

Variabilidade e estrutura genética molecular em acessos de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores análogos a genes de resistência

Lucas Amorim Silveira ¹
Thalana Souza Santos Silva ¹
Messulan Rodrigues Meira ¹
Onildo Nunes de Jesus ²
Fábio Gelape Faleiro ³
Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva ^{1*}
Elisa Susilene Lisboa dos Santos ¹

¹ Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus Juvino Oliveira
BR-415, CEP 45.700-000, Itapetinga – BA, Brasil

² Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – BA, Brasil

³ Embrapa Cerrados, Planaltina – DF, Brasil

* Autor para correspondência
csilva@uesb.edu.br

Submetido em 21/09/2022

Aceito para publicação em 06/02/2023

Resumo

O Brasil é um centro de diversidade de espécies do maracujazeiro, sendo a *Passiflora edulis* Sims. a mais cultivada. Devido à sua importância comercial e à suscetibilidade às doenças, objetivou-se avaliar a diversidade genética e a estruturação de acessos de *Passiflora edulis*. dos bancos ativos de germoplasma da Embrapa Cerrados e Mandioca e Fruticultura utilizando marcadores moleculares análogo a genes de resistência (RGAs). A diversidade genética de 163 plantas, totalizando 71 variedades não melhoradas e cinco cultivares foram avaliadas. Foram utilizadas nove combinações de iniciadores, totalizando 157 marcadores, com média de 17,4 marcadores/combinção. A heterozigosidade esperada média foi 0,18. O conteúdo de informação polimórfica foi 0,15. A variância molecular apresentou 82% de diversidade existente dentro dos Bancos Ativos de Germoplasma (BAG). Os genótipos estruturaram-se em três *pools* gênicos, com subgrupo heterogêneo com acessos de ambos os bancos, um homogêneo com acessos do BAG Cerrados e o último predominando cultivares também do BAG Cerrados. A análise de Coordenadas Principais demonstrou que os bancos possuem genótipos semelhantes. Os resultados enfatizaram existência de material genômico passivo para desenvolvimento de novas cultivares. Os marcadores certificaram como estas coleções podem contribuir nos programas de melhoramento. Existem alelos compartilhados entre as variedades não melhoradas dos dois BAGs, porém, respectivas variedades não possuem relação com as cultivares.

Palavras-chave: Diversidade; Germoplasma; Maracujazeiro; Marcador molecular; Recursos genéticos



Abstract

Variability and molecular genetic structure in *Passiflora edulis* Sims. accessions based on markers analogous to resistance genes. Brazil is a center of diversity of passion fruit vine species, with *Passiflora edulis* Sims. being the most cultivated one. Due to their commercial importance and susceptibility to diseases, the objective of this study was to evaluate the genetic diversity and structuring of *Passiflora edulis* Sims. accessions from the *Cerrados* and *Mandioca & Fruticultura* active germplasm banks of Embrapa using Resistance Gene Analog (RGA) molecular markers. The genetic diversity of 163 plants, totaling 71 unimproved varieties and five cultivars, was evaluated. Nine combinations of primers were used, totaling 157 markers, with an average of 17.4 markers/combination. The mean expected heterozygosity was 0.18. The polymorphic information content was 0.15. The molecular variance showed 82% diversity existing within the Active Germplasm Banks (AGBs). The genotypes were structured in three gene pools, with a heterogeneous subgroup containing accessions from both banks, a homogeneous one with accessions from the *Cerrados* ABG and the last one containing mainly cultivars from the same. Principal Coordinate Analysis (PCoA) demonstrated the banks have similar genotypes. The results obtained emphasized the existence of passive genomic material for the development of new cultivars. The markers certify that these collections can contribute to breeding programs. There are shared alleles between unimproved varieties of the two ABGs; however, these varieties are not related to the cultivars.

Key words: Diversity; Genetic resources; Germplasm; Molecular marker; Passion fruit vine

Introdução

O gênero *Passiflora* L. possui 520 espécies, sendo o Brasil e a Colômbia os principais centros de diversidade, com 150 e 170 espécies distribuídas nos seus territórios, respectivamente (BERNACCI et al., 2014). Entre os locais de ocorrência natural, no Brasil encontra-se um amplo acervo das espécies conservadas em Bancos Ativos de Germoplasma – BAG. Nesses BAGs diferentes genótipos de espécies do gênero *Passiflora* são estudados e conservados, sendo a *Passiflora edulis* Sims. a espécie mais bem representada. Essa maior representatividade decorre do fato de ser o gênero mais cultivado no Brasil (FERREIRA, 2005; WETZEL et al., 2011).

Considerando o potencial estimado da cultura, que pode chegar a 50 ton.ha⁻¹, segundo o último Censo Agropecuário e os índices de produção municipal mais atualizados, em 2020 sua produtividade média esteve abaixo do esperado, perfazendo aproximadamente 14,8 ton.ha⁻¹ em todo o território nacional (IBGE, 2020). Entre os fatores determinantes que explicam a baixa produtividade do maracujá no país, estão os ataques de patógenos, a seca prolongada existente em algumas regiões do Brasil, bem como o manejo incorreto (CERQUEIRA-SILVA et al., 2018).

Devido aos fatores relatados, o mercado consumidor requer um material melhorado, a fim de reduzir os

custos de produção e otimizar a escala de produção da cultura (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016). Diante da demanda, estudos preliminares da diversidade genética de passifloras foram realizados e contribuíram com informações moleculares importantes para os produtores de maracujá. A partir dessa iniciativa, outros estudos foram realizados com o propósito de investigar características genético-moleculares responsáveis pela perda dessa produtividade (PAULA et al., 2010). Nesses estudos, os melhoristas buscaram aumentar a produtividade da cultura por meio da seleção de genótipos superiores, mas, para isto, foi necessário realizar etapas de pré-melhoramento (FALEIRO et al., 2005; MELETTI, 2011).

Quando se trata de pré-melhoramento, a prospecção, caracterização e conservação de germoplasmas são indispensáveis. Essas etapas contribuem para aumentar a variabilidade genética existente nos bancos de germoplasma e campos de produção, ao mesmo tempo em que promovem a manutenção destes através da inserção de materiais externos. Tais inserções, mediante triagem prévia realizada nos novos genótipos, enriquecem o BAG com características superiores passíveis de melhoramento (CERQUEIRA-SILVA et al., 2018).

Existem várias ferramentas para a caracterização genética dos vegetais. Um dos meios mais utilizados

em maracujazeiros são os marcadores moleculares (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014). Entre os diversos marcadores, os análogos a genes de resistência – RGA (*Resistance Gene Analogs*) têm se destacado quanto à sua eficiência para a obtenção de informações genéticas dessa natureza. A partir desses marcadores é possível acessar variações genéticas das espécies diretamente relacionadas aos genes de resistência às doenças. Esses genes caracterizam regiões conservadas no genoma, os quais são expressos por resistirem aos fatores adversos, como doenças e patógenos vegetais (COLLINS et al., 2001; SELVARAJ et al., 2011).

O uso desses marcadores em estudos genéticos de maracujazeiros está relacionado à caracterização molecular de germoplasma em BAG (PAULA et al., 2010), bem como aos estudos de diversidade genética visando à conservação (PEREIRA et al., 2015). Também contribuem para a construção de mapas genéticos, juntamente com outros tipos de marcadores (PEREIRA et al., 2013). Além disso, estudos de avaliação com marcador molecular dessa natureza em diferentes espécies e variedades comerciais de maracujazeiros trazem informações de iniciadores mais adequados e informativos para a caracterização genética (SOUZA et al., 2020).

Vista a necessidade de identificar as características de resistência em plantas e caracterizar geneticamente os acessos existentes em diferentes bancos de germoplasma de forma rápida, objetivou-se avaliar a diversidade genética e a estruturação de acessos de *Passiflora edulis* existentes nos Bancos Ativos de Germoplasma das unidades da Embrapa, no Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (Planaltina – DF) e no Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas – BA), por meio de marcadores moleculares RGAs.

Material e Métodos

Material vegetal

O estudo foi realizado em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Mandioca e Fruticultura, situada em Cruz das Almas – BA, sob as coordenadas geográficas (S12.4039, W39.0623), e Embrapa Cerrados, situada em Planaltina – DF, sob as coordenadas geográficas (S15.6034, W-47.7139). Para o estudo, foram coletadas amostras de folhas jovens e sadias de 163 plantas. Essas amostras compuseram três grupos, representados por: 34 variedades não melhoradas do BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura (com 99 plantas coletadas); 37 variedades não melhoradas do BAG Flor da Paixão da Embrapa Cerrados (com 37 plantas coletadas); e cinco cultivares (BRS Céu do Cerrado, BRS Gigante Amarelo, BRS Rubi do Cerrado, BRS Sol do Cerrado e BRS Mini maracujá roxo), também provenientes do BAG Flor da Paixão (com 27 plantas coletadas).

O DNA genômico foi extraído no Laboratório de Genética Molecular Aplicada (LGMA) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB, *campus* Juvino de Oliveira), no município de Itapetinga, Bahia. Para tanto foi utilizado o método do brometo de cetiltrimetilamônio 2% (CTAB) (DOYLE, 1990). Após extração do DNA, o material foi quantificado a partir de eletroforese horizontal em gel de agarose 1% (p/v), corado com 0,2% p/v de Gel Red Biotium® e comparado com uma série de concentrações do DNA do fago lambda (λ) (25 ng. μL^{-1} e 50 ng. μL^{-1}). Posteriormente, o DNA foi padronizado em 50 ng. μL^{-1} e armazenado a -20°C até o momento da genotipagem.

Genotipagem das amostras

Para a caracterização da diversidade genética, foram utilizados nove pares de iniciadores RGA previamente selecionados para o gênero *Passiflora* (Tabela 1) (PAULA et al., 2010; SOUSA et al., 2015). A despeito de comporem a classe dos marcadores dominantes, cuja genotipagem não permite a distinção de alelos (ou seja, a identificação direta de heterozigotos), a heterozigosidade esperada (*He*) pode ser estimada de forma aproximada considerando a hipótese do EHW.

TABELA 1: Combinações de nove iniciadores RGA (*Resistance Gene Analogs*) utilizados para caracterização de *Passiflora edulis* Sims.; e suas respectivas sequências de nucleotídeos.

Iniciadores	Sequência 5' – 3'
S1 + NBSr1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG GGTGGGGTTGGGAAGACAACGYCT
S2 + As1	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC CAAGGCTAGTGGCAATCC
S1 + As1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG CAAGGCTAGTGGCAATCC
S1 + As2	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG IAAIGCIAIGIGGIAAICC
NBSf1 + NBSr1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC GGTGGGGTTGGGAAGACAACGYCT
NBSf1 + As1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC CAAGGCTAGTGGCAATCC
RGA1f + RGA2r	AGTTTATTATTYSATTGCT CACACGGTTTAAATTCTCA
S1+As3	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG IAGIGCIAIGIGGIAIGICC
As1 + As3	CAAGGCTAGTGGCAATCC IAGIGCIAIGIGGIAIGICC

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

Análises descritivas e estatísticas

As reações de amplificação via Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foram realizadas em termociclador Veriti™ 96-Well ThermalCycler (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA). Cada mix, de volume total de 16 µL, foi composto por 8 µL de DNA genômico (2 ng.µL⁻¹); 1 µL de cada iniciador RGA, sendo 2 iniciadores; 1 µL do mix de dNTP; 1 µL do cloreto de magnésio (MgCl₂); 1,7 µL do 10X Buffer; 0,11 µL da Taq DNA Polymerase; e 2,19 µL de água ultrapura (q.s.p). O programa de amplificação incluiu desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C; seguida por 34 ciclos (95°C por 30 segundos para desnaturação, 37°C por 1 minuto para anelamento, 72°C por 1 minuto e 20 segundos para extensão); e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% (m/v) em solução TBE (0,5X) (Tris/Borato/EDTA) por 2 h a uma voltagem de 120 V. Foi utilizado como

intercalante do DNA o GelRed® (Biotium Inc.) e o 1 Kb Plus DNA Ladder standard (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) foi o padrão de peso molecular utilizado para comparação dos fragmentos amplificados obtidos. Após a amplificação, os fragmentos obtidos foram observados em transluminador UV e fotodocumentados, ambos pelo sistema LPIX-EX (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil).

O padrão de amplificação obtido foi convertido em dados binários de presença e ausência de bandas (zero e um) com o auxílio do Excel. A Análise Bayesiana da estrutura populacional foi realizada com *Software STRUCTURE* (PRITCHARD et al., 2000). Por sua vez, estimativas de diversidade e estruturação também foram calculadas utilizando o *software* GenAEx v.6.5, avaliando a distribuição dos genótipos em espaço bidimensional (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

Para a análise Bayesiana da estrutura populacional, assumiu-se como parâmetro a avaliação do número de *pools* gênicos (K) de 1 a 10, com 10 simulações para cada K. O período de *burn-in* aplicado foi de 100.000 interações e o número de repetições MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) foi de 1.000.000. A escolha do valor de Delta K com melhor representatividade da estrutura genética foi baseada no método descrito por Evanno et al. (2005), com o auxílio da ferramenta online *Structure Harvester* (EARL; VONHOLDT, 2012). Para efeito de análise, uma planta foi considerada pertencente a um *pool* gênico quando esta apresentou identidade mínima de 70% com este *pool* ($Q \geq 0,7$). Valores inferiores a 70% foram considerados misturas de *pools* gênicos, cujas misturas correspondem à heterogeneidade.

Para estimar a estrutura genética entre os dois BAGs considerados neste estudo, bem como entre os três grupos considerados (BAG Mandioca e Fruticultura; BAG Flor da Paixão; e cultivares BRS da Embrapa), realizou-se a análise da Variância Molecular (AMOVA). Análises de Coordenadas Principais (PCoA) foram realizadas com intuito de se verificar a distribuição total das plantas amostradas, bem como a distribuição das plantas em cada um dos três grupos considerados no estudo.

As análises descritivas, associadas às ampliações, permitiram a obtenção da quantidade de marcadores por combinação de iniciadores; quantidade de marcadores exclusivos de cada BAG; e quantidade de marcadores raros (considerados neste estudo como aqueles com ocorrência em até 5% das plantas avaliadas). Estimativas das frequências alélicas, heterozigiosidade esperada, considerando o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), e o conteúdo médio de informação polimórfica (PIC) também foram realizados com o auxílio do *software* GENES (CRUZ, 2013). O PIC foi calculado de acordo com a fórmula proposta por Botstein et al. (1980):

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

quência do alelo i ; X_j = frequência do marcador; k = número de alelos. A classificação deste parâmetro é de acordo o valor, onde índices abaixo de 0,25 são levemente informativos; entre 0,25 e 0,50, razoavelmente informativos; e acima de 0,50 altamente informativos. Já a He do locus foi calculada pela fórmula proposta por Nei (1973): $He = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2$, sendo, X_i = frequência do alelo i ; k = número de alelos, respectivamente.

Resultados

Do total de 157 marcadores, obteve-se média de 17,4 marcadores por combinação de iniciadores. A combinação dos iniciadores S1+As3 se destacou quanto ao número de marcadores gerados, apresentando um total de 29. Já a combinação NBSf1+NBSr1 foi a que obteve menor número de marcadores, com apenas 12. Em relação aos marcadores raros, os resultados apresentaram total de 39 marcadores, representando 24,8% do total. Ao avaliar os bancos separadamente, observou-se que o BAG Mandioca e Fruticultura e Cerrados apresentaram valores semelhantes, com 33,1% e 33,3% de marcadores raros, respectivamente, enquanto as cultivares apresentaram apenas 2,8% desses marcadores raros (Tabela 2).

Os marcadores exclusivos foram observados em ambos os bancos, sendo que o BAG Mandioca e Fruticultura, também devido ao maior número de plantas avaliadas, apresentou maior número de marcadores exclusivos (19). Nas cultivares, esses marcadores apresentaram o maior número. Os pares de iniciadores RGAs que se destacaram foram as combinações S2+As3 no BAG Mandioca e Fruticultura, S1+As2 no BAG Cerrados e NBSf1+As1 nas cultivares.

TABELA 2: Análise descritiva e diversidade genética obtida a partir de 9 combinações de iniciadores RGAs e 163 genótipos de *Passiflora edulis* Sims. oriundos de Bancos Ativos de Germoplasmas das Embrapa Cerrados e Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Combinação iniciadores RGA	Marcadores	Marcadores raros	Marcadores exclusivos VNM Mandioca e Fruticultura	Marcadores exclusivos VNM Cerrados	Marcadores exclusivos cultivares	He	PIC
S2 + As1	18	6	5	1	0	0,21	0,17
S1 + As2	18	13	1	3	3	0,16	0,13
S1 + As1	19	8	3	2	3	0,13	0,11
As1 + As3	14	3	0	1	3	0,27	0,22
S1 + NBSr1	17	5	2	0	1	0,17	0,15
S1 + As3	29	18	7	0	3	0,12	0,10
RGA1f + RGA2r	14	4	1	0	2	0,28	0,23
NBSf1 + As1	16	7	0	2	4	0,16	0,14
NBSf1 + NBSr1	12	3	0	0	2	0,13	0,12
TOTAL	157	39	19	9	21	MÉDIAS	
						0,18	0,15

VNM: Variedades não melhoradas; He : Heterozigiosidade esperada; PIC: Conteúdo de Informação Polimórfica.

A heterozigosidade esperada variou de 0,12, para os marcadores revelados pela combinação de iniciadores S1+As3, até 0,28, para os iniciadores RGA1f+RGA2r. A média de *He* para os 9 pares de iniciadores foi de 0,18. O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,10 a 0,23 para os mesmos pares de iniciadores, e a média do PIC foi de 0,15.

Quanto à inferência Bayesiana, está indicado o número de três *pools* gênicos ($K = 3$), sendo este o número mais provável existente para os 71 acessos e cinco cultivares pertencentes às 163 plantas avaliadas (Figura 1).

A estruturação $K = 2$ separa as variedades não cultivadas das cultivares, enquanto a estruturação com $K = 4$ apresenta subestruturas que demonstram acessos únicos em cada BAG, que possuem relação alélica e as cultivares. O histograma com $K = 3$, indicado

como mais provável em função do seu score de Delta K, ilustra a estruturação dos genótipos avaliados com distintos *pools* gênicos no BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura, homogeneidade nas variedades do BAG da Embrapa Cerrados e *pool* gênico distinto para as cultivares (Figura 1).

A análise de variância molecular (AMOVA) indicou estrutura genética entre grupos e também elevada diversidade genética dentro dos grupos, tanto ao se considerar a distribuição dos acessos em dois grupos (BAGs) bem como em três grupos (variedades não cultivadas distribuídas nos dois BAGs e grupo de cultivares) (Tabela 3). Ao se considerar a distribuição dos acessos em dois grupos, a distribuição da variabilidade foi de 82% (dentro) e 18% (entre) grupos, enquanto ao se considerar três grupos a distribuição da variabilidade foi de 68% (dentro) e 32% (entre) grupos.

FIGURA 1: Histograma de estruturação dos *pools* gênicos, para as 34 variedades não melhoradas do BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura (com 99 plantas coletadas); as 37 variedades não melhoradas do BAG Flor da Paixão da Embrapa Cerrados (com 37 plantas coletadas); e as cinco cultivares também provenientes do BAG Flor da Paixão (com 27 plantas coletadas), todas associadas à *Passiflora edulis* Sims.

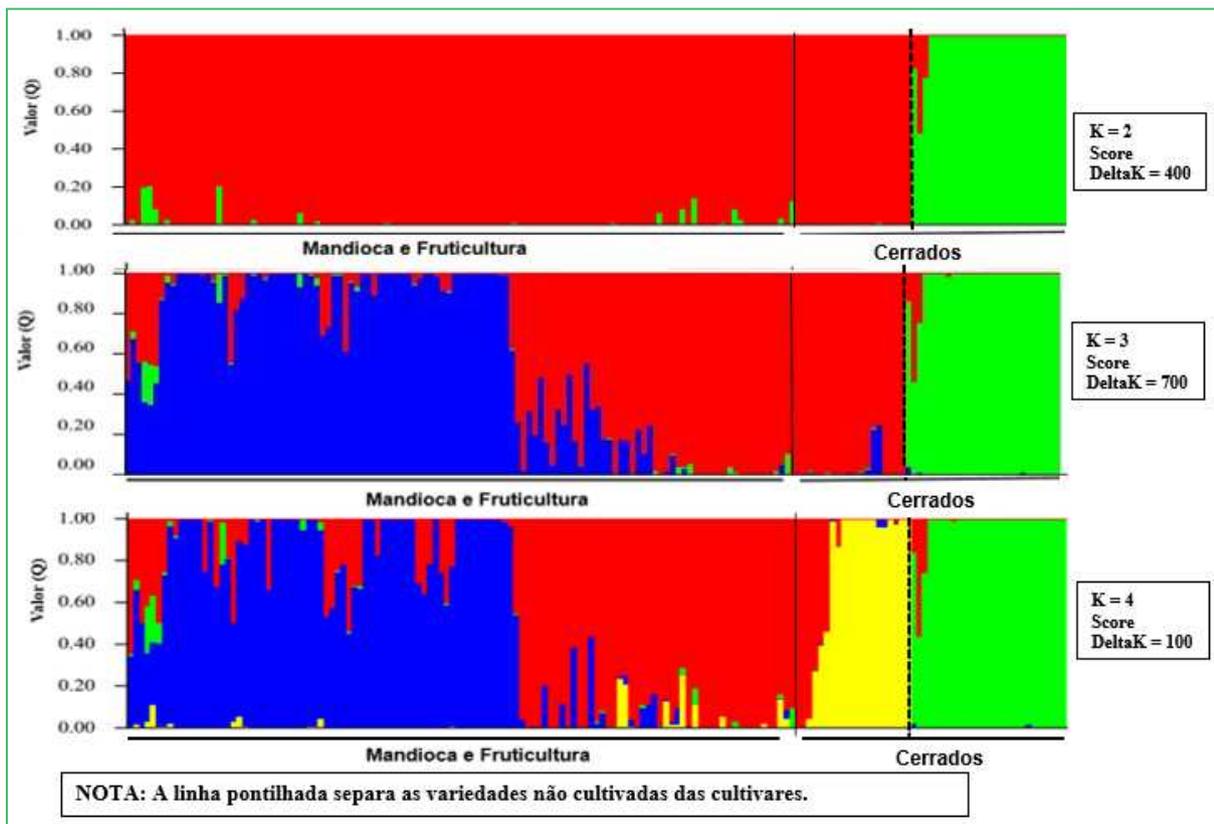


TABELA 3: Análise molecular de variância (AMOVA) para 163 plantas de *Passiflora edulis* Sims., distribuídas no BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura (com 34 variedades não melhoradas, representadas por 99 plantas); no BAG Flor da Paixão da Embrapa Cerrados (com 37 plantas coletadas, representadas por uma planta cada); e cinco cultivares também provenientes do BAG Flor da Paixão (representadas com 27 plantas), todas associadas à *Passiflora edulis* Sims em dois e três grupos, caracterizados a partir da genotipagem com nove combinações de iniciadores RGAs.

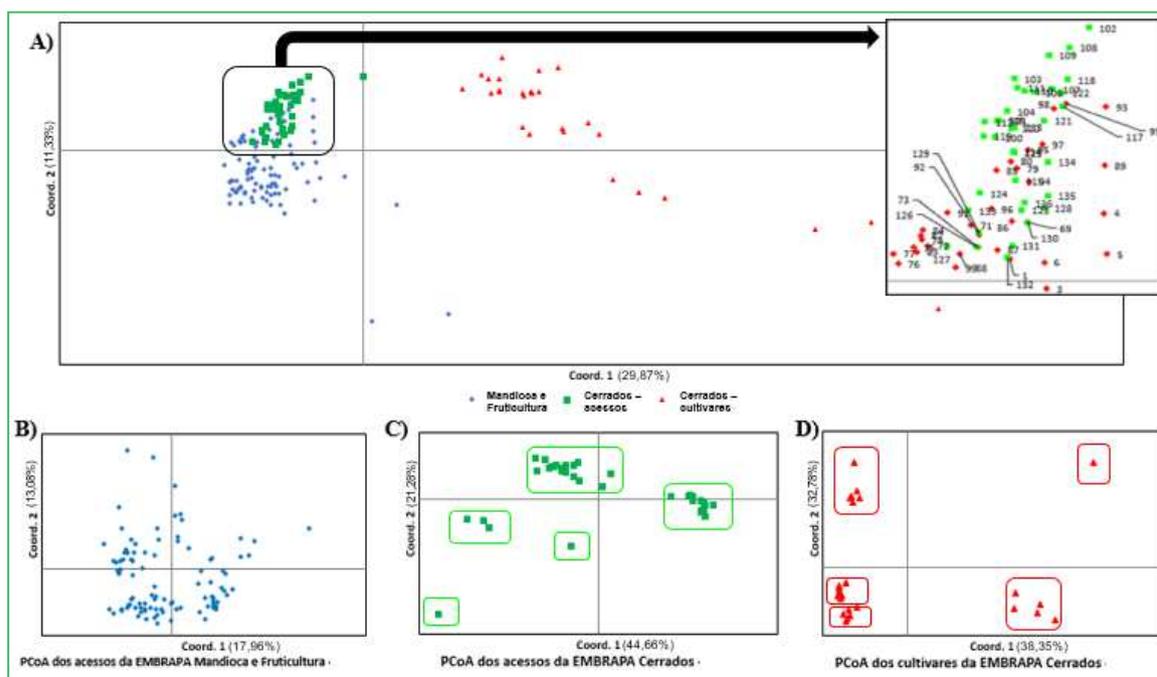
Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Varição (%)	
Dois Grupos*	Entre Grupos	1	364,7	4,43	18
	Dentro de grupos	161	3.220,6	20	82
	Total	162	3.585,3	24,44	100
Três Grupos**	Entre Grupos	2	770,2	8,17	32
	Dentro de grupos	160	2.815,1	17,59	68
	Total	162	3.585,3	25,76	100

* Composto pelas variedades não cultivadas dos dois BAGs; ** Composto pelas variedades não cultivadas dos dois BAGs e da Cultivares.

Por sua vez, a partir da Análise de Coordenadas Principais (PCoA), foi possível obter quatro gráficos de PCoA, um relacionando todas as 163 plantas e outros três, representativos das variedades não cultivadas em cada um dos dois BAGs amostrados e das cultivares.

A informação trazida neste gráfico da PCoA permitiu visualizar a formação de grupos relacionados aos previamente considerados na coleta das amostras dos acessos de *P. edulis* (Figura 2).

FIGURA 2: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) de acessos de *P. edulis* Sims. referente: (A) aos acessos das variedades não melhoradas e cultivares de *P. edulis*. obtidos nos Bancos de Germoplasma das unidades da Embrapa Mandioca e Fruticultura e Embrapa Cerrados; (B) as análises de PCoA referente às variedades não melhoradas presentes no BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura; (C) as análises de PCoA referente às variedades não melhoradas presentes no BAG da Embrapa Cerrados; (D) as análises de PCoA referente às cultivares.



Discussão

Analisando o número médio de marcadores, este corrobora com a literatura para espécies do mesmo gênero *Passiflora*, onde Paula et al. (2010), ao estudar acessos de maracujá representados por oito espécies e um híbrido, a partir de seis pares de RGA, reportaram 99 marcadores com média de 16,5 por combinação de iniciador, em que 96% foram polimórficos.

Dos pares que apresentaram como marcadores para as amostras, observou-se que algumas combinações de pares de iniciadores RGAs S2+As1 apresentaram perspectivas para estudos interespecíficos (PAULA et al., 2010). Portanto esta observação demonstrou o potencial das combinações de RGA para estudos de diversidade genética de baixo custo.

Ao avaliar os bancos separadamente, observou-se que o BAG Mandioca e Fruticultura e o BAG Flor da Paixão apresentaram valores semelhantes, com 33,1% e 33,3% de marcadores raros. Enquanto isso, as cultivares apresentaram 2,8%, sendo o par de iniciadores S1+As3 o responsável pela maior quantidade desses marcadores. Essa observação enfatiza a importância do estudo para verificar a ocorrência de marcadores relacionados a alguma característica de interesse.

As cultivares avaliadas apresentaram maior número de marcadores exclusivos. Acredita-se que os marcadores exclusivos decorrem do melhoramento do material advindo de cruzamentos intra e interespecíficos, desenvolvidos pelas duas unidades da Embrapa. Essa exclusividade apresentada pelos pares de iniciadores é importante do ponto de vista econômico, bem como para otimizar a manutenção dos BAGs.

A heterozigosidade esperada, neste trabalho estimada considerando a hipótese teórica do EHW, apresentou uma variabilidade de acordo com o observado para espécies do gênero *Passiflora*. Em estudo intraespecífico de 66 progênies de dois ciclos de seleção de *P. edulis*, utilizando marcadores microssatélites, observaram-se médias de *He* de 0,18 a 0,20 e PIC entre 0,16 e 0,18 para as progênies, respectivamente (REIS et al., 2011). Não obstante, em outro estudo, com *P. edulis*, porém com marcadores microssatélites, o PIC apresentou valor de até 0,81 (OLIVEIRA et al., 2005).

Segundo os autores, esse valor foi considerado alto, uma vez que a eficiência do marcador está nos índices de valores $\geq 0,5$ (ZANELLA et al., 2017). Entretanto o perfil genético-molecular apresentado no presente estudo pode ser se dado devido à natureza do material já domesticado, característica de acessos de germoplasmas protegidos. Mesmo em populações naturais, são observadas estimativas de diversidade relativamente baixas para uma espécie alógama, a exemplo dos valores de *He* encontrados para *P. cincinnata* Mast. (média de *He* = 0,30) em seis populações naturais distribuídas no estado da Bahia, Brasil (SILVA et al., 2022).

A baixa diversidade obtida no presente trabalho corrobora estudos anteriores, ao reportarem que espécies do gênero *Passiflora*, avaliadas com microssatélite, parecem possuir baixa variabilidade (CERQUEIRA-SILVA et al., 2015). No referido estudo, Cerqueira-Silva e colaboradores realizaram a caracterização e seleção de acessos de *P. edulis*. e uma cultivar (BRS Gigante Amarelo) e observaram apenas 1% de diversidade genética existente entre os grupos avaliados (CERQUEIRA-SILVA et al., 2012; 2014).

A caracterização dos BAGs é essencial para verificar tanto a diversidade genética existente quanto para possibilitar comparações temporais entre períodos de recomposição/regeneração do banco, especialmente quando se utiliza de bancos de sementes como fonte para regeneração do BAG. A partir dessa caracterização é possível conhecer quanto a variabilidade genética entre os acessos conservados *ex situ*. De posse desse conhecimento será possível monitorar se o equilíbrio da frequência alélica está sendo mantido. Informações como essas são importantes para evitar a perda genética desses recursos e identificar acessos com características de maior interesse para o cultivo e melhoramento do maracujazeiro. Embora escassos, estudos comparativos dessa natureza, envolvendo tanto populações naturais quanto acessos mantidos em Bancos de germoplasma e variedades cultivadas, já estão disponíveis para espécies de maracujazeiros (SILVA et al., 2022).

Segundo a estruturação observada no histograma (Figura 1), o BAG Mandioca e Fruticultura apresentou genótipos de *P. edulis* homogêneos e heterogêneos neste BAG, possuindo de dois até três *pools* gênicos na

constituição genética. Nessa análise, observou-se que existe uma relação entre genótipos da Embrapa Cerrados, grupo menos estruturado, com alguns da Embrapa Mandioca e Fruticultura, grupo mais estruturado.

O comportamento estrutural de cada banco aqui apresentado tem relação com a forma de manutenção de cada um deles. O BAG Cerrados, por exemplo, utiliza técnica de reprodução vegetativa, com geração de clones, mantendo o grupo homogêneo, com menor variabilidade genética, entre os acessos. Já o BAG Mandioca e Fruticultura realiza a renovação de suas plantas através de polinização induzida e reprodução cruzada entre plantas do mesmo acesso, de forma a gerar um fruto e sementes específicas de cada acesso que compõe o BAG. Embora a heterozigosidade e a informação polimórfica tenham se apresentado baixas, essa reprodução orientada e de forma cruzada aumenta a variabilidade genética existente, favorecendo a estruturação mais heterogênea.

Observando a PCoA (Figura 2) foi possível identificar formação de grupos entre os acessos e entre as cultivares. Assim como observado na estruturação, houve sobreposição de parte da informação genética dos acessos presente nos dois BAGs (Figura 1). Ainda em relação à dispersão dos acessos no gráfico de PCoA, foi possível verificar maior dispersão das plantas dos acessos do BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura do que do BAG Flor da Paixão, mantido na Embrapa Cerrados (Figura 2A), em que a representação gráfica demonstrou uma maior dispersão entre os acessos do banco da Mandioca e Fruticultura. A partir da sobreposição de quatro pontos, também foi possível observar a relação genética existente entre os acessos de ambos os bancos (Figuras 1 e 2A).

Os componentes principais individualmente gerados para cada grupo apresentaram a dispersão existente dentro de cada BAG e entre as cultivares. O BAG Mandioca e Fruticultura (Figura 2B) possui uma alta dispersão no gráfico, o que garante a sua maior variabilidade. Essas características podem ter alguma relação com os acessos do BAG Cerrados, pois para esse BAG observou-se pelo menos cinco grupos (Figura 2C). Já as cultivares apresentaram quatro grupos distintos,

sendo dois mais próximos, distribuídos em um dos quadrantes do PCoA (Figura 2D).

Este estudo mostrou que os BAGs necessitam de maiores informações sobre acessos de diferentes espécies e fontes de variabilidade genética. Uma vez que, do total de acessos inseridos nos BAGs existentes em centros de pesquisa no Brasil, aproximadamente 25% são de espécies comerciais. Esse fato é explicado pela dificuldade em manter um BAG, pois sua gestão demanda investimento e recursos humanos capacitados para sua manutenção. Um banco bem monitorado garante maior variabilidade genética cujos alelos superiores são indispensáveis aos estudos de melhoramento.

Os genótipos referentes às cultivares distribuíram-se nos quadrantes, havendo assim uma relação mais distante com os acessos de ambos os bancos (Figura 2A). A distribuição das cultivares nos quatro quadrantes (Figura 2D) indica a variabilidade genética dessas amostras. Com isso é possível inferir que a distribuição relacionada às cultivares e à origem das matrizes utilizadas para o seu desenvolvimento resultaram em uma estruturação homogênea, porém, com alta variabilidade genética entre eles e os demais acessos.

É notória a existência de diversidade genética intraespecífica entre os acessos de *P. edulis*, presentes nos BAGs da Embrapa Cerrados e Mandioca e Fruticultura. Embora essa informação seja importante na seleção de acessos para os programas de melhoramento genético, ainda não é possível indicar indivíduos como progênie para essa finalidade, pois é necessário realizar uma avaliação fenotípica em conjunto, observando a relação fenótipo-genótipo (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016). Tais características podem ser identificadas pelos descritores morfoagronômicos, sendo esta uma das técnicas de pré-seleção de genótipos bem explorada pelos geneticistas (WETZEL et al., 2011; CERQUEIRA-SILVA et al., 2018).

Embora ainda seja necessário relacionar genótipo com fenótipo, bem como caracterizar demais materiais existentes além dos novos que serão incorporados, os dados apresentados no presente estudo fornecem suporte para iniciar uma seleção de genótipos de maior interesse. Assim, buscando a composição de coleções-núcleo com

alta diversidade genética. Entretanto, os resultados do presente estudo certificaram que os marcadores RGAs são ferramentas eficientes para estudos genético-moleculares; podendo ser aplicados na caracterização genética de bancos ativos de germoplasma de *Passiflora*.

Espera-se que os resultados apresentados encorajem futuros estudos, uma vez que as informações obtidas nesta pesquisa contribuem para o aprimoramento/uso dos germoplasmas, visando à conservação dos recursos genéticos dos maracujazeiros. Além disso, esta pesquisa subsidiará melhoramento de novas cultivares, já que a diversidade genética individual de cada banco se apresentou alta, o que favorece a obtenção de novos alelos responsáveis pelas características de interesse.

Os marcadores RGA certificam que a coleção *ex situ* de *P. edulis* possui alta diversidade genética. Existe compartilhamento de alelos entre as variedades não melhoradas dos dois BAGS, porém, as respectivas variedades não possuem relação com as cultivares.

Agradecimentos

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB, *campus* Juvino Oliveira) e às agências de fomento à pesquisa, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelos recursos financeiros (Projetos PIE0014/2016; DTE0001/2016 e APP0005/2016) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de estudo (Mestrado e PNPd).

Referências

- 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**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2014. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB182>>. Acesso em: 14 fev. 2022.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Houston, v. 32, p. 314-331, 1980.
- CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; FALEIRO, F. G.; JESUS, O. N.; SANTOS, E. S. L.; SOUZA, A. P. Passion fruit (*Passiflora* spp.) breeding. In: AL-KHAYRI, J.; JAIN, S.; JOHNSON, D. (Ed.). **Advances in plant breeding strategies: fruits**. Cham: Springer, 2018. p. 929-951.
- CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; JESUS, O. N.; OLIVEIRA, E. J.; SANTOS, E. S. L.; SOUZA, A. P. Characterization and selection of passion fruit (yellow and purple) accessions based on molecular markers and disease reactions for use in breeding programs. **Euphytica**, Amsterdam, v. 202, n. 3, p. 345-359, 2015.
- CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; JESUS, O. N.; SANTOS, E. S. L.; CORRÊA, R. X.; SOUZA, A. P. Genetic breeding and diversity of the genus *Passiflora*: progress and perspectives in molecular and genetic studies. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 15, n. 8, p. 14122-14152, 2014.
- CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; SANTOS, E. S.; CONCEIÇÃO, L. D.; CARDOSO-SILVA, C. B.; PEREIRA, A. S.; OLIVEIRA, A. C.; CORRÊA, R. X. Genetic variation in a wild population of the “sleep” passion fruit (*Passiflora setacea*) based on molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, Waco, v. 11, n. 1, p. 731-738, 2012.
- COLLINS, N.; PARK, R.; SPIELMEYER, W.; ELLIS, J.; PRYOR, A. J. Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance genes. **Genome**, Saskatoon v. 44, n. 3, p. 375-381, 2001.
- CRUZ, C. D. GENES – *Software* para análise de dados em estatística experimental e em genética quantitativa. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.
- DOYLE, J. J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v. 12, p. 13-15, 1990.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, Dordrecht, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the *software* STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Embrapa Cerrados: Livro técnico CPAC (INFOTECA-E), Coleção 500 perguntas, 500 respostas. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2016. 341 p.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 187-209.
- FERREIRA, F. Recursos genéticos de *Passiflora*. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 41-50.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção de maracujá**. 2020. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/maracuja/br>>. Acesso em: 14 fev. 2022.

- MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 83-91, 2011.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.
- OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Molecular Ecology Notes**, Weinheim, v. 5, n. 2, p. 331-333, 2005.
- PAULA, M. da S.; FONSECA, M. E. de N.; BOITEUX, L. S.; PEIXOTO, J. R. Genetic characterization of *Passiflora* species by analog markers of resistance genes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, p. 222-229, 2010.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012.
- PEREIRA, D. A.; CORRÊA, R. X.; OLIVEIRA, A. C. Molecular genetic diversity and differentiation of populations of 'somnus' passion fruit trees (*Passiflora setacea* DC): implications for conservation and pre-breeding. **Biochemical Systematics and Ecology**, Maryland Heights, v. 59, p. 12-21, 2015.
- PEREIRA, G. S.; NUNES, E. S.; LAPERUTA, L. D. C.; BRAGA, M. F.; PENHA, H. A.; DINIZ, A. L.; MUNHOZ, C. F.; GAZAFFI, R.; GARCIA, A. A. F.; VIEIRA, M. L. C. Molecular polymorphism and linkage analysis in sweet passion fruit, an outcrossing species. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 162, n. 3, p. 347-361, 2013.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Pittsburgh, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.
- REIS, R. V.; OLIVEIRA, E. J.; VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SILVA, M. G. M. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro-amarelo detectada por marcadores microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, p. 51-57, 2011.
- SELVARAJ, C. I.; BABU, S.; SANKAR, P. D.; NAGARAJAN, P.; SABESAN, M. Genome scanning for identification of resistance gene analogs (RGAs) in a highly durable blast resistance rice (*Oryza sativa* L.) cultivar, moroberekan. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 34, p. 6418-6433, 2011.
- SILVA, T. S. S.; MEIRA, M. R.; VIEIRA, J. G. P.; SANTOS, E. S. L.; JESUS, O. N.; FALEIRO, F. G.; CERQUEIRA-SILVA, C. B. C. Structure and molecular genetic diversity in natural populations and active germplasm banks of *Passiflora cincinnata* Mast. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 82, n. 4, p. 628-637, 2022.
- SOUSA, A. G. R.; SOUZA, M. M.; MELO, C. A. F.; SODRÉ, G. A. ISSR markers in wild species of *Passiflora* L. (Passifloraceae) as a tool for taxon selection in ornamental breeding. **Genetics and Molecular Research**, Waco, v. 14, n. 4, p. 18534-18545, 2015.
- SOUZA, L. N. B.; DIAS, N. D. S. C.; SANTANA, V. O.; SILVEIRA, L. A.; MEIRA, M. R.; SANTOS, E. S. L.; FALEIRO, F. G.; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. Amplification test and selection of markers analogue to resistance genes in species and commercial varieties of *Passiflora* spp. **Multi-Science Journal**, Uratai, v. 3, n. 1, p. 65-71, 2020.
- WETZEL, M. M. V. S.; GIMENES, M. A.; PÁDUA, J. G.; JOSÉ, S. C. B. R.; NETO, L. G. P. Conservação de espécies silvestres com potencial de utilização em programas de pré-melhoramento na coleção base da Embrapa. In: LOPES, M. A.; FÁVERO, A. P.; FERREIRA, M. A. J. F.; FALEIRO, F. G.; FOLLE, S. M.; GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Pré-melhoramento de Plantas** – Estado da Arte e Experiências de Sucesso. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. p. 99-122.
- ZANELLA, C. M.; TURCHETTO, C.; PALMA-SILVA, C.; SPERB-LUDWIG, F. Microsatélites: metodologias de identificação e análise. In: TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. (Ed.). **Marcadores moleculares na Era Genômica: metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p. 94-117.