UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE CULTIVARES E POPULAÇÕES DE MARACUJAZEIRO AZEDO (*Passiflora edulis* Sims) NO BRASIL

CAROLINA SAMPAIO ARAPONGA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2023

CAROLINA SAMPAIO ARAPONGA

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE CULTIVARES E POPULAÇÕES DE MARACUJAZEIRO AZEDO (*Passiflora edulis* Sims) NO BRASIL

.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

CAROLINA SAMPAIO ARAPONGA

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE CULTIVARES E POPULAÇÕES DE MARACUJAZEIRO AZEDO (*Passiflora edulis* Sims) NO BRASIL

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Ilhéus, 27 de fevereiro de 2023.

Drª Margarete Magalhães de Souza
(UESC - Orientadora)

Drª Ioná Santos Araújo Holanda
UFERSA

Dr. Leandro Lopes Loguércio
UESC

Alesandro Sousa Santos
UESC

À minha família e amigos que tornaram
essa caminhada mais leve...

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me permitiu chegar até aqui.

Aos meus avós maternos, Edene Sampaio e Waldemar Sampaio (*in memoriam*) e meus avós paternos, Sonia Araponga e Antonio Araponga (*in memoriam*), por todo exemplo, vocês são/foram inspiração.

A minha família, em especial aos meus pais, Antonio e Noelia, meus irmãos, Tom e Kinho e meu sobrinho Antonio, por todo apoio e incentivo durante esse percurso.

A minha tia Ledinha, que mesmo longe está sempre se mostrando presente e me apoiando em tudo.

As minhas amigas, Lariane, Malu, Vitória, Bia e Camila, que acompanharam cada fase dessa trajetória e não me permitiram desistir em momento nenhum, vocês são minha fortaleza!

A minha equipe de trabalho, Bianca, Sueli, Cris e Dan, que tornam minha rotina mais leve, vocês são incríveis.

A minha secretária de saúde e coordenadoras, Laryssa, Edilene e Ellen, por todo auxilio e compreensão.

A professora Dra. Margarete Magalhães de Souza, pela dedicação na orientação e confiança em meu trabalho.

Aos doutores Cláusio Melo e Gonçalo Silva, pela colaboração e parceria imensurável.

Por fim agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho.

“Não fui eu que ordenei a você? Sê forte e corajoso; não temas, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares. ”

Josué 1:9

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE CULTIVARES E POPULAÇÕES DE MARACUJAZEIRO AZEDO (*Passiflora edulis* Sims) NO BRASIL

RESUMO

Passiflora edulis (maracujazeiro-azedo) é a espécie de maior importância econômica dentro do gênero *Passiflora*. O maracujazeiro é mais conhecido pelo consumo do seu fruto, mas devido à beleza de suas flores ele também é utilizando para ornamentação. O composto passiflorina também faz com que o maracujazeiro-azedo seja utilizado pela indústria farmacêutica como matéria prima para produção de calmantes naturais. Os estudos de diversidade genética e estrutura populacional em cinco populações com 25 indivíduos cada de *P. edulis* foi conduzido utilizando o marcador molecular ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*). O índice diversidade genética e o índice de Shannon variou de h=0,166 e I= 0,249 a h=0,203 e I=0,308. A análise de variância molecular (AMOVA) explicou 55% da variação dentro das populações. A análise de agrupamento dividiu as espécies inicialmente em dois grupos principais, seguido por cinco grandes grupos, e a análise das coordenadas principais (PCoA) indicaram cinco grupos distintos, no qual os indivíduos foram separados de acordo com suas populações. Os dois primeiros eixos de PCoA explicaram 36,87% da variação. As espécies de *Passiflora* estudadas foram geneticamente diferenciadas em cinco populações distintas que foram observadas por meio de análise da estrutura populacional baseada no modelo Bayesiano. Assim, o presente artigo revelou a diversidade genética existente entre as populações de *P. edulis* analisadas e que podem ser um recurso genético valioso para futuros programas de melhoramento de *Passifloras*.

Palavras-chave: ISSR. Marcador molecular. Maracujazeiro. *Passiflora*. Variabilidade genética.

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE CULTIVARES E POPULAÇÕES DE MARACUJAZEIRO AZEDO (*Passiflora edulis* Sims) NO BRASIL

ABSTRAT

Passiflora edulis (sour passion fruit) is the most economically important species within the genus *Passiflora*. The passion fruit is best known for the consumption of its fruit, but due to the beauty of its flowers it is also used for ornamentation. The compound passiflorin also makes the passion fruit plant used by the pharmaceutical industry as a raw material for the production of natural tranquilizers. Studies of genetic diversity and population structure in five populations with 25 individuals each of *P. edulis* were conducted using the molecular marker ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat). The genetic diversity index and the Shannon index ranged from h=0.166 and I=0.249 to h=0.203 and I=0.308. Molecular analysis of variance (AMOVA) explained 55% of the variation within populations. The cluster analysis initially divided the species into two main groups, followed by five large groups, and the principal coordinate analysis (PCoA) indicated five distinct groups, in which individuals were separated according to their populations. The first two PCoA axes explained 36.87% of the variation. The *Passiflora* species studied were genetically differentiated into five distinct populations that were observed through analysis of the population structure based on the Bayesian model. Thus, the present article revealed the existing genetic diversity among the populations of *P. edulis* analyzed and which may be a valuable genetic resource for future *Passiflora* breeding programs.

Keywords: ISSR. Molecular marker. Passion fruit. Passiflora. Genetic variability.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Populações de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis Sims*.....18

Tabela 2 - *Primers* ISSR utilizados para estudar a diversidade genética em populações e cultivares de *Passiflora edulis* 19

Tabela 3 - Média dos índices de diversidade genética calculadas pelo programa GenAlEx para 28 *primers* ISSR em populações e cultivares de *Passiflora edulis*.....21

Tabela 4 - Resumo da análise de variância molecular dentro e entre populações e cultivares de *Passiflora edulis*.....22

Tabela 5 - Similaridade genética entre cinco populações e cultivares de *Passiflora edulis*.....24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) em duas populações (Livramento de Nossa Senhora e São Francisco de Itabapoana) e três cultivares (FB 300, IAC 273/277 e BRS RC) de *Passiflora edulis*.....22

Figura 2 - Dendrograma obtido através da análise do polimorfismo de regiões ISSR de populações de *Passiflora edulis*. Agrupamento gerado pelo método UPGMA do coeficiente de similaridade de Jaccard.....23

Figura 3 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) em populações e cultivares de *Passiflora edulis*. As cores são as mesmas que identificam as populações no STRUCTURE. 24

Figura 4 - Estimativa do K ideal inferida pela observação do Delta K para populações e cultivares de *Passiflora edulis*.....25

Figura 5 - Análise Bayesiana de agrupamentos genéticos entre populações e cultivares de *Passiflora edulis* obtida pelo software STRUCTURE para K = 5.....25

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO **11**

2.0 REVISÃO DE LITERATURA **13**

2.1 Família *Passifloracea* e gênero *Passiflora* **13**

2.2 Importância Econômica **14**

2.3 Melhoramento de maracujazeiro **15**

2.4 Marcadores moleculares em Passiflora **16**

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS **17**

3.1 Material vegetal **18**

3.2 Extração de DNA **18**

3.3 Amplificação dos marcadores ISSR **19**

3.4 Análise estatística **19**

4.0 RESULTADOS **21**

5.0 DISCUSSÃO **25**

6.0 CONCLUSÃO **27**

REFERENCIAS **29**

1. Introdução

O maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) é a espécie mais importante do ponto de vista agronômico e comercial dentro do gênero *Passiflora* L. Em 2021 o Brasil produziu 684.993 toneladas, representando um rendimento de 10.259 Kg/h em sistemas produtivos comercias, principalmente por pequenos e médios agricultores da região Nordeste do país, não qual o Ceará e a Bahia são importantes estados produtores (IBGE, 2021). A espécie produz frutos de valor comercial, sendo direcionados à indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, apresentando variação fenotípica como coloração amarela a roxos/arroxeados dos frutos (MARTHINS et al., 2019). No ambiente silvestre, a espécie *P. edulis* pode ser encontrada em duas formas variantes: *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. e *P. edulis* Sims f. *edulis*, variações atribuídas às características morfológicas em descritores qualitativos e quantitativos (JUNQUEIRA et al., 2005).

O maracujazeiro-azedo tem passado por longo processo de melhoramento genético em conjunto com o fluxo de germoplasma, ampliando a diversidade genética das populações comerciais. Adicionalmente, *P. edulis* é alogama com existência de autoincompatibilidade, desta forma pomares heterogêneos devem ser uma exigência para a produção de frutos e elevada produtividade (RENDÓN et al., 2013). Os pomares plantados de maracujazeiro são constituídos por materiais selecionados pelos próprios produtores ou por cultivares lançadas pelas instituições de pesquisa públicas e privadas, tanto para a qualidade e produtividade, quanto para resistência às principais doenças e pragas que afetam a cultura. A seleção feita pelo próprio produtor consiste na escolha dos melhores frutos a cada ano para a composição de novos pomares. Os pomares que utilizam as cultivares são formados a partir da compra de sementes e de mudas de viveiristas credenciados (REDDY et al., 2002; TORRE et al., 2012).

As cultivares existentes atualmente foram obtidas através de diferentes métodos de melhoramento, como a seleção massal, cruzamentos intraespecíficos e retrocruzamentos, por diferentes instituições, entre elas o Instituto Agronômico de Campinas (IAC), a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), e o Viveiros Flora Brasil (MELETTI, 2001). Em 1999, o IAC lançou no mercado as primeiras cultivares híbridas da Série 270 (IAC-273, IAC-275 e IAC-277), selecionadas para qualidade e produtividade (MELETTI, 2001). Através da seleção recorrente, obtenção e classificação de híbridos intra- e interespecíficos, a EMBRAPA Cerrado (D.F., Brasil) desenvolveu a 'BRS rubi do cerrado' (EMBRAPA, 2014). A empresa privada Viveiros Flora Brasil, situada no município

de Araguari em Minas Gerais, produzem pesquisas de melhoramento genético desde o ano de 1985 e, em decorrência desses trabalhos, foram disponibilizadas duas cultivares comerciais de maracujazeiro, a FB 200 – Yellow Master e FB 300 - Araguari, que foram registradas no ano de 2008 (FLORA BRASIL, 2018).

O estudo da diversidade genética em maracujazeiro tem sido realizado por meio de marcadores fenotípicos, os quais têm sido incluídos nos programas de melhoramento para a seleção e obtenção de plantas superiores (PAIVA et al., 2014; BRAGA et al., 2018). Contudo, os marcadores moleculares são uma forma mais rápida e informativa de acessar a diversidade genética sem a influência ambiental ou necessidade de esperar longo tempo de plantio (VIANA et al., 2003). No gênero *Passiflora* tem sido observado ampla variabilidade fenotípica intra- e interespecífica; essa variação tem sido reflexo do elevado polimorfismo genético observado em diversas espécies, principalmente nas utilizadas comercialmente (VIANA et al., 2003; COSTA et al., 2010; DIAS et al., 2020).

Marcadores moleculares randômicos têm sido informativos para o estudo da diversidade e da estrutura genética de populações de *Passiflora* (COSTA et al., 2010; DIAS et al., 2020). Os marcadores RADP (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) foram os pioneiros a serem obtidos para a análise da variabilidade em germoplasma silvestre e cultivado, sendo aplicados no melhoramento genético por proporcionarem a seleção de plantas e a indicação de genitores promissores a cruzamentos. Em análises intra- e interespecífica, os marcadores moleculares randômicos possibilitaram não apenas a distribuição e o agrupamento de genótipos silvestres em comparação com variedade comerciais, mas possibilitou a identificação de hibridações (OLIVEIRA et al., 2019). A utilização de marcadores ISSR para a caracterização de espécies de *Passiflora* apresentou eficiência na amplificação de mais da metade dos marcadores testados, indicando o potencial da diversidade do gênero (DIAS et al., 2020). Por outro lado, a análise intraespecífica de genótipos de *P. edulis* têm indicado a distinção entre plantas em função da sua origem, melhoramento (meios irmãos de cruzamento), BAG (em Banco Ativo de Germoplasma), CT (em Coleção de Trabalho) e de híbridos (COSTA et al., 2010).

O objetivo do presente trabalho foi inferir a diversidade e estrutura genética dentro e entre cinco cultivares e populações de maracujazeiro-azedo utilizadas como plantas matrizes em

pomares brasileiros, possibilitando a compreensão da variabilidade e estruturação das populações analisadas para serem aplicados em programas de melhoramento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família *Passifloraceae* e gênero *Passiflora*

A família *Passifloraceae* A.L. de Jussieu ex Kunth pertencente à ordem Malpighiales Juss. ex Bercht. & J.Presl, possui 18 gêneros e mais de 700 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (BERNACCI et al., 2013). O gênero *Passiflora* L. é o mais representativo da família, com cerca de 500 espécies, distribuídos principalmente nas regiões tropicais das Américas (BERNACCI et al. 2022). As espécies de *Passiflora* são popularmente conhecidas como maracujazeiros, havendo variação conforme espécie (MESQUITA, 2019). A origem da palavra maracujá provém do tupi, que significa "alimento em forma de cuia"; para os ingleses é conhecida como "*passion flower*", tendo como significado flor da paixão, no qual se relaciona com o símbolo da Paixão de Cristo (FALEIRO et al., 2005). No Brasil já foram catalogadas cerca de 150 espécies, sendo 87 consideradas endêmicas, tornando o país um dos principais centros de diversidade do gênero. O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, e a região Nordeste vem liderando a produção brasileira nos últimos anos, tendo como destaque os estados da Bahia e Ceará; na região Sul, Santa Catarina; e na região Sudeste, evidenciam-se os estados de Minas Gerais e São Paulo como relevantes produtores deste fruto, responsáveis por mais da metade da produção nacional (IBGE, 2021). A Bahia é o estado brasileiro que possui 44 espécies endêmicas distribuídas em três biomas: Caatinga, Mata Atlântica e Cerrado (BERNACCI et al., 2020).

A espécie mais cultivada em pomares comerciais é *Passiflora edulis* Sims (maracujazeiro-azedo) (MELETTI, 2011). Contudo, existem duas variedades da espécie *P. edulis* de fruto amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* Deg.) e a outra de fruto roxo (*P. edulis* f. *edulis* Sims). Essas duas variações podem ser encontradas no estado silvestre no Brasil (JUNQUEIRA et al., 2005). Na agricultura, seus frutos são colhidos praticamente o ano inteiro, principalmente nas regiões Norte e Nordeste (ARAÚJO et al., 2009). Esse fruto dispõe de um formato arredondado ou ovoide com cerca de 7 cm, e na fase madura, sua casca apresenta cor amarela

ou roxa. Juntamente com a polpa, de cor também amarela, existe um amontoado de sementes pequenas e negras. A casca do maracujá é formada pelo flavedo, que representa a camada externa de cor verde a amarela e o albedo, que equivale à camada interna de cor branca (BÄRTELS, 2007; MATOS, 2007; JANEBRO et al., 2009; ALVES; MELO, 2017).

As plantas possuem gavinhas axilares e são caracterizadas por serem trepadeiras lenhosas ou herbáceas (GENEROSO, 2018). Possui caule cilindro, folhas alternas, pecioladas, inteiras ou lobadas, por vezes caducas. Flores actinomorfas, solitárias ou inflorescências, contêm brácteas, cinco sépalas, cinco pétalas e uma ou mais séries de filamentos que constituem a corona (CERVI, 1997; VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004). As flores de *P. edulis* são hermafroditas, possuindo um sistema de autoincompatibilidade homomórfica gametofítica controlados pelo loco *S*. Elas apresentam tamanho grande, são vistosas e possuem brácteas foliares protegendo a base. A corona é constituída por diversos filamentos ou fímbrias, correspondendo a um traço característico de todo o gênero. O fruto tem forma de baga, globoso. A parte externa do fruto do é composta pelo pericarpo e a interna pela polpa mucilaginosa, com sementes providas de arilos (SUASSUNA et al. 2003; JESUS; FALEIRO, 2016). A respeito da biologia reprodutiva, por possuir necessidade de fecundação cruzada, os agentes polinizadores são de grande importância para a manutenção da *P. edulis* em um ambiente natural. A carência destes agentes é um dos aspectos que podem provir em baixa formação de frutos e novas plantas (BENEVIDES, 2009; SIQUEIRA et al., 2009).

2.2. Importância econômica

O cultivo do maracujazeiro possui grande relevância econômica e social por contribuir na formação de empregos no campo, no setor de vendas, nas agroindústrias e nas cidades, além de ser uma opção significativa para geração de renda de micro, pequenos, médios e grandes fruticultores. Além disso, a elevada aceitação do fruto no mercado e a vasta possibilidade de uso da cultura, acarreta uma grande oportunidade de capitalização em curto prazo de tempo; além do que, por possuir longo período de safra, proporciona fonte de renda mensal, levando em conta que a produção acontece durante diversos meses do ano. Desse modo, esses atributos fazem da cultura uma interessante opção de renda para propriedades rurais de aproveitamento familiar, especialmente devido ao maracujá possibilitar, economicamente, a produção em pequenas áreas (COELHO et al., 2016; FALEIRO et al., 2016). A produção nacional, no ano de 2020, foi de 690.364 toneladas (IBGE, 2020).

Os seus principais canais de comercialização são os mercados de frutas *in natura* e as agroindústrias de processamento; entretanto, a cultura viabiliza múltiplo uso sendo possível a comercialização das sementes que conseguem ser transformadas em óleos para indústrias alimentícias e de cosméticos; as cascas possuem grande valor para adubo, ração animal e farinha; suas flores, além de apresentar uma beleza exuberante, são utilizadas na indústria de cosméticos por conta do seu aroma, como também, algumas espécies são plantadas com finalidade de uso ornamental; já as folhas possuem relevante importância para indústria por possuírem propriedades funcionais e medicinais, sendo utilizadas para produção de condimentos, cosméticos e uso medicinal, constituindo vários fitoterápicos e outros medicamentos (FALEIRO et al., 2016).

2.3. Melhoramento de maracujazeiro

O começo do melhoramento genético do maracujazeiro no Brasil ocorreu na década de 80, momento em que a cultura se encontrava em expansão pelo país. Porém, somente na década de 90 que foram lançadas as primeiras cultivares melhoradas no mercado (FALEIRO e JUNQUEIRA, 2016). Essas cultivares foram consequências da junção de profissionais especializados na cultura do maracujazeiro, de diversas instituições localizadas em diferentes estados brasileiros. Os programas de melhoramento possuíam como foco somente o aumento da produtividade (MELETTI, 2011). A característica principal que marcou o melhoramento do maracujazeiro nos anos 2000, e que permanece até hoje, foi a efetuação genética da resistência e tolerância a pragas e doenças que acometem a cultura (PREISIGKE et al., 2020; SANTOS et al., 2015; FREITAS et al., 2016).

Por ser uma planta alógama, diversos são os métodos de melhoramentos aplicáveis ao maracujazeiro, objetivando o proveito do vigor híbrido ou heterose e aumento da frequência de genes favoráveis. Métodos de melhoramento embasado em hibridações interespecíficas têm sido aproveitados com sucesso e o método dos retrocruzamento é utilizado para inserção de genes de resistência e outros genes de relevância em materiais comerciais (JUNQUEIRA et al., 2005; FALEIRO; JUNQUEIRA, 2009; FONSECA et al., 2009). Outro método utilizado é a seleção recorrente, através dele é possível ampliar a frequência dos alelos favoráveis em uma população mediante ciclos contínuos de avaliação, seleção e recombinação daqueles genótipos que são preferíveis (OLIVEIRA et al., 2020; SILVA et al., 2017).

Ao longo da técnica de desenvolvimento de cultivares, diversos materiais, sejam variedades ou híbridos, são explorados em locais sortidos por anos consecutivos para que suas propriedades sejam adequadamente observadas, visto que o desempenho das cultivares é ambientalmente influenciado. Portanto, se busca explorar a interação genótipos x ambientes de modo a apontar cultivares que possuem melhor desempenho para cada região (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016). Por conta da sua importância econômica e social, o maracujazeiro-azedo vem sendo explorado por vários programas de melhoramento, onde as pesquisas têm alcançado sucesso na melhoria da produção, rendimento da polpa, excelência dos frutos, introdução de genes que proporcionam resistência a situações climáticas adversas, criação de cultivares híbridas e várias outras características (FALEIRO et al., 2021; FISCHER et al., 2021).

Espécies selvagens de *Passiflora* são utilizadas em hibridação interespecíficas com *P. edulis* e depois de vários anos de controle e seleção em populações segregantes, cultivares com maior produção, mais resistentes e tolerantes a inúmeros fatores, com potencial medicinal e ornamental, têm sido alcançadas e registradas no Cadastro Nacional de Registro de Cultivares do Ministério da Agricultura, Pecuárias e abastecimento - MAPA (BRASIL, 2021; FREITAS et al., 2016; OCAMPO et al., 2016; YOCKTENG et al., 2011).

O melhoramento genético do maracujazeiro-azedo, que representa 95% do plantio nacional de *Passiflora* (MELETTI et al., 2011), está direcionado à melhoria nas características do fruto, no crescimento da produção e na transferência de fatores de resistência, especialmente a fatores bióticos. Muitas doenças afetam o maracujazeiro, tais como a verrugose (*Cladosporium cladosporioides*), podridão do colo (*Nectria haematococca* e *Phytophthora* spp.) e CABMV(*Cowpea aphid borne mosaic virus*) (NASCIMENTO et al., 2004; SANTOS et al., 2008;FISCHER et al., 2010).

2.4. Marcadores moleculares ISSR em *Passiflora*

O ISSR é uma dentre várias técnicas de *fingerprinting* baseada em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que faz uso de *primers* de sequência simples repetitiva para amplificar regiões entre sequencias alvo. Essa técnica tem a habilidade de produzir um amplo número de marcadores *multiloci* e podem ser utilizados para analisar praticamente qualquer organismo, incluindo aqueles que se tem pouca ou nenhuma informação genética previa (ARCADE et al., 2000). O uso de marcadores ISSR em plantas ou animais são classificados por serem bastante

reprodutíveis, informativos, polimórficos, de rápida utilização e baixo custo (ZIETKIEWICZ et al., 1994, BORNET; BRANCHARD, 2002; BORNET et al., 2002).

Os marcadores ISSR têm se mostrado altamente eficientes em vários estudos de classificação da variabilidade genética intra- e interespecíficas, e exemplo de diversas frutíferas com relevância econômica reconhecida ou não (ROCHA et al., 2012), dentre elas, umbu-cajazeira (SANTANA et al., 2011), manga (ROCHA et al., 2012), videira (WU et al., 2009) e mamão (JESUS et al., 2013). Em jenipapeiro, os macadores ISSR foram usados na caracterização de germoplasma, constatando a eficiência desse marcador, especialmente pela amplificação de 86% de *loci* polimórficos, possibilitando com isso, analisar a diversidade genética dos acessos estudados (SANTOS, 2012). Em cacau tem sido utilizado para manutenção e caracterização de germoplasma (CHARTERS; WILKINSON, 2000).

Os ISSR podem contribuir nas análises genéticas em *P. edulis* devido à ampla variabilidade da espécie, e o fundamento da técnica possibilita amplificar segmentos de DNA presentes em duas regiões de microssatélites em direções opostas (ZIETKIEWICZ et al., 1994). A variação genética existente nessa espécie se faz uma ferramenta valiosa para atividades de melhoramento em pesquisa de genótipos mais propícios ao sistema intensivo de cultivo (SANTOS et al. 2011). Costa et al. (2012) apresentaram o uso potencial dos marcadores ISSR na caracterização do polimorfismo molecular em germoplasma melhorado e não melhorado de maracujazeiro, tornando possível analisar alto polimorfismo independente do genótipo explorado, apesar que os genótipos não melhorados tenham demonstrado maior percentual. Santos et al. (2011) constataram haver alto percentual de banda de bandas polimórficas nas espécies *P. edulis* e *P. alata* (98%) e constataram ainda, a importante utilidade dos ISSR para estudos de diversidade genética.

Costa et al. (2010), objetivando apontar a diversidade genética existente em acessos do banco de germoplasma e em acessos melhorados do programa de melhoramento genético do maracujazeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, descobriram uma quantidade significativa de bandas polimórficas com o uso de marcadores ISSR e se obteve um dendrograma dividido em dois grandes grupos. A análise realizada constatou que os marcadores ISSR se mostraram uma ferramenta valiosa para estudo de diversidade genética dentro de *P. edulis*.

3. Materiais e métodos

3.1. Material vegetal

Foram avaliadas cinco populações de *P. edulis* Sims, sendo que de cada população foram utilizados 25 genótipos. Três populações foram obtidas de sementes comerciais e duas populações coletadas em área de produção (Tabela 1). As sementes foram colocadas para germinar em bandejas de isopor, contendo terra vegetal como substrato. Após a germinação e surgimento das folhas verdadeiras, as plântulas foram transferidas para sacos pretos de polietileno, com capacidade para 1,5 L. Para as populações coletadas em áreas comerciais de pequenos produtores, a propagação foi realizada por estaquia. As estacas foram retiradas da parte intermediária dos ramos, preparadas e padronizadas com dois nós e duas folhas reduzidas à metade de sua área, secionadas em bisel e imersas em auxina sintética (ácido indol-3 butírico - AIB) e em seguida colocadas em sacos pretos de polietileno, com capacidade de 0,5 L, contendo areia lavada para o enraizamento. Após o enraizamento, as plantas foram transferidas para sacos pretos de polietileno, com capacidade para 1,5 L. As plantas foram mantidas em ambiente protegido, na coleção de trabalho de Passifloras da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brasil (longitude 39° 10' W, latitude 14° 39' S, 78 m acima do nível do mar).

Tabela 1 - Populações de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims).

Pop	População	Nome comum	Mantenedor	Local	No. Registro
1	FB 300*	Araguari	Viveiros Flora Brasil	Minas Gerais	23218
2	IAC 273/277*	Monte Alegre/Joia	IAC	Pará	11314/11316
3	BRS RC*	Rubi do Cerrado	EMBRAPA	Distrito Federal	29632
4	Livramento de Nossa Senhora**	Maracujá azedo	Pequenos produtores	Bahia	-
v	São Francisco de Itabapoana**	Maracujá azedo	Pequenos produtores	Rio de Janeiro	-

* Classificação de acordo com o Registro Nacional de Cultivares (RNC), com comercialização de sementes e mudas legalizada pelo MAPA
** Populações coletadas em área de produção

3.2. Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990), seguindo as seguintes etapas: folhas jovens foram maceradas em nitrogênio líquido e condicionadas em tampão de extração CTAB 2% [NaCl 1,5 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl 100 mM; β Mercaptoethanol 0,2%] por 40 min a 65 ºC. O isolamento de ácidos nucléicos foi realizado com solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e a ressuspensão do DNA com a utilização de tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM). A verificação da concentração do DNA genômico foi realizada pela comparação com 100 ng de DNA Lambda (Promega®) em eletroforese em gel de agarose 1,2% e corado com SYBR® safe (Invitrogen®). O DNA genômico foi diluído para a concentração de 10 ng/µl em tampão TE.

3.3. Amplificação dos marcadores ISSR

As amplificações ISSR foram realizadas através da utilização de 28 primers ISSR UBC (Tabela 2). As reações foram realizadas para um volume final de 20 µl, incluindo tampão 10x, MgCl2 10 mM, primer 10 pmol, dNTP 10 mM e 1 U de Taq DNA Polimerase. As amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf® Mastercycle), submetidas à seguinte programação: desnaturação inicial de 95 ºC por 4 min, seguida de 31 ciclos, desnaturação por 30 s a 94 ºC, anelamento por 45 s, variando de 52 °C a 60 °C, a depender do primer (Tabela 2), extensão por 2 min a 72 ºC, e extensão final a 72 ºC por 10 min. Os fragmentos amplificados na reação de ISSR foram corados com SYBR® safe (Invitrogen®) e separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, utilizando 90 V por 50 min e tampão SB 1X (H3BO3 100 mM, NaOH 150 mM).

Os fragmentos amplificados para cada primer foram tratados com marcadores dominantes e foram avaliados como presença (1) ou ausência (0) de uma banda. A partir dos padrões obtidos pela técnica ISSR, parâmetros genéticos, como estrutura da população, conteúdo de polimorfismo, diversidade genética e número efetivo de populações foram avaliados.

3.4. Análise genética

A matriz binária de presença (1) e ausência (0) de bandas foi elaborada em uma planilha no Software Microsoft Excel. Os dados perdidos foram identificados de acordo com os programas utilizados. A porcentagem de *loci* polimórficos (P), índice de

diversidade genética de Shannon (I), diversidade genética (h), número de alelos diferentes (Na), número efetivo de alelos (Ne) e número de bandas privadas para cada população, foram obtidos utilizando o software GenAlEx 6.5 (Peakall; Smouse 2012). As análises de variância molecular (AMOVA) e Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foram realizadas em conjunto no software GenAlEx 6.5 (Peakall; Smouse 2012).

Para a análise de similaridade entre os indivíduos de cada população foi utilizado o software NTSYS-pc 2.1 (Rohlf, 2000), no qual foi calculado o coeficiente de similaridade de Jaccard (Jaccard, 1901). O método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Avarages) foi utilizado para a construção do dendrograma. O coeficiente de correlação cofenética foi calculado para comparar a representação gráfica contra a matriz de similaridade original.

A análise da estrutura genética entre as diferentes populações foi realizada utilizando modelo Bayesiano. A estrutura genética foi inferida usando o software STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). O modelo de ancestralidade de mistura foi selecionado, e o número de *clusters* testados (valor de K) variou de 1 a 10. Dez corridas independentes foram realizadas para cada K testado. Todas as corridas foram realizadas utilizando 400.000 replicações após um período de *burn-in* de 100.000 interações. O STRUCTURE Harvester v. 0.6.93 (Earl; von Holdt, 2012) foi utilizado para analisar o arquivo de saída do STRUCTURE e o valor de K ideal foi calculado usando a estatística ad hoc ΔK de Evanno (Evanno et al., 2005).

Tabela 2 - *Primers* ISSR utilizados para estudar a diversidade genética em populações e cultivares de *Passiflora edulis* Sims.

Primer	Sequência (5'-3')[1]	TM (ºC)	N. TB	N. POL	N. POL (%)
UBC-808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	56	16	15	93,75%
UBC-810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	52	16	16	100,00%
UBC-811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52	13	13	100,00%
UBC-812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	54	18	18	100,00%
UBC-823	TCTCTCTCTCTCTCTCC	55	12	11	91,67%
UBC-825	ACACACACACACACACT	55	15	14	93,33%
UBC-826	ACACACACACACACACC	58	15	13	86,67%
UBC-828	TGTGTGTGTGTGTGTGA	55	16	15	93,75%
UBC-834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	55	20	20	100,00%
UBC-835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	55	6	5	83,33%
UBC-836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	56	14	13	92,86%
UBC-840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	54	12	11	91,67%

UBC-841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	56	21	21	100,00%
UBC-842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	58	16	14	87,50%
UBC-846	GAGAGAGAGAGAGAGAA	52	14	12	85,71%
UBC-847	CACACACACACACACARC	58	18	18	100,00%
UBC-848	CACACACACACACACARG	56	19	18	94,74%
UBC-850	GTGTGTGTGTGTGTGTYC	58	20	18	90,00%
UBC-852	TCTCTCTCTCTCTCTCCRA	54	16	16	100,00%
UBC-855	ACACACACACACACACYT	56	13	11	84,62%
UBC-856	ACACACACACACACACYA	54	19	19	100,00%
UBC-857	ACACACACACACACACYG	58	18	17	94,44%
UBC-858	TGTGTGTGTGTGTGTGRT	56	15	14	93,33%
UBC-861	ACCACCACCACCACCACC	58	19	15	78,95%
UBC-866	CTCCTCCTCCTCCTCCT	60	16	14	87,50%
UBC-868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	52	18	16	88,89%
UBC-888	BDBCACACACACACACA	56	18	17	94,44%
UBC-889	DBDACACACACACACAC	55	19	16	84,21%

(1) B, D, Y, R e V significa nucleotídeos degenerados: B = (C, G, T); D = (A, G, T); Y = (C, T); R= (A, G) e V = (A, C, G); TM- Temperatura de *melting*; N. TB- número total de bandas amplificadas por *primer*; N. POL - número de bandas polimórficas por *primer* e N. POL (%) - porcentagem de polimorfismo. UBC - Columbia International College

4. Resultados

Os 28 *primers* utilizados geraram um total de 452 bandas com boa resolução analítica, com uma média de 16,14 bandas por *primer*, com aproximadamente 92,9% de bandas polimórficas. O número de bandas totais variou de 6 (UBC-835) a 21 (UBC-841), enquanto o número de bandas polimórficas variou de 5 (UBC-835) a 21 (UBC-841), demonstrando boa capacidade de detectar polimorfismo (Tabela 2).

A porcentagem de polimorfismo variou de acordo com cada população, sendo a de menor valor a BRS-RC com 47,79% e a de maior valor a LV com 63,50% (Tabela 3). O índice de diversidade genética e o índice de Shannon variaram de h = 0,166 e I = 0,249 para BRS-RC a h = 0,203 e I = 0,308 para LV (Tabela 3).

Tabela 3 - Média dos índices de diversidade genética calculadas pelo programa GenAlEx para 28 *primers* ISSR em populações e cultivares de *Passiflora edulis* Sims.

Pop	Na	I	%P	Pa
BRS-RC	1,215	0,249	47,79%	2

FB300	1,338	0,265	54,42%	3
IAC	1,290	0,257	51,55%	10
LV	1,493	0,308	63,50%	11
RJ	1,352	0,278	58,63%	5

Na (número de alelos diferentes); I (índice Shannon); %P (Porcentagem de locus polimórficos); Pa (alelos privados).

O teste de AMOVA (Figura 1) possibilitou a observação da variação significativa entre as populações. Foi observado que a maior variação ocorreu dentro das populações (55%), sendo a variação entre as populações de 45% (Tabela 4).

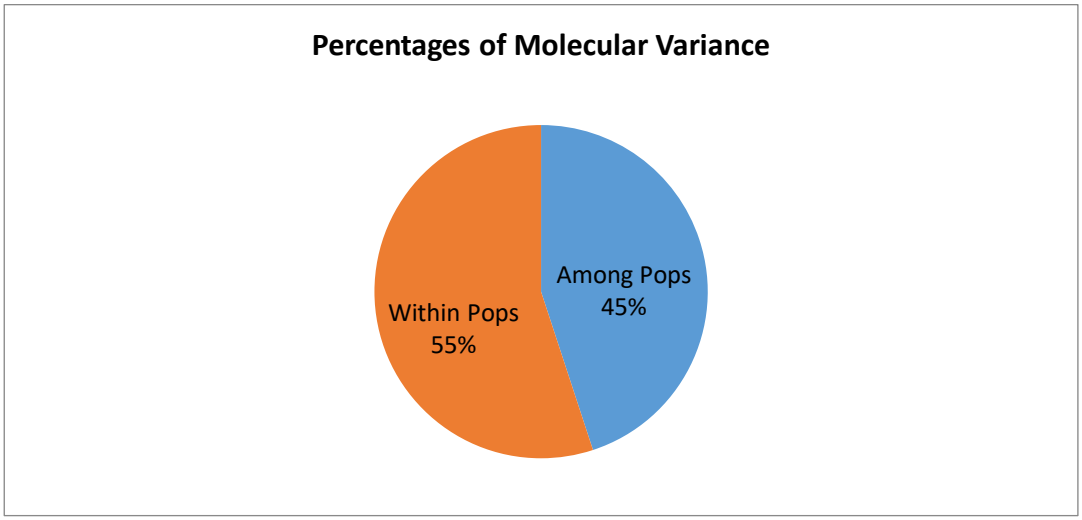

Figura 1 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) em duas populações (Livramento de Nossa Senhora e São Francisco de Itabapoana) e três cultivares (FB 300, IAC 273/277 e BRS RC) de *Passiflora edulis* Sims.

Tabela 4 - Resumo da análise de variância molecular dentro e entre populações e cultivares de *Passiflora edulis* Sims.

Fonte	GL	SQ	QM	VE	%
Entre populações	4	3427,360	856,840	32,674	45%
Dentro de populações	120	4800,240	40,002	40,002	55%
Total	124	8227,600		72,676	100%

GL (grau de liberdade); SQ (soma dos quadrados); QM (quadrados médios); VE (variação estimada); % (porcentagem).

O dendrograma dividiu inicialmente dois grupos principais seguidos por cinco grandes grupos (I, II, III, IV e V) (Figura 2). O grupo principal mais representativo foi composto pelos grupos I, II, III e IV. O segundo grupo principal foi exclusivo para o grupo V se mostrando mais distante dos demais. O grupo II e III são os mais próximos, enquanto os

grupos I e V são mais distantes (Figura 2). O grupo I foi representado pela população BRS-RC e subdivido em dois subgrupos (IA e IB). O grupo II foi composto pela população FB300 e apresentou três subgrupos (IIA, IIB e IIC). O grupo III foi representado pela população LV e apresentou dois subgrupos (IIIA e IIIB). O grupo IV foi representado pela população de IAC e subdivido em três subgrupos (IVA, IVB e IVC). O grupo V foi formado pela população RJ com três subgrupos (VA, VB e VC).

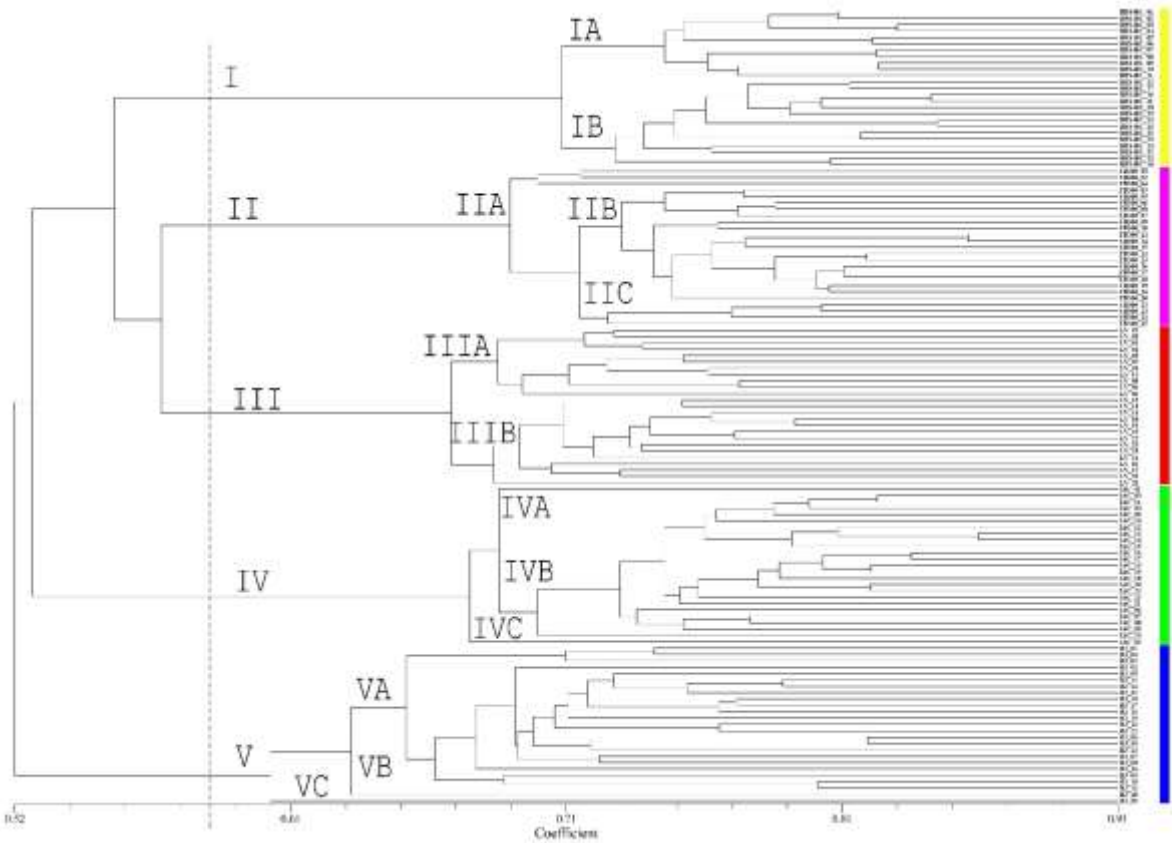

Figura 2 - Dendrograma obtido através da análise do polimorfismo de regiões ISSR de populações de *Passiflora edulis* Sims. Agrupamento gerado pelo método UPGMA do coeficiente de similaridade de Jaccard.

Na análise de coordenadas principais (PCoA), as duas primeiras coordenadas principais foram responsáveis por 36,87% da variância total (21,23% e 15,64%, respectivamente). Os resultados de PCoA indicaram cinco grupos distintos, nos quais os indivíduos foram separados de acordo com suas populações. As populações mais próximas foram FB300 e LV, a população IAC apresentou a maior distância em relação as demais populações (Figura 3). A similaridade genética entre as populações e cultivares variou de 0,785 a 0,869, de acordo com o coeficiente de similaridade de Nei. As maiores

distâncias foram encontradas entre as populações de BRS-RC e IAC e a menor distância ocorreu entre as populações FB300 e LV (Tabela 5).

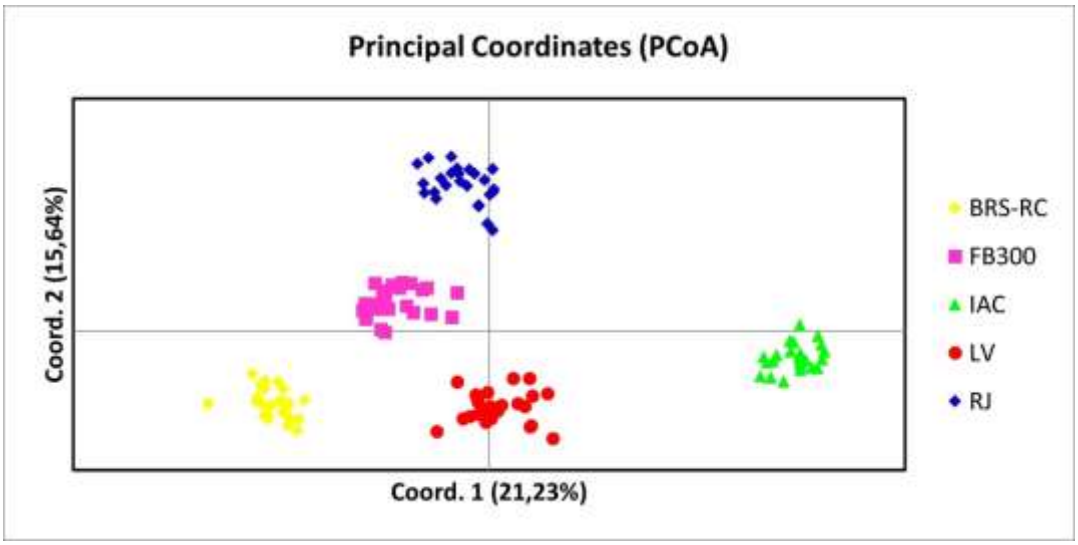

Figura 3 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) em populações e cultivares de *Passiflora edulis* Sims. As cores são as mesmas que identificam as populações no STRUCTURE.

Tabela 5 - Similaridade genética entre cinco populações e cultivares de *Passiflora edulis* Sims.

BRS-RC	FB300	IAC	LV	RJ	
1,000*					BRS-RC
0,837	1,000				FB300
0,785	0,816	1,000			IAC
0,857	0,869	0,858	1,000		LV
0,838	0,865	0,823	0,854	1,000	RJ

*segundo Nei (1978)

Na análise Bayesiana, a máxima verossimilhança dada pelo método STRUCTURE foi ΔK = 2 seguido de ΔK = 5 (Figura 4) indicou que as populações de *P. edulis* estudadas inicialmente formaram dois grupos principais seguidos por cinco outros grupos I, II, III, IV e V, no qual cada um representou uma população. Os resultados obtidos confirmaram o padrão de agrupamento observado pela análise UPGMA. (Figura 5).

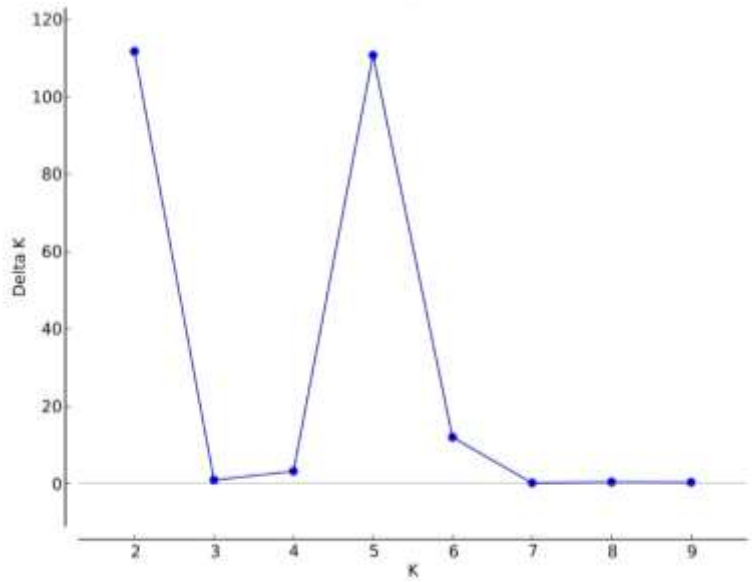

Figura 4 - Estimativa do K ideal inferida pela observação do Delta K para populações e cultivares de *Passiflora edulis* Sims.

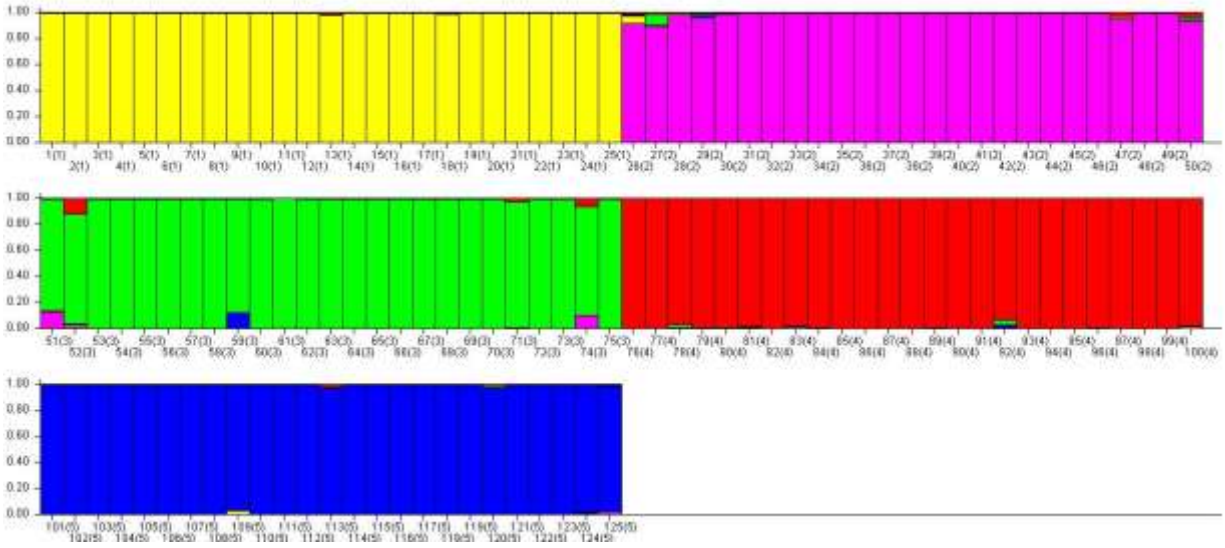

Figura 5 - Análise Bayesiana de agrupamentos genéticos entre populações e cultivares de *Passiflora edulis* Sims obtida pelo software STRUCTURE para K = 5.

Em geral, o conjunto de resultados das análises realizadas mostram que as cinco populações são geneticamente heterogêneas.

5. Discussão

Neste trabalho, informações moleculares obtidas por meio de marcadores moleculares ISSR possibilitou a análise de polimorfismo em cinco populações de maracujazeiro-azedo (*P. edulis*), gerando elevado número de bandas polimórficas, fato comum em análises

intraespecíficas com marcadores dominantes em passifloras (DOS SANTOS et al., 2011). A identificação do baixo número de bandas monomórficas indicou alta variabilidade genética intraespecífica de *P. edulis* (LELES COSTA et al., 2012). Por outro lado, menor polimorfismo foi observado por meio da obtenção de outros marcadores moleculares dominantes, como o RAPD em *P. cincinnata* Mast., indicando que o marcador molecular ISSR revelou variações em mais regiões genômicas em análises da diversidade intraespecifica (CARMO et al., 2017).

Dentre os primers utilizados, o UBC-841, além de revelar o maior número de bandas polimórficas, possui sítio de anelamento *loci* SSR dinuceotídeo CT, indicando a riqueza desta sequência microssatélite no genoma de *P. edulis*. Em plantas, a presença de dinucleotídeos microssatélites é mais comum que as outras classes com mais bases, como sequencias em tandem tri-, tetra- e pentanucleotídeos (LIU et al., 2018). Essa ampla distribuição pode ser utilizada nas estratégias do estudo da diversidade genética, possibilitando a seleção *primers* mais informativos para análises futuras.

O índice de Shannon visa medir a diversidade genética da população, indicando que quanto mais próximo do zero for o seu valor, menor a diversidade genética existente (REIS et al., 2011). Neste estudo, foi possível observar que as duas populações coletadas em área de produção agrícola apresentaram maiores índices de Shannon em relação às populações obtidas através de sementes, o qual variou de 0,308 a 0,249. Estudo utilizando sementes de 22 genótipos de maracujá de diferentes regiões produtoras no Quênia revelaram também um menor índice de shannon, o qual variou de 0,0388 a 0,1637 (OLUOCH; NYABOGA; BARGUL, 2018).

As características reprodutivas refletem na diversidade genética de populações naturais ou cultivadas. Pelo fato de *P. edulis* possuir autoincompatibilidade esporofítica (BRUCKNER et al., 2005), para a formação de pomares altamente produtivos é recomendada ampliar a base genética, favorecendo assim cruzamentos pela variação de alelos que gerenciam a autoincompatibilidade. Neste aspecto, a diversidade genética está relacionada com a eficiência na polinização, fertilização e obtenção de frutos (JESUS; GIRARDI; et al., 2018). Em *P. setacea*, os dados do teste de AMOVA complementaram a análise de diversidade genética, e a utilização de marcadores ISSR em 259 acessos distribuídos em 12 municípios da Bahia revelaram resultados parecidos nos quais 57% da variação ocorreu dentro da população (PEREIRA; CORRÊA; OLIVEIRA, 2015).

A visualização gráfica da distribuição da diversidade genética indicou que as populações apresentam genótipos com variabilidade alélica específica para cada população, refletindo na

formação de um subgrupo específico para cada população. As populações FB300 e LV revelaram maior proximidade genética que as demais populações, indicando similaridades na variação alélica. Desta forma, as populações FB300 e LV podem ser utilizadas para a obtenção de linhagens com menor segregação alélica, ou seja, maior homozigose. Por outro lado, a população do RJ se mostrou mais externa que as demais, indicando maior distância genética, podendo ser utilizada como uma população promissora na seleção de plantas para a produção de linhagens segregantes, utilizadas em hibridações com outras populações, principalmente a população BRS-RC, a qual possui maior distância genética (ALUÍZIO BORÉM; MIRANDA; FRITSCHE-NETO, 2021).

Os dados obtidos através da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) possibilitaram confirmar a distribuição de três populações observadas no dendrograma. No PCoA as populações RJ e IAC foram alocadas diferentes em relação ao dendrograma, indicando que alterações na distribuição da variabilidade e diversidade genética com uso de marcadores moleculares variam em função do coeficiente de similaridade/dissimilaridade genética utilizado. Alguns estudos revelaram resultados similares, como em *P. cristalina*, onde a diversidade genética de 50 indivíduos de duas populações foi avaliada por meio da PCoA, no qual o gráfico revelou que seus indivíduos ficaram separados em suas respectivas populações, revelando não haver mistura entre eles; como as populações encontram-se na Zona Rural do município de Alta Floresta – Mato Grosso, há possibilidade da cidade estar atuando como uma barreira geográfica, condição que pode interromper o fluxo gênico (SILVEIRA et al., 2020), como observado entre as cinco populações estudadas de *P. edulis*.

A formação de cinco grupos (ΔK=5) pela análise da estrutura genética corroborou com a formação de grupos e distribuição dos mesmos observados tanto no dendrograma como pelo PCoA. Os cinco grandes grupos revelaram individualidade populacional, apontando que cada população possui sua estrutura e diversidade genética, não havendo mistura entre elas, facilitando assim a rastreabilidade dessas plantas. Em duas populações de *P. cristalina*, utilizando marcadores microssatélites, foram encontrados resultados semelhantes à análise de *P. edulis*, com a utilização de oito *primers* SSR os dados do STRUCTURE revelaram ΔK=2, no qual os indivíduos ficaram separados em suas respectivas populações, confirmando a individualidade da estrutura populacional (SILVEIRA et al., 2020).

6. Conclusão

A obtenção de marcadores ISSR possibilitou a detecção do polimorfismo em regiões entre microssatélites em *P. edulis*. Adicionalmente, o alto polimorfismo no germoplasma analisado indica que *P. edulis* possui variabilidade e diversidade genética em populações cultivadas. As populações, obtidas por meio de sementes e adquiridas comercialmente, apresentaram menor diversidade genética entre os genótipos destas populações, comparados as populações coletadas em áreas de produção. A conservação de um perfil alélico intrapopulacional particular foi revelada por meio da formação de grupos específicos para cada população, de acordo com as análises para a observação da distribuição da diversidade e estrutura genética. Neste aspecto, as informações de diversidade e estrutura genética permitirão a seleção de populações e/ou genótipos para serem utilizados em programas de melhoramento de *P. edulis*, por exemplo, selecionando genitores contrastantes (com maior distância genética entre eles) para hibridações e obtenção de populações segregantes.

REFERÊNCIAS

ALUÍZIO BORÉM; MIRANDA, G. V.; FRITSCHE-NETO, R. **Melhoramento de plantas**. [s.l.] Oficina de Textos, 2021

ALVES, P. R. B; MELO, B. CULTURA DO MARACUJAZEIRO [online] Disponível em: http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/maracuja2.html. Acesso em: 01 ago. 2017.

ARAÚJO, A. J. B; AZEVÊDO, L. C.; COSTA, F. F. P.; AZOUBEL, P. M. Caracterização físico-química da polpa de maracujá do mato. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS - ENAAL, 16; CONGRESSO LATINOAMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 2., 2009, Belo Horizonte. Anais... São Paulo: SBAAL, 2009.

ARCADE, A. F.; ANSELIN, P.; FAIVRE, R. M. C.; LESAGE, L. E.; PRAT, D. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japonese larch. Theoretical and Applied Genetics, v.100, p.299-307, 2000.

BÄRTELS, A. Guia de plantas tropicais: plantas ornamentais, plantas úteis, frutos exóticos. Tradução de Cecília Beatriz; revisão técnica e atualização A. L. V. Toscano de Brito. Rio de Janeiro: Lexikom, 2007

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

BERNACCI LC, NUNES TS, MEZZONATO AC, MILWARD-DE-AZEVEDO MA, IMIG CD, CERVI AC. 2022. Passifloraceae. Flora e Funga do Brasil. Rio de Janeiro, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. https://floradobrasil. jbrj.gov.br/fb182

BERNACCI, L. C.; CERVI, A. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; NUNES, T. S.; IMIG, D. C.; MEZZONATO, A. C. Passiflora ceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013.

BERNACCI, L.C., NUNES, T.S., MEZZONATO, A.C., MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A., IMIG, D.C., AND CERVI, A.C. (in memoriam). 2020. Passiflora in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at Available at http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12506 (accessed September 2020)

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Report, v. 19, p. 209–215, 2002.

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

BRAGA, C. DOS S., RODRIGUES, D. V., BISPO, R. B., GÖTTER, V., MARTINS, K. C.; SOUZA, S. A. M. Caracterização e diversidade genética de espécies do gênero Passiflora com

base em características físicas e químicas dos frutos. **Revista De Ciências Agroambientais**, v. 15, n. 2, p. 181–186, 2018.

BRASIL (2021). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Registro Nacional de cultivares – RNC. Órgão pertencente à Coordenação de Sementes e Mudas - CSM. Disponível em: . Acesso em: 15 de setembro de 2021.

BRUCKNER, C.H.; SUASSUNA, T. M.F.; RÊGO, M.; NUNES, E.S. Autoincompatibilidade do maracujá– implicações no melhoramento genético. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético, 2005. p. 137 – 338.

CARMO, T. V. B. D. et al. GENETIC DIVERSITY IN ACCESSIONS OF Passiflora cincinnataMast. BASED ON MORPHOAGRONOMIC DESCRIPTORS AND MOLECULAR MARKERS. **Revista Caatinga**, v. 30, p. 68–77, 2017.

CERVI AC. 1997. Passifloraceae from Brazil. Studies of genus Passiflora L., subgenus Passiflora. Fontqueria, 45: 1-92 (in Portuguese, with abstract in English).

COELHO, E.M; AZEVÊDO, L.C; UMSZA-GUEZ, M.A. Fruto do maracujá: importância econômica e industrial, produção, subprodutos e prospecção tecnológica. Cad. Prospec., Salvador, v. 9, n. 3, p.323-336, jul./set. 2016.

COSTA, J. L. et al. Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit. Crop Breeding and Applied Biotechnology, Viçosa, 12: 253-260, 2012.

COSTA, J. L. Marcadores issr: diversidade genética e correlação com heterose em genótipos de Passiflora edulis Sims. 2010. 49 f. TCC (Graduação em Biologia) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2010.

COSTA, J. L.; OLIVEIRA, E. J.; JESUS, O. N.; OLIVEIRA, G. A. F.; NEVES, C. G. Marcadores moleculares como ferramenta para estruturação da diversidade genética em 12 genótipos de maracujazeiro. Jornada Científica – Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2010.

DIAS, N. D. S. C. et al. Characterization and selection of ISSR molecular markers in species of *Passiflora* spp. **Multi-Science Journal**, v. 3, n. 3, p. 17-22. 2020.

DOS SANTOS, L. F. et al. ISSR Markers as a Tool for theAssessmentofGeneticDiversity in Passiflora. **BiochemicalGenetics**, v. 49, n. 7-8, p. 540–554, 22 mar. 2011.

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

EMBRAPA**. Híbrido de maracujazeiro-azedo de frutos avermelhados e amarelos para indústria e mesa, 2014.** Disponível em: <https://www.cpac.embrapa.br/lancamentobrsrubidocerrado/>. Acesso em: 18 nov. 2022.

EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. Mol Ecol 14: 2611–2620.

FALEIRO GF, JUNQUEIRA NTV, BRAGA MF. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005.

FALEIRO, F. G. & JUNQUEIRA, N. T. V. Passion fruit (Passiflora spp.) improvement using wild species. In: MARIANTE, A. S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. The state of Brazil´s plant genetic resources. Second National Report. Conservation and Sustainable Utilization for food and agriculture. Brasília, DF: Embrapa Technological Information, p. 101-106, 2009.

FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N. T. V., FABIO GELAPE FALEIRO, C. P. A. C., & JUNQUEIRA, N. T. V. Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília: Embrapa, 2016.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados. cap. 4, p. 81-107, 2005.

FALEIRO, FÁBIO GELAPE; JUNQUEIRA, N. T. V. Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Embrapa Cerrados-Livro técnico (INFOTECA-E), 2016.

FISCHER, I. H., ALMEIDA, A. M. DE, FILETI, M. D. S., BERTANI, R. M. D. A., ARRUDA, M. C. DE, BUENO, C. J. Avaliação de passifloraceas, fungicidas e trichoderma para o manejo da podridão-do-colo do maracujazeiro, causada por Nectria haematococca. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 3, n. 3, p. 709–717, 2010.

FLORA BRASIL. Viveiro flora Brasil. Maracujá. 2018. Disponível em: <http://www.viveiroflorabrasil.com.br/site/produtos/maracuja/. Acesso em: 6 jan 2022. http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128567. Accessed 6 august 2017

FONSECA, K. G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; COSTA, A. M. BARTH, M.; FELDBERG, N. P. Morphoagronomic and molecular characterization of ornamental passion fruit cultivars. Pesq. agropec. bras., Brasília. Vol. 52, No. 10, pp.849-860, 2017. DOI: 10.1590/S0100- 204X2017001000004

FREITAS, J. C. O.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; PAIVA, C. L.; SILVA, F. H. D. L.; SOUZA, M. M. Sour passion fruit breeding: Strategy applied to individual selection in segregating population of Passiflora resistant to Cowpea aphid-born mosaic virus (CABMV). Scientia Horticulturae, v. 211, p. 241-247, 2016.

Fruticultura, volume especial, p.83-91, 2011.

GENEROSO AL. CONSERVAÇÃO E CULTIVO in vitro DE EMBRIÕES DE MARACUJAZEIRO-AZEDO (Passiflora edulis Sims). Universidade Estadual Do Norte Fluminense. Darcy Ribeiro UENF. Campos dos Goytacazes RJ. 2018.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Available: http://www.cnpmf. embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/maracuja/b1_maracuja .pdf. 2021.

IBGE. Produção de maracujá. Brasil: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2020. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/maracuja/br. Acesso em: 21 maio 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - INBE. **Produção de Maracujá no Brasil em 2021**. Disponível 2m: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/maracuja/br>. Acesso em 26 jan 2022.

JACCARD P (1901). Étude comparativo da distribuição florale dans une portion des Alpes et des Jura.Touro. Soc. Sci. Vaudoise. Nat. 37: 547-579.

JANEBRO, Daniele Idalino. Investigação do efeito da farinha da casca de Passiflora edulis f. flavicarpa Deg. (maracujá amarela) em portadores de síndrome metabólica com diabetes mellitus tipo II. 117 f. Tese de Doutorado (Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e sintéticos Bioativos do centro de Ciências da Saúde) Universidade Federal da Paraíba. Centro de ciências da saúde. João Pessoa. 2009.

JESUS, O. N. DE et al. **Produção de mudas de maracujazeiro amarelo pelo método de estaquia, 2018**. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/197265/1/BoletimDePesquisa-98-Onildo-Ainfo3.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2023.

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

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. p. 81 – 106, 2005.

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:

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: Maracujá Germoplasma e Melhoramento Genético./ Eds.: FALEIRO, F. G.;
LELES COSTA, J. et al. Effectofselectionongeneticvariability in yellowpassionfruit. **CropBreedingandAppliedBiotechnology**, v. 12, p. 253–260, 2012.

LIU, S., AN, Y., LI, F. et al. Genome-wide identification of simple sequence repeats and development of polymorphic SSR markers for genetic studies in tea plant (Camellia sinensis). Mol Breeding 38, 59 (2018). https://doi.org/10.1007/s11032-018-0824-z

MARTINS, H. F.; CARVALHO, S. S. R.; DE A.; BISPO, J. A. C.; SOUZA, S. M. A. DE.; MARTINEZ, E. A. Maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*): cinética da secagem artificial e natural da casca / Yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*): kinetics of artificial and natural drying of the peel. **Brazilian Journal of Development**, n. 5, v. 11, p. 23234–23245. 2019.

MATOS, F.J. de A. Plantas Medicinais: Guia de Seleção e Emprego de Plantas Usadas em Fitoterapia no Nordeste do Brasil. 3ª ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. Revista Brasileira de Fruticultura, p. 83–91, 2011.

MELETTI, L. M. M.; BRUCKNER, C. H. Melhoramento genético. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre; Cinco Continentes, p. 345-385. 2001.

MELETTI, L.M.M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. Revista Brasileira de

MESQUITA LSS. Estudo de revisão e prospecção biotecnológica das espécies Passiflora alata CURTIS e Passiflora edulis SIMS. Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2019.

MORAES AM, MILWARD-DE-AZEVEDO MA, MENINI NETO L, FARIA APG. 2020. Distribution patterns of Passiflora L. (Passifloraceae s.s.) in the Serra da Mantiqueira, Southeast Brazil. Brazilian Journal of Botany 43: 999–1012

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

OCAMPO, J.; ARIAS, J. C.; URREA, R. Interspecific hybridization between cultivated and wild species of genus Passiflora L. Euphytica, v. 209, n. 2, p. 395-408, 2016.

OLIVEIRA, J. S.; FALEIRO, F. G.; VIANA, C. G.; VIANA, M. L.; DA FONSECA, K. G. Variabilidade de matrizes selecionadas de Passiflora quadrangularis L. com base em marcadores ISSR e RAPD. MAGISTRA, v. 31, p. 490-501, 2020.

OLIVEIRA, J. S.; FALEIRO, G.; UNQUEIRA, N. T. V.; FONSECA, K. G.; ARAYA, S. Genetic variability of *Passiflora* spp. based on ISSR and RAPD. **Asian journal of**

OLUOCH, P.; NYABOGA, E. N.; BARGUL, J. L. Analysis of genetic diversity of passion fruit (Passiflora edulis Sims) genotypes grown in Kenya by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. **Annals of Agrarian Science**, v. 16, n. 4, p. 367–375, dez. 2018.

PAIVA, C. L. et al. Diversidade genética de espécies do gênero Passiflora com o uso da estratégia Ward-MLM. **Revista Brasileira de Fruticultura** , v. 36, n. 2, pp. 381-390, 2014.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. Bioinformatics (Oxford, England), v. 28, n. 19, p. 2537–9, 2012.

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

PREISIGKE, S. D. C.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; SANTOS, P. R. D.; SANTOS, V. O. D.; AMBRÓSIO, M.; WALTER, F. H. D. B. Selection strategies in a segregating passion fruit population aided by classic and molecular techniques. Bragantia, v. 79, p. 47-61, 2020.

PRITCHARD JK, STEPHENS M, DONNELLY P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945–959.

REDDY, P.M.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9–17, 2002.

REIS, R. V. DOS et al. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro-amarelo detectada por marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 1, p. 51–57, jan. 2011.

RENDÓN, S. S.; OCAMPO, J.; URREA, R. Study of pollination and floral biology of *Passiflora edulis* f. *edulis* Sims as a basis for pre-breeding. **Acta Agronomica**, v. 63, n. 2, p. 332-341, 2013.

ROCHA, A. et al. Genetic Diversity of „Ubá" Mango Tree Using ISSR Markers. Molecular Biotechnology, Totowa, v. 50, n. 2, p. 108- 113, 2012.

ROHLF FJ (2000) NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. New York: Exeter Software 83.

SANTANA, I. B. B. et al. Variabilidade genética entre acessos de Umbu-Cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011.

SANTOS, C. E. M.; PISSIONI, M. L. L.; MORGADO, M. A. D.; CRUZ, C. D.; BRUCKNER, C. H. Estratégias de seleção em progênies de maracujazeiro amarelo quanto ao vigor e incidência de verrugose. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 30, n. 2, p. 444–449, 2008.

SANTOS, E. A. et al. Confirmation and characterization of interspecific hybrids of Passiflora L. (Passifloraceae) for ornamental use. Euphytica, Wageningen, v. 184, p. 389-399, 2012

SANTOS, E. A.; VIANA, A. P.; DE OLIVEIRA FREITAS, J. C.; RODRIGUES, D. L.; TAVARES, R. F.; PAIVA, C. L.; SOUZA, M. M. Genotype selection by REML/BLUP methodology in a segregating population from an interspecific Passiflora spp. crossing. Euphytica, v. 204, n. 1, p. 1-11, 2015.

SANTOS, L. F. et al. ISSR Markers as a Tool for the Assessment of Genetic Diversity in Passiflora. Biochemical Genetics, v. 49, p. 540-554, 2011

SANTOS, L. F.; OLIVEIRA, E. J.; SILVA, A. S.; CARVALHO, F. M.; COSTA, J. L.; PÁDUA, J. G. ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in Passiflora. Biochemical Genetics, v.49, p. 540–554, 2011.

SILVA, F. H. D. L.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; FREITAS, J. C. D. O.; RODRIGUES, D. L.; AMARAL, A. T. D. Prediction of genetic gains by selection indexes and REML/BLUP methodology in a population of sour passion fruit under recurrent selection. Acta Scientiarum. Agronomy, v. 39, p. 183-190, 2017.

SILVEIRA, G. F. DA et al. Estrutura Populacional e Variabilidade Genética em Populações Nativas de Passiflora cristalina Vanderpl. &Zappi, em Fragmentos Florestais no estado de Mato Grosso/Passiflora cristalina Vanderpl. &Zappi in forestfragments in thestateof Mato Grosso. **BrazilianJournalofDevelopment**, v. 6, n. 11, p. 87328–87341, 12 nov. 2020.

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

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

TORRE, M. P.; GARCÍA, M.; HEINZ, R.; ESCANDÓN, A. Analysis of genetic variability by ISSR markers in Calibrachoa caesia, DOI: 10.2225/vol15-issue5-fulltext-8.

TORRE, M. P.; GARCÍA, M.; HEINZ, R.; ESCANDÓN, A. Analysis of genetic variability by ISSR markers in *Calibrachoa caesia*. **Electronic Journal of Biotechnology,** v. 15 n. 5, 2012.

ULMER T, MACDOUGAL JM. Passiflora: passionfloweroftheworld. Cambridge: Timer Press, 2004.

VANDERPLANK J. Passionflowers. 3ª ed. Cambridge: The MIT Press. 224p. 2000.

VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N; S.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, M. M.; MALDONADO, J. F. M.; JUNIOR, A. T. A. Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. Flavicarpa) e entre espécies de passifloras nativas determinada por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 3, p. 489-493.

WU, Z. L. et al. Analysis of genetic diversity of Vitis by using ISSR markers. Acta Horticulturae, Leuven v. 827, p. 125-130, 2009.

YOCKTENG, R.; D'EECKENBRUGGE, G. C.; SOUZA-CHIES, T. T. Passiflora. In: Wild crop relatives: Genomic and breeding resources. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 129-171, 2011

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