 21 – 67, 2011.

PORTER. B. W., PAIDI. M. MING. R., ALAM M., NISHIJIMA W. T., ZHU Y. J. Genomewide analysis of *Carica papaya* reveals a small NBS resistance gene family. **Mol Genet Genomics** 281:609–626, 2009

RAO, V. R.; HODGKIN, T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, vol. 68, p. 1-19. 2002.

RASOOL, S. N.; JAHEERUNNISA S.; JAYAVEERA K. N.; SURESH KUMAR, C. In vitro callus induction and in vivo antioxidant activity of *Passiflora foetida* L. leaves. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2011.

REDDY, M. P. et al. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v.128, n.1, p.9-17, 2002.

REIS, R. V et al. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro amarelo detectada por marcadores microssatélites. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.46, n.1, p.51-57, 2011.

RESENDE. M. D. V., SILVA. F. F., AZEVEDO. C. F. Estatística matemática, biométrica e computacional: modelos mistos, multivariados, categóricos e generalizados (REML/BLUP), inferência bayesiana, regressão aleatória, seleção genômica, QTLGWAS, estatística espacial e temporal, competição, sobrevivência. Visconde do Rio Branco: Suprema, 882 p., 2014

SAKALEM, M. E.; NEGRI, G.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 1219-1232, 2012.

SALAS, S. I. A. **Desenvolvimento, validação, transferibilidade e aplicação de marcadores microssatélites em estudos genéticos das passifloras**. 2016. iv, 283 f., il. Tese (Doutorado em Agronomia) — Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

SANTOS, E. A. Quantificação da Diversidade Genética entre Genitores e Híbridos de Maracujazeiro por meio da Estratégia Ward-Mlm. **Anais**. CD-Rom dos Anais do XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura, Bento Gonçalves – RS, 2012.

SANTOS, F. R. et. al. Diversidade genética. **Biota Minas**, 2009

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 12, (70-84). 2000.

SANTOS, L. F et al. ISSR Markers as a Tool for the Assessment of Genetic Diversity in *Passiflora*. **Biochem Genet**, 2011.

SANTOS, L. F.; DE OLIVEIRA, E. J.; DOS SANTOS, A.; CARVALHO, F. M.; COSTA, J. L.; Y PÁDUA, J. G. ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. **Biochem. Gen.** 49(7 - 8):540 – 54, 2011.

SEKHWAL, M.K., LI, P., LAM, I., WANG, X., CLOUTIER, S., YOU, F.M. "Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants.", **International Journal of Molecular Sciences**, 16(8), pp. 19248-19290. doi : 10.3390/ijms160819248, 2015

SEMAGN, K. et al. An overview of molecular markers methods for plants. **African Journal of Biotechnology**. v.5, n.25, p.2540-68, 2006.

SILVA, P. I.; MARTINS, A. M.; GOUVEA, E. G.; PESSOA-FILHO, M.; FERREIRA, M. E. Development and validation of microsatellite markers for *Brachiaria ruziziensis* obtained by partial genome assembly of Illumina single-end reads. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 17, 2013.

SMITH, J.S.C.; SMITTH, O.S. Fingerprinting crop varieties. **Advances in Agronomy**, v. 47, pag.85-140, 1992.

SMITHSON, A. Pollinator limitation and inbreeding depression in orchid species with and without nectar rewards. **New Phytologist**, v. 169, p. 419-430, 2006.

SOARES, E. L. C.; VENDRUSCOLO, G. S.; EISINGER, S. M.; ZÁCHIA, R. A. Estudo etnobotânico do uso dos recursos vegetais em São João do Polêsine, RS, Brasil, no período de outubro de 1999 a junho de 2001. Capítulo I – Referências 57 2001. I–Origem e fluxo do conhecimento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 6, n. 3, p. 69-95, 2004.

SOUZA, L. N. B. **Caracterização genética em acessos de *Passiflora* spp. com base em marcadores moleculares**. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga – BA, 2018

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APG II. 2º Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008

STASKAWICS, B. J.; AUSUBEL, F. M.; BAKER, B. J. & JONES, J. D. G. Molecular genetics of plant-disease resistance. **Science**, v.268, p. 661-667, 1995.

STENZEL, N. M. C.; SERA, T. Melhoramento genético de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Paraná. In: **REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO**, 2., 1999, Londrina. **Anais**. Londrina: IAPAR-SBF, 1999, p. 81.

TOCCHINI, ROGÉRIO P.; NISIDA, ALBA L. A. C.; HASHIZUME, TAKUO; MEDINA, JÚLIO C.; TURATTI, JAANE M. Processamento: produtos, caracterização e utilização. In: **Maracujá – cultura, matéria-prima e aspectos econômicos**. et. al., 1995). Campinas, ITAL, 1995, p. 161-195

TOPPA, E. V. B., JADOSKI, C. J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**. Volume 12, número 1, p.1-5, 2013

TULLU, A.; TAR'AN, B.; BREITKREUTZ, C.; BUCHWALDT, L.; BANNIZA, S.; WARKENTIN, T.D.; 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, p.588-595.2006

TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética: 2017.

TURCHETTO-ZOLET, A.C.; SEGATTO, A.L.A.; TURCHETTO, C.; PALMA-SILVA, C.; FREITAS, L.B. Guia Prático para estudos Filogeográficos. Ribeirão Preto: **SBG**, 105 p., 2013.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. **Passiflora: Passionflowers of the World**. Portlad-Cambridge: Timber Press. 2004, 430 p.

URBANO, M. F. C. A. **Estudo do Albedo do maracujá e de seu aproveitamento em barras de Cereais**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, 2003.

VANDERPLANK, J. Passion flowers. **3ª ed. Cambridge: The MIT Press**. p. 224, 2000.

VANDERPLANK, J.; BLANCO, E. G.; FEUILLET, C.; FRANK, A.; KING, L.; KUGLER, E.; LAURENS, C.; MACDOUGAL, J.; SKIMINA, T. The International *Passiflora* Register 2003. **Passiflora Society International**, v. 1, p. 1-36, 2003.

VASCONCELLOS, M.A.; BRANDÃO FILHO, J.U.T.; VIEITES, R.L. Maracujá-doce. In: BRUCNER, C.H.; PIKANÇO, M.C. (Eds). **Maracujá: tecnologia de produção, póscolheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes. p. 71-83, 2001.

VIANA, A.P., PEREIRA, T.N.S., PEREIRA, M.G., AMARAL JÚNIOR, A.T., SOUZA, M.M. E MALDONADO, J.F.M. Parâmetros genéticos em populações de maracujazeiro amarelo. **Revista Ceres**, Viçosa, 51: 545-555, 2004

VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; SOUZA, M.M.; MALDONADO, J.V.M.; AMARAL JUNIOR, A.T. Genetic diversity among yellow passion fruit commercial genotypes and among *Passiflora* species using RAPD. **Rev. Bras. Frutic.** 2003, 25, 489–493.

VICENTE, M. C.; GUZMÁN, F. A.; ENGELS, J.; RAMANATHA RAO, V. Genetic Characterization and its use in decision making for the conservation of crop germplasm. In: *The Role of Biotechnology*. Turin, p. 121-128. 2005.

VIEIRA, F. A.; FAJARDO, C. G.; CARVALHO, D.; REIS, C. A. F.; MARCOS, A. S. Fine-scale genetic dynamics of a dominant neotropical tree in the threatened Brazilian Atlantic Rainforest. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, p. 1191-1201, 2012.

WAN. H., YUAN. W., BO. K., SHEN. J, PANG. X, CHEN. J. Genome-wide analysis of NBS-encoding disease resistance in *Cucumis sativus* and phylogenetic study of NBS-encoding genes in Cucurbitaceae crops. **BMC Genomics**, 14(109), 2013

YOCKTENG, D'EECKENBRUGGE, G.C., SOUZA-CHIES, T.T. *Passiflora*. In: Kole, C. (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. **Springer**, pp. 129–171, 2011.

CAPÍTULO I

Estimativas de diversidade e estrutura genética em maracujazeiros (*Passiflora* spp.) por meio de marcadores análogos a genes de resistência

Thayse Karollyne dos Santos Fonsêca¹, Lucas Amorim Silveira², Anderson Carvalho Vieira³, Elisa Susilene Lisboa dos Santos⁴, Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva⁴ *

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 45700-000; ²Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 45700-000

Author para correspondência: CBM Cerqueira-Silva
E-mail: csilva@uesb.edu.br

RESUMO

O gênero *Passiflora* se destaca como maior representante da família Passifloraceae com aproximadamente 600 espécies distribuídas na América tropical, sendo sua maior diversidade encontrada no Brasil e Colômbia. Objetivou-se estimar a diversidade e a estrutura genética em *Passiflora* spp., foram extraídos o DNA genômico de 35 acessos de quatro espécies – *P. alata*, *P. setacea*, *P. maliformes* e *P. quadrangularis*. As reações em cadeia da polimerase foram realizadas para acessar regiões análogas a genes de resistência. O percentual de bandas polimórficas variou de 84,4% (*P. quadrangularis*) a 92,5% (*P. maliformes*). O valor médio de heterozigosidade esperada foi de 0,28 variando de 0,00 a 0,46, o valor médio do conteúdo de informação polimórfica foi de 0,23 variando de 0,00 a 0,36. Do total de 247 alelos, 4 (1,61%) alelos privados foram identificados para todas as espécies, sendo: três (1,21%) na Embrapa Mandioca e Fruticultura e um com 0,40% na Embrapa Cerrados. Quanto a Identidade e distâncias de Nei, a maior divergência genética foi entre *P. alata* e *P. quadrangularis*, com I 0,33 e D 0,72, e, o índice de Shannon médio variou entre 0,40 a 0,48 entre as espécies. A análise de variância molecular evidenciou maior diversidade dentro dos acessos com 67%, entre acessos obteve 33%. Na análise interespecífica, a inferência Bayesiana indica dois *pools* gênicos, um grupo se refere aos genótipos de *P. alata* e outro às demais espécies silvestres *Passiflora* spp. O dendograma permitiu a separação dos genótipos em sete grupos. O PCoA proporcionou uma ampla distribuição dos genótipos. A associação das análises Bayesiana, PCoA e agrupamento UPGMA intraespecífica permitiu identificar a similaridade entre os acessos e a distribuição

em dois grupos principais para as quatro espécies. Os resultados obtidos com esta pesquisa contribuirão com os programas de melhoramento genético e subsidiará estratégias para o manejo e conservação dessas espécies mantidas em Bancos de Germoplasma.

Palavras-chave: Marcadores moleculares; Diversidade genética; RGA; BAG; maracujá.

INTRODUÇÃO

A família Passifloraceae compreende aproximadamente 600 espécies, sendo cerca de 150 delas nativas do Brasil (Oliveira; Ruggiero, 2005; Nascimento, 2006). O país é um dos principais centros de diversidade do gênero *Passiflora*, é o mais importante da família Passifloraceae do ponto de vista econômico. A cultura do maracujazeiro se destaca na fruticultura tropical e no cenário agroindustrial como opção de plantas cultivadas de retorno econômico rápido em que sua produção é realizada durante todas as estações do ano (Leão et al., 2006; Meletti, 2011).

As espécies de *Passiflora* que possuem maior importância econômica no Brasil são *P. edulis* Sims (maracujá-azedo) e *P. alata* Curtis (maracujá-doce) (Faleiro et al., 2016). A importância econômica dessas espécies é atribuída pelas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (Córdova et al., 2005).

Marcadores moleculares têm sido utilizados em diferentes momentos, desde a caracterização de germoplasma até as etapas finais do melhoramento genético (Ferreira; Grattapaglia, 1998; Vieira et al., 2005; Pereira et al., 2005; Faleiro, 2007; Ferreira; Faleiro, 2008). Os cruzamentos inter e intraespecíficos tem sido realizados para a associação de características de interesse (Meletti et al., 2005).

Fontes de resistência a patógenos têm sido identificadas em germoplasma de espécies cultivadas e silvestres de *Passiflora*. Os genes de resistência estão presentes em plantas e acessam a áreas do genoma que são filogeneticamente conservadas, denominadas “motivos”, os quais podem incluir proteínas ricas em leucina (LRR), sítios de ligação a nucleotídeos (NBS), estruturas complexas de NBS-LRR e proteínas quinases (Staskawicz et al., 1995; Hammond-Kosack; Jones, 1997). Os fenótipos de resistência são, em sua maioria, de difícil identificação e os marcadores moleculares análogos a genes de resistência (RGA) podem auxiliar na caracterização da diversidade e estrutura genéticas bem como na identificação de

genes de resistência em plantas e seleção de genótipos de interesse (Geffroy et al., 1999; Tullu et al., 2006).

O gênero *Passiflora* apresenta variabilidade genética a ser explorada, deste modo, vale ressaltar a importância da busca por espécies com características de interesse agrônomo como: longevidade, floração mais duradoura, maior produção de metabólitos secundários, bem como adaptação a condições adversas e resistência a pragas e doenças (Junqueira et al., 2005). A caracterização da diversidade genética entre as espécies de *Passiflora* pode indicar recursos genéticos fundamentais, como genes de espécies silvestres úteis ao melhoramento genético de espécies cultivadas (Cunha, 1998; Faleiro et al., 2005; Bellon, 2014). Diante do exposto, objetivou-se caracterizar a diversidade genética a partir de 35 acessos de quatro espécies do gênero *Passiflora* – *P. alata*, *P. setacea*, *P. maliformes* e *P. quadrangularis* mantidos em bancos de germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) utilizando marcadores moleculares Análogos a Genes de Resistência.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e extração de DNA

Amostra de folhas referentes quatro espécies de *Passiflora* - *P. alata*, *P. setacea*, *P. maliformes* e *P. quadrangularis* foram obtidas em dois Bancos Ativos de Germoplasma (BAG) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Um destes bancos está localizado no Centro de Pesquisa Agropecuária do Cerrado (CPAC), na Embrapa Cerrados, Brasília, Distrito Federal, e o outro na Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia.

Um total de 55 plantas de 39 acessos foi amostrado. No BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura, o número de plantas por acesso variou de 1 a 6, de acordo a disponibilidade no banco. Na Embrapa Cerrados só foi possível apenas 1 planta para cada acesso, em virtude deste banco ser mantido em clones. Desta forma, foram coletadas folhas de 27 plantas (correspondendo a 16 acessos) de *P. alata*, 12 plantas (7 acessos) de *P. setacea*, 8 plantas (6 acessos) de *P. maliformes* e, 8 plantas (6 acessos) de *P. quadrangularis*.

O DNA genômico foi extraído a partir do protocolo Cetyl trimethylammonium bromide descrito por Doyle & Doyle (1990). As amostras foram quantificadas em eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), e visualizadas em transluminador sob incidência de luz ultravioleta. Para estimar a concentração de DNA (ng/uL) foi adotado como padrão o marcador de peso molecular Lambda (DNA Lambda) (Invitrogen), conforme especificações do fabricante e quantificado as absorbâncias em espectrofotômetro Biodrop. Posteriormente, foram armazenadas e transportadas ao Laboratório de Genética Molecular Aplicada (LGMA) na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus Itapetinga, Bahia.

Reações de amplificação

As combinações de pares de iniciadores que acessa regiões análogas a genes de resistência (RGA) foram pré-selecionadas por Souza (2018). De posse da seleção, utilizou-se treze combinações de marcadores RGA para o presente estudo, alcançando um total de até onze combinações por espécie (Tabela 1).

Tabela 1. Combinações de iniciadores RGA (*Resistance Genes Analog*) selecionadas para uso no gênero *Passiflora*

INICIADORES	SEQUÊNCIA 5' - 3'
S1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG
As1	CAAGGCTAGTGGCAATCC
As1	CAAGGCTAGTGGCAATCC
As3	IAGIGCIAGIGGIAGICC
S2	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC
As1	CAAGGCTAGTGGCAATCC
S1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG
As2	IAAIGCIAGIGGIAAICC
S1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG
NBSr1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACGYCT
NBSf1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC
As2	IAAIGCIAGIGGIAAICC
RGA1f	AGTTTATTATTYSATTGCT
RGA8r	CCGAAGCATAAGTTGGTG
NBSf1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC
NBSr1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACGYCT
As1	CAAGGCTAGTGGCAATCC
As2	IAAIGCIAGIGGIAAICC
RGA1f	AGTTTATTATTYSATTGCT
RGA2r	CACACGGTTTAAAATTCTCA
NBSf1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC
As1	CAAGGCTAGTGGCAATCC

S2	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC
As3	IAGIGCIAGIGGIAGICC
NBSf1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC
As3	IAGIGCIAGIGGIAGICC

Nota: I= A/T/G/C; Y= C/T

As reações de PCR foram realizadas com 4 µL de DNA à 2 ng, 1 µL de cada iniciador, 0,11 µL Taq DNA Polimerase, 1 µL do mix de dNTP, 1 µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 1,7 de Tampão 10X e 6,19 de água milli-Q, totalizando 16 µL para o volume final. Nas reações de amplificação foram adotados para os primers RGA o seguinte programa: desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C; seguido de 34 ciclos (30 segundos a 95°C, 1 minuto a 37°C, 1 minuto e 20 segundos a 72°C); e a extensão final de 10 minutos a 72°C. Todas as amplificações foram realizadas no LGMA da UESB.

Os produtos da amplificação foram visualizados a partir de corrida de eletroforese, em gel de agarose a 2% (m/v) e tampão de corrida TBE 0,5x (Trisborate-EDTA) por 2 horas a 120V. Foi utilizado o marcador de peso molecular Ladder 1Kb plus. As marcas foram visualizadas em transluminador sob incidência de luz ultravioleta e fotodocumentadas em fotodocumentador Kodak.

Genotipagem e estimativa da diversidade genética

Os géis foram analisados e os padrões de bandas obtidos foram considerados para construção de uma tabela de dados binários (0 ; 1). Com base nesta tabela, para cada espécie foi realizada uma análise estatística descritiva para todos os marcadores RGA gerados, calculando-se o percentual de polimorfismo para cada espécie e alelos privados.

A média de heterozigosidade esperada (He) com base no equilíbrio de Hardy-Weinberg e o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) foram calculados usando o programa Genes (Cruz, 2013).

As Análises de Coordenadas Principais (PCoA), Índice de Shannon (H'), A Identidade e distância genética de Nei (1972) e análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) utilizada para a divisão da variância entre seus componentes hierárquicos dentro e entre espécies, foram obtidos com o auxílio do software GenAlEx v. 6.5 (Peakall; Smouse, 2012). A significância foi obtida por meio de 999 permutações ao acaso (Bootstrap).

Foi realizada análises de estimativa da estrutura genética intra e interespecífica adotando o método de inferência Bayesiano (baseado em valores Delta K) implementado no software Structure (Pritchard et al. 2000). Para tal análise, considerou-se K entre 1 e 10, sendo realizadas 10 corridas para cada valor de K, com período de *burnin* igual a 100.000 repetições, considerando a Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) de 1.000.000. A estimativa do número de *pools* gênicos (K) que melhor representam a distribuição da diversidade foi realizada com o auxílio da ferramenta *online* Structure Harvester (Earl; Vonholdt, 2012), utilizando o método proposto por Evanno et al. (2005).

As matrizes de similaridade foram obtidas utilizando o coeficiente de Jaccard (j), gerada pelo programa Genes e foi realizado o método de agrupamento por pares do vizinho mais próximo (UPGMA). A similaridade de Jaccard foi obtida pela fórmula:

$$S_{ij} = \frac{a}{a + b + c},$$

onde *a* é o número de casos em que ocorre a presença de bandas em todos os indivíduos, simultaneamente; *b* é o número de casos em que ocorre a presença de bandas somente no indivíduo *i*, e *c* é o número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo *j*.

RESULTADOS

O número de combinações de primers RGA polimórficos obtido para cada espécie foi variável, tendo sido utilizado 8 combinações para *P. alata*, 10 combinações para *P. maliformes* e 11 combinações para *P. setaceae* e *P. quadrangularis* (Tabela 2). Foi identificado um total de 247 marcadores para as quatro espécies avaliadas, com 64 marcadores para *P. alata* (média de 8 marcadores por combinação de primers RGA), 66 marcadores para *P. setacea* (6 marcadores por combinação), 53 marcadores para *P. maliformes* (5,3 marcadores por combinação) e 64 marcadores para *P. quadrangularis* (5,8 marcadores por combinação) (Tabela 2).

O percentual de bandas polimórficas (valor médio) para as quatro espécies avaliadas variou de 84,4% (*P. quadrangularis*) a 92,5% (*P. maliformes*) (Tabela 2). *P. alata* e *P. setaceae* apresentaram valores médios de polimorfismo de 89,1% e 89,4%, respectivamente. Na análise em conjunto com as quatro espécies, foi possível observar que as combinações de

primers S1 + As1; S2 + As1; RGA1f + RGA2r; NBSf1 + As3 amplificam RGAs apresentando ao menos uma banda polimórfica. Além disso, as combinações S2 + As1 e NBSf1 + As3 destacam-se por apresentarem número de banda geradas iguais ou superiores a 5 por combinação; sendo todos os marcadores gerados 100% polimórficos (Tabela 2).

Na análise das combinações de primers RGAs que geraram marcadores em cada espécie, foi possível observar que das 13 combinações testadas, oito permitiram a geração de marcadores polimórficos em *P. alata*. Para *P. setaceae*, das 11 combinações que amplificaram RGAs, 10 foram polimórficas. Para *P. maliformis*, 10 combinações geraram marcadores sendo nove polimórficos e, para *P. quadrangularis* das 11 combinações que geraram bandas nove foram polimórficas. Considerando as combinações de primers mais informativas para cada espécie como aquelas que geraram ao menos cinco marcadores polimórficos, foi observado cinco combinações para *P. alata*, seis combinações para *P. setaceae* e quatro combinações para *P. maliformis* e *P. quadrangularis* (Tabela 2). Estas combinações são indicadas como prioritárias (considerando o número aqui testado) para detectar polimorfismos nas espécies alvos deste estudo.

A análise descritiva de diversidade foi observada a partir dos resultados de Heterozigozidade esperada (H_e), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) e Índice de Shannon (H'). O valor médio de heterozigozidade esperada (H_e) para as quatro espécies foi de 0,28. Os valores médios de H_e para cada espécie foram: 0,26 para *P. alata*, 0,31 para *P. setaceae*, 0,26 para *P. maliformes*, 0,27 para *P. quadrangularis*. O valor médio do Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) foi de 0,27 para as quatro espécies. Os valores médios de PIC para cada espécie foram: 0,21 para *P. alata*, 0,25 para *P. setacea*, 0,23 para *P. maliformes* e, 0,22 para *P. quadrangularis* (Tabela 3).

O índice de Shannon (H') foi obtido para cada espécie tendo sido observado a seguinte variação: *P. alata* de 0,13 a 0,61; *P. setacea*: 0,34 a 0,66; *P. maliformes* e *P. quadrangularis*: 0,00 a 0,63. O valor médio de Índice de sahnnon (H') foi de 0,44 (Tabela 3).

Tabela 2. Análise de polimorfismo obtida a partir de combinações de primers RGA para genótipos de quatro espécies de *Passiflora*: *P. alata*, *P. setaceae*, *P. maliformis* e *P. quadrangularis*.

Combinação de primers RGA	<i>P. alata</i> Nº de marcas		<i>P. setaceae</i> Nº bandas		<i>P. maliformis</i> Nº bandas		<i>P. quadrangularis</i> Nº bandas	
	Total	Polimórficas (%)	Total	Polimórficas (%)	Total	Polimórficas (%)	Total	Polimórficas (%)
S1 + As1	12	12 (100)*	6	6 (100)*	7	7 (100)*	3	2 (66,7)
As1 + As3	4	1 (25)	4	0	4	4 (100)	4	2 (50)
S2 + As1"	9	9 (100)*	7	7 (100)*	5	5 (100)*	8	8 (100)*
S1 + As2	13	13 (100)*	9	9 (100)*	x	x	9	9 (100)*
S1 + Nbsr1	x	x	4	2 (50)	3	3 (100)	2	2 (100)
Nbsf1 + As2	x	x	4	4 (100)	4	4 (100)	4	0 (0)
RGA1f + RGA8r	x	x	9	9 (100)*	9	9 (100)*	15	15 (100)*
NBSf1 + NBSr1	x	x	X	x	4	0 (0)	4	4 (100)
As1 + As2	x	x	4	4 (100)	x	x	x	x
RGA1f + RGA2r	5	1 (20)	9	9 (100)*	4	4 (100)	3	1 (33,3)
NBSf1 + As1	9	9 (100)*	3	2 (66,7)	4	4 (100)	x	x
S2 + As3	2	2 (100)	X	x	x	x	1	0 (0)
NBSf1 + As3"	10	10 (100)*	7	7 (100)*	9	9 (100)*	11	11 (100)*
Média	x	7,1 (89,1)	X	5,9 (89,4)	x	5,4 (92,5)	x	6 (84,4)
Total	64	x	66	x	53	x	64	x

"combinações mais informativas na análise inter-específica, isto é, que amplificam nas quatro espécies analisadas e que apresentaram ao menos 5 marcadores polimórficos por espécie.

*combinações mais informativas na análise intra-específica, isto é, que apresentaram ao menos 5 bandas polimórficas para cada espécie.

Tabela 3. Análise de diversidade obtida a partir de combinações de primers RGA para genótipos de quatro espécies de *Passiflora*: *P. alata*, *P. setaceae*, *P. maliformis* e *P. quadrangularis*. He *Heterozigosidade esperada*, PIC *Informação de Conteúdo Polimórfico*, H' *índice de Shannon*.

Combinação de primers RGA	<i>P. alata</i>			<i>P. setaceae</i>			<i>P. maliformis</i>			<i>P. quadrangularis</i>		
	He	PIC	H'	He	PIC	H'	He	PIC	H'	He	PIC	H'
S1 + As1	0.21	0.18	0.35	0.31	0.26	0.49	0.31	0.25	0.48	0.33	0.25	0.46
As1 + As3	0.12	0.09	0.16	0.41	0.33	0.60	0.39	0.30	0.57	0.13	0.11	0.21
S2 + As1	0.23	0.19	0.36	0.27	0.23	0.43	0.31	0.26	0.48	0.44	0.34	0.63
S1 + As2	0.33	0.26	0.49	0.20	0.17	0.34	x	x	x	0.29	0.24	0.46
S1 + Nbsr1	x	x	x	0.44	0.34	0.63	0.37	0.30	0.56	0.29	0.23	0.44
Nbsf1 + As2	x	x	x	0.38	0.30	0.56	0.33	0.28	0.51	0.00	0.00	0.00
RGA1f + RGA8r	x	x	x	0.21	0.18	0.34	0.21	0.18	0.35	0.39	0.31	0.58
NBSf1 + NBSr1	x	x	x	x	x	x	0.00	0.00	0.00	0.29	0.24	0.45
As1 + As2	x	x	x	0.28	0.24	0.45	x	x	x	x	x	x
RGA1f + RGA2r	0.09	0.07	0.13	0.30	0.24	0.46	0.44	0.34	0.63	0.11	0.09	0.17
NBSf1 + As1	0.24	0.20	0.39	0.46	0.36	0.66	0.40	0.32	0.59	x	x	x
S2 + As3	0.42	0.33	0.61	x	x	x	x	x	x	0.00	0.00	0.00
NBSf1 + As3	0.40	0.32	0.58	0.46	0.35	0.65	0.40	0.32	0.43	0.18	0.15	0.31
Média	0.26	0.21	0.40	0.31	0.25	0.48	0.26	0.23	0.45	0.27	0.22	0.42

A análise conjunta de diversidade e estrutura genética considerando os 55 genótipos dos 39 acessos das quatro espécies de *Passiflora* (*P. alata*, *P. setacea*, *P. maliformes* e *P. quadrangulares*) estão apresentadas na Figura 1. Considerando a análise Baeynsiana, foi possível observar 2 *pools* gênicos (K=2) como a estrutura genética mais provável (Figura 1A). Neste sentido, um dos *pools* gênicos foi representado exclusivamente por genótipos de *P. alata*, ao passo que o outro pool incluiu as três espécies silvestres (*P. setacea*, *P. maliformes* e *P. quadrangularis*) (Figura 1B). A análise PCoA permitiu uma ampla distribuição dos genótipos. *P. alata* foi disposto em dois grupos separando-os por origens de BAGs em que foram coletados. *P. setacea* também se encontra em dois grupos relacionados a origem de BAG, e um genótipo se aproxima de *P. quadrangularis*. Os grupos *P. maliformes* e *P. quadrangularis* são mais restritos no PCoA. O gráfico indica que *P. maliformes* e *P. alata* podem estar mais relacionadas geneticamente. Os três primeiros eixos explicaram 60,9% da variação total das variáveis genéticas em *Passiflora* spp. O primeiro eixo explicou 25,34%, o segundo eixo 20,49%, e o terceiro eixo 15,10% da variância total das variáveis.

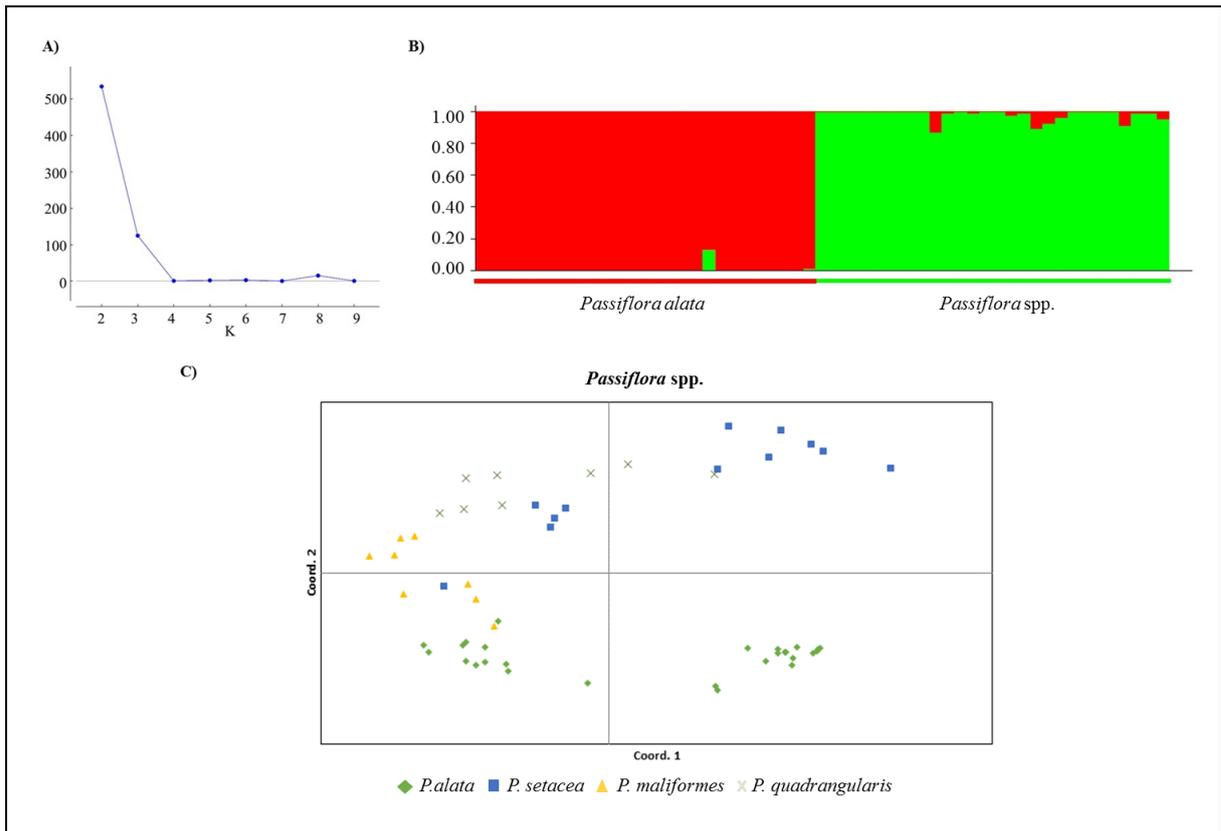


Figura 1. Análise de estrutura e diversidade genética obtidas a partir de regiões análogas a genes de resistência para as espécies de *Passiflora* - *P. alata*, *P. setaceae*, *P. maliformis* e *P. quadrangularis* presentes em Bancos de Germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Mandioca e Fruticultura e Cerrados. A) Número mais provável de pools gênicos em *Passiflora* sp. (K); B) Histograma (baseado nos valores de Delta K) representando a estruturação interespecífica dos prováveis pools gênicos em *Passiflora* sp, separando *P. alata*, espécie comercial, das outras três espécies, consideradas como silvestres; C) Análise de coordenadas principais (PCoA).

No âmbito da diversidade genética entre espécies, os valores médios dos coeficientes de identidade genética (I) e de distância genética (D) foram 0,78 e 0,25, respectivamente. O maior valor de I (0,81) e o menor de D (0,21) foi entre *P. setacea* e *P. quadrangularis*. Os grupos que mais se divergem geneticamente são *P. alata* e *P. quadrangularis*, com I igual a 0,33 e D igual a 0,72 (Tabela 4). Os grupos que apresentam menor distância genética são observados com menor valor de D, como em *P. quadrangulares* e *P. setacea* (D = 0,21).

Tabela 4. Matriz de distância genética de Nei (1972) (abaixo da linha diagonal) e identidade genética (acima da linha diagonal) referente a análise com marcadores RGA entre genótipos de quatro espécies de *Passiflora* provenientes de Bancos Ativos de Germoplasma.

	Pa	Ps	Pm	Pq
Pa		0.784	0.802	0.716
Ps	0.243		0.802	0.808
Pm	0.220	0.221		0.756
Pq	0.334	0.213	0.280	

Nota: **Pa** *P. alata*, **Ps** *P. setacea*, **Pm** *P. maliformes*, **Pq** *P. quadrangularis*

A análise de agrupamento UPGMA realizada com base nas distâncias genéticas considerando a análise interespecífica, permitiu dividir os 55 acessos de *Passiflora* sp. em 7 grupos de similaridade genética, a qual houve maior distinção dos genótipos. O coeficiente de similaridade variou de 0,11 a 0,82 (Figura 2). O primeiro grupo foi formado por acessos de *P. alata* de origem do banco de germoplasma Embrapa Cerrados. O segundo grupo reuniu um acesso de *P. maliformes* da Embrapa Mandioca e Fruticultura e acessos de *P. quadrangulares* da Embrapa Cerrados e Embrapa Mandioca e Fruticultura. O terceiro grupo é formado por acessos de *P. setacea* pertencentes aos dois BAGs. O quarto agruparam acessos de *P. alata* da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Acessos de *P. setacea* da Embrapa Cerrados formaram o quinto agrupamento. O sexto grupo foi composto por dois acessos de *P. quadrangulares* da Embrapa Cerrados. Cinco acessos de *P. maliformes* provenientes Embrapa Cerrados formaram o sétimo grupo. Um genótipo de *P. setacea* não foi agrupado com os demais, possivelmente por ser um indivíduo caracterizado como mistura como inferiu-se na análise Bayesiana, se distanciando geneticamente.

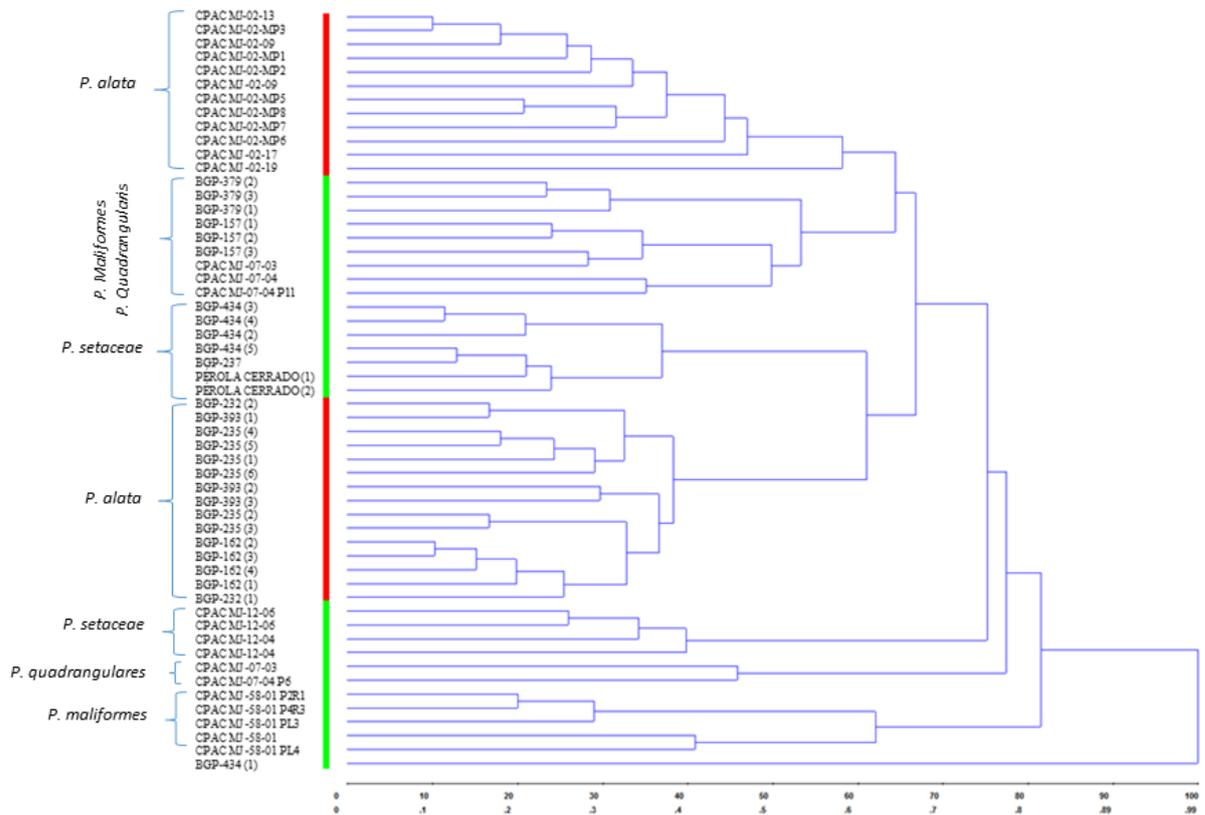


Figura 2. Análise de agrupamento de interespecífico do gênero *Passiflora* obtidos pelo UPGMA com o Coeficiente de Similaridade de Jaccar. As cores das linhas correspondem àquelas utilizadas para representar os pools gênicos predominantes no histograma obtido.

Considerando a análise Bayesiana (baseado nos valores de Delta K) intraespecífica para cada uma das quatro espécies analisadas (Figura 3), observou-se uma possível estruturação principal em dois *pools* gênicos ($K=2$) para *P. alata*, *P. setaceae*, *P. maliformes* e *P. quadrangularis*. É interessante notar que para todas as quatro espécies a distribuição dos acessos em dois grupos corresponde aos BAGs onde foram coletados, isto é, Embrapa Mandioca e Fruticultura, cujo os genótipos estão representados pela cor vermelha nos histogramas e Embrapa Cerrados representados pela cor verde (Figura 3).

Também foi empregado o coeficiente de associação (q) utilizados como critério para classificação dos indivíduos nos *pools* gênicos, sendo considerado como mistura (i.e., indivíduo de *pool* gênico indefinido) os indivíduos com valores de $q \leq 0,60$ para um dos *pools* gênicos estimados. Para *P. alata* foi possível observar que dos 27 genótipos analisados, um foi considerado de mistura, uma vez que não obteve um valor de adesão ($q \geq 0,7$) para um único grupo (Figura 3A). Em *P. setacea*, embora observado clara separação entre os genótipos oriundos de cada BAG, um dos genótipos (BGP-434) coletado na embrapa

Mandioca e Fruticultura apresentou alta identidade (q) com o BAG Embrapa Cerrados indicando origem genética comum aos genótipos deste BAG (Figura 3B). De forma semelhante, observando os genótipos de *P. quadrangularis*, um genótipo (CPAC MJ -07-03) coletado na Embrapa Cerrados, apresentou cerca de 80% de identidade (q) para o grupo MFT (Figura 3D). *P. maliformes* não apresentou genótipos que representem misturas entre *pools* gênicos tendo-se observado a distinção dos grupos de acordo com o BAG (Mandioca e Fruticultura ou Cerrados) (Figura 3C).

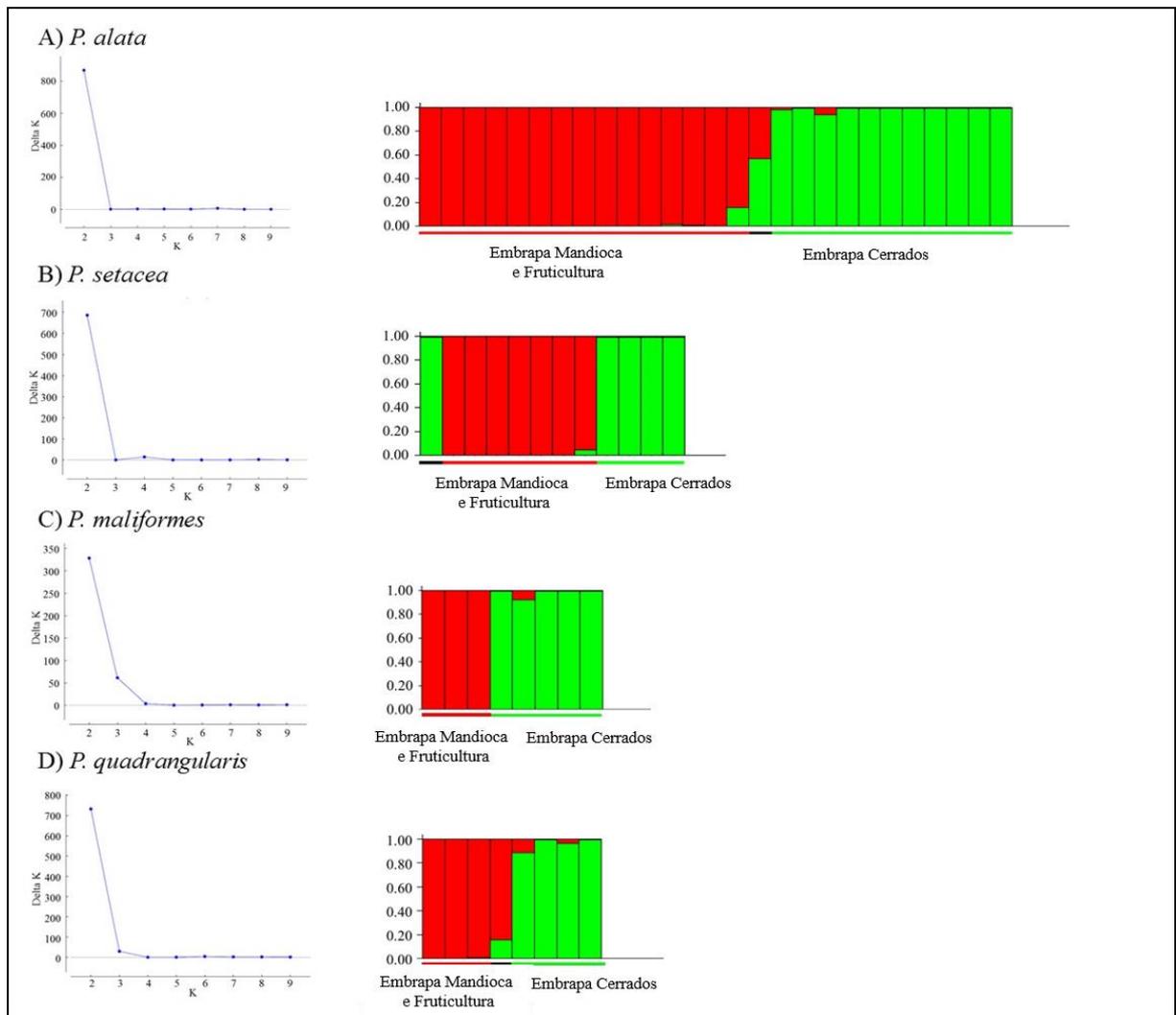


Figura 3. Número mais provável de *pools* gênicos (K) e Histogramas (baseado nos valores de Delta K) gerados a partir de análise de regiões análogas a genes de resistência, representando a distribuição dos prováveis *pools* gênicos em quatro espécies de *Passiflora* presentes em Bancos de Germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Mandioca e Fruticultura e Cerrados. A) *P. alata*, B) *P. setaceae*, C) *P. maliformes* e D) *P. quadrangularis*.

A análise PCoA para cada espécie individual, corroboram a hipótese de estruturação Bayesiana considerando uma correspondência com a distribuição dos genótipos. Na Figura 4, é apresentado os agrupamentos dos indivíduos delimitados por retângulos cuja cor correspondente aos *pools* gênicos no histograma Structure (Figura 3). Esses resultados estão de acordo com as origens de coletas de BAGs. Os genótipos em *P. alata* estão mais dispersos na Mandioca e Fruticultura, e os da Cerrados se encontram bem próximos, embora, é possível ver dois mais afastados dos demais, indicando a formação de subgrupo. Em *P. setaceae*, os genótipos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, embora mais disperso, parece estar subdividido em dois grupos, e um genótipo da Cerrados se encontra mais distante dos grupos. A separação dos genótipos da Embrapa Mandioca e Fruticultura e Cerrados é nítida em *P. maliformes*. Em *P. quadrangularis*, os genótipos da Embrapa Cerrados estão mais dispersos, entretanto, um se encontra mais próximo dos genótipos Mandioca e Fruticultura. Essa aproximação indica que este pode estar relacionado geneticamente com os indivíduos deste grupo. Esses dados correspondem aos *pools* indicados no histograma representado pelos BAGs e ao dendograma obtido por meio do método de agrupamentos hierárquicos UPGMA (Figura 5).

Quanto a variação total das variáveis genéticas no PCoA, em *P. alata*, os três primeiros eixos obtiveram 75,99%, sendo: eixo 1: 57,39%, eixo 2: 10,77% e eixo 3: 7,83%. Em *P. setacea*, os dois primeiros eixos explicaram 88,64% da variância total que foi 92,81%, o eixo 1 contribuiu com 69,81%, o eixo 2 com 18,83% e eixo 3 com 4,17%. Em *P. maliformes*, a variação detectada pelo valor *eigen* foi para o eixo 1: 79,50%, eixo 2: 10,44% e eixo 3: 8,02%. Em *P. quadrangularis*, a variância total foi de 89,06%, sendo eixo 1: 63,42%, eixo 2: 17,30% e eixo 3: 8,34%.

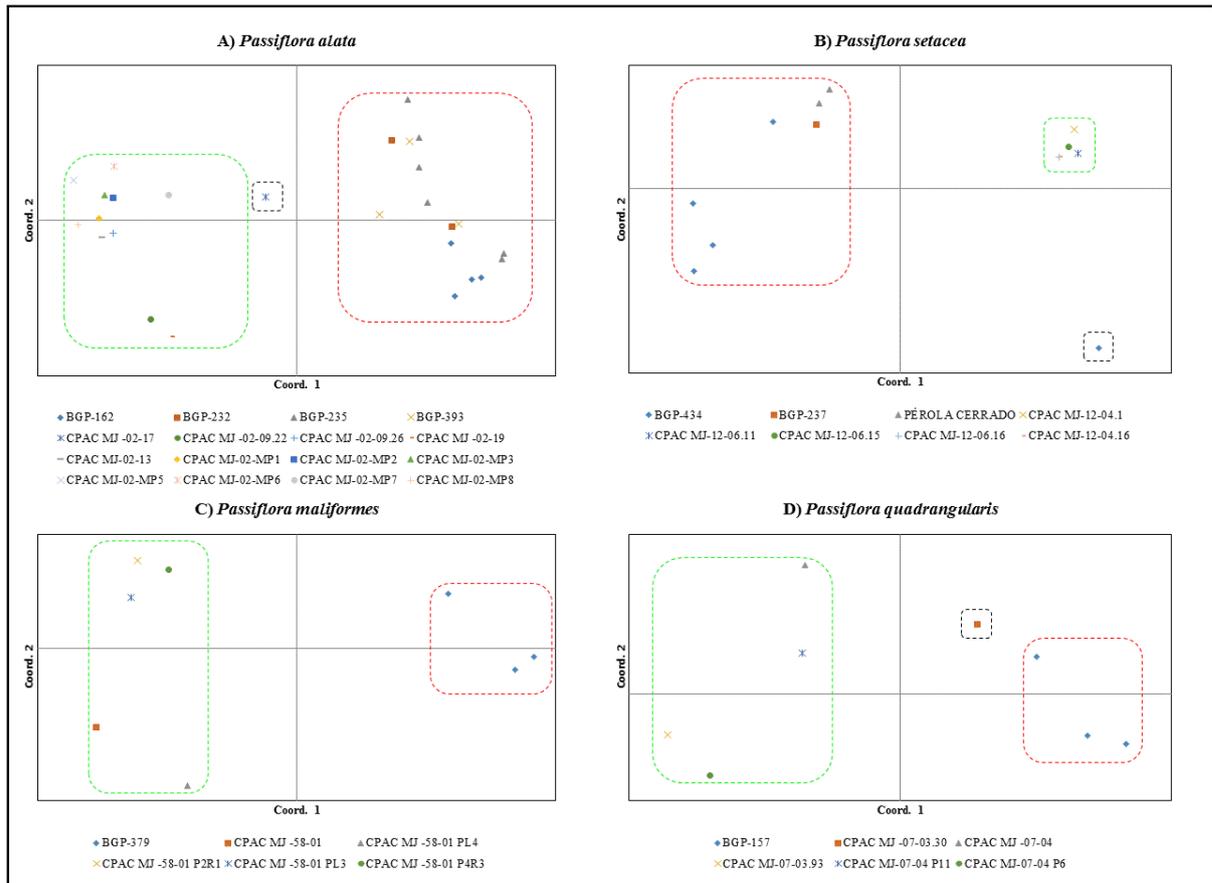


Figura 4. Análise de coordenadas principais (PCoA), gerados a partir de análise de regiões análogas a genes de resistência para espécies de *Passiflora* spp. obtidas em de Bancos de Germoplasma da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura e Cerrados. A) *P. alata*, B) *P. setacea*, C) *P. maliformes* e D) *P. quadrangularis*. As cores das linhas tracejadas correspondem ao banco onde os genótipos foram obtidos; vermelho = Embrapa Mandioca e Fruticultura, verde = Embrapa Cerrados.

Assim como observado nos resultados do STRUCTURE e PCoA (Figuras 3 e 4, respectivamente), análises dos dendogramas gerados com base nas distâncias genéticas para cada espécie permitiu a identificação de dois grupos principais formados de acordo com o BAG onde o genótipo foi amostrado, isto é, Mandioca e Fruticultura e Cerrados (Figura 5). As maiores distâncias genéticas foram observadas em *P. setacea* (variando de 0 – 0.99) (Figura 5B) e as menores distâncias foram em *P. quadrangularis* (variando de 0 – 0.63) (Figura 5D).

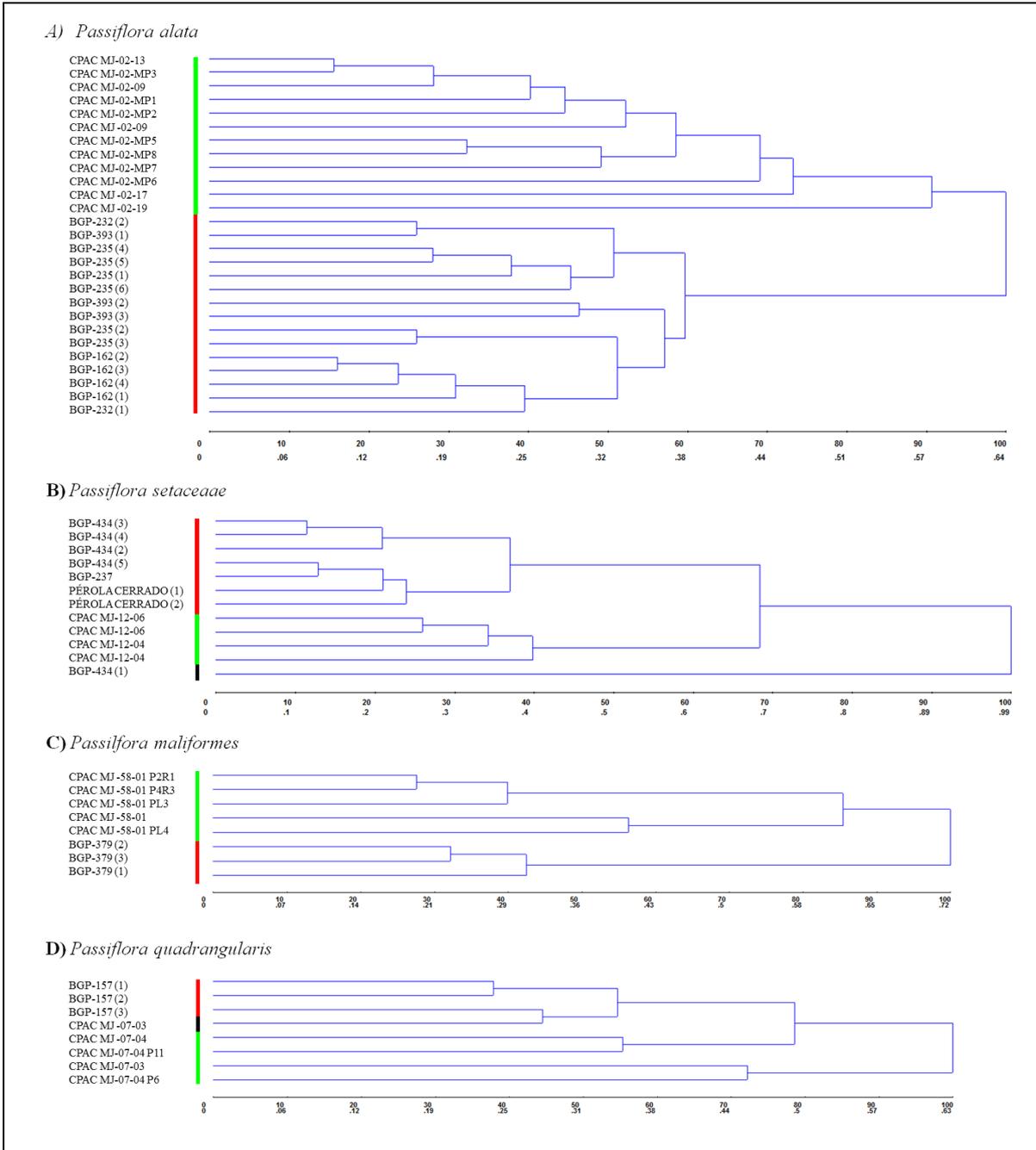


Figura 5. Análise de agrupamentos para quatro espécies do gênero *Passiflora* obtidos a partir de regiões análogas a genes de resistência pelo método UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) e Coeficiente de Similaridade de Jaccard. As cores das linhas laterais esquerda correspondem aos Bancos de Germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Mandioca e Fruticultura (representado pela cor vermelha) e Cerrados (cor verde) onde os genótipos foram amostrados. A) *P. alata*, B) *P. setacea*, C) *P. maliformes* e D) *P. quadrangularis*.

O estudo da estrutura genética entre e dentro dos acessos de *Passiflora spp.* obtido pela Análise de Variância Molecular (AMOVA F_{ST}), constatou-se maior diversidade dentro dos acessos, com 67% ($p < 0,01$) e entre acessos obteve 33% ($p < 0,01$) (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) em acessos de *Passiflora spp.* provenientes de Bancos de Germoplasma da Embrapa.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Est. Var.	% variância
Entre acessos	3	233.941	77.980	5.467	33%
Dentro acessos	51	557.005	10.922	10.922	67%
Total	54	790.945		16.388	100%

Grau de Liberdade (GL), Soma dos Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Componentes da variância (Est. Var.), Variância total (%).

O estudo dos alelos privados indicou a sua presença em *P. setaceae* e *P. maliformes* para os BAGs Mandioca e Fruticultura e Cerrados. Sendo que, em *P. setaceae*, foi somente um alelo exclusivo (1,5%) na Mandioca e Fruticultura. Em *P. maliformes* foram dois alelos no Mandioca e Fruticultura (3,8%) e um alelo na Cerrados (1,9%) (Figura 6).

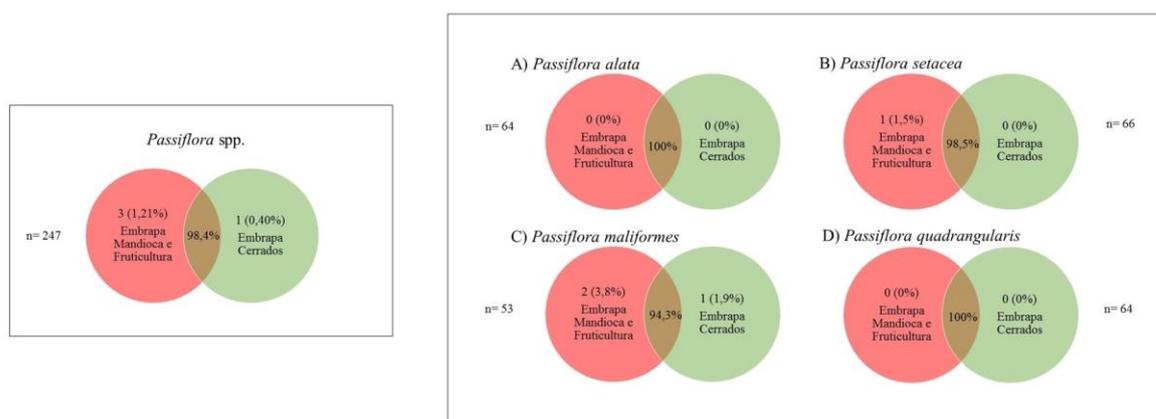


Figura 6. Diagramas de Ven ilustrando a distribuição de alelos privados entre os bancos de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura e Cerrados, para *Passiflora spp.* em geral a esquerda e por espécie a direita. N= número total de alelos.

DISCUSSÃO

A elevada percentagem de marcas polimórficas demonstrou a alta variabilidade genética existente na maioria dos genótipos de *Passiflora* spp. avaliados nesse estudo. A avaliação da amplificação de *primers* RGA já descritos na literatura constitui em uma boa ferramenta para estudos genéticos moleculares aplicados aos maracujazeiros (Paula, 2006; Paula, 2009; Pereira, 2012; Pereira, 2012b; e Souza, 2018).

Paula (2006) também encontrou um elevado grau de polimorfismo, aproximadamente 97% com marcadores RGAs para espécies do gênero *Passiflora*. Paula et. al. (2010) avaliaram os marcadores RGA como eficiente ferramenta para acessar polimorfismo em espécies de *Passiflora* silvestres. Estes autores, mediante uso de seis combinações de *primers* RGA encontraram grande variedade entre as 8 espécies de maracujazeiros estudadas.

Os resultados de Souza et. al. (2018) também relataram grande diversidade genética nas espécies do gênero *Passiflora* avaliadas por meio de 17 pares de iniciadores RGA, possuindo majoritariamente, marcadores moleculares 100% polimórficos. Em estudo feito por Pereira, et. al. (2012b) a partir de quatro combinações de *primers* RGA em populações nativas de *P. setacea* no Sudoeste do Estado da Bahia, para os 259 indivíduos, 100% foram polimórficos.

Pereira (2012) utilizou *primers* ISSR e RGA em acessos de *P. edulis*, para os *primers* ISSR, dos 10 iniciadores avaliados, 50% amplificaram, perfazendo 93,8% de polimorfismo. Para os *primers* RGAs, 85% dos *primers* testados amplificaram. O autor relata que ambos os marcadores foram satisfatórios, apresentando potencial para estudos intraespecíficos com maracujazeiro ‘amarelo’, por possibilitarem o acesso a quantidades satisfatórias de regiões genômicas. A elevada percentagem de locos polimórficos parece ser um padrão entre espécies do gênero *Passiflora*, e, é um indicativo importante para a diversidade genética.

Quanto à heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e), valores mais elevados de H_e sugerem uma ampla variabilidade genética no gênero *Passiflora* (Paiva et al., 2014). O valor de H_e variou de 0.00 a 0.46 nas espécies analisadas. Também foi evidenciado que o valor de H_e quando a análise intraespecífica, chegou a ter valores de zero para alguns loci analisados, evidenciando baixa variabilidade genética. O PIC informa o quanto cada *primer* foi informativo entre os acessos (Paiva et al., 2014), e também é utilizado para verificar a qualidade do *primer* que é estudado. O valor H_e e PIC ($> 0,5$) evidencia que o marcador é altamente informativo; valores entre 0,25 e 0,50 são considerados razoavelmente

informativo (Botstein et al., 1980). No estudo aqui amostrado, o valor médio de PIC variou de 0,21 a 0,25 para as espécies, entretanto alguns marcadores foram mais informativos, apresentando o valor de PIC até 0,36. O baixo valor de PIC pode estar relacionado com a concentração da frequência alélica, isso ocorre quando todos os alelos não apresentam frequência semelhantes ou não apresentam distribuição alélica igual (Paiva et al., 2014). Em *P. alata*, a combinação de marcadores mais informativos foram S2 + As3 (0,33); Em *P. setaceae* foram NBSf1 + As1 (0,36); Em *P. malifomes* foram RGA1f + RGA2r (0,34) e em *P. quadrangularis* foi S2 + As1 (0,34).

Em estudos utilizando marcadores SSR em *Passiflora*, Bernardes (2018) verificou valores de PIC variando de levemente a altamente informativo (0,00 - 1,00). Entretanto, observou que principalmente no subgênero *Astrophea* e entre as populações das espécies de *P. alata*, *P. amethystina*, *P. kermsina*, *P. porophylla* e *P. speciosa* os valores de PIC foram relativamente baixos. Paiva et al. (2014) verificaram marcadores SSR que variaram de razoavelmente (0,28 – 0,31) a altamente (0,62 – 0,64) informativo em diferentes espécies de *Passiflora*. Os valores de PIC também estão relacionados com o tamanho da população utilizada, ou seja, o polimorfismo do loco não foi explorado inteiramente devido à baixa quantidade de indivíduos em uma população. Desse modo pode ocorrer a subestimação do valor de PIC (Silva, 2010), isso justifica os baixos valores de PIC observados nas espécies *P. malifomes* e *P. quadrangularis* observados, podendo chegar a 0.00.

O Índice de Shannon (H') caracterizado neste estudo avaliando dentro das espécies, pode se obter valores considerados levemente e altamente informativos de diversidade genética. Entretanto, o valor médio entre as espécies foram entre 0,40 a 0,48, caracterizado como valores moderados, pois estão abaixo de 0,5 (Botstein et al., 1980). O número de genótipos avaliados também pode estar influenciando nos valores deste índice. Em outros estudos com passifloras, esse índice, apresentou-se valores médio com marcadores SSR: 0,49 e 0,66 (Reis, et. al., 2011) e 0,49 (Barbosa, 2016); 0,51 e 0,34 com marcadores ISSR e RGA, respectivamente (Pereira, 2015). Todavia, Melo Júnior et al. (2012) reportaram que os índices de diversidade genética podem variar de acordo com a espécie e o marcador molecular.

Foram identificados 4 alelos privados, correspondente a 1,61% do número total de alelos distribuídos entre os genótipos das quatro espécies analisadas. A diferença observada entre os BAGs, sendo 3 alelos (1,21%) na Mandioca e Fruticultura e 1 alelo (0,40%) na Cerrados, reflete sobre o número de plantas por acesso. Nos acessos da Mandioca e Fruticultura isso pode ser um indicativo de maior variabilidade dentro do acesso, em virtude

do método de manutenção do BAG, onde os acessos são provenientes de campos abertos e casas de vegetação, contrário ao BAG da Cerrados, onde as plantas são clones, mantidas por estaquia. É sabido que os alelos privados em populações silvestres são originados do isolamento natural ou reprodutivo, portanto, esses são importantes para definir a identidade genética de cada genótipo, e podem ser utilizados para a determinação do relacionamento genético entre os mesmos (Brondani, et. al., 2004).

Na análise PCoA interespecífica dos 55 acessos de *Passiflora* spp., a variância acumulada explicada pelos três primeiros eixos foi satisfatória com autovalor 60,92% da variância total. Na análise intraespecífica, a maior porcentagem acumulada satisfatória dos três primeiros eixos foi obtida por *P. maliformes*, com 97,97% da variabilidade total dos genótipos, e a menor foi em *P. alata* com 75,99%. Partindo do princípio de que a importância ou variância dos componentes principais decresce do primeiro para o último, têm-se que os últimos componentes explicam uma fração muito pequena da variância total (Cruz et al., 2014). Pode-se verificar que a variância acumulada demonstrou distribuição concentrada nos três primeiros componentes, podendo-se constatar que foi possível acumular uma porcentagem satisfatória da variabilidade total dos genótipos.

As análises combinadas do PCoA, histograma e agrupamento UPGMA intraespecífica se complementaram e permitiram uma análise eficaz quanto a diversidade e estrutura dentro dos acessos. A variabilidade e diversidade genética no gênero está relacionada à alogamia, bem como a sua autoincompatibilidade (Pérez-Almeida et al., 2010). Entretanto, sistema de reprodução, dispersão das sementes, deriva genética, evolução e forma de vida são fatores que influenciam a diversidade genética (Bernardes, 2018). Por meio dessas análises, foi possível distinguir claramente os acessos por BAGs. Esse fato chama atenção no que se refere à variabilidade alélica armazenada por cada um dos bancos, que são características com elevada distinção genética. A caracterização dos BAGs é essencial para se conhecer os acessos conservados, pois, é por meio desta que pode se inserir efetivamente esses acessos nos programas de melhoramento genético (Costa et al., 2011).

No agrupamento UPGMA interespecífica, verificou-se que houve uma estruturação em relação à similaridade entre acessos de mesmo BAG, e em alguns casos a proximidade dos BAGs devido à presença de espécie em comum, exceto para o acesso BGP 434 (1), indivíduo com alta divergência genética, proveniente da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Quanto às análises de agrupamento PCoA e inferência Bayesiana entre as espécies, os acessos comerciais representados por *P. alata* foram agrupados distinto das demais espécies

do gênero *Passiflora*. Essa observação, corrobora o observado por Faleiro *et. al.*, 2004 e Bellon, *et. al.*, 2007, esse fato pode estar relacionado às propriedades definidas pelo mercado, em que as espécies comerciais seguem padrões de seleção em programas de melhoramento, sobretudo quanto ao tamanho e uniformidade de frutos, as quais não são típicas dos acessos silvestres. Esses resultados refletem a importância da introdução de espécies silvestres em programas de melhoramento à ampliação da variabilidade genética em Bancos de Germoplasma, visto que estas podem conter genes de resistência a doenças, e características agrônômicas de interesse não encontradas no maracujazeiro cultivado (Faleiro *et al.*, 2004; Junqueira *et. al.*, 2005).

Levando em conta que na AMOVA, estimativas com valor de ($p < 0,01$), são consideradas indicadores de alta estruturação populacional (Matioli, 2001), a maior diversidade genética foi encontrada dentro das populações (Tabela 5). Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos com maracujazeiros (Loss *et al.*, 2006; Pereira, 2012b; Barbosa, 2016). A alta variabilidade genética intra-específica em relação à interespecífica pode ser resultado da reprodução sexual, mutação de células somáticas, seleção, fluxo gênico, deriva genética, alterações ambientais (Gao; Iang, 2006; Meira *et. al.*, 2019).

Os Bancos de Germoplasma da Embrapa Mandioca Fruticultura e Cerrados abrange uma gama diversidade de acessos. O intuito foi explorar o máximo de genótipos disponíveis das espécies aqui amostrado. O número de plantas apontados neste estudo teve o propósito de caracterizar a maior diversidade dos acessos, na Embrapa Mandioca e Fruticultura onde cada planta do acesso representa um genótipo diferente (BAG mantido por germinação de sementes), e na Embrapa Cerrados, os acessos são mantidos em clones, isto é, cada acesso, uma planta, conta com o maior número de acessos de *Passiflora* spp em relação à Mandioca e Fruticultura neste estudo.

A maior exploração dos acessos foi da Embrapa Mandioca e Fruticultura, reflexo do maior número de exemplares cultivados. Embora a manutenção dessas coleções seja feita de formas diferentes, ambas são essenciais em salvaguardar informações acerca dos acessos silvestres, comerciais e cultivares. Vale ressaltar que os BAGs enfrentam dificuldade de manutenção, sobretudo no controle de patógenos. Visto isso, é importante que os BAGs busquem enriquecer o acervo de recursos genéticos de *Passiflora*.

Por fim, programas de pré-melhoramento de maracujazeiros é primordial para a conservação de espécies de *Passiflora* silvestres. Esse fato destaca a importância de caracterizar a diversidade genética das espécies, bem como construir mais BAGs e dar

manutenção aos bancos ativos de germoplasma existente, uma vez que bancos de germoplasma bem caracterizado e com boa quantidade de acessos é fundamental para o avanço dos programas de melhoramento, já que hibridações intraespecíficas e interespecíficas são indispensáveis para essa finalidade (Cerqueira-Silva, 2014).

CONCLUSÃO

Os primers RGAs utilizados para caracterização de *P. alata*, *P. setacea*, *P. maliformes* e *P. quadrangularis* permitiram diferenciar os grupos nas espécies e separar de forma clara os acessos mais próximos, evidenciando regiões do DNA que são conservadas em cada espécie.

Os Bancos de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura e Cerrados são bem representativos em termo de diversidade para o gênero, apresentando espécies silvestres, comerciais e cultivares de *Passiflora*. Os BAGs guardam informações diferentes das espécies analisadas, o que é interessante para maior exploração da diversidade das espécies.

Os parâmetros de diversidade genética estimados indicam elevada diversidade genética nas espécies do gênero *Passiflora*, sobretudo dentro das espécies. As informações geradas podem ser úteis para subsidiar futuros estudos de conservação e melhoramento genético.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e ao programa de pós-graduação em Ciências Ambientais (PPGCA) pela concessão da bolsa de estudo.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, N. C. S. **Anatomia foliar e diversidade genética em *Passiflora* spp. (*Passifloraceae* L.) resistentes ao Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)**. Programa de Mestrado (Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade). Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA, 2016

BELLON, G., FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, K. P., JUNQUEIRA, N. T. V., et al. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Rev. Bras. Frutic.** 29: 124-127, 2007

BELLON, G. **Filogenia, variabilidade genética e caracterização de Passifloras silvestres, comerciais e híbridos interespecíficos como fontes de resistência à doenças.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, 151 p. Tese de Doutorado.

BERNARDES, P. M. **Caracterização agrônômica, molecular e fitoquímica de espécies do gênero *Passiflora*.** Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e engenharias. Alegre – ES, 2018

BOTSTEIN D; WHITE RL; SKOLMICK H. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics** 32: 314-331

BRONDANI, C., BRONDANI, R. P. V. BORBA, T. C. O., BRUNES, T., RANGEL, H. N., GUIMARÃES, E. P. Utilização de Marcadores Microssatélites no Melhoramento Populacional do Arroz. Santo Antônio de Goiás, GO: **Embrapa arroz e feijão**, Documentos 169, 2004. P. 19

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

CORDOVA, K. R. V.; GAMA, T. M. M. T. B.; WINTER, C. M. G.; KASKANTZIS NETO, G.; FREITAS, R. J. S. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa Degener) obtida por secagem. **Boletim do CEPPA**. Curitiba, v. 23, n. 2, p. 221-230, jan./jun. 2005

COSTA, T. S., SILVA, A. V. C., LÉDO, A. S., SANTOS, A. R. F., SILVA JÚNIOR, J. F. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.46, n.5, p.499-508, maio 2011.

CRUZ, C.D. **Programa genes:** aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2013.

CRUZ, C.D., CARNEIRO, P.C.S., REGAZZI, A.J. (2014) **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** v.2, 3ª. ed. Viçosa: UFV, 668p.

CRUZ, C.D., CARNEIRO, P.C.S., REGAZZI, A.J. (2014) **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** v.2, 3ª. ed. Viçosa: UFV, 668p.

CUNHA, M.A.P. da. **Prioridades de pesquisa por subárea e objetivo.** Cruz das Almas-BA: EMBRAPA/ CNPMF, 1998. p.11-14 (Documentos, 77)

DOYLE, J.J. & J.L. DOYLE. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12: 13-15.

EARL DA AND VONHOLDT BM. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conserv Genet Resour** 4:359-361, 2012.

EVANNO G, REGNAUT S AND GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. **Mol Ecol** 14:2611-2620, 2005

EXCOFFIER, L., P. E. SMOUSE., J. M. QUATTRO. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131(2): 479-491, 1992

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. (Ed.). **Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa. 2016. p. 235-246 (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – desafios da pesquisa In: Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Braga, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2005

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BELLON, G.; BORGES, T.A.; ANJOS, J.R.N.; PEIXOTO, J.R.; BRAGA, M.F.; SANTOS, D.G. Diversidade genética de espécies silvestres de maracujazeiro com resistência a múltiplas doenças com base em marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, supl, p. S325, 2004.

FERREIRA, M. E.; FALEIRO, F. G. Biotecnologia: avanços e aplicações no melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L. **Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 765-792.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

GAO, L.; YANG, B. 2006. Genetic diversity of wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) populations from Hubei based on ISSR analysis. *Biodiversity Science*, vol. 3, p. 250–257.

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, p.774-784, 1999.

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

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

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

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

MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. 1ª edição. Ribeirão Preto: Holos. 2001

MEIRA, M. R. **Ecogeografia e diversidades genética e química de *Lippia aff. rotundifolia* Cham.** Universidade Federal de Lavras. Lavras - MG, 2016.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, volume especial, 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. (Org.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: EMBRAPA CERRADOS, 2005. v. 1, p. 55-78

MELO JUNIOR, A. F. et al. Spatial genetic structure in natural populations of *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) in the North of Minas Gerais, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 43, p. 205-209, Aug. 2012.

NASCIMENTO, A. V. S.; SANTANA, E. N.; BRAZ, A. S. K.; ALFENAS, P. F.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P.; CARVALHO, M. G. de; ZERBINI, F. M. *Cowpea aphid-bourme mosaic virus* (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Archives of Virology**, New York, v. 151, p. 1797-1809, 2006

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônômico. P. 143-148. In: F.G, FALEIRO; N. T. V. JUNQUEIRA; M. F. Braga Ed. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 677p, 2005

PAIVA, C. L.; VIANA, A. P.; SANTOS, A. E.; FREITAS, J. C. DE O.; SILVA, R. N. O.; OLIVEIRA, E. J. DE. Genetic variability assessment in the genus *Passiflora* by SSR markers. **Chilean Journal Of Agricultural Research**, v. 74, n. 3, p355-360, 2014.

PAULA, M. N. et al. Caracterização genética de espécies de passiflora por marcadores moleculares análogos a genes de resistência. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 32, n. 1, p. 222-229, 2009.

PAULA, M. S. **Diversidade genética e reação de *Passiflora* spp. A *Meloidogyne incognita* e a *Meloidogyne javanica***. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. 2006

PEAKALL, ROD; E SMOUSE, PETER. (2012). GenAIEx V5: Genetic Analysis in Excel. Populations Genetic Software for Teaching and Research. **Bioinformatics** (Oxford, England). 28. 2537-9. 10.1093/bioinformatics/bts460.

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**, **59**: 12-21, 2015

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

PEREIRA, A. S. **Genética e pós-melhoramento em cultivares de maracujazeiro ‘amarelo’: variabilidade acessada por ferramentas biométricas e moleculares**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus-BA, 2012a.

PEREIRA, D. A. **Conservação e pré-melhoramento de maracujazeiro ‘do-sono’ (*passiflora setacea* dc): prospecção ecogeográfica, diversidade e estruturação genéticas baseadas em *locus* moleculares e repetibilidade de caracteres dos frutos**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Jequié-BA, 2012b

PÉREZ-ALMEIDA, I.; VÁSQUEZ GARCÍA, S.; PÉREZ, D.; SALAZAR, E. Genetic diversity in six species of *Passiflora* spp. using RAPD introducción. **Revista Facultad Agronómica**, v. 27, p. 347-359, 2010.

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

REIS R. V., OLIVEIRA E. J., VIANA A. P., PEREIRA T. N. S., PEREIRA, M. G., SILVA, M. G. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro-amarelo detectada por marcadores microssatélites. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.46, n.1, p.51-57, 2011

SILVA, M. A. A. **Caracterização molecular por microssatélites de passifloras Silvestres do BAG – UESC, Ilhéus – Bahia / . – BA: UESC 2010**. xi, 84 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

SOUZA, L. N. B. **Caracterização genética em acessos de *Passiflora* spp. com base em marcadores moleculares**. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga – BA, 2018

STASKAWICZ, B.J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B.J.; ELLIS, J.G. & JONES, J.D. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science** 268:661–667.

TULLU, A.; TAR'AN, B.; BREITKREUTZ, C.; BUCHWALDT, L.; BANNIZA, S.; WARKENTIN, T.D. & 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, p.588-595.2006.

VIEIRA, M. L. C.; OLIVEIRA, E. J.; MATTA, F. P.; PÁDUA, J. G.; MONTEIRO, M. Métodos biotecnológicos aplicados ao melhoramento genético do maracujá. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 411-453.