

**INTEGRANDO A ABORDAGEM CLÁSSICA E MOLECULAR NA  
PESQUISA DO MARACUJAZEIRO CONTRA O CABMV**

**JULIE ANNE VIEIRA SALGADO DE OLIVEIRA**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO - UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
AGOSTO - 2023**

**INTEGRANDO A ABORDAGEM CLÁSSICA E MOLECULAR NA  
PESQUISA DO MARACUJAZEIRO CONTRA O CABMV**

**JULIE ANNE VIEIRA SALGADO DE OLIVEIRA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador: Prof. Alexandre Pio Viana

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
AGOSTO – 2023

### FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

O48

Oliveira, Julie Anne Vieira Salgado de.

INTEGRANDO A ABORDAGEM CLÁSSICA E MOLECULAR NA PESQUISA DO MARACUJAZEIRO  
CONTRA O CABMV / Julie Anne Vieira Salgado de Oliveira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

91 f.

Bibliografia: 63 - 79.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual  
do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2023.

Orientador: Alexandre Pio Viana.

1. Marcadores moleculares. 2. REML/BLUP. 3. Diversidade genética. 4. Híbridos  
interespecíficos. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

# INTEGRANDO A ABORDAGEM CLÁSSICA E MOLECULAR NA PESQUISA DO MARACUJAZEIRO CONTRA O CABMV

**JULIE ANNE VIEIRA SALGADO DE OLIVEIRA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Aprovada em 07 de agosto de 2023

Comissão Examinadora:



Prof.<sup>a</sup> Eileen Azevedo Santos (D.Sc, Genética e Melhoramento de Plantas) - UNEMAT



Prof.<sup>a</sup> Helaine Christine Cancela Ramos (D. Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) – UENF



Dr. Natan Ramos Cavalcante (D.Sc, Genética e Melhoramento de Plantas) - UENF



Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF  
(Orientador)

## DEDICATÓRIA

Filipe, mozo, *in memoriam*, que me deu forças para concluir meus planos e realizar meus sonhos.

**“The ones that love us never really leave us.”**

*Sirius Black*

## AGRADECIMENTOS

Uma das melhores partes de escrever um trabalho acadêmico é poder dar os devidos agradecimentos, da minha forma, às pessoas que tornaram tudo possível.

Primeiramente a Deus que me permitiu estar aqui, ao olhar atento, é notável quantas bênçãos me foram concedidas nesses dois anos de mestrado.

É essencial agradecer aos meus colegas do LMGV e da pós-graduação que me acompanharam nas matérias, no Agrícola e tornaram essa jornada mais leve. À Naty eu agradeço por ser minha companheira de laboratório, por todos cafés e conversas. À Débora os meus mais sinceros agradecimentos por me passar tanto conhecimento sobre a cultura do maracujá, todas as dicas, pelas videochamadas que me ajudaram a construir este trabalho e todas suas ajudas no campo.

Ao Luís, meu colega, que veio para dividir o experimento e me ajudou muito no campo, nunca reclamava e sempre pegava pesado. Ao Natan, meu querido 'pós-doc', por saber exatamente tudo o que eu precisava fazer e me passar cada instrução com paciência, por todas as vezes que estive no agrícola nos auxiliando e por cada dado que me ajudou a interpretar.

Ao Alex por todo auxílio na molecular, todos os dados que me ajudou a rodar e seu humor ácido que tornou os dias mais divertidos. À Marcela por ser incrível na molecular, me ajudar com a metodologia e as atividades do laboratório, e me aconselhar sempre.

Aos demais colegas de laboratório: Flávia, Thays, Joameson, por todas as ajudas no campo, todos os cafés e as risadas na salinha do P8, também à Lidiane e Letícia.

Um agradecimento especial ao meu orientador, o professor Alexandre, por me confiar este trabalho tão importante e acreditar no meu potencial. E também à Eileen que, mesmo de longe, nunca deixou de me auxiliar. Ao secretário, Daniel, que sempre correu atrás para me ajudar com os documentos e processos.

Aos professores da pós-graduação, cada um que transmitiu seus conhecimentos, especialmente às professoras Telma, Helaine e Rosana, acadêmicas que admiro muito. Aos colegas do Ganho Genético que fizeram a jornada mais construtiva e divertida, organizar um evento com vocês foi uma parte gratificante do mestrado.

Meus agradecimentos aos familiares e amigos, que não necessariamente fizeram parte desse trabalho, mas que por estarem na minha vida, tornaram muito mais fácil passar por essa etapa que teve um início tão complicado, se não fosse cada um deles me apoiando teria sido muito mais difícil.

Ao meu pai, Ciro, que mesmo com alguns olhares reprovadores (risos) sempre me apoiou e nunca deixou de acreditar nas minhas escolhas. À minha madrastra, Renata, que me deixou usar sua impressora a cada 15 dias por um ano inteirinho, tornando possível as avaliações desse trabalho.

Aos eternos amores da minha vida, vovó e vovô, que torcem mais que ninguém pelas minhas conquistas! Vóvis merece todo reconhecimento do mundo!

Ao meu gêmeo, o Zé, que mais uma vez me ajudou na formatação do meu trabalho. Ao meu irmão mais velho, João, que investiu no meu sonho internacional. À mamãe, que é minha maior apoiadora, a melhor pessoa que eu conheço.

Minha amiga Liza, muito obrigada por ser você, minha *best*, meu amor, por defender as minhas ideias, nunca criticar e nem julgar. Nana e Babi, minha lindinha e minha docinho, eu sou tão grata por ter vocês e as amo muito.

À CAPES pela minha primeira bolsa do mestrado e ao CNPq pela oportunidade de inserção no meio científico. À FAPERJ pela bolsa nota 10. E principalmente à UENF, todos os colaboradores e professores, por possibilitar um ensino de qualidade num ambiente tão incrível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
2.1 Geral .....	4
2.2 Específicos.....	4
3. CAPÍTULOS.....	5
3.1 ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS DA POPULAÇÃO SEGREGANTE RC <sub>3</sub> E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO CABMV (cowpea aphid- borne mosaic vírus).....	5
3.1.1 INTRODUÇÃO .....	5
3.1.2 REVISÃO DE LITERATURA .....	7
3.1.2.1 Aspectos gerais da cultura do maracujazeiro.....	7
3.1.2.2 Importância econômica .....	9
3.1.2.3 Melhoramento genético do maracujazeiro e o método do retrocruzamento.....	10
3.1.2.4 Virose do endurecimento dos frutos.....	13
3.1.2.5 Modelos mistos (REML/BLUP).....	14
3.1.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1.3.1 Material genético e obtenção das progênes.....	16
3.1.3.2 Instalação e condução do experimento.....	18

3.1.3.3 Resistência ao CABMV .....	20
3.1.3.4 Seleção de genótipos via metodologia REML/BLUP .....	22
3.1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
3.1.4.1 Severidade dos sintomas .....	23
3.1.4.2 Estimativa dos parâmetros genéticos .....	26
3.1.4.3 Seleção de genótipos e estimativa de ganho genético por BLUP .....	28
3.1.5 CONCLUSÕES .....	34
3.2 APLICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM POPULAÇÃO SEGREGANTE RC <sub>3</sub> PARA ESTIMAR DISTÂNCIAS GENÉTICAS E AUXILIAR NA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS .....	35
3.2.1 INTRODUÇÃO .....	35
3.2.2 REVISÃO DE LITERATURA .....	37
3.2.2.1 Marcadores moleculares e microssatélites .....	37
3.2.2.2 Melhoramento do maracujazeiro com marcadores moleculares .....	39
3.2.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	42
3.2.3.1 Extração e quantificação do DNA genômico .....	42
3.2.3.2 Triagem dos <i>primers</i> .....	43
3.2.3.3 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para marcadores SSR .....	47
3.2.3.4 Análises estatísticas .....	47
3.2.3.5 Proporção genômica dos genótipos .....	50
3.2.3.6 Análise da estrutura genética da população .....	51
3.2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	51
3.2.4.1 Parâmetros de diversidade via marcadores SSR .....	51
3.2.4.2 Dissimilaridade via UPGMA .....	54
3.2.4.3 Análise da proporção do genoma parental .....	57
3.2.4.4 Estrutura genética da população .....	58
3.2.5 CONCLUSÕES .....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63

## RESUMO

Oliveira Salgado Vieira, Julie Anne; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; 07 de agosto de 2023. Integrando a abordagem clássica e molecular na pesquisa do maracujazeiro contra o CABMV. Orientador: Prof. Alexandre Pio Viana. Conselheiros: Dr. Natan Ramos Cavalcante e Prof.<sup>a</sup> Rosana Rodrigues.

O maracujazeiro é uma espécie tropical cultivada em diversos países, amplamente aceita no mercado e importante para o setor agrícola brasileiro. Em 2021 a produção foi de 683.993 toneladas da fruta, sendo o Brasil seu maior produtor e consumidor. Existem diversos fatores que limitam a expansão da área cultivada, como a virose do endurecimento dos frutos, que pode causar perdas totais das lavouras. No Brasil, ela é causada pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), as plantas infectadas por esse vírus têm redução da área foliar e do peso dos frutos, apresentam mosaico nas folhas que podem evoluir para deformação de bolhas. Salieta-se que ainda não existe uma cultivar de maracujazeiro-azedo resistente à virose. Com isso, pesquisadores da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) desenvolveram o programa de melhoramento genético do maracujazeiro visando à resistência ao CABMV, obtendo híbridos interespecíficos entre *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea*. O objetivo geral do presente estudo foi a avaliação da terceira geração de retrocruzamento (RC<sub>3</sub>) do maracujazeiro para seleção de melhores famílias e genótipos resistentes ao CABMV. As cinco famílias de retrocruzamento (RC<sub>3</sub>-293, RC<sub>3</sub>-153, RC<sub>3</sub>-355, RC<sub>3</sub>-501 e RC<sub>3</sub>-17), a cultivar 'UENF Rio Dourado' e a espécie silvestre *P. setacea* foram

avaliadas neste experimento. Foi estabelecido um delineamento em blocos ao acaso composto por cinco famílias, com seis repetições e número de plantas desbalanceado por tratamento. Foi utilizada uma escala de notas nas folhas jovens e na distribuição dos sintomas da virose em toda a área ocupada pela planta, sendo as avaliações feitas quinzenalmente, em um período de 365 dias. Por meio da escala foram estimadas a área abaixo da curva de progresso da doença para folhas jovens, e para a área total da planta, para cada genótipo. A característica de resistência à doença, foi analisada via modelos mistos para estimativa dos componentes de variâncias, via máxima verossimilhança restrita (REML), e para predição de ganhos com a seleção, via melhor predição linear não-viesada (BLUP). Foram utilizados 27 marcadores microssatélites para calcular a distância genética de 95 genótipos da população avaliada. Os dados obtidos da amplificação foram convertidos em código numérico para cada alelo por *loco*, obtendo-se uma matriz numérica que permitiu calcular as distâncias genéticas, gerando um dendrograma pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*). Para acessar a estrutura dos genótipos, foram feitas análises com o método Bayesiano. Dos 30 genótipos melhor ranqueados para resistência ao CABMV, os genótipos 450, 476 e 340 da família RC<sub>3</sub>-293 e o genótipo 389 da família RC<sub>3</sub>-153, apresentaram as melhores características para serem indicados a compor a próxima geração de retrocruzamento. A planta 450 tem 77% de similaridade a cultivar comercial, além de ter sido considerada a mais resistente. Esse genótipo, juntamente com outros melhor ranqueados (340, 475 e 476) podem ser indicados para serem genitores das famílias da próxima geração. Com isso, é possível dar continuidade ao programa com o avanço da quarta geração de retrocruzamento, utilizando como genitores, pelo menos, quatro melhores genótipos indicados.

**Palavras-chave:** marcadores moleculares; REML/BLUP; diversidade genética; híbridos interespecíficos.

## ABSTRACT

Oliveira Salgado Vieira, Julie Anne; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; August 7, 2023. Integrating the classical and molecular approach in passion fruit research against CABMV. Advisor: Prof. Alexandre Pio Viana. Counselors: Dr. Natan Ramos Cavalcante and Prof. Rosana Rodrigues.

Passion fruit is a tropical species cultivated in several countries, widely accepted on the market and important for the Brazilian agricultural sector. In 2021, production was 683,993 tons of fruit, with Brazil being its largest producer and consumer. There are several factors that limit the expansion of the cultivated area, such as the fruit-hardening virus, which can cause total crop losses. In Brazil, it is caused by the *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) plants infected by this virus have a reduction in leaf area and fruit weight, and present mosaics on the leaves that can evolve into blister deformation. It should be noted that there is still no sour passion fruit cultivar resistant to the virus. As a result, researchers from Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) developed a passion fruit genetic improvement program aimed at resistance to CABMV, obtaining interspecific hybrids between *Passiflora edulis* and *Passiflora setacea*. The general objective of the present study was to evaluate the third generation of passion fruit backcrossing (RC3) to select the best families and genotypes resistant to CABMV. The five backcross families (RC3-293, RC3-153, RC3-355, RC3-501 and RC3-17), the cultivar 'UENF Rio Dourado' and the wild species *P. setacea* were evaluated in this experiment. A randomized block design was established consisting of five

families, with six replications and an unbalanced number of plants per treatment. A rating scale was used on young leaves and the distribution of virus symptoms throughout the area occupied by the plant, with assessments being carried out every fortnight, over a period of 365 days. Using the scale, the area under the disease progress curve was estimated for young leaves, and for the total area of the plant, for each genotype. The disease resistance trait was analyzed via mixed models to estimate variance components, via restricted maximum likelihood (REML), and to predict gains from selection, via best unbiased linear prediction (BLUP). 27 microsatellite markers were used to calculate the genetic distance of 95 genotypes from the evaluated population. The data obtained from amplification were converted into a numerical code for each allele per locus, obtaining a numerical matrix that allowed the calculation of genetic distances, generating a dendrogram using the UPGMA method (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages). To access the structure of the genotypes, analyzes were carried out using the Bayesian method. Of the 30 genotypes best ranked for resistance to CABMV, genotypes 450, 476 and 340 of the RC3-293 family and genotype 389 of the RC3-153 family, presented the best characteristics to be indicated to form the next backcross generation. Plant 450 has 77% similarity to the commercial cultivar, in addition to being considered the most resistant. This genotype, together with other better ranked ones (340, 475 and 476) can be indicated to be the parents of the next generation families. With this, it is possible to continue the program with the advancement of the fourth generation of backcrossing, using at least four best indicated genotypes as parents.

**Keywords:** molecular markers; REML/BLUP; Genetic diversity; interspecific hybrids.

## 1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims) é uma das espécies mais conhecidas do gênero *Passiflora*, família *Passifloraceae*, com plantas lenhosas e trepadeiras (Nascimento et al., 2020). O maracujá azedo é cultivado em diversas partes do mundo, no Brasil são conhecidas aproximadamente 157 espécies desse gênero (Bernacci et al., 2022).

O cultivo do maracujá é bastante relevante no campo da agricultura, visto que é altamente aceito no mercado. No Brasil, a produção em 2021 foi de 683.993 toneladas em uma área de 44.827 hectares (IBGE, 2021).

Apesar de ser uma cultura relevante, existem diversos fatores que limitam a expansão da área cultivada do maracujazeiro. A espécie é sensível ao estresse abiótico, como seca, salinidade e temperaturas extremas, que podem reduzir seu crescimento e rendimento (Zhang et al., 2023). O maracujazeiro requer níveis específicos de nutrientes para crescer e produzir frutos. Deficiências de nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio, podem limitar o crescimento e a produção do maracujá (Bailey et al., 2021).

Além disso, a espécie requer um clima quente e úmido para crescer, e é sensível a geadas e temperaturas frias. Portanto, sua produção é limitada a regiões tropicais e subtropicais. Além de todos esses fatores, as doenças podem causar perdas totais da lavoura, visto que o maracujá é suscetível a várias doenças causadas por fungos, vírus e bactérias, que podem causar murcha, manchas nas folhas, podridão dos frutos, entre outros sintomas (Aiello et al., 2021).

No Brasil, uma das doenças de maior relevância econômica é a virose do endurecimento dos frutos, causada pelo CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*) que, por consequência, ocasiona uma redução na qualidade e valor comercial dos frutos (Cerqueira-Silva et al., 2008). Apesar dos esforços para controlar o vírus, os métodos utilizados, como renovar todo o pomar todos os anos, *roguing*, inoculação com variantes atenuadas de CABMV e inseticida, não têm sido eficientes. Um dos motivos da ineficiência do controle do CABMV é a alta diversidade genética do vírus e sua capacidade de infectar múltiplos hospedeiros, o que dificulta o controle (Nascimento et al., 2006). Mais pesquisas são necessárias para entender a epidemiologia do CABMV e desenvolver métodos de controle eficazes para prevenir a propagação do vírus em cultivos de maracujazeiro no Brasil (Garcêz et al., 2015).

Este vírus é transmitido por espécies de afídeos, também conhecidos como pulgões. O pulgão do caupi (*Aphis craccivora*) é considerado o principal vetor natural do CABMV, por ser a espécie de pulgão mais abundante na cultura do maracujazeiro. O vírus também pode ser transmitido por outras espécies de afídeos, incluindo *Aphis gossypii* e *Myzus persicae* (Bashir et al., 2022).

Em seu estudo sobre o progresso temporal e espacial do CABMV em lavouras de maracujá, Kotsubo et al. (2021) constataram que o vírus se espalha rapidamente e pode causar perdas significativas na produtividade. O levantamento da população de pulgões em uma lavoura de maracujá azedo mostrou que sua abundância está positivamente correlacionada com a incidência de CABMV (Garcêz et al., 2015).

Os sintomas da infecção por CABMV em maracujá (mosaico foliar, bolhas, endurecimento do fruto) contribuem coletivamente para perdas econômicas significativas na produção (Nascimento et al., 2006; Garcêz et al., 2015; Kotsubo et al., 2021).

É nesse cenário que pesquisadores da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) desenvolvem, desde 2010, o programa de melhoramento genético do maracujazeiro, visando resistência ao CABMV. Primeiramente foram obtidos híbridos interespecíficos entre uma espécie comercial e suscetível ao CABMV e uma espécie silvestre e resistente (Santos et al., 2014).

Um dos métodos utilizados nos avanços das gerações do programa é o método do retrocruzamento. Com ele há possibilidade de transferência de alelos

entre genótipos (Borém et al., 2021), assim, ferramentas como os marcadores moleculares podem ser utilizados para auxiliar os programas de melhoramento genético vegetal, principalmente na redução do tempo de pesquisa. Dentre os marcadores disponíveis para a espécie, os microssatélites, conhecidos como SSR, se destacam por serem ferramentas versáteis e de fácil reprodução (Turchetto-Zolet et al., 2017). Esses marcadores são amplamente utilizados no melhoramento de plantas e na análise do genoma devido à sua alta abundância, distribuição aleatória e herança codominante (Vieira et al., 2016).

Além das análises moleculares, foram realizadas análises estatísticas utilizando a metodologia dos modelos mistos que têm várias aplicações no melhoramento de plantas, tornando-os uma ferramenta valiosa para analisar e interpretar dados complexos. Além disso, modelos mistos podem ser usados para selecionar genótipos com base em um modelo linear misto, levando em conta tanto os efeitos genéticos fixos, quanto os fatores ambientais (Walker; Pita; Campbel, 2011).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Avaliação da terceira geração de retrocruzamento (RC<sub>3</sub>) do maracujazeiro para seleção de melhores famílias e genótipos resistentes ao CABMV.

### 2.2. Específicos

1. Conduzir a terceira geração de retrocruzamento, visando a obtenção cultivares de maracujazeiro resistentes ao CABMV;
2. Avaliar a resistência ao CABMV na população segregante obtida por retrocruzamento, com o auxílio de escalas de notas nas folhas jovens e na distribuição dos sintomas da virose em toda a área ocupada pela planta;
3. Estimar parâmetros genéticos e valores genotípicos pelo procedimento REML/BLUP ao nível de planta dentro de progênies, para a resistência ao CABMV, utilizando a área abaixo da curva de progresso da doença;
4. Estimar as distâncias genéticas entre indivíduos da população segregante por informações moleculares via marcadores microssatélites (SSR);
5. Selecionar genótipos com base na resistência ao CABMV e na similaridade genética ao genitor recorrente.

### **3. CAPÍTULOS**

#### **3.1. ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS DA POPULAÇÃO SEGREGANTE RC<sub>3</sub> E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO CABMV (cowpea aphid-borne mosaic vírus)**

##### **3.1.1. INTRODUÇÃO**

O maracujá (*Passiflora edulis* Sims) pertence à classe Magnoliopsida e ao gênero *Passiflora*, o maior gênero da família Passifloraceae, que possui aproximadamente 700 espécies de trepadeiras, arbustos e árvores lenhosas (Santos et al., 2014).

O cultivo do maracujazeiro-azedo é importante para o setor agrícola, sendo uma espécie amplamente aceita no mercado nacional e internacional (Cavalcante et al., 2016). No ano de 2021, o Brasil produziu 683.993 toneladas em uma área de 44.827 hectares, a quantidade produzida teve uma queda nos últimos anos, indicando possíveis problemas que afetam a cultura (IBGE, 2021).

Dentre os principais fatores que limitam a expansão da área cultivada, estão as doenças, como a virose do endurecimento dos frutos, que pode causar perdas totais nas lavouras. Esta doença é causada pelo CABMV no Brasil, sendo

transmitida por espécies de afídeos e de forma mecânica. As plantas infectadas pela virose apresentam mosaico foliar, frutos com o pericarpo endurecido, redução do peso de polpa e deformação, causando redução na qualidade e valor comercial dos frutos, sendo esta a doença viral de maior importância econômica no Brasil (Cerqueira-Silva et al., 2008).

Nesse cenário, no início de 2010 um grupo de pesquisadores da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) desenvolveu o programa de melhoramento genético do maracujazeiro visando resistência ao CABMV, por meio da obtenção de híbridos interespecíficos entre *Passiflora edulis* (espécie comercial e suscetível) e *Passiflora setacea* (espécie silvestre e resistente) (Santos et al., 2014).

Posteriormente, estes híbridos interespecíficos foram avaliados e selecionados quanto à resistência ao CABMV (Santos et al., 2015b) e às características agronômicas (Santos et al., 2015a; Freitas et al., 2016). Todavia, os híbridos interespecíficos obtidos apresentaram características agronômicas indesejáveis ao consumidor, como cor, tamanho e sabor, por isso há necessidade de recuperar o genoma da espécie comercial.

O método do retrocruzamento possibilita a recuperação do genoma para uma característica, cuja expressão é controlada por poucos genes (Borém et al., 2021). Dessa forma, acredita-se que é possível resgatar as características agronômicas de *P. edulis* com permanência dos genes de resistência à doença nos genótipos segregantes.

Nesse estudo foi utilizada a metodologia dos modelos mistos, que são modelos estatísticos usados para analisar dados com efeitos fixos e aleatórios. No melhoramento de plantas, modelos mistos são usados para estimar parâmetros genéticos, como herdabilidade, correlações genéticas e ganhos genéticos, que são importantes para a seleção de genótipos superiores. O método *Best Linear Unbiased Prediction* (BLUP), baseado em um modelo linear misto, é o método mais comumente utilizado para avaliação genética de espécies vegetais (Moreira et al., 2020).

O estudo de Freitas et al. (2016) teve como objetivo melhorar a seleção de maracujás para resistência ao *Cowpea aphid-born mosaic virus* (CABMV), utilizando o método de modelo misto (REML/BLUP). Os pesquisadores desenvolveram uma nova estratégia de seleção para famílias de meios-irmãos de

maracujá azedo, que envolveu seleção recorrente para melhorar características genéticas, como resistência à doenças e sabor. O método de modelo misto foi utilizado para estimar parâmetros genéticos e prever valores genéticos, fornecendo informações valiosas para programas de melhoramento. O estudo demonstrou a eficiência de modelos mistos no melhoramento de maracujá e o potencial de melhoria de características genéticas, por meio da seleção recorrente.

A partir dessas informações, o objetivo deste estudo foi de avaliar a população da terceira geração de retrocruzamento do programa de melhoramento genético do maracujazeiro para resistência ao CABMV, e indicar famílias e genótipos para darem continuidade ao programa utilizando a metodologia dos modelos mistos REML/BLUP, identificando os melhores genótipos da população de retrocruzamento.

### 3.1.2. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1.2.1. Aspectos gerais da cultura do maracujazeiro

O maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis*) é uma fruteira tropical originária da América do Sul. A espécie foi posteriormente introduzida em outras partes do mundo, incluindo África, Ásia e Austrália, onde agora é cultivada comercialmente (ScienceDirect Topics, 2023).

As *Passifloras* são espécies únicas e fascinantes de plantas com flores, conhecidas por suas cores vibrantes e formas complexas. O maracujá (*Passiflora edulis* Sims) é abundantemente cultivado para consumo do suco e da fruta fresca. O fruto comestível é muito utilizado na culinária e pode ser doce ou azedo, dependendo da variedade. O maracujá puro contém, aproximadamente, 73% de água, 22% de carboidratos, 2% de proteína e 0,7% de gordura. Diversas variedades de maracujá são ricas em polifenóis que podem trazer vários benefícios à saúde (He et al., 2020).

A fruta é rica em vitaminas A e C, ferro e potássio, e é usada em uma variedade de aplicações culinárias, desde sobremesas e sucos até molhos e marinadas. Além disso, o maracujá tem sido utilizado na medicina tradicional para

o tratamento de diversas doenças, devido ao seu alto valor nutricional e medicinal (Bailey et al., 2021).

Sendo originário da América tropical, o maracujá conta com 150 espécies nativas do Brasil (Souza et al., 2022). Ele possui ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais, pertence à classe Magnoliopsida e ao gênero *Passiflora*, o maior gênero da família Passifloraceae (Li et al., 2011), que possui aproximadamente 700 espécies de trepadeiras, arbustos e árvores lenhosas (Santos et al., 2014).

O maracujazeiro possui gavinhas que nascem nas axilas das folhas, apresentando uma tonalidade vermelha ou roxa quando jovem (Nascimento et al., 2020). As espécies do gênero *Passiflora* possuem flores pentâmeras sésseis (Santos et al., 2014).

Seus frutos, geralmente, são bagas, globosos ou ovoides, de coloração amarela, ou roxo escuro na maturidade, com um interior de varia de macio a firme e suculento, repleto de numerosas sementes. As principais espécies desse gênero são diploides ( $2n=2x=18$  cromossomos) e autoincompatíveis do tipo esporófitica. Este é um mecanismo genético que impede a autofecundação em organismos que se reproduzem sexualmente e, portanto, incentiva o cruzamento e a alogamia (Rêgo et al., 2011; He et al., 2020; Case, 2022).

É uma planta alógama, dependente de polinização cruzada, podendo esta ser artificial ou natural pela ação das abelhas mamangavas (*Xylocopa* spp.). As flores do maracujazeiro são hermafroditas, possuem sépalas brancas na parte adaxial e verdes na parte abaxial. Existem duas séries de coronas, sendo a base, próxima ao centro da flor, na cor roxa e as extremidades brancas. Algumas das principais características das flores de maracujá incluem cinco pétalas e cinco sépalas, que são geralmente coloridas e dispostas em padrões complexos (Cobra et al., 2015).

Quando se trata de cultivo de maracujá, existem vários aspectos importantes a serem considerados. Um dos principais fatores é a qualidade do solo, pois as plantas de maracujá requerem solo bem drenado com uma faixa de pH entre 6,0 e 7,0. Além disso, precisam de muita luz solar e rega regular. Outro aspecto importante do cultivo do maracujá é a poda, já que ela ajuda a controlar o crescimento da planta, que por sua vez ajuda a aumentar a produção de frutos,

além de remover quaisquer galhos mortos ou doentes que possam comprometer a saúde geral da planta (Thokchom; Mandal, 2020).

O maracujá recebe o nome da flor da planta, em inglês chamada de “passion fruit”, nomeação dada pelos missionários espanhóis que viram a flor como um símbolo da paixão de Cristo. Os três estigmas representam os pregos que prenderam Jesus na cruz, e as cinco anteras representam as cinco chagas que ele sofreu (Janick; Paull, 2008).

### **3.1.2.2. Importância econômica**

O cultivo do maracujazeiro é importante para o setor agrícola, já que a fruta é amplamente aceita no mercado. É uma espécie de relevância econômica no Brasil, visto que seu cultivo é um dos que mais crescem no setor frutícola, representando uma fonte de renda para os agricultores e, conseqüentemente, gerando oportunidades de trabalho no setor agrícola (Meletti, 2011). Seu cultivo tem demonstrado benefícios econômicos, com uma produção mundial anual estimada em cerca de 1,5 milhão de toneladas (Bailey et al., 2021).

O Brasil possui mais de 150 variedades diferentes de maracujá. Ele ocupa um lugar de destaque nas tradições culinárias e medicinais do país, e possui significativa importância econômica, devido ao seu valor nutricional, medicinal e comercial. Os extratos de maracujá têm valor comercial em escala global, difundidos por meio das indústrias farmacêuticas (Duarte et al., 2021).

O maracujá também é uma rica fonte de vitaminas, minerais e antioxidantes, tornando-o um ingrediente popular na indústria de alimentos e bebidas (Thokchom; Mandal, 2020). Além de ser fonte de vitamina A e C, ele contém quantidades razoáveis de ferro, potássio, sódio, magnésio, enxofre e cloretos, demonstrando-se uma cultura valiosa para o Brasil (Mandal, 2017). Além disso, as propriedades medicinais do maracujá foram estudadas e descobriu-se que ele tem efeitos anti-inflamatórios, anticancerígenos e antidiabéticos (He et al., 2020).

Muitas espécies de *Passifloras* são utilizadas para diversos fins, principalmente alimentares, mas com grande importância para fins medicinais, visto que as folhas, flores, raízes e frutos são utilizados contra diversas enfermidades, tais quais, verminoses, problemas gástricos e estresse, fazendo parte do conhecimento associado à cultura de diferentes povos (Costa; Tupinambá, 2005).

No quesito ornamental, as *Passifloras* são atrativas, possuem uma beleza exótica e despertam interesse. Na alimentação, o maracujá, pode ser consumido *in natura* e em diversos alimentos derivados, como sucos, doces, sorvetes e bebidas alcoólicas (Ruggiero et al., 1996).

A produção de maracujá no Brasil vem crescendo nos últimos anos, tornando-se uma importante fonte de renda para muitos agricultores (Miyake et al., 2018). No ano de 2021, o Brasil produziu 683.993 toneladas de maracujá em uma área de 44.827 hectares, tendo um rendimento médio de 15.259 kg por hectare. A região Nordeste lidera a produção brasileira, sendo a Bahia o maior produtor, com 207.488 toneladas e rendimento médio de 12.339 kg por hectare. O estado do Rio de Janeiro produziu 6.632 toneladas, com área colhida de 427 hectares e rendimento médio de 15.532 kg por hectare, mostrando seu potencial para a produção da cultura, que teve o valor da produção avaliado em 1.533.905.000 reais no país (IBGE, 2021).

A cultura do maracujá também tem gerado oportunidades de trabalho no meio rural, contribuindo para o crescimento econômico do país, tendo um impacto significativo na economia do Brasil, e espera-se que continue crescendo nos próximos anos.

As regiões norte e noroeste fluminense apresentam grande potencial para a fruticultura, pois possuem condições edafoclimáticas adequadas para a produção de fruteiras tropicais como o maracujá, além da proximidade às instituições de pesquisa que geram informações e produtos qualificados (Brandão, 2004).

A cultura do maracujá possui significativa importância econômica devido ao seu valor nutricional, medicinal e comercial, além de apresentar potencial para trazer benefícios econômicos aos agricultores, contribuindo, assim, para a indústria de alimentos e bebidas.

### **3.1.2.3. Melhoramento genético do maracujazeiro e o método do retrocruzamento**

O melhoramento genético do maracujazeiro tem potencial para aumentar a disponibilidade de cultivares com maior produção, qualidade dos frutos e com resistência às pragas e doenças. Técnicas específicas de melhoramento genético usadas no melhoramento de maracujá incluem a seleção de populações segregantes para resistência genética ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus*

(CABMV) (Preisigke et al., 2020), caracterização e seleção de maracujá para características desejáveis (Cerqueira-Silva et al., 2015), e avaliação agromorfológica para estimar a variabilidade genética e implementar um programa de melhoramento por meio da seleção assistida (Ocampo; Acosta-Barón; Hernández-Fernández, 2017).

O melhoramento para características de produção, qualidade de frutos e resistência ao CABMV é complexo devido à natureza poligênica dessas características e à existência de correlações genéticas entre elas (Chavarría-Perez et al., 2020).

Em um estudo conduzido para melhorar as características de produção e qualidade de frutos de maracujá-doce, 30 genótipos foram selecionados para qualidade de frutos de 100 progênies de irmãos completos de maracujá-doce em três ambientes. O estudo encontrou evidências de interação de genótipo por ambiente e seleção de genótipos promissores (Chavarría-Perez et al., 2020).

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) é uma das principais instituições nessa área no Brasil, com pesquisadores realizando extensos estudos para melhorar cultivares de maracujá. Os pesquisadores têm se envolvido ativamente em estudos de melhoramento genético para aumentar o rendimento da cultura e resistência a doenças. O programa de melhoramento da UENF desenvolveu a cultivar de maracujá 'UENF Rio Dourado' que tem apresentado maior produtividade e resistência a doenças. Ela foi desenvolvida por meio de três ciclos de seleção recorrente, resultando em um aumento de 36% na produtividade, 25% no número de frutos e 3% no peso do fruto quando comparado a cultivar padrão (FB 200).

O programa começou em 1998 coletando vários genótipos de regiões produtoras do estado do Rio de Janeiro e atualmente está em seu quarto ciclo de seleção recorrente. O programa de melhoramento visa atender às demandas do mercado e desenvolver cultivares resistentes a doenças (Viana et al., 2016).

No geral, esses estudos destacam a importância do melhoramento genético no cultivo de maracujá e o potencial dessa cultura para contribuir na redução da pobreza, segurança alimentar e melhoria da nutrição nas comunidades rurais. São necessárias mais pesquisas nesta área buscando melhoramento das cultivares de maracujá e promovendo práticas agrícolas sustentáveis (Cerqueira-Silva et al., 2014b).

O método do retrocruzamento tem base na hibridação entre uma planta F1, descendente de um cruzamento determinado pelo melhorista com um de seus parentais, que será definido como o parental recorrente. Com esse método é possível transferir genes do parental doador, geralmente uma espécie silvestre que possui os genes desejados, ao parental recorrente que geralmente é o genótipo elite disponível no mercado, mas que possui alguma característica indesejável a ser melhorada geneticamente. Esse método é bastante utilizado para transferir genes resistentes a viroses (Hospital, 2005; Borges et al., 2008; Fonseca et al., 2009; Bellon, 2014).

No início de 2010, pesquisadores UENF desenvolveram o programa de melhoramento genético do maracujazeiro visando resistência ao CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*). Foram obtidos híbridos interespecíficos entre *Passiflora edulis*, sendo essa a cultivar comercial e suscetível, e *Passiflora setacea*, a espécie silvestre e resistente (Santos et al., 2014).

Os híbridos interespecíficos foram, então, avaliados e selecionados quanto à resistência ao CABMV (Santos et al., 2015b) e em relação às características agronômicas (Santos et al., 2015a; Freitas et al., 2016). Os híbridos ainda apresentaram características agronômicas indesejáveis ao consumidor, se tornando necessário recuperar o genoma da espécie comercial.

Os melhores híbridos deram continuidade ao programa de melhoramento, conduzidos por retrocruzamento, os melhores genótipos de cada geração foram selecionados para dar origem a geração seguinte (Preisigke et al., 2020). No trabalho de Vidal (2021) foi avaliada a resistência ao CABMV na população segregante RC<sub>2</sub> de maracujazeiro visando selecionar genótipos resistentes e agronomicamente superiores, dando origem a mais uma geração do programa de melhoramento genético do maracujazeiro.

Atualmente, esse programa se encontra na terceira geração de retrocruzamento (RC<sub>3</sub>), conduzida e avaliada neste estudo para manter as características agronômicas de *P. edulis*, com os genes de resistência à virose da *P. setacea*. O método utilizado possibilita a transferência de alelos, quando a característica é controlada por poucos genes (Borém et al., 2021).

### 3.1.2.4. Virose do endurecimento dos frutos

Dentre as doenças que infectam a cultura do maracujazeiro, a virose do endurecimento dos frutos, causada pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) é considerada a doença viral de maior importância econômica no Brasil, visto que as doenças estão entre os principais fatores que limitam a expansão da área cultivada, podendo em alguns casos provocar perdas totais nas lavouras (Cerqueira-Silva et al., 2008).

A *Passiflora edulis* é suscetível a várias doenças, incluindo as virais, bacterianas e fúngicas. Algumas doenças podem causar clareamento das nervuras, colônias amarelas brilhantes nas folhas e eventual deterioração da polpa dos frutos, especialmente dos frutos jovens (He et al., 2020).

O trabalho publicado por Cerqueira-Silva et al. (2014a) revisa a história da identificação de patógenos virais envolvidos na doença do endurecimento do maracujá, que podem afetar diferentes espécies de *Passiflora*.

Inicialmente, o *Passion fruit woodiness virus* (PWV) foi relatado como um vírus fitopatogênico que causa a doença do endurecimento do maracujá, uma das doenças economicamente mais importantes que afetam esta cultura. O PWV foi relatado pela primeira vez na Austrália, infectando *Passiflora edulis*, e desde então tem sido relatado em vários outros países, incluindo Japão, Taiwan, Nigéria e EUA (Arogundade et al., 2018). O vírus foi descrito como capaz de infectar em qualquer estágio de crescimento, e é transmitido por pelo menos duas espécies de afídeos. Os sintomas de PWV incluem folhas distorcidas, manchas cloróticas ou anéis nas folhas, frutos lenhosos, perda de vigor e redução da vida útil da planta (Elliott, 2015).

Sabe-se que pelo menos quatro tipos de *Potyvirus* podem causar a doença do endurecimento dos frutos em todo o mundo, o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), o *Passion fruit woodiness virus* (PWV), o *east asian passiflora virus* (EAPV) e o *ugandan passiflora virus* (UPV).

No Brasil, o agente causal da doença do endurecimento dos frutos do maracujá foi inicialmente identificado como o *Passion fruit woodiness virus* (PWV), mas estudos posteriores mostraram que ele é causado principalmente pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). Além disso, um grupo de isolados do Brasil, previamente caracterizados que haviam sido designados como *Passion fruit woodiness virus* (PWV), foram reclassificados como CABMV, com base em análises filogenéticas, fornecendo evidências inequívocas de que, no Brasil, a

doença do maracujá é causada principalmente por CABMV (Nascimento et al., 2006; Melo et al., 2015; Carvalho et al., 2021; Mendes et al., 2022).

A doença é transmitida por várias espécies de afídeos durante as picadas de prova de alimentação. Também é transmitido de forma mecânica, pelo uso de ferramentas em plantas infectadas durante as podas, e por enxertia (Barbosa; Filho, 2017).

O CABMV pertence à família Potyviridae e ao gênero *Potyvirus*, seu genoma possui uma única molécula de RNA fita simples, infectando espécies de maracujazeiro e de leguminosas. As plantas infectadas por esse vírus têm redução da área foliar e do peso dos frutos, apresentam mosaico nas folhas que podem evoluir para deformação e bolhas (Barbosa; Filho, 2017). Os frutos se tornam deformados, pequenos e duros, há espessamento do pericarpo, e isso causa a perda da qualidade e do valor comercial (Sacoman et al., 2018).

Para essa doença, não há relatos de manejo e controle eficiente, então se torna necessário o desenvolvimento de cultivares resistentes, visto que até o momento não existe registro de cultivar de maracujazeiro-azedo resistente à virose do endurecimento dos frutos (Preisigke et al., 2021). Entretanto, há relatos de espécies silvestres resistentes ao CABMV (Gonçalves et al., 2018), e também em híbridos interespecíficos (Freitas et al., 2015).

### **3.1.2.5. Modelos mistos (REML/BLUP)**

A metodologia REML/BLUP é uma abordagem estatística usada no melhoramento de plantas para estimar parâmetros genéticos e valores genotípicos (Santos et al., 2015a). Esta metodologia é comumente utilizada para avaliar o desempenho de diferentes genótipos e selecionar os melhores para futuros programas de melhoramento (Silveira et al., 2022). O método foi adaptado por Wright em 1923, é usado para avaliar várias características em cada indivíduo e para determinar os efeitos diretos e indiretos de cada característica no resultado final. É uma combinação de dois métodos: máxima verossimilhança restrita (REML) e melhor predição linear não-viesada (BLUP). O REML é usado para estimar componentes de variância, enquanto BLUP é usado para prever valores genotípicos (Olivoto et al., 2017).

O estudo de Olivoto et al. (2017) teve como objetivo estimar componentes de variância, parâmetros genéticos e valores genotípicos em milho, usando

procedimentos baseados em REML/BLUP. A análise de caminho sequencial também foi usada para determinar as inter-relações entre diferentes características. O estudo constatou que procedimentos baseados em REML/BLUP podem ser úteis para estimar os valores genotípicos e as relações entre diferentes características.

Em sua pesquisa, Ambrósio et al. (2021) utilizaram a metodologia de modelos mistos para selecionar genótipos com características altamente influenciadas pelo ambiente. A modelagem mista foi utilizada para seleção truncada e simultânea para determinar a superioridade genotípica das famílias *Psidium guajava* S1. O trabalho teve como objetivo desenvolver um programa de melhoramento genético de goiaba, e identificar os genótipos mais superiores para o melhoramento. O método utilizado permitiu a seleção de genótipos superiores para as características avaliadas.

Em outro estudo, pesquisadores da UENF utilizaram modelos mistos (REML/BLUP) para selecionar genótipos superiores de feijão-vagem, adaptados às condições edafoclimáticas das regiões Norte e Noroeste do Rio de Janeiro. O estudo teve como objetivo desenvolver genótipos superiores de feijão-vagem que resistissem às condições ambientais da região. A seleção para produção de feijão-vagem e grãos aplicando BLUP possibilitou a previsão e obtenção de ganhos genéticos significativos para as gerações subsequentes (Cruz et al., 2018).

Outro estudo de pesquisadores da mesma universidade investigou o grau de divergência genética entre 40 híbridos dialélicos de pipoca, 16 pais e 6 controles de elite, usando modelos mistos. O estudo teve como objetivo determinar a diversidade genética de híbridos de pipoca e identificar os híbridos mais diversos geneticamente. Os resultados apontaram que existiu variabilidade genética entre os genótipos avaliados, e as correlações lineares mostraram que floração mais precoce e genótipos mais altos exibiram associação com materiais mais tolerantes a *Exserohilum turcicum* (Pena et al., 2022).

Os pesquisadores da UENF desenvolvem o programa de melhoramento genético de maracujazeiro há mais de uma década. A metodologia de modelos mistos tem sido utilizada em alguns trabalhos relacionados ao maracujá nesta universidade, por ser uma ferramenta eficiente para estimar parâmetros e prever valores genéticos.

O método de modelo misto REML/BLUP tem sido aplicado para estimar parâmetros genéticos e prever valores genéticos na seleção de maracujá, visando

resistência ao Cowpea aphid-born mosaic virus (CABMV). Os pesquisadores da UENF também utilizaram a metodologia Ward-MLM para medir a diversidade genética em progênies de maracujá azedo e definir potenciais grupos heteróticos. Uma nova estratégia de seleção para famílias de meios-irmãos de maracujá azedo também foi desenvolvida utilizando modelos mistos sob seleção recorrente (Silva et al., 2014; Freitas et al., 2016; Ribeiro et al., 2018)

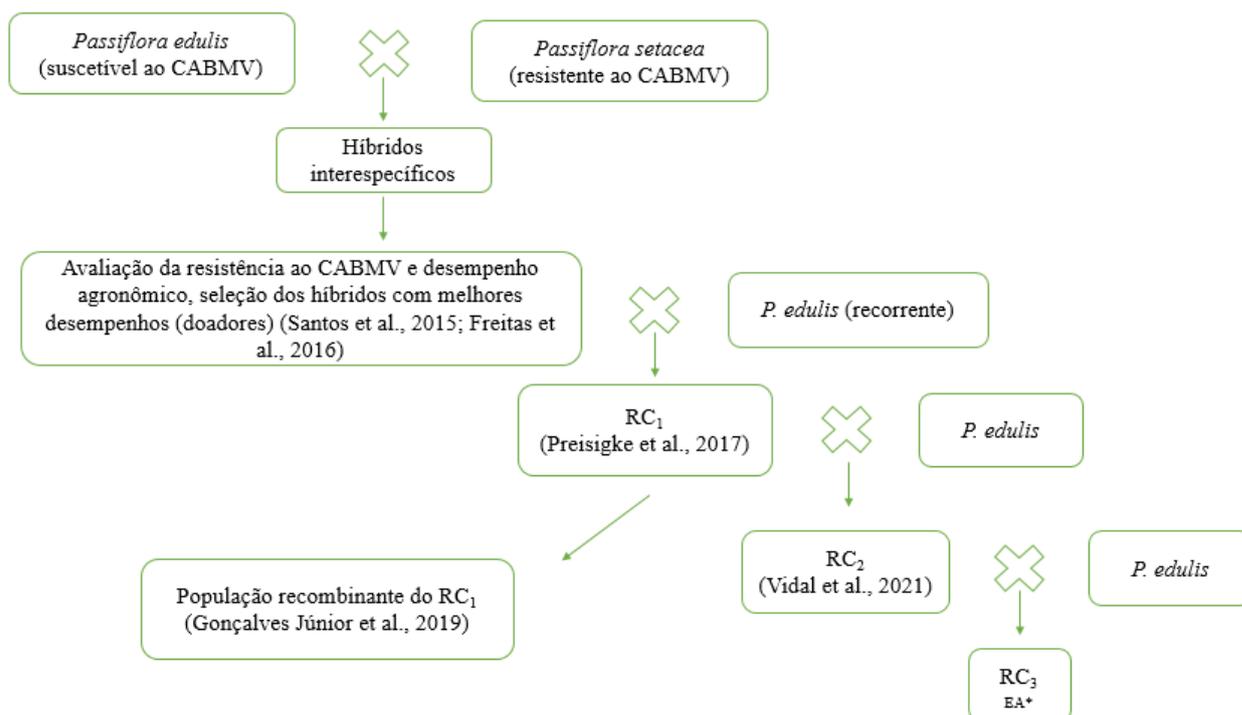
### 3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1.3.1. Material genético e obtenção das progênies

As famílias conduzidas neste experimento originaram a terceira geração de retrocruzamento do programa de melhoramento genético do maracujazeiro da UENF, são elas: RC<sub>3</sub>-17, RC<sub>3</sub>-153, RC<sub>3</sub>-293, RC<sub>3</sub>-355 e RC<sub>3</sub>-501.

Os seis melhores híbridos do cruzamento interespecífico entre *P. setacea*, resistente ao CABMV e *P. edulis*, suscetível (Santos et al., 2014), foram utilizados no primeiro retrocruzamento com *P. edulis* (genitor recorrente) para obter a primeira geração de retrocruzamento (RC<sub>1</sub>) (Preisigke, 2017). Os 10 melhores genótipos da RC<sub>1</sub> selecionados foram retrocruzados com *P. edulis* para obtenção da segunda geração de retrocruzamento (RC<sub>2</sub>), e os 5 melhores genótipos da RC<sub>2</sub> selecionados foram retrocruzados com *P. edulis* para obtenção da terceira geração de retrocruzamento (RC<sub>3</sub>) (Vidal et al., 2021). As seleções dos híbridos, RC<sub>1</sub> e RC<sub>2</sub> foram baseadas em características agrônômicas e de resistência à virose.

Para a obtenção das progênies, os botões florais dos genitores femininos em pré-antese foram emasculados e protegidos com sacos de papel pela manhã. O mesmo procedimento foi adotado para os genitores masculinos, exceto a emasculação. A polinização foi realizada a partir das 12h, pois este é o horário de antese dos genitores. Durante as polinizações, as anteras dos genótipos doadores foram cuidadosamente esfregadas no estigma dos genótipos receptores com o auxílio de uma pinça. Após a hibridação artificial, os cruzamentos foram identificados e as flores foram novamente protegidas por até 24 horas.



\*EA: em andamento

**Figura 1.** Organograma do programa de melhoramento genético do maracujazeiro da UENF visando resistência ao CABMV pelo método do retrocruzamento. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ, 2023.

Os frutos resultantes dos cruzamentos foram protegidos com rede de náilon até o seu completo amadurecimento, posteriormente as sementes foram extraídas, secas e armazenadas em sacos de papel revestidos por sacos plásticos, conservadas em geladeira a + 10°C no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) da UENF. O processo originou as cinco famílias conduzidas em campo e avaliadas neste estudo (Tabela 1), além delas, foi avaliada a cultivar comercial *Passiflora edulis* (Cultivar UENF Rio Dourado) e a espécie silvestre *Passiflora setacea*.

As sementes foram semeadas em sacos plásticos de polietileno para mudas, com capacidade para 0,5L, contendo substrato orgânico *Basaplant* e mantidas em casa de vegetação. Cerca de cinco meses após a semeadura, as mudas dos genótipos foram plantadas na área experimental.

**Tabela 1.** Identificação e origem da população em estudo.

Descrição	Origem	Total de genótipos
PE	'UENF Rio Dourado'	24
PS	BAG- <i>Passifloras</i>	24
RC <sub>3</sub> -293	RC <sub>2</sub> - 323 x PE	132
RC <sub>3</sub> -355	RC <sub>2</sub> - 583 x PE	132
RC <sub>3</sub> -17	RC <sub>2</sub> - 138 x PE	132
RC <sub>3</sub> -501	RC <sub>2</sub> - 89 x PE	127
RC <sub>3</sub> -153	RC <sub>2</sub> - 110 x PE	132
<b>Total</b>		<b>703</b>

PE: *Passiflora edulis*; PS: *Passiflora setacea*.

### 3.1.3.2. Instalação e condução do experimento

O experimento foi conduzido no Colégio Agrícola Antônio Sarlo, em Campos dos Goytacazes - RJ, (21° 45' latitude Sul, 41° 20' longitude Oeste e altitude de 11m). O clima do local é caracterizado como tropical subúmido e seco, com temperatura média anual variando entre 22 e 25°C, e precipitação média anual variando entre 1200 e 1300mm.

O experimento foi estabelecido em um delineamento em blocos ao acaso composto por cinco famílias, com seis repetições, e desbalanceado para plantas por tratamento, pois o número de plantas por família dependeu da quantidade de mudas obtidas. Foram feitas avaliações individuais das plantas.

Para condução das plantas foi utilizado o sistema de espaldeira vertical, com mourões de 1,8 m de altura, espaçados a 4 m, e com um fio de arame número 12 a 1,60 m do solo. A distância entre as linhas de plantio foi de 3,5 m. Foi utilizada a irrigação do tipo localizada por gotejamento. Os tratos culturais foram realizados sempre que necessário, conforme recomendações para a cultura do maracujazeiro, a calagem, adubações de plantio e de cobertura foram realizadas a partir da análise de solo, seguindo as recomendações de Costa et al. (2008).

As famílias RC<sub>3</sub>-293, RC<sub>3</sub>-153, RC<sub>3</sub>-355 e RC<sub>3</sub>-17 produziram mais mudas do que o necessário, então, foram instaladas 132 mudas de cada família no campo. A família RC<sub>3</sub>-501 apresentou adversidades em casa de vegetação com algumas

plantas mortas, não gerando a quantidade de mudas desejadas, sendo possível a instalação de 127 mudas desta família no campo. Tanto para a cultivar comercial *Passiflora edulis*, quanto para a espécie silvestre *Passiflora setacea*, foram obtidas mudas suficientes para serem instaladas 24 de cada no campo, constituindo 4 mudas de cada espécie por bloco.



**Figura 2.** Condução das plantas de maracujazeiro na área experimental localizada na Escola Técnica Estadual Agrícola Antônio Sarlo, no Município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro (RJ) - Brasil, 2023. Acervo: Próprio.

### 3.1.3.3. Resistência ao CABMV

As avaliações dos sintomas da virose foram realizadas quinzenalmente, por 365 dias após os primeiros sintomas da ocorrência natural da doença, que ocorreu 30 dias após o plantio. A área do experimento apresenta histórico da doença e, por isso, os genótipos não foram inoculados.

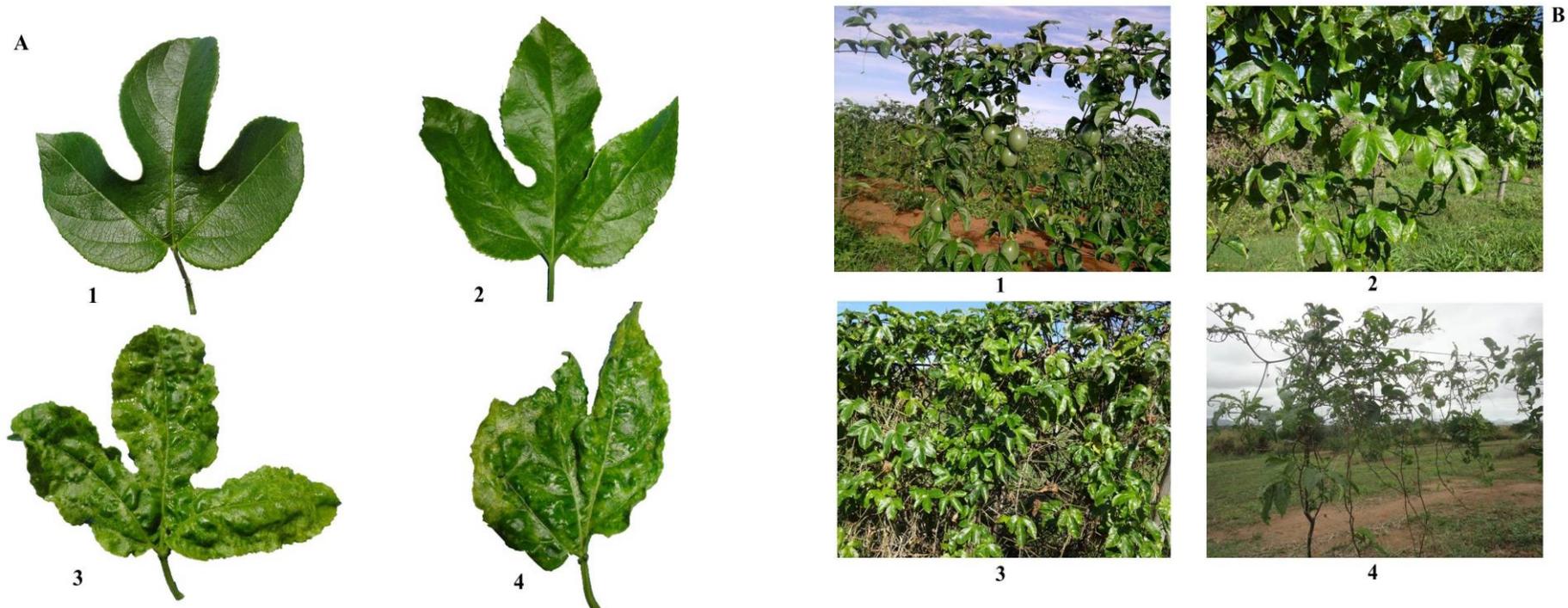
As avaliações dos sintomas foram realizadas visualmente em folhas jovens, a partir da terceira folha mais jovem nos ramos novos, e pela distribuição dos sintomas da virose em toda a área ocupada pela planta.

Foi utilizada uma escala de notas proposta por Novaes e Rezende (1999) com algumas modificações sugeridas por Oliveira et al. (2013). Tanto para as folhas novas, quanto para a área total da planta, as notas de severidade variaram de 1 a 4, em que: para as folhas novas, 1 = sem sintomas de mosaico; 2 = sintoma de mosaico leve e sem deformações foliares; 3 = sintomas de mosaico severo e sem deformações foliares e 4 = sintomas de mosaico severo, com bolhas e deformações foliares. Já para a planta: 1 = sem sintomas; 2 = poucas folhas com sintomas, mosaico leve ou enrugamento leve das folhas; 3 = quantidade moderada de folhas com sintomas, mosaico leve e enrugamento nas folhas e 4 = muitas folhas com sintomas, mosaico, enrugamento severo e deformação foliar.

Por meio da escala de notas, foram estimadas a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para folhas jovens e para a área total da planta para cada genótipo, pelo seguinte estimador:

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{y_i + y_{i+1}}{2} (T_{i+1} - T_i)$$

Em que:  $Y_i$  = proporção da doença na  $i$ -ésima observação;  $T_i$  = tempo em dias da  $i$ -ésima observação;  $n$  = número de observações (Campbell; Madden, 1990). Após estimados os valores médios de AACPD para as folhas jovens e para área total da planta, foi obtida uma média aritmética com as AACPDs (AACPDM) utilizando os valores da AACPD para ambas as avaliações.



**Figura 3.** Sintomas da virose induzida pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) em maracujazeiro: A) escala de notas de sintomas em folha jovem variando de 1, para plantas sem sintomas, a 4, sintomas mais severos; B) escala de notas para a área total ocupada pela planta variando de 1 planta sem sintomas a 4, sintomas mais severos. Fonte: Preisigke et al. (2020 b).

### 3.1.3.4. Seleção de genótipos via metodologia REML/BLUP

A característica resistência à doença AACPDm foi analisada via modelos mistos, considerando o modelo indicado por Resende (2002). Para estimativa dos componentes de variâncias via máxima verossimilhança restrita (REML) e para predição de ganhos com a seleção via melhor predição linear não-viesada (BLUP). As análises foram realizadas com o programa Selegen-REML/BLUP (Resende, 2016), utilizando o modelo estatístico 147, sendo este o que mais se aproxima da real estrutura genética das progênes analisadas. Este modelo é designado para avaliação em um local, mais de uma planta por parcela e indivíduos em progênes de irmãos completos de plantas alógamas. A análise seguiu o seguinte modelo estatístico:

$$y = Xr + Zg + Wp + e,$$

Em que  $y$  é o vetor de dados,  $r$  é o vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral,  $g$  é o vetor dos efeitos genotípicos individuais (assumidos como aleatórios),  $p$  é o vetor dos efeitos de parcelas (aleatórios),  $e$  é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios). As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos.

Foram estimados os seguintes componentes de variância (REML Individual):

$\sigma_g^2$ : variância genotípica entre progênes de irmãos completos, equivalendo a 1/2 da variância genética aditiva mais 1/4 da variância genética de dominância, ignorando-se a epistasia;

$\sigma_f^2$ : variância fenotípica individual;

$h^2_a = h^2$ : herdabilidade individual no sentido restrito, obtida ignorando-se a fração (1/4) da variância genética de dominância;

$h^2_{mp}$ : herdabilidade da média de progênes, assumindo sobrevivência completa;

$Ac_{prog}$ : acurácia da seleção de progênes, assumindo sobrevivência completa;

$h^2_{ad}$ : herdabilidade aditiva dentro de parcela, obtida ignorando-se a fração (1/4) da variância genética de dominância e média geral do experimento.

A partir do modelo descrito por Viana e Resende (2014), foi realizada análise de *deviance* (ANADEV) com o seguinte modelo:

$$D = -2\ln(L)$$

$$\ln(L) = -1/2\ln|X'V^{-1}X| - 1/2\ln|V| - 1/2(y - Xm)'V^{-1}(y - Xm)$$

Em que

$\ln(L)$ : ponto máximo da função de logaritmo de máxima verossimilhança restrita (REML);  $y$  = vetor da variável analisada;  $m$  = vetor dos efeitos das observações, assumido fixo;  $X$  = matriz de incidência dos efeitos fixos; e  $V$  = matriz de variância-covariância de  $y$ .

Para testar a significância dos efeitos, foi utilizado o teste estatístico LRT (teste de razão de verossimilhança):

$$LRT: | - 2\ln(Lse) + 2\ln(Lfm)$$

Em que  $Lse$ : ponto máximo da função de máxima verossimilhança para o modelo reduzido (sem os efeitos) e;  $Lfm$ : ponto máximo da função de máxima verossimilhança para o modelo completo.

### 3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1.4.1. Severidade dos sintomas

Os primeiros sintomas da doença foram observados 30 dias após o plantio em um genótipo de *Passiflora edulis* e seis genótipos da geração RC<sub>3</sub>. Aos 150 dias, quase todos os genótipos de *P. edulis* apresentavam sintomas, exceto a planta 542, que apresentou sintomas aos 225 dias. Nos estudos de Preisigke et al. (2021), em que foi avaliada a população de RC<sub>1</sub>, foram relatados os primeiros sintomas após 120 dias de avaliações e, aos 180 dias, 100% dos genótipos de *P. edulis* estavam sintomáticos.

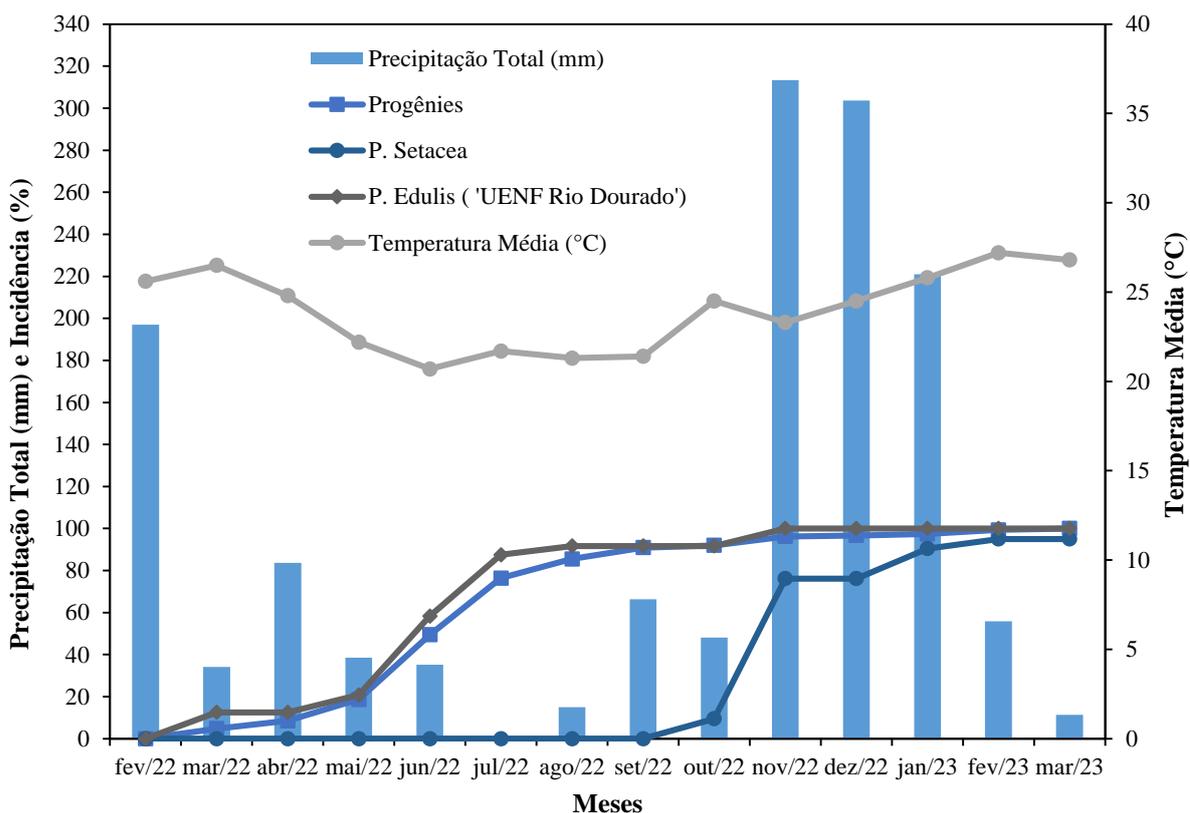
Nos estudos de Santos et al. (2015b), em que foi avaliada uma população de híbridos interespecíficos (*P. edulis* x *P. setacea*), os primeiros sintomas foram observados aos nove meses após a instalação do experimento no campo, ou seja, com 270 dias de avaliações. Ao término das avaliações, foram constatados genótipos sem sintomas, o que difere desse trabalho, em que não foram observados genótipos sem sintomas, mas sim a amenização de alguns sintomas.

Essas informações podem estar relacionadas à quantidade de genes envolvidos na herança da resistência, por se tratar de herança quantitativa, é difícil encontrar genótipos sem sintomas da doença com o avanço de gerações de retrocruzamentos. Isso ocorre, pois os genótipos estão cada vez mais semelhantes geneticamente, já que a probabilidade de recombinação entre os genomas do doador e do recorrente diminui a cada geração de retrocruzamento, levando a uma maior proporção do genoma do recorrente na progênie (93,75%), resultando, conseqüentemente, em uma maior similaridade entre a progênie e a genitor recorrente (Souza et al., 2022). As famílias deste estudo estão em RC<sub>3</sub>, com isso, o genoma de *P. edulis*, que é susceptível, já está quase todo recuperado.

Outro fator pode ser o maior período de avaliação feito neste estudo, em comparação ao estudo de Santos et al. (2015b) mencionado anteriormente, em que as avaliações foram feitas semanalmente durante cinco meses. No presente trabalho os genótipos foram avaliados por 12 meses, expondo as plantas por mais tempo aos fatores bióticos e abióticos.

Deve-se levar em consideração a hipótese de variabilidade genética do vírus e sua interação com o ambiente no qual está inserido. Outro fator que também pode ter contribuído para os resultados é a concentração de inóculo viral nas plantas e/ou agressividade do inóculo presente no campo (Pinto et al., 2008).

A espécie resistente, *Passiflora setacea*, apresentou sintomas leves da virose em alguns genótipos após 240 dias de avaliações. Aos 300 dias de avaliações, esses sintomas atingiram todos os genótipos da espécie. No nono mês após o plantio, todos os indivíduos de *P. edulis* apresentavam sintomas da doença. Nesse mesmo período, 96,2% das famílias de RC<sub>3</sub> apresentaram características dos sintomas causados pelo CABMV, enquanto 9,52% dos indivíduos de *P. setacea* apresentavam características leves da doença (Figura 4).



**Figura 4.** Precipitação, temperatura média e incidência de plantas infectadas por *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). Dados climáticos fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), conforme registrado mensalmente na Estação Automática de Campos dos Goytacazes, RJ, entre fevereiro de 2022 e março de 2023. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ, 2023.

Resultados semelhantes foram encontrados por Mendes et al. (2022) que, ao avaliarem a população de seleção recorrente no nono mês após o plantio, observaram que 80,4% das progênes e todos os indivíduos de *P. edulis* apresentavam sintomas da doença, enquanto os indivíduos de *P. setacea* estavam assintomáticos. Nos estudos de Gonçalves et al. (2021b), que avaliaram três famílias de irmãos completos, oriundas da recombinação entre indivíduos da primeira geração de retrocruzamento, os primeiros sintomas foram relatados aos 50 dias após o início do experimento e, também, no nono mês de avaliação todas as plantas estavam sintomáticas, com os sintomas variando de leves a severos.

Após um ano, no final das avaliações, 100% das plantas apresentavam sintomas da doença, com diferentes níveis de severidade. Diferença esta que pode estar relacionada com a variabilidade genética existente na população segregante e, também, nos isolados virais (Cerqueira-Silva et al., 2008).

Outros fatores como a quantidade de genes envolvidos na herança da resistência também devem ser considerados para explicar os diferentes níveis de severidade causados pelo CABMV. Santos et al. (2019) encontraram sete *locos* de menor efeito (QTLs) associados à resistência ao vírus. Além desses, os fatores ambientais como temperatura e precipitação devem ser considerados, visto que podem influenciar na virulência do patógeno e como os sintomas da doença se manifestam (Mendes et al., 2022).

Durante o período de avaliação do experimento, as temperaturas mínimas variaram de 17,4 a 23,9 °C e as temperaturas máximas de 27,6 a 33,9 °C. A precipitação média mensal variou de 0,1 a 313,4 mm, com total acumulado de 1423,2 mm. Foi observado que nos meses mais frios e com menores precipitações, no período do inverno, houve um aumento dos sintomas da virose. O período do inverno é caracterizado por apresentar menor incidência de luz natural, isso causa redução da atividade vegetativa da planta (Xu; Hu; Poethig, 2021) o que, de acordo com Santos et al. (2021), pode causar um aumento dos sintomas foliares da virose causada pelo CABMV.

Foi observado que as condições favoráveis de temperatura para a maioria das espécies de pulgões descritas no Brasil são na variação de 20 a 24 °C e baixa precipitação, o que favorece a formação de maiores colônias desses insetos (Garcêz et al., 2015). Os principais responsáveis pela transmissão e dispersão do CABMV são os afídeos alados, mas temperaturas acima de 25°C inibem sua atividade biológica, interferindo na sua mobilidade, o que impede, em grande parte, a disseminação da doença (Rodrigues et al., 2016).

#### **3.1.4.2. Estimativa dos parâmetros genéticos**

Os valores de AACPD<sub>M</sub> variaram de 371,25 (resistente) a 1076,25 (suscetível) para os genótipos avaliados. Os genótipos que obtiveram os menores valores de AACPD<sub>M</sub> foram de *P. setacea* (371,25 a 393,75) e as plantas 450, 340 e 30 da população segregante RC<sub>3</sub> (397,5; 412,5; 420 respectivamente). Esses genótipos apresentaram sintomas leves da doença, com mosaico leve, sem deformação foliar e poucas folhas com os sintomas, sendo considerados resistentes.

Os genótipos que obtiveram maiores valores de AACPD<sub>M</sub>, além das *P. edulis*, foram as plantas 533 (1076,25) e 365 (990) da família RC<sub>3</sub>-501, e a planta 417 (975) da família RC<sub>3</sub>-17, ambas as famílias obtiveram os resultados mais severos da doença. A planta 426 de *P. edulis* foi um dos genótipos que obteve maior valor de AACPD<sub>M</sub> com 948,75. Todos esses genótipos exibiram sintomas

mais graves da doença, com mosaico severo, bolhas e deformações foliares distribuídas em quase toda área ocupada pela planta, portanto, foram consideradas altamente suscetíveis.

Os parâmetros genéticos foram estimados para AACPD (Tabela 2). Foi possível observar diferenças significativas entre os genótipos a 1% de probabilidade pelo teste do Qui-quadrado para as características AACPD, isso indica que há variabilidade genética na população avaliada, possibilitando a seleção dos melhores genótipos para futuras etapas do método do retrocruzamento.

Na Tabela 2 é possível observar valores medianos para as estimativas de herdabilidade individual no sentido restrito ( $h^2_a$ ), e baixos para herdabilidade aditiva dentro de parcela ( $h^2_{ad}$ ). A natureza poligênica e de herança complexa pode ser utilizada para explicar esses resultados, em sua maioria, essas características, são condicionados por muitos genes com pequenos efeitos individuais e sofrem grande influência do ambiente (Cruz; Carneiro; Regazzi, 2014).

**Tabela 2.** Análise de *deviance* e estimativas dos parâmetros genéticos via procedimento REML, para resistência ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus* baseado na área abaixo da curva de progresso da doença média (AACPD), em genótipos de maracujazeiro provenientes da população segregante RC<sub>3</sub>.

	AACPD	
<b>Efeito</b>	Deviance	LRT ( $\chi^2$ )
<b>Genótipos</b>	4815,64	18,71**
<b>Modelo completo</b>	4796,93	
<b>Parâmetros Genéticos</b>	<b>AACPD</b>	
$\sigma^2_g$	2426,47	
$\sigma^2_{\text{parc}}$	399,06	
$\sigma^2_{\text{dentro}}$	8961,38	
$\sigma^2_f$	11786,92	
$h^2_a$	0,41 +- 0,12	
$h^2_{ad}$	0,27	
$h^2_{mp}$	0,95	
$C^2_{\text{parc}}$	0,03	
$AC_{\text{prog}}$	0,97	
<b>Média</b>	<b>621,63</b>	

\*\* significativo a 1 % de probabilidade pelo teste Qui-quadrado. LRT( $\chi^2$ ): teste de razão de verossimilhança.

$\sigma^2_g$ : variância genotípica entre progênies de irmãos completos;  $\sigma^2_{\text{parc}}$ : variância ambiental entre parcelas;  $\sigma^2_{\text{dentro}}$ : variância residual dentro de parcela;  $\sigma^2_f$ : variância fenotípica individual;  $h^2_a$ : herdabilidade individual no sentido restrito;  $h^2_{ad}$ : herdabilidade aditiva dentro de parcela;  $h^2_{mp}$ : herdabilidade da média de progênies;  $C^2_{\text{parc}}$ : coeficiente de determinação dos efeitos de parcela;  $AC_{\text{prog}}$ : acurácia da seleção de progênies.

Considerando a herdabilidade com base na média de família ( $h^2_{mp}$ ), o valor para AACPDm foi considerado alto (0,95), sendo este um resultado esperado, visto que os efeitos ambientais são minimizados, já que estes são divididos pelo número de repetições e pelo número de plantas por parcela. Com isso, os valores fenotípicos se aproximam dos valores genotípicos, como também foi observado no trabalho de Mendes et al. (2022).

As estimativas dos parâmetros genéticos auxiliam na escolha do método de melhoramento de um programa. Elas são essenciais, pois auxiliam na indicação de genótipos, facilitando a condução de etapas futuras de programas de melhoramento.

O retrocruzamento é uma estratégia de melhoramento com o objetivo de introduzir características controladas por um ou poucos genes (Freitas et al., 2015). O programa de melhoramento do maracujazeiro da UENF utilizou desse método para a incorporação de uma característica de herança complexa e, mesmo assim, vem apresentando resultados promissores.

Os valores obtidos da herdabilidade para AACPDm mostraram que, nesse caso, a melhor forma de fazer a seleção para a característica avaliada é com base nas famílias que irão proporcionar ganhos genéticos mais significativos (Ramalho et al., 2012a).

No trabalho de Preisigke et al. (2021), em que foi avaliada a população RC<sub>1</sub>, também foi encontrada alta herdabilidade com base na média da família (0,95), possivelmente indicando que a variação fenotípica observada tem mais origem genética do que ambiental. Isso indica uma situação favorável à seleção de famílias ou de indivíduos dentro de famílias, de forma a contribuir para redução da virose em gerações futuras.

Em relação à acurácia seletiva, segundo Resende et al. (2014), valores acima de 70% devem ser buscados. No presente estudo a estimativa foi de 97%, apresentando alta precisão e confiabilidade dos valores preditos, como também foi observado no estudo de Vidal et al. (2021).

#### **3.1.4.3. Seleção de genótipos e estimativa de ganho genético por BLUP**

Foram ranqueados 30 genótipos com os menores valores genéticos para a característica avaliada. Sabe-se que o êxito de um programa de melhoramento genético depende da escolha dos melhores genótipos que serão os genitores das

gerações futuras, essa seleção deve ser feita com base nos valores genéticos aditivos dos indivíduos (Cruz; Carneiro; Regazzi, 2014). Dessa forma, os ganhos genéticos foram preditos e novas médias estimadas (Tabela 3).

A AACPD<sub>M</sub> corresponde as interações numéricas da proporção de doenças em relação ao tempo e, com ela, é possível inferir a severidade da doença ao longo do tempo. Dessa forma, quanto mais resistente for o indivíduo, menor será o valor da AACPD<sub>M</sub> (Gonçalves et al., 2021b; Mendes et al., 2022). Com isso, o ranqueamento para AACPD<sub>M</sub> foi feito em ordem crescente para os valores dos efeitos genéticos aditivos preditos e ganhos.

Os valores genéticos aditivos variaram de -103,73 a -74,28 e os ganhos preditos variaram entre -7,85% a -2,98%, sendo a nova média dos indivíduos selecionados menor que a média geral. Como as estimativas são com base na área abaixo da curva de progresso da doença, são esperados valores negativos dos ganhos genéticos para os melhores genótipos.

Em relação às famílias com maior número de genótipos resistentes, a RC<sub>3</sub>-293 se destacou com 25 genótipos, sendo considerada a melhor família. Em seguida está a família RC<sub>3</sub>-153 com 5 genótipos. Nenhum genótipo das famílias RC<sub>3</sub>-355, RC<sub>3</sub>-17 e RC<sub>3</sub>-501 foi selecionado, não sendo estas famílias indicadas para gerar genótipos resistentes nas próximas gerações.

**Tabela 3.** Ranqueamento dos 30 genótipos com as menores estimativas para valor genético aditivo, ganhos genéticos e novas médias preditas, estimados via REML/BLUP, em genótipos de maracujazeiro oriundos da terceira geração de retrocruzamentos, para área abaixo da curva de progresso da doença média (AACPDM). Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

Ordem	Genótipo	Bloco	Família	AACPDM			Nova Média
				Valor fenotípico	Valor Genético	Ganho (%)	
1	450	4	293	397,50	-103,73	-7,85	613,78
2	675	6	293	423,75	-101,94	-7,65	613,98
3	163	2	293	420,00	-94,63	-7,45	614,18
4	340	3	293	412,50	-94,12	-7,26	614,37
5	476	5	293	438,75	-90,03	-7,08	614,55
6	475	5	293	446,25	-88,01	-6,91	614,73
7	673	6	293	476,25	-87,73	-6,73	614,91
8	334	3	293	442,50	-85,99	-6,56	615,07
9	483	5	293	453,75	-85,97	-6,38	615,24
10	183	2	293	457,50	-84,47	-6,22	615,42
11	441	4	293	476,25	-82,41	-6,05	615,58
12	474	5	293	468,75	-81,91	-5,88	615,75
13	434	4	293	480,00	-81,39	-5,72	615,91
14	482	5	293	472,50	-80,89	-5,56	616,07
15	481	5	293	472,50	-80,89	-5,39	616,24
16	674	6	293	506,25	-79,60	-5,23	616,40
17	445	4	293	487,50	-79,36	-5,07	616,56
18	389	4	153	453,75	-79,12	-4,91	616,73
19	677	6	293	510,00	-78,58	-4,75	616,88
20	446	4	293	491,25	-78,34	-4,58	617,05

Tabela 3, Cont.

Ordem	Genótipo	Bloco	Família	AACPDM			Nova Média
				Valor fenotípico	Valor Genético	Ganho (%)	
21	396	4	153	457,50	-78,09	-4,42	617,21
22	106	1	153	442,50	-76,95	-4,26	617,37
23	41	1	293	468,75	-76,01	-4,11	617,53
24	35	1	293	468,75	-76,01	-3,94	617,69
25	579	5	153	468,75	-75,76	-3,78	617,85
26	384	4	153	468,75	-75,05	-3,63	618,01
27	29	1	293	472,50	-74,99	-3,46	618,17
28	486	5	293	495,00	-74,81	-3,31	618,33
29	479	5	293	495,00	-74,81	-3,15	618,48
30	448	4	293	506,25	-74,28	-2,98	618,65

**Valor fenotípico:** intensidade dos danos à planta causados pelo CABMV ao final das avaliações; **Nova média:** média esperada da próxima geração em relação à intensidade dos danos à planta causados pela CABMV; **AACPDM:** área média sob a curva de progresso da doença.

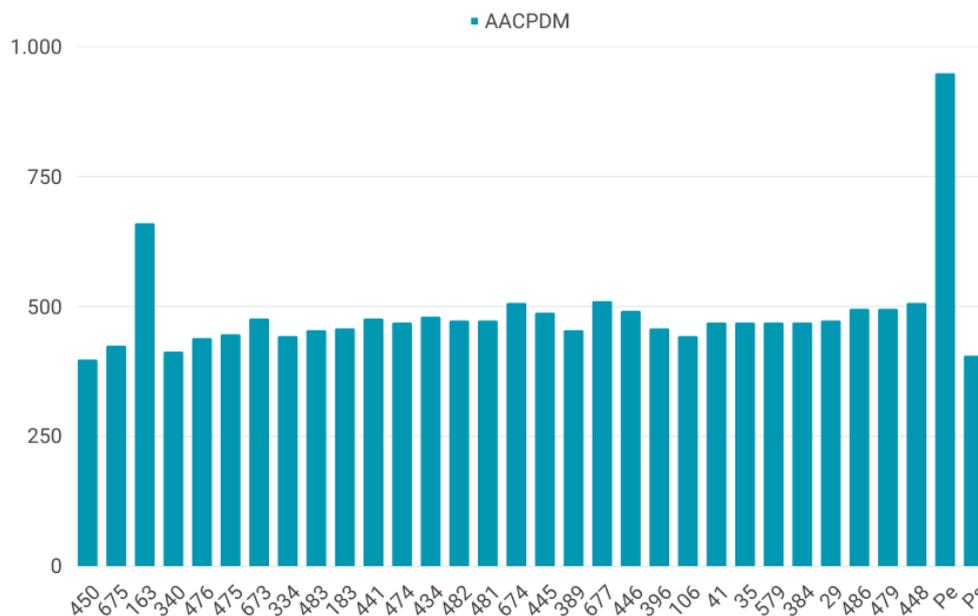
Nos estudos de Gonçalves et al. (2021) foram avaliadas três famílias de irmãos completos originadas da recombinação entre os indivíduos da geração RC<sub>1</sub>, os ganhos para AACPD variaram de -0,07 a 0,28%. Na população RC<sub>2</sub>, avaliada por Vidal et al. (2021), os valores genéticos variaram de -7,28 a -3,89 e ganhos positivos de 0,60 a 1,92%. Observa-se que, com o passar das gerações de retrocruzamentos, os ganhos negativos para AACPD são incrementados, resultados que são positivos para dar continuidade a esse método de melhoramento no programa do maracujá da UENF.

O genótipo representado pela planta 450 no campo, foi observado como o mais resistente entre os 30 genótipos selecionados, com 397,5 de AACPD. Ele também foi o indicado com o melhor valor genético, pertencendo à família RC<sub>3</sub>-293, que foi a família com os melhores ganhos, seguida pela família RC<sub>3</sub>-153 (Tabela 4).

**Tabela 4.** Ranqueamento das cinco famílias de RC<sub>3</sub> com as estimativas para valor genético aditivo, ganhos genéticos e novas médias preditas, estimados via REML/BLUP. Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

Ordem	Progênie	g	Ganho	Nova Média
1	501	54,8166	54,8166	676,4502
2	17	27,7524	41,2845	662,9181
3	355	16,6791	33,0827	654,7163
4	153	-42,8960	14,0880	635,7217
5	293	-56,3522	0	621,6336

Comparando os genótipos selecionados da terceira geração de retrocruzamento com a espécie silvestre (Ps) e a cultivar comercial (Pe) na Figura 5, é possível observar que nenhum genótipo passou de 700 no valor da AACPD, sendo a cultivar comercial extremamente suscetível à doença. Todos os genótipos foram levados juntos e sadios ao campo, mas *P. edulis* apresentou sintomas no início das avaliações e se manteve com sintomas severos e constantes da doença.



**Figura 5.** Média da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPDm) ao longo de 12 meses de avaliações em 30 genótipos mais bem ranqueados para resistência ao CABMV da terceira geração de retrocruzamento, bem como a cultivar comercial (Pe) e a espécie silvestre (Ps). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ, 2023.

Nota-se que o genótipo 163 obteve maior valor de AACPDm depois da *P. edulis*, com 660, sendo este genótipo não recomendado para compor futuras gerações de retrocruzamento. Genótipos como 450, 340, 476 e 389 poderão ser indicados como genitores na próxima geração de retrocruzamento, visto que estão entre os 30 mais bem ranqueados, apresentaram baixos valores de AACPDm e foram selecionados para análises moleculares, conforme apresentado no segundo capítulo deste trabalho.

Mesmo que a característica de resistência seja de herança quantitativa, o uso do método do retrocruzamento tem se mostrado efetivo em transferir genes de resistência ao CABMV. Esse resultado positivo pode ser consequência do grande número de genótipos avaliados e pelas altas estimativas da herdabilidade para a característica avaliada. Quando a expressão da característica envolve vários genes, é recomendado avaliar um grande número genótipos em cada geração de retrocruzamento e avaliar bem os sintomas induzidos pela doença, o que aumenta a acurácia na seleção de genótipos resistentes ao vírus (Preisigke et al., 2021).

Segundo Borém et al. (2021), para o desenvolvimento de novas cultivares com as características desejáveis, é essencial a escolha de indivíduos com boas características agrônômicas. O presente trabalho não indicou genótipos a partir dessas características, sendo este um trabalho paralelo, aqui os genótipos foram indicados com base em características estimadas para a área abaixo da curva de progresso da doença e, no próximo capítulo, com base nas análises moleculares.

### **3.1.5. CONCLUSÕES**

Os valores da herdabilidade individual no sentido restrito e da herdabilidade da média de progênies sugeriram a melhor seleção dentro das famílias, possibilitando a seleção de indivíduos superiores.

Dos 30 genótipos ranqueados para resistência ao CABMV, os genótipos 450, 476, 340 e 389 apresentam os melhores ganhos e menores valores de AACPD, com isso, podem ser indicados a compor a próxima geração de retrocruzamento.

Dos 30 genótipos mais bem ranqueados, somente os 163, 446, 448, 489, 674 e 677 não são considerados resistentes no decorrer das análises. Todos os outros genótipos do ranqueamento apresentam características promissoras para a resistência ao CABMV.

## **3.2. APLICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM POPULAÇÃO SEGREGANTE RC<sub>3</sub> PARA ESTIMAR DISTÂNCIAS GENÉTICAS E AUXILIAR NA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS**

### **3.2.1. INTRODUÇÃO**

Os marcadores moleculares são ferramentas de auxílio muito importantes em programas de melhoramento genético, utilizados em análises para as mais diversas finalidades. Nesse estudo, foram utilizados marcadores microsatélites para estimar as distâncias genéticas entre genótipos da terceira geração de retrocruzamento do maracujazeiro da UENF.

Repetições de sequência simples (SSRs), também conhecidas como microsatélites, são repetições curtas em tandem de sequências de DNA, amplamente utilizadas como marcadores genéticos em várias aplicações, como impressão digital de DNA, mapeamento de genes, análise forense, reprodução assistida por marcadores e avaliação da pureza da semente (Abdurakhmonov, 2016).

Os marcadores SSR são polimórficos e, por isso, fornecem bastante informação genética por *locos*, além de serem abundantes no genoma, são multialélicos, acessíveis e fáceis de serem analisados (Turchetto-Zolet et al., 2017).

Estes marcadores genéticos são ideais devido à diversidade de sequências SSR e à conservação de suas regiões flangeadoras. Seu uso na seleção de genótipos é baseado na genotipagem precisa e eficiente, que constitui a base dos SSRs como um marcador genético eficaz em várias aplicações (Li et al., 2017).

Nos últimos anos, o uso de marcadores microssatélites emergiu como uma poderosa ferramenta na pesquisa de melhoramento genético do maracujá. A aplicação de marcadores microssatélites em programas de melhoramento de maracujá tem fornecido informações valiosas sobre a diversidade genética, estrutura populacional e padrões de herança desta fruticultura.

Pesquisadores da UENF desenvolveram uma nova estratégia de seleção para famílias de meios-irmãos de maracujá azedo (*Passiflora edulis*), utilizando marcadores microssatélites que envolve seleção recorrente e visa melhorar as características genéticas do fruto, como resistência a doenças e melhoria do sabor (Cavalcante et al., 2019).

Avanços recentes nas tecnologias de sequenciamento do genoma permitiram a geração de uma montagem do genoma em escala cromossômica para o maracujá. Esta descoberta fornece informações valiosas sobre a evolução e síntese do sabor do maracujá, facilitando novos esforços de melhoramento genético (Xia et al., 2021).

Os marcadores microssatélites apresentam altos níveis de polimorfismo, permitindo a detecção de variabilidade em espécies com baixos níveis de diversidade genética. Essa característica os torna particularmente úteis no melhoramento genético do maracujá, que pode apresentar variação genética limitada (Cavagnaro et al., 2011).

Esses marcadores são herdados de maneira mendeliana e atuam como marcadores codominantes. Isto significa que podem refletir com precisão as contribuições genéticas de ambos os progenitores, fornecendo informações valiosas para programas de melhoramento (Miah et al., 2013).

Marcadores microssatélites têm sido amplamente utilizados em estudos de diversidade genética de populações de maracujá. Ao analisar as variações nos alelos dos microssatélites, os pesquisadores podem avaliar as distâncias genéticas e as relações entre os diferentes genótipos dentro de uma população, auxiliando na compreensão da estrutura e diversidade genética. Eles também têm sido empregados em genética populacional e estudos evolutivos do maracujá. Esses

marcadores permitem aos pesquisadores investigarem a estrutura genética, o fluxo gênico e os processos evolutivos que moldam as populações de maracujá (Gonçalves-Vidigal & Rubiano, 2011).

O programa de melhoramento genético vegetal da UENF faz uso dos marcadores moleculares em suas variadas pesquisas, por exemplo, no estudo de Cavalcante (2019) foram utilizados 107 iniciadores microssatélites, desenvolvidos para *P. edulis* para identificar *locos* SSR capazes de diferenciar os genitores da população proveniente do quarto ciclo de seleção recorrente do maracujazeiro. Foi constatado, por meio dos dados moleculares, que havia variabilidade nessa população e alguns genótipos foram indicados para dar continuidade ao programa.

Este trabalho visa a aplicação de marcadores SSR em indivíduos da terceira geração de retrocruzamento do maracujazeiro da UENF, selecionados com base na AACPDM. A ferramenta molecular foi utilizada a fim de analisar a estrutura genética da população, com o propósito de selecionar os melhores genótipos que sejam geneticamente próximos a cultivar comercial *Passiflora edulis*. Com isso, é possível gerar suporte ao desenvolvimento da próxima geração de retrocruzamento desse programa de melhoramento genético, que poderá gerar a primeira cultivar de maracujá azedo resistente ao CABMV.

## **3.2.2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.2.2.1. Marcadores moleculares e microssatélites**

Os marcadores moleculares são amplamente utilizados em vários campos da biologia, incluindo genética, biologia populacional, filogenética e biotecnologia. Eles fornecem uma ferramenta estável, econômica e de fácil utilização, para detectar a variação genética e compreender a base genética das características em uma variedade de aplicações, incluindo mapeamento de genoma, marcação de genes, diversidade genética, análise filogenética e investigações forenses. Alguns exemplos de marcadores moleculares incluem aloenzimas, variações de repetição de DNA, polimorfismos de sequência de DNA e marcadores de hibridização de DNA (Gonçalves-Vidigal & Rubiano, 2011).

Vale ressaltar que os marcadores moleculares de DNA também são usados no melhoramento de plantas para investigar polimorfismos entre sequências de nucleotídeos de diferentes indivíduos, fornecendo informações para a compreensão da base genética das características (Nadeem et al., 2018). A escolha do marcador para uma pesquisa dependerá do uso direcionado, mas microssatélites e SNPs atendem amplamente à maioria dos requisitos (Grover; Sharma, 2016).

Os marcadores moleculares conhecidos como *Single Sequence Repeat*, os SSR, são baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), essas ferramentas versáteis são utilizadas em estudos genéticos de população (Turchetto et al., 2017). São repetições curtas em tandem de sequências de DNA, de motivos de 1 a 6 nucleotídeos. Eles são amplamente utilizadas como marcadores genéticos em vários campos de pesquisa incluindo genética de culturas, genética populacional e análise de diversidade genética (Vieira et al., 2016).

Os marcadores microssatélites são codominantes, o que significa que ambos os alelos podem ser distinguidos, além de serem multialélicos, com isso, fornecem um alto número de informação genética por *loco*. Eles são altamente polimórficos, tornando-se úteis para distinguir entre indivíduos ou populações (Wang et al., 2021). O número de unidade de repetição pode variar entre genótipos, o que se atribui ao fato de o marcador ser altamente polimórfico (Zanella et al., 2017).

O número de marcadores microssatélites usados em um estudo podem influenciar significativamente os resultados obtidos, com números crescentes de marcadores levando a estimativas mais precisas de parâmetros de diversidade (Wang et al., 2021).

Uma vez desenvolvidos, os marcadores microssatélites podem ser usados para analisar a diversidade genética, estrutura populacional e fluxo gênico, entre outras aplicações (Vieira et al., 2016). Alguns estudos têm focado no desenvolvimento de novos marcadores microssatélites e sua aplicação na análise da diversidade genética em espécies vegetais específicas, como lentilhas e amendoins (Grover; Sharma, 2016; Zhao et al., 2017).

Os marcadores microssatélites têm sido extensivamente estudados e desenvolvidos na área de melhoramento genético do maracujá. Os desenvolvimentos recentes nesta área incluem altos níveis de polimorfismo de

DNA, cujos estudos recentes desenvolveram com sucesso marcadores microssatélites para maracujazeiro azedo usando sequenciamento parcial do genoma. Esses novos marcadores apresentam altos níveis de polimorfismo de DNA, indicando seu potencial para análise genética e fins de melhoramento. Os marcadores também foram testados quanto à eficiência de genotipagem e polimorfismo de marcadores em acessos de maracujá e mostraram resultados promissores, com alta porcentagem de polimorfismo de DNA detectado e uma gama de alelos por *locus* (Araya et al., 2017).

Os marcadores microssatélites recentemente desenvolvidos têm sido aplicados para estudar a diversidade genética e a estrutura populacional do maracujá. Esses marcadores permitem aos pesquisadores avaliarem a variabilidade genética nas populações de maracujá, fornecendo informações valiosas para os esforços de conservação e melhoramento (Cerqueira-Silva et al., 2014c).

A tecnologia de sequenciamento de próxima geração tem sido utilizada para analisar o genoma do maracujá e identificar repetições de microssatélites. Esta abordagem permitiu a identificação e seleção de contigs específicos contendo sequências de microssatélites repetidas perfeitas para o desenvolvimento de marcadores (Araya et al., 2017).

No geral, os recentes desenvolvimentos em marcadores microssatélites para maracujá forneceram ferramentas valiosas para análise genética, melhoramento e esforços de conservação. Esses marcadores oferecem um meio econômico e eficiente de avaliar a diversidade genética, a estrutura populacional e o polimorfismo de marcadores em populações de maracujá. Além disso, contribuem para os esforços contínuos para melhorar as variedades de maracujá e garantir o cultivo sustentável desta fruteira economicamente importante.

### **3.2.2.2. Melhoramento do maracujazeiro com marcadores moleculares**

O recurso genético do maracujá apresenta variabilidade na resistência às principais doenças do maracujá e uma alta variabilidade morfológica. A biologia molecular e o uso de marcadores moleculares fornecem ferramentas úteis para pesquisas básicas e aplicadas associadas ao melhoramento genético em diferentes estágios. A base genética do maracujá azedo é restrita quanto à resistência e tolerância a doenças, e os autores defendem o uso de recursos

genéticos de espécies silvestres em programas de melhoramento (Cerqueira-Silva et al., 2014a).

O melhoramento do maracujá é uma importante área de pesquisa, e vários estudos têm sido realizados para explorar a diversidade genética do gênero *Passiflora*. O estudo de Paiva et al., (2014) objetivou determinar a variabilidade genética e as distâncias entre 10 espécies do gênero *Passiflora* usando marcadores microssatélites. Constatou-se que os marcadores SSR foram eficazes na detecção da variabilidade genética entre as espécies e podem ser usados para apoiar programas de melhoramento.

No estudo de Viana et al. (2010), foi investigada a diversidade genética em seis espécies silvestres de *Passiflora* usando características morfológicas e moleculares. O estudo encontrou diferenças estatisticamente significativas entre as espécies, indicando que tanto características morfológicas, quanto moleculares podem ser utilizadas para avaliar a diversidade genética em *Passiflora*.

Vários autores têm enfatizado pesquisas sobre a descrição, caracterização e uso de germoplasma como prioridade para a produção de maracujá visando obtenção de cultivares mais produtivas e com maior resistência a doenças. Estudos têm sido conduzidos para determinar a diversidade genética de genótipos de maracujá, usando marcadores de polimorfismo amplificado relacionado à sequência (SRAP) e marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) (Sturm et al., 2020).

Oluoch et al. (2018) analisaram a diversidade genética de genótipos de maracujá cultivados no Quênia por marcadores de polimorfismo amplificado relacionado à sequência (SRAP). O estudo constatou que a diversidade genética do maracujá era alta e os marcadores SRAP foram eficazes em detectar a variação genética entre os genótipos (Oluoch; Nyaboga; Bargul, 2018).

Um estudo recente publicado na *Nature* usou a montagem do genoma em escala cromossômica para fornecer informações sobre a evolução e a síntese do sabor do maracujá. Foi constatado que o maracujá tem uma história evolutiva complexa e identificou-se genes envolvidos na síntese de compostos de sabor (Xia et al., 2021).

Existem estudos com o uso de marcadores microssatélites no gênero *Passiflora*, mas poucos envolvendo várias espécies. Paiva et al. (2014) investigaram a amplificação cruzada de marcadores SSR para 10 espécies de

*Passiflora*, de forma a quantificar a variabilidade genética dos genótipos. *Primers* heterólogos foram amplificados na maioria das espécies analisadas, sendo encontrada ampla diversidade entre elas, isso propicia pesquisas com cruzamentos interespecíficos de forma a transferir alelos favoráveis.

No estudo de Cavalcante (2019), foram avaliadas 23 famílias de meios-irmãos oriundas do terceiro ciclo de seleção recorrente do programa de melhoramento genético do maracujazeiro da UENF, para investigar o efeito da junção de informações agrônômicas e moleculares na expressão da diversidade genética. Para a análise molecular, foram selecionados 95 genótipos pertencentes as 20 melhores famílias de maracujazeiro-azedo, tendo como critério os indivíduos mais produtivos. Foi notada que há variabilidade na população proveniente do quarto ciclo de seleção recorrente, possibilitando a continuidade do programa e a obtenção de ganhos genéticos com a seleção de genótipos superiores.

Em uma pesquisa para confirmar a hibridação em genótipos de maracujá ornamental, o DNA genômico das espécies genitoras e dos supostos híbridos foi extraído, e os *primers* RAPD foram usados para obter marcadores moleculares e selecionar híbridos interespecíficos de maracujá. Oito *primers* foram usados para confirmar os híbridos derivados de *P. gardneri* com *P. alata*, *P. watsoniana* com *P. alata*, *P. watsoniana* com *P. gardneri* e *P. gardneri* com *P. gibertii* (Conceição et al., 2011).

Outro estudo caracterizou e selecionou acessos de maracujá com base em marcadores moleculares microssatélites e reações a doenças para uso em programas de melhoramento. O estudo identificou 127 alelos (média de 5,52 alelos por *loco*), sendo 30% privados para acessos de maracujá amarelo ou roxo (Cerqueira-Silva et al., 2015).

No geral, a pesquisa sobre melhoramento do maracujazeiro tem se concentrado na identificação da diversidade genética, resistência a doenças e caracterização de germoplasma para desenvolver cultivares mais produtivas e resistentes a doenças. O uso de marcadores moleculares forneceu ferramentas úteis para essas pesquisas.

### 3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.2.3.1. Extração e quantificação do DNA genômico

As amostras de folhas jovens dos 92 genótipos de todas as famílias, selecionados com base em variadas notas na AACPDM, foram coletadas na área experimental localizada na Escola Técnica Estadual Agrícola Antônio Sarlo, no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, além desses genótipos, também foram selecionadas as espécies de *Passiflora* e um parental que originou a família RC<sub>3</sub>-501.

As amostras foram levadas ao Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Em seguida elas foram maceradas em nitrogênio líquido, sendo efetuada a extração do DNA genômico, empregando-se o procedimento proposto por Doyle e Doyle (1990), com algumas adaptações.

Foram adicionados aos tubos contendo as amostras maceradas, 850 µL do tampão de extração contendo 2% CTAB, 2,0 mols L-1 NaCl, 20 mmol L-1 EDTA, 100 mmol L-1 TrisHCl (pH 8,0), 2% PVP e 2,0% - mercaptoetanol, estes dois últimos necessários para remoção dos compostos fenólicos. O material foi incubado a 65°C por 40 minutos e homogeneizado suavemente por inversão a cada 10 minutos.

Após as amostras atingirem temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados por 8 minutos a 14.000 rpm e vertidos em novo tubo de 1,5 mL. Foram adicionados 800 µL clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) para efetuar a desproteinização. Este material sofreu suaves inversões durante aproximadamente 10 minutos, até ficar turvo.

A fase orgânica foi separada por centrifugação, a 14.000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5 mL devidamente identificado, essas etapas foram repetidas por mais três vezes, sendo que o clorofórmio adicionado deve ser 100 µL a mais que o volume do sobrenadante em cada etapa. Os ácidos nucleicos foram precipitados pela adição de dois terços (cerca de 400 µL) do volume de isopropanol gelado, e incubados por 30 minutos a -80°C.

O precipitado foi sedimentado por centrifugação, a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 500 µL de etanol a 70% gelado, para retirada de sal presente, e mais duas vezes

com 500  $\mu$ L de etanol a 95% gelado. Após cada lavagem o material foi centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm.

Após o descarte do último sobrenadante, o material foi levado ao aparelho de banho seco, até todo etanol ser removido. Em seguida, o material foi ressuspenso em 100  $\mu$ L de solução TE (Tris-EDTA - 10 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 1 mmol L<sup>-1</sup> EDTA, pH 8,0) com RNase em uma concentração final de 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> e incubado em banho-maria a 37°C por 40 minutos. O material foi, então, armazenado a -20°C até o uso.

Após a extração, o DNA foi submetido à quantificação via análise em gel de agarose a 1% com tampão TAE 1X (Tris, Acetato de Sódio, EDTA, pH 8,0) utilizando o marcador Lambda ( $\lambda$ ) de 100 pb (100 ng/ $\mu$ L<sup>-1</sup>) (Invitrogen, USA). As amostras de DNA foram coradas utilizando a mistura de *GelRed<sup>TM</sup>* e *Blue Juice* (1:1) e a imagem capturada pelo sistema de fotodocumentação da *Loccus L-PIX EX*. Baseada nas imagens obtidas, a concentração de DNA foi estimada em comparação com o marcador de 100pb e as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de trabalho de 10 ng/ $\mu$ L<sup>-1</sup>.

### 3.2.3.2. Triagem dos *primers*

Visando testar as condições da reação em cadeia da polimerase (PCR), um total de 135 pares de *primers* gênicos desenvolvidos por VenancioGroup da UENF, projetados para amplificar *locos* SSR em *Passiflora edulis*. Foram testados em 5 indivíduos, com gradiente de temperatura variando de 50°C a 57°C, com as reações de PCR realizadas em termocicladores da *Applied Biosystems/Veriti 96 well*, num programa de 36 ciclos, com às seguintes temperaturas e tempo: 94°C durante 4 minutos (desnaturação inicial); 94°C por 1 minuto (desnaturação cíclica); temperatura específica de cada iniciador, em graus Celsius, por 1 minuto (anelamento); 72°C por 2 minutos (extensão cíclica); 72°C por 10 minutos (extensão final); e 4°C forever.

Após o *screening*, foi selecionado um conjunto de 45 iniciadores para as reações de amplificação, sendo 5 *primers* por grupo de ligação. A partir destes foram selecionados 27 *primers* polimórficos (Tabela 5).

**Tabela 5.** Sequência dos 27 pares de iniciadores microssatélites, customizados pela empresa Invitrogen em 2021, utilizados nas ampliações dos 95 genótipos de *Passiflora*.

<b>Cromossomo</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequência (5'3')</b>	<b>TA</b>
Chr01	<b>Maracujá 01</b>	F: CCATGCATGGTGTTCCTTCCC R: GACTCAATGCCACACACAACC	51°C
Chr01	<b>Maracujá 07</b>	F: TCGCTCCTTTTTCTCTCCG R: CACTTATCGGGAGGCAACCC	56°C
Chr01	<b>Maracujá 08</b>	F: CACAGTGATTGGCATCCTGC R: GAGGCCTGATTTGTTGATGGC	56°C
Chr02	<b>Maracujá 17</b>	F: AGCATCCCCAATACTACTGCC R: ACCTGGATAAAGAGGGAACGG	53°C
Chr02	<b>Maracujá 22</b>	F: TCTGGATGTAGAAAGCGTTTTGC R: CCCTGCAGTTTTCTTCTGAGG	53°C
Chr02	<b>Maracujá 30</b>	F: CTCACCGAAACCGATTTCCG R: GTGAGAGCAGAGTGAGAGCG	54°C
Chr03	<b>Maracujá 32</b>	F: TGTCTGAATGGTCCTCTCCG R: TCGTATCCGACAGAGATCCG	53°C
Chr03	<b>Maracujá 35</b>	F: AGAATCGAGCTTGTTTGTTTTAACC R: TAAGAGAACCGGTGGACTGC	55°C
Chr03	<b>Maracujá 42</b>	F: TGAATTATTTGGCCTAGGCTATGC R: TCTTTTAGATGGTGC GTTGGC	55°C
Chr04	<b>Maracujá 58</b>	F: TGCATGTGAAAGGAGGATTGG R: CAAAGGAGGCAAGGCAAAGG	55°C

**Tabela 5, Cont.**

<b>Cromossomo</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequência (5'3')</b>	<b>TA</b>
Chr04	<b>Maracujá 60</b>	<b>F: CGTTTGAGTGGTAAGTCTGGC R: AGCAGCCAGATTCAAGTTTAATCC</b>	53°C
Chr05	<b>Maracujá 62</b>	<b>F: ACAATGATATTTGGAGGCACTTTGG R: ACTGCTGGGATTACATCAAAGG</b>	54°C
Chr05	<b>Maracujá 63</b>	<b>F: AGCCTGCCATTATTCATTCTGC R: CTTTCATGAATACCGCAGCCG</b>	51°C
Chr05	<b>Maracujá 71</b>	<b>F: GTTGAGGAACACACAAGGAGG R: AAGCAGCACTCTCGATCTCC</b>	55°C
Chr06	<b>Maracujá 76</b>	<b>F: TACCTCAGGCCTACCTCTGG R: CGAGTCTGTTTCGAGAGCAGG</b>	52°C
Chr06	<b>Maracujá 81</b>	<b>F: CATTGGTAGACAACAAAAGTTAGGG R: CCAATAAAATTCAAGGTACGCTTGC</b>	51°C
Chr06	<b>Maracujá 89</b>	<b>F: CCACCTAATCGAAGACAGCCC R: TGCCTATCGGGATACTTATGAACC</b>	52°C
Chr07	<b>Maracujá 93</b>	<b>F: ACAACCACACCTTCCTTCGG R: GCTTGATAAAGATTGAAAAGATGGGC</b>	52°C
Chr07	<b>Maracujá 94</b>	<b>F: TAGGCGAATGCTCATGACCC R: TCATGCTTCCCCAAACAAGC</b>	51°C
Chr07	<b>Maracujá 101</b>	<b>F: GGCCTGTGCTTTGTAACGC R: TTCTTACAGCCGACACCACC</b>	52°C

**Tabela 5, Cont.**

<b>Cromossomo</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequência (5'3')</b>	<b>TA</b>
Chr08	<b>Maracujá 109</b>	<b>F:</b> CCCTGACCACTTCTCTACTGG <b>R:</b> TGACCAGTTTTTCATGATGAGACC	53°C
Chr08	<b>Maracujá 110</b>	<b>F:</b> GGTCATGACTGAGCCTATAGAGG <b>R:</b> GCATCTCAGAGAGGCCATCC	52°C
Chr08	<b>Maracujá 112</b>	<b>F:</b> TCAAAGCACGTCGTATCACG <b>R:</b> TTTTGTCGGTTTGCGTTTGC	51°C
Chr08	<b>Maracujá 119</b>	<b>F:</b> TGCTCGATTGTGAAGCAAGC <b>R:</b> GGAATTCCACCAGCAAAGGC	52°C
Chr09	<b>Maracujá 123</b>	<b>F:</b> TTACCTGTCCCATTTCAGCCG <b>R:</b> CTGTGTTTTGTCACGATCATGC	53°C
Chr09	<b>Maracujá 125</b>	<b>F:</b> TGAGTCCGTTTCATGAGCAGC <b>R:</b> CAACTACCGGCTCAGGTGG	54°C
Chr09	<b>Maracujá 135</b>	<b>F:</b> ACCTTTGAGATGAGCATCCTCG <b>R:</b> TGGCATTGACTTATGATTATAGACCC	53°C

**TA:** Temperatura de anelamento.

### 3.2.3.3. Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para marcadores SSR

As reações de PCR foram realizadas em termocicladores da *Applied Biosystems/Veriti 96 well*, em um programa de 38 ciclos, obedecendo às seguintes temperaturas e tempo: 94°C durante 4 minutos (desnaturação inicial); 94°C por 2 minutos (desnaturação cíclica); temperatura específica de cada iniciador, em graus Celsius, por 1 minuto (anelamento); 72°C por 2 minutos (extensão cíclica); 72°C por 10 minutos (extensão final); e 4°C *forever*.

O volume final foi de 13 µL para cada amostra, sendo: 2 µL de DNA (10 ng/µl), 1,50 µL de Tampão 10X (NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1,5 µL de dNTPs (2 mM), 1 µL de iniciador (R+F) (5 µM) e 0,12 µL de Taq-DNA polimerase (5 U/µL) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA).

Os produtos da amplificação foram diluídos numa relação de 8 µl de amostra para 16 µl de Buffer E do kit DNF 900 e submetidos a um sistema de eletroforese capilar (*Fragment Analyzer - AATI*), no qual fragmentos amplificados de 35 a 500pb são separados com uma resolução de aproximadamente 2bp. Cada corrida teve duração de 2h e 20min sob uma voltagem de 8 kw.

### 3.2.3.4. Análises estatísticas

Os dados obtidos a partir da amplificação dos 27 marcadores SSR foram convertidos em código numérico para cada alelo por *loco*. A matriz numérica foi desenvolvida atribuindo-se valores de 1 até o máximo de alelos por *loco*, como descrito a seguir: para um *loco* que apresenta três alelos, tem-se a representação 11, 22 e 33 (A1A1, A2A2 e A3A3) para as formas homozigotas, e 12, 13 e 23 (A1A2, A1A3 e A2A3) para as heterozigotas. A partir dessa matriz numérica, foi calculada a distância genética entre os genótipos estudados, com o auxílio do programa GENES (Cruz, 1998).

Foram testados três índices que calculam a similaridade entre os pares de genótipos (Tabela 6), são eles: o Índice não ponderado, o Índice Ponderado e o Índice de Smouse e Peakall.

Três métodos hierárquicos de agrupamento foram testados (Tabela 6). O UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*) que utiliza de médias aritméticas das medidas de dissimilaridade, evitando caracterização por valores extremos (Cruz; Ferreira; Pessoni, 2011). O método do vizinho mais

próximo (Neighbor Joining), proposto por Saitou e Nei (1987), que agrupa os indivíduos mais próximos com os dados da matriz de distância. E o método Ward, em que a medida de similaridade usada no agrupamento é a soma dos quadrados entre dois agrupamentos (Seidel et al., 2008).

**Tabela 6.** Índices e métodos testados que calculam a similaridade entre os pares de genótipos.

<b>Medidas de distância</b>	<b>Métodos de agrupamento</b>	<b>Correlação Cofenética (CCC)</b>	<b>Distorção (%)</b>	<b>Estresse (%)</b>
<b>Índice Ponderado</b>	UPGMA	0,8343	3,7744	19,4296
	Vizinho mais próximo	0,7875	69,3246	47,9051
	Ward	0,4975	—	—
<b>Índice não ponderado</b>	UPGMA	0,7913	4,7017	21,6814
	Vizinho mais próximo	0,7342	74,807	53,1769
	Ward	0,599	—	—
<b>Índice de Smouse e Peakall</b>	UPGMA	0,7319	8,3169	28,8394
	Vizinho mais próximo	0,7019	81,8213	60,7808
	Ward	0,5784	—	—

Foi escolhido o Índice Ponderado porque obteve a maior correlação cofenética. Ele pode ser calculado por:

$$S_{ii=\frac{1}{2}} = \sum_{j=1}^L p_j c_j$$

Em que:

$p_j = \frac{a_j}{A}$ : peso associado ao *loco* j, determinado por:

$a_j$ : número total de alelos no *loco* j;

A: número total de alelos estudados

Sendo  $\sum_{j=1}^L p_j = 1$ ;

$c_j$ : número de alelos comuns entre os pares de acessos  $i$  e  $i'$ .

O índice trata de medidas de similaridade. Entretanto, em análises de agrupamento o recomendado é utilizar medidas de dissimilaridade, definidas por:

$$D = 1 - S$$

O método selecionado nesse estudo foi o UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*) devido a maior correlação cofenética (CCC), que mensura o grau de ajuste entre o dendrograma desenvolvido e a matriz de dissimilaridade. Essa análise possibilitou a construção de um dendrograma com auxílio do programa R. A dispersão gráfica entre os genótipos foi realizada com base na análise das coordenadas principais (PCA), utilizando o programa Genalex 6.5 (Peakall; Smouse, 2012).

Após a obtenção da matriz de distância, foi feita a análise de agrupamento dos indivíduos via dendrograma, pelo método UPGMA, com auxílio do programa Mega versão 6 (Kumar et al., 2008).

Os índices de diversidade dos 95 genótipos foram estimados com o auxílio do programa Genalex 6.5 (Peakall; Smouse, 2012), tendo por base os seguintes parâmetros: número de alelos por *locos* polimórfico ( $N_a$ ), número de alelos efetivos ( $N_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), índice de informação ou índice de Shannon ( $I$ ), e índice de fixação ou coeficiente de endogamia ( $F$ ).

O número de alelos efetivos ( $N_e$ ), ou seja, aqueles que realmente se encontram na população pode ser calculado por:

$$N_e = \frac{1}{\sum p^2}$$

Onde:

$\sum p^2$ : somatório da frequência dos alelos homozigotos e heterozigotos.

O índice de informação, conhecido como Índice de Shannon ( $I$ ), é usado para estimar a diversidade e pode ser calculado por:

$$I = -1. \sum [P_i \cdot \ln(P_i)]$$

Em que:

$P_i$ : frequência alélica para cada um dos alelos em questão.

A  $H_o$  é a proporção de indivíduos heterozigotos observados em uma população estudada, sendo calculado por:

$$H_o = \frac{Nx}{N}$$

Onde:

$H_o$ : heterozigosidade observada;

$Nx$ : número de heterozigotos;

$N$ : número total de indivíduos da amostra.

A  $H_e$  pode ser definida como um somatório estimado de todos os indivíduos que poderiam ser heterozigóticos em um *loco*.

$$H_e = 1 - \sum P_i^2$$

Em que:

$H_e$ : heterozigosidade esperada;

$P_i$ : frequência do alelo do *i*-ésimo alelo.

Uma forma mais simplificada de calcular seria através da fórmula do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo:  $H_e = 2pq$ .

O índice de fixação ( $F$ ) exibe valores que variam de -1 a +1, e estima o coeficiente médio de endogamia por meio de:

$$F = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

Onde:

$H_o$ : heterozigosidade observada, que é a proporção de  $N$  amostras que são heterozigotas em um dado *locos*.

$H_e$ : proporção de heterozigosidade esperada sob acasalamento aleatório.

### 3.2.3.5. Proporção genômica dos genótipos

Para a estimar o nível da proporção genômica dos genótipos avaliados em comparação com o genitor recorrente, foi efetuado o cálculo da relação entre o número de *locos* iguais a 'UENF Rio Dourado' e o número total de *locos* analisados por genótipo, com o auxílio do programa computacional MICROSOFT EXCEL (2016).

### 3.2.3.6. Análise da estrutura genética da população

Para acessar a estrutura dos 95 genótipos, foram feitas análises com o método Bayesiano usando o *software STRUCTURE*, versão 2.3.4 (Pritchard; Stephens; Donnelly, 2000b).

Considerando que o presente estudo foi realizado com uma população proveniente de plantas de cruzamentos controlados, foi utilizado o modelo “*no admixture*”, sem mistura, correlacionado com as frequências alélicas da população (Cerqueira-Silva et al., 2014; Silva et al., 2016).

O período de *burn-in* e os números de replicação foram definidos em 25.000 e 75.000, respectivamente, para cada execução. O número de grupos (K) foi sistematicamente variado de 1 a 5, e 20, e as simulações foram realizadas para estimar cada K.

Foi utilizado o método *ad hoc*  $\Delta K$  descrito por Evanno et al. (2005), implementado na ferramenta online *Structure Harvester* (Earl; Vonholdt, 2012) para estimar o K mais provável para a população.

O limite de probabilidades de associação de 0,60 foi usado como a probabilidade máxima de associação entre os subgrupos. Com base na probabilidade posterior de associação (q) de um determinado genótipo pertencer a um determinado grupo em comparação com o número total de grupos (K), classificamos os indivíduos com  $q > 0,60$  como membros de um determinado *cluster*, enquanto para os *clusters* com associação (q) com valores  $\leq 0,60$ , o genótipo foi classificado como misto (Cerqueira-Silva et al., 2014c).

## 3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.2.4.1. Parâmetros de diversidade via marcadores SSR

A variabilidade genética entre os genótipos avaliados foi constatada para os 27 marcadores utilizados. O número de alelos por *loco* ( $N_a$ ) variou de 2 a 5, com média de 3,11 e um total de 84 alelos para todos os *locos* avaliados (Tabela 7).

Em um estudo sobre o desenvolvimento de marcadores SSR e SNP em maracujá, os marcadores SSR foram desenvolvidos a partir de um conjunto de genes selecionados da biblioteca F. Transcritos selecionados de *Passiflora edulis* contendo SSRs foram usados para desenvolver 15 marcadores SSR, e testados em 24 acessos de espécies de *Passiflora*. Os resultados mostraram que o número de alelos por *locos* variou de 2 a 8, com média de 4,3 alelos por *locos* (Costa; Munhoz; Vieira, 2017).

Em seu estudo Paiva et al. (2014) avaliaram a variabilidade genética no gênero *Passiflora* e as distâncias entre 10 espécies provenientes do banco de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agrônômica (EMBRAPA), foram utilizados 20 marcadores SSR. Os resultados mostraram que o número de alelos por *locos* variou de 2 a 10, com uma média de 4,6 alelos por *locos*.

A população de retrocruzamento avaliada neste estudo é proveniente de seleções anteriores, assim, o número baixo de alelos observados era esperado. O número de alelos observados nos outros estudos é mais elevado, algo que ocorre quando se avalia genótipos provenientes de bancos de germoplasma.

O número de alelos efetivos ( $N_e$ ) variou de 1,022 a 2,817. Os valores de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variaram de 0,000 a 0,967 e os de heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) variaram 0,021 a 0,645 (Tabela 7).

Os valores médios de heterozigosidade observada (0,285) foram ligeiramente superiores aos obtidos para heterozigosidade esperada (0,264), sugerindo maioria de indivíduos heterozigotos. Isso pode ser explicado pela espécie avaliada ser autoincompatível, assim, o mecanismo da autoincompatibilidade induz a alogamia, mantendo o alto grau de heterozigosidade (Duvick, 1967).

Para indicar a diversidade genética da população, foi utilizado o Índice de Informação (I), que é uma medida da quantidade de informação genética fornecida por um marcador. Também é conhecido como Índice de Shannon e varia de 0 a 1, quanto mais próximo de 0, menor a diversidade genética (MOURA et al., 2005). No entanto, é possível obter um valor negativo para o índice de Shannon, o que pode parecer contraintuitivo dada a sua amplitude. Isto pode ocorrer quando o número de espécies é pequeno e o tamanho da amostra é grande, resultando em uma

estimativa tendenciosa da diversidade. Nesses casos, recomenda-se a utilização de um estimador imparcial do índice de Shannon (Konopiński, 2020).

**Tabela 7.** Parâmetros de diversidade para 27 *locos* avaliados em 95 genótipos de *Passiflora*: número de alelos por *loco* (Na), número de alelos efetivos (Ne), índice de Shannon (I), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He) e índice de fixação (F).

<b>Locos</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>I</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>F</b>
<b>Primer 1</b>	4,000	1,073	0,182	0,023	0,068	0,658
<b>Primer 7</b>	3,000	1,172	0,307	0,116	0,147	0,212
<b>Primer 8</b>	5,000	2,817	1,105	0,840	0,645	-0,303
<b>Primer 17</b>	4,000	1,032	0,099	0,021	0,031	0,326
<b>Primer 22</b>	4,000	1,752	0,771	0,432	0,429	-0,006
<b>Primer 30</b>	2,000	1,022	0,059	0,021	0,021	-0,011
<b>Primer 32</b>	5,000	1,077	0,200	0,074	0,072	-0,026
<b>Primer 35</b>	3,000	1,044	0,116	0,043	0,042	-0,018
<b>Primer 42</b>	2,000	1,032	0,081	0,032	0,031	-0,016
<b>Primer 58</b>	3,000	1,066	0,156	0,043	0,062	0,314
<b>Primer 60</b>	3,000	1,201	0,362	0,112	0,167	0,329
<b>Primer 62</b>	4,000	2,043	0,799	0,442	0,511	0,134
<b>Primer 63</b>	2,000	1,296	0,389	0,221	0,229	0,033
<b>Primer 71</b>	2,000	1,652	0,584	0,424	0,395	-0,073
<b>Primer 76</b>	5,000	1,117	0,280	0,060	0,105	0,424
<b>Primer 81</b>	3,000	2,065	0,806	0,819	0,516	-0,588
<b>Primer 89</b>	2,000	1,999	0,693	0,958	0,500	-0,917
<b>Primer 93</b>	2,000	1,182	0,289	0,168	0,154	-0,092
<b>Primer 94</b>	4,000	2,263	0,994	0,695	0,558	-0,245
<b>Primer 101</b>	2,000	1,915	0,671	0,368	0,478	0,229
<b>Primer 109</b>	3,000	1,484	0,610	0,372	0,326	-0,142
<b>Primer 110</b>	4,000	2,468	1,077	0,118	0,595	0,801
<b>Primer 112</b>	2,000	1,089	0,176	0,064	0,081	0,217
<b>Primer 119</b>	3,000	1,420	0,494	0,253	0,296	0,146
<b>Primer 123</b>	2,000	1,998	0,693	0,967	0,499	-0,937
<b>Primer 125</b>	3,000	1,043	0,117	0,021	0,041	0,492
<b>Primer 135</b>	3,000	1,139	0,268	0,000	0,122	1,000
<b>Média</b>	<b>3,111</b>	<b>1,499</b>	<b>0,458</b>	<b>0,285</b>	<b>0,264</b>	<b>0,072</b>

O valor médio de 0,458 indica moderada diversidade na população, visto que um alto índice de informação indica alta diversidade genética na população, por outro lado, um baixo índice de informação indica baixa diversidade genética na

população (Botstein et al., 1980). Os valores medianos são esperados em gerações avançadas de retrocruzamento, dado que o genoma do genitor recorrente está sendo recuperado. Com o índice foi apontado que os *primers* 8 e 94 foram os mais eficientes em discriminar a diversidade genética, indicando que os marcadores foram altamente informativos e podem distinguir entre muitos alelos naquele *loco*. Estes mesmos *primers* obtiveram altos valores de  $H_o$ , confirmando essa informação.

O Índice de Fixação  $F$  é também designado por Coeficiente de Endogamia e apresenta valores que variam de -1 a +1. Ele foi calculado para a população avaliada e apresentou valor médio de 0,072, variando de -0,937 a 1,000 entre os *locos* (Tabela 7). Entre os 27 *locos* analisados, 13 *locos* obtiveram valores negativos, que indicam excesso de heteroziguidade, valores próximos a zero são esperados em cruzamentos aleatórios, enquanto valores positivos indicam endogamia ou alelos nulos não detectados (Peakall; Smouse, 2012).

Foi observado que os *locos* com valores negativos são os mesmos que obtiveram heteroziguidade observada maior que a heteroziguidade esperada, indicando que os alelos para esses *locos* não estão sendo fixados por endogamia. Os 14 *locos* restantes obtiveram valores positivos e possuem valores de heteroziguidade esperada maior que a observada. É importante observar que esses valores podem ser explicados pelo método de melhoramento, já que uma população na terceira geração de retrocruzamento tem uma porcentagem média de 93,75 do genoma do parental recorrente, ou seja, é uma população geneticamente semelhante entre si.

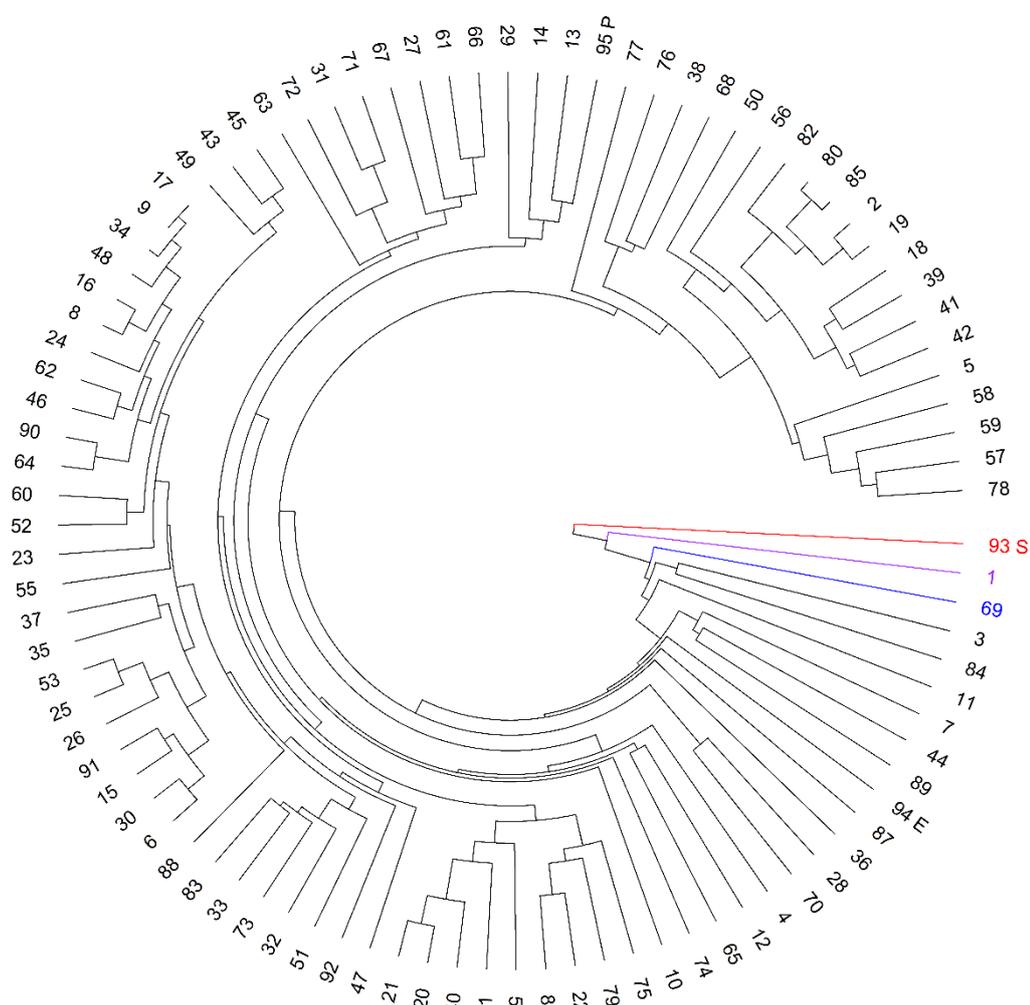
#### **3.2.4.2. Dissimilaridade via UPGMA**

A dissimilaridade genética foi estimada entre os genótipos estudados. A *Passiflora setacea* foi o genótipo mais divergente entre toda população, como era o esperado, por ser uma espécie diferente. Uma vez obtida a matriz de dissimilaridade, os genótipos avaliados foram reunidos em quatro grupos distintos pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*), método escolhido por possuir a maior correlação cofenética (CCC).

O ponto de corte no dendrograma foi determinado por meio do critério de Mojena (1977), com cortes a 80% de dissimilaridade. Neste critério estatístico o cálculo é baseado no tamanho relativo dos níveis de distâncias no dendrograma,

sem precisar de um conhecimento anterior da conformação dos grupos (Faria et al., 2012).

A *Passiflora setacea* (93 S), com 405 de AACPDM, foi separada dos demais genótipos, formando o primeiro grupo, ressaltado pela cor vermelha (Figura 6), esse foi o grupo que mais se distanciou dos demais. Como esperado, a maior dissimilaridade encontrada foi entre a *Passiflora setacea* e a *Passiflora edulis* sendo de 0,57.



**Figura 6.** Dendrograma gerado pelo método UPGMA (CCC=0,84), a partir da matriz de distância pelo índice ponderado obtida pelos marcadores microssatélites avaliados nos genótipos de *Passiflora* selecionados. **93S:** *Passiflora setácea*, **94E:** *Passiflora edulis*, **96P:** parental da família RC3-501. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ, 2023.

O genótipo 1 é a planta 5 no campo, com 495 de AACPDM, que sozinho formou o segundo grupo, em lilás. Ele foi mais distante da *Passiflora setacea*, com 0,54 de dissimilaridade.

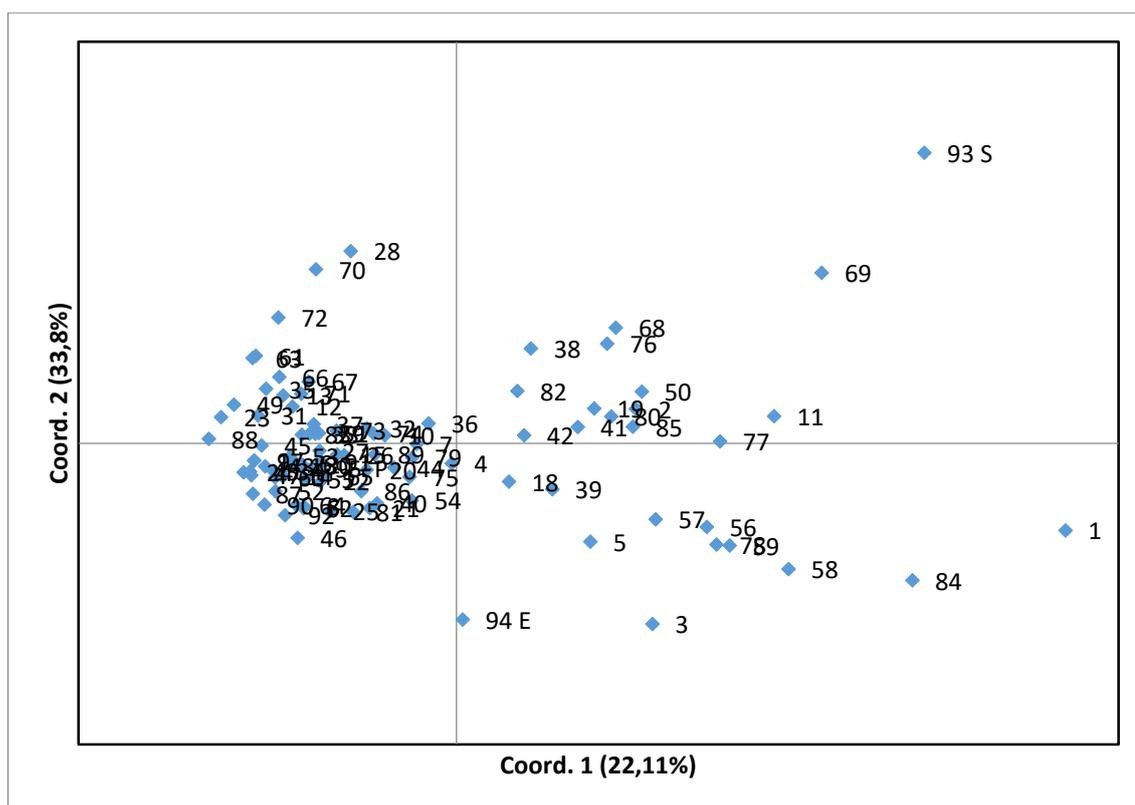
O grupo III, em azul (Figura 6), foi constituído somente pelo genótipo 69, planta 520 no campo, com 952,5 de AACPDM. O genótipo 69 foi mais distante do genótipo 44, planta 337 no campo, que possui 498,75 de AACPDM, com 0,50 de dissimilaridade.

O quarto grupo, em preto (Figura 6) foi composto pelo maior número de indivíduos, sendo 92 genótipos ao todo (96,8%) incluindo a *Passiflora edulis* (94 E), que possui 948,75 de AACPDM. Essa quantidade de genótipos no mesmo grupo indica que esses indivíduos compartilham a maioria dos alelos para os *locos* avaliados. Os indivíduos 9 (planta 40, AACPDM=435) e 17 (planta 108, AACPDM=543,75) foram os mais próximos, com 0,98 de similaridade. A média geral da AACPDM desse grupo foi de 648,99, variando de 397,5 (genótipo 62) a 990 (genótipo 48).

Essa mesma população continua sendo avaliada para as características de teor de sólidos solúveis (TSS), massa de frutos (MF), massa de polpa (MP), número de frutos por planta (NF) e produção por planta (PROD). Ainda não é possível vincular os dados moleculares aos dados agrônômicos, porém em relação à resistência algumas observações podem ser feitas.

Os genótipos considerados mais resistentes foram da família RC<sub>3</sub>-293, sendo o melhor genótipo o 62 (planta 450), com 397,5 de AACPDM, seguido pelo 88 (planta 675) com AACPDM de 423,75. O genótipo 62 tem 0,77 de similaridade a cultivar comercial *Passiflora edulis*, sendo um bom genótipo a ser indicado para formar a futura geração de retrocruzamento, visto que o objetivo desse estudo é indicar genótipos resistentes e com características semelhantes a cultivar comercial. O genótipo 88 tem 0,68 de similaridade a *P. edulis*, outros dos 30 melhores genótipos selecionados na AACPDM que podem ser indicados são: genótipo 45 (planta 340, AACPDM= 412,5), genótipo 65 (planta 475, AACPDM= 446,25) e genótipo 66 (planta 476, AACPDM= 438,75), com 0,74, 0,73 e 0,68 de similaridade com a *P. edulis*, respectivamente.

A dispersão dos indivíduos foi observada pela análise de coordenadas principais em um gráfico bidimensional, que explicaram 55,91% da variação (Figura 7).



**Figura 7.** Análise das Coordenadas Principais, considerando as espécies: *P. edulis*, *P. setacea*, e a população segregante RC<sub>3</sub> com base na matriz de distância obtida pela análise dos marcadores microssatélites. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ, 2023.

Com a dispersão observada no gráfico, foi possível visualizar que a espécie *Passiflora setacea* realmente se distanciou dos demais indivíduos, isso já era esperado, visto que esta é uma espécie silvestre considerada resistente à virose do endurecimento dos frutos, possuindo características morfológicas e agrônômicas diferentes da espécie do maracujá azedo (*Passiflora edulis*).

No gráfico, é possível observar que os genótipos da terceira geração do retrocruzamento estão agrupados mais próximos da *P. edulis* e que o único parental avaliado está inserido nesse agrupamento, o que também é esperado, pois as características desse genitor foram transferidas a família gerada por ele.

### 3.2.4.3. Análise da proporção do genoma parental

Foi realizada uma análise individual quanto à proporção do genoma do parental recorrente, a cultivar 'UENF Rio Dourado', considerando os *locos* iguais aos do genitor e o número total de alelos.

Em uma população RC<sub>3</sub> é esperado 93,75% do genoma do parental recorrente na progênie. Porém, ao analisar essa proporção, considerando todos os alelos amplificados na população avaliada, verificou-se uma proporção média de 72,36% do genoma do genitor recorrente ('UENF Rio Dourado') na população, um valor abaixo do esperado.

Considerando todos os alelos amplificados entre as cinco famílias avaliadas, a que apresentou maior proporção do genitor recorrente foi a RC<sub>3</sub>-153, com uma média de 74,48%. Todos os genótipos desta família apresentaram um percentual genômico do genitor recorrente maior ou igual a 68,52%, com valores individuais variando de 68,52% a 81,48%. O segundo maior nível foi verificado na família RC<sub>3</sub>-293, com uma média de 72,93% e uma proporção por genótipo que variou de 61,11% a 81,48%. O genótipo 62 pertencente à família RC<sub>3</sub>-293 obteve 79,63% de proporção, considerado promissor nas outras análises, bem como os genótipos 88, 45, 65 e 66 da mesma família, que obtiveram proporção de 70,37%, 75,93%, 74,08% e 72,22%, respectivamente.

Na família RC<sub>3</sub>-17, a média foi de 72,15%, e uma proporção por genótipo que variou de 62,96% a 77,77%. Na família RC<sub>3</sub>-355, a média foi de 71,66%, com a proporção por genótipo variando de 51,85% a 85,18%. Já a família RC<sub>3</sub>-501 obteve média de 69,48%, com uma proporção por genótipo que variou de 51,85% a 79,63%.

Os genótipos com as maiores proporções genômicas do genitor recorrente foram: 25 (85,18%), 46 (81,48%), 53 (81,48%), pertencendo às famílias RC<sub>3</sub>-355, RC<sub>3</sub>-293 e RC<sub>3</sub>-153, respectivamente. O genótipo 25 obteve 318,75 de AACPD, o genótipo 46 obteve 322,5 de AACPD e o genótipo 53 somente 285. Ainda assim, esses três genótipos também são considerados promissores para serem indicados a se tornarem genitores na próxima geração de retrocruzamento.

#### **3.2.4.4. Estrutura genética da população**

Outra análise utilizada foi a análise bayesiana que sugeriu a formação de dois grupos. Esta é uma análise mais rigorosa que permite observar a estrutura da população em grupos mais delineados, além de ser menos subjetiva que os métodos hierárquicos, como o UPGMA (Pritchard; Stephens; Donnelly, 2000a).

Conforme o critério de Evanno et al. (2005), o delta K ideal foi constatado quando K=2, sugerindo que a melhor estruturação foi observada quando a amostra

esteve dividida em dois grupos, sendo estes grupos bem estruturados (Figura 8). Foi adotada uma probabilidade de adesão de 60% para pertencer a um grupo, com isso, o grupo I (Figura 9, vermelho) foi formado pela maioria dos genótipos, sendo 67 ao todo (70,5%), incluindo a cultivar comercial e o único parental de uma família avaliado. A média geral da AACPDMD desse grupo foi de 642,75, variando de 397,5 (genótipo 62) a 990 (genótipo 48). O grupo II foi formado por 28 genótipos (Figura 9, verde), estando presente nesse grupo a espécie silvestre, com a média da AACPDMD do grupo de 656,8, variando de 405 (*P. setacea*) a 963,75 (genótipo 82).

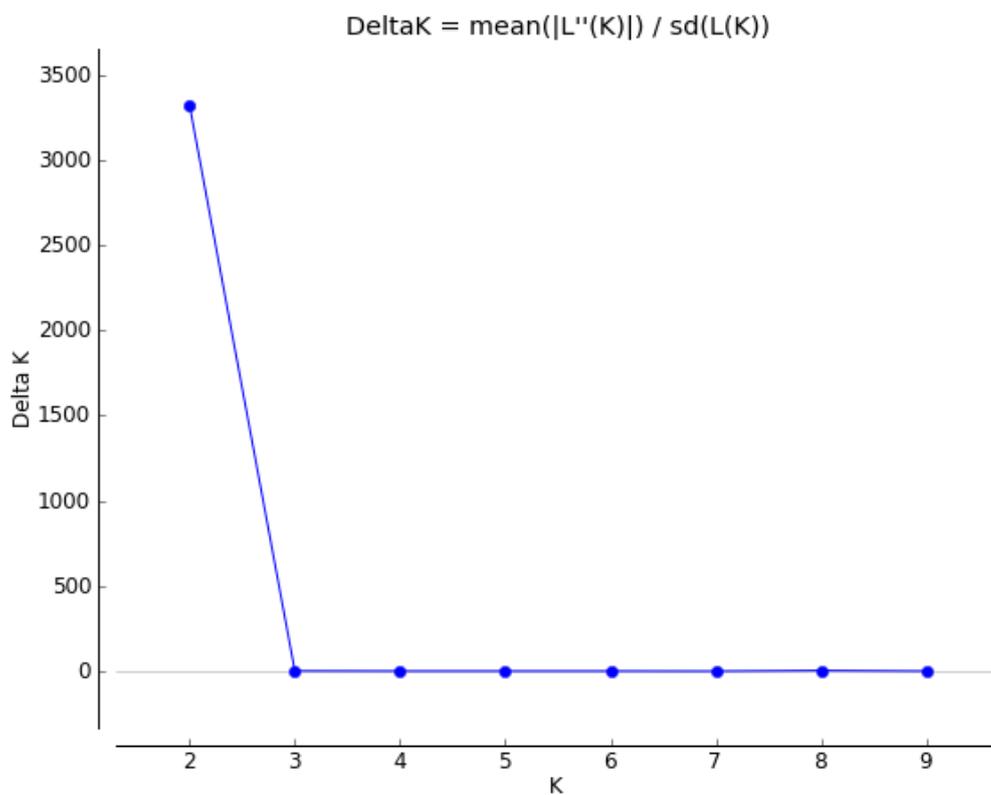
A grande maioria dos genótipos que fazem parte do grupo I possui 100% de probabilidade de adesão, entretanto, alguns genótipos foram observados por terem probabilidade mista, indicando alelos compartilhados com os genótipos do outro grupo. Tomando, por exemplo, o genótipo 70, planta 521 com AACPDMD de 727,5, esta possui 70% de probabilidade de adesão ao grupo vermelho, os 30% restantes indicam semelhança alélica com os genótipos do grupo verde.

A mesma situação ocorre no grupo II, a maioria dos genótipos possui 100% de probabilidade de adesão a este grupo, porém, alguns genótipos como o 10 (planta 62, AACPDMD= 468,75) e 4 (planta 10, AACPDMD= 427,5) possuem adesão mista, com alelos compartilhados aos genótipos do grupo I. A estruturação em dois grupos indica que o grupo verde possui um conjunto de alelos que o diferencia do grupo vermelho, para os marcadores utilizados neste estudo, os marcadores SSR são genômicos e não estão relacionados a características fenotípicas.

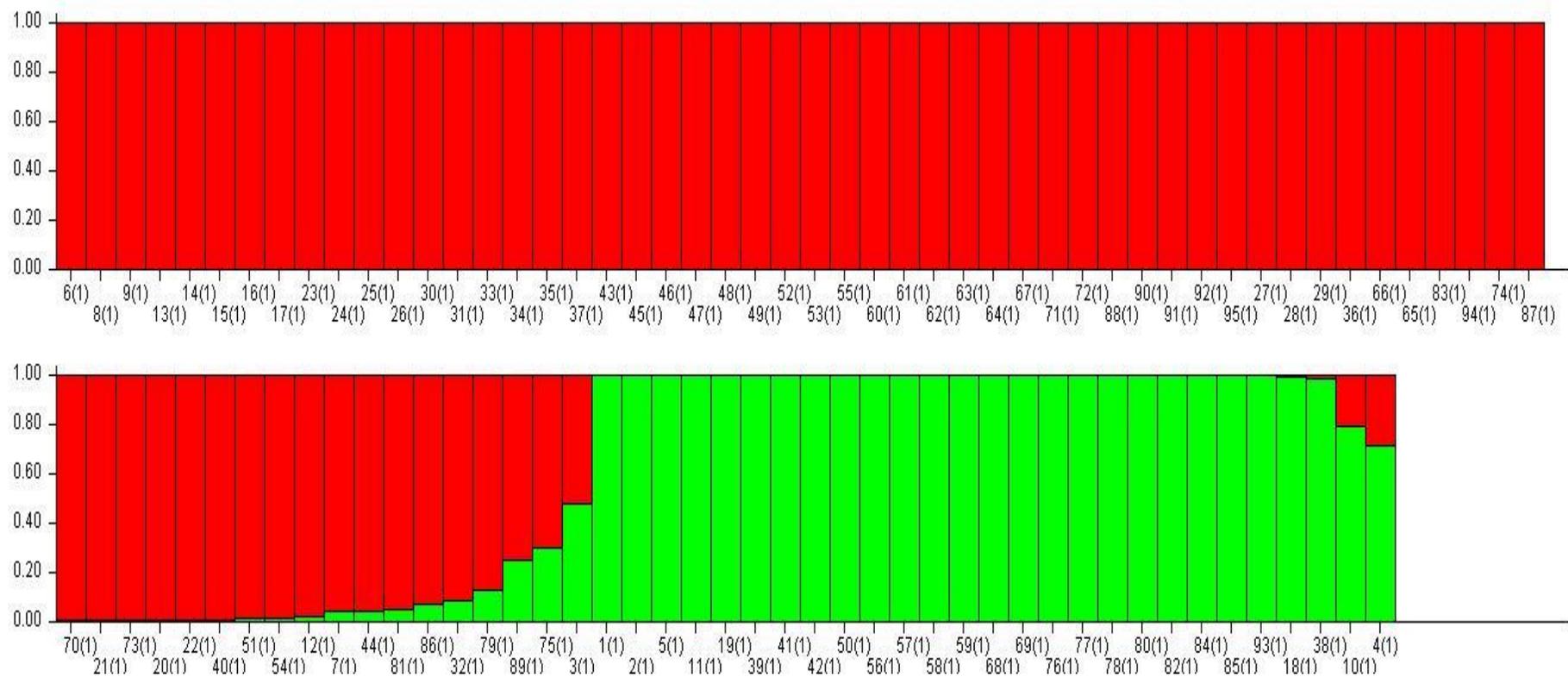
Foram observados poucos grupos, visto que os indivíduos avaliados neste estudo compartilham a maioria das regiões genômicas analisadas, algo explicado pela estrutura genética da população. Esses indivíduos são provenientes da terceira geração de retrocruzamento do programa de melhoramento genético do maracujazeiro da UENF, sendo esperado que tenham a maioria das regiões genômicas analisadas semelhantes entre si.

Nesse estudo a obtenção de dois grupos é suficiente para auxiliar no direcionamento dos próximos passos do programa de melhoramento do maracujazeiro da UENF, pois os 95 genótipos avaliados compõem um conjunto definido de estruturação genética. Considerando os diferentes tipos de análise, os genótipos a serem indicados para futuras gerações deveriam ser os mais semelhantes a cultivar comercial, mas também os que obtiveram as melhores médias para a resistência. Além disso, é importante aliar esses resultados com os

dados agronômicos da população avaliada, selecionando os indivíduos com maiores potenciais agronômicos.



**Figura 8.** Delta K ( $\Delta K$ ) para os respectivos números de grupos (K).



**Figura 9.** Agrupamento e estruturação genética pela inferência bayesiana dos 95 genótipos de *Passiflora* (K=2).

### 3.2.5. CONCLUSÕES

Os marcadores SSR utilizados neste estudo se mostraram eficientes em constatar a estrutura genética entre os genótipos de *Passiflora* avaliados. A estruturação em grupos observada foi eficiente para indicar os genótipos promissores.

Foi possível indicar os genótipos considerados mais resistentes e semelhantes a cultivar, sendo eles os genótipos codificados como: 25, 45, 46, 53, 62, 65, 66 e 88 nas análises moleculares, sendo as seguintes plantas no campo: 165, 340, 345, 389, 450, 475, 476 e 675 respectivamente.

Além disso, é importante aliar esses resultados aos dados agronômicos da população avaliada, selecionando os indivíduos com maiores potenciais agrônômico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdurakhmonov, I.Y. (2016) Introduction to Microsatellites: Basics, Trends and Highlights. *In: Microsatellite Markers*. IntechOpen, 252p.
- Aiello, D., Fiorenza, A., Leonardi, G.R., Vitale, A., Polizzi, G. (2021) *Fusarium nirenbergiae* (*Fusarium oxysporum* Species Complex) Causing the Wilting of Passion Fruit in Italy. *Plants*, 10(10), 2011.
- Ambrósio, M., Viana, A.P., Cavalcante, N.R., Costa, P.S., Santana, J.G.S, Crevelari, J.A. (2021). Coefficient of repeatability, stability, and adaptability estimates for *Psidium guajava* S1 progenies via mixed models. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 45, e-502.
- Araya, S., Martins, A.M., Junqueira, N.T.V., Costa, A.M., Faleiro, F.G., Ferreira, M.E. ( 2017) Microsatellite marker development by partial sequencing of the sour passion fruit genome (*Passiflora edulis* Sims). *BMC Genomics*, 18, 549.
- Arogundade, O., Oresanya, A., Oyekanmi, O.J., Akinyemi, S.O.S., Kumar, P.L. (2018) First report of Passion fruit woodiness virus associated with passion fruit woodiness disease of passion fruit caused by a strain of Passion fruit woodiness virus in Nigeria. *Plant Disease*, 102:6, 1181-1181.
- Bailey, M., Sarkhosh, A., Rezazadeh, A., Anderson, J., Chambers, A., Crane, J. H. (2021) The Passion Fruit in Florida. *EDIS*, 1:2021.

- Balzarini, M. (2002). Applications of Mixed Models in Plant Breeding. In: Balzarini, M. *Quantitative genetics, genomics and plant breeding*. CABI Digital Library, 2: 33-45.
- Barbosa, C.J., Filho, H.P.S. (2017) Doenças do maracujazeiro causadas por vírus e fitoplasma. In: Junghans, T.G., Jesus, O.N. (Eds.) *Maracujá: do cultivo à comercialização*. Brasília, DF: Embrapa, p. 281-298.
- Barbosa, N.C.S., Leite, K.R.B., Carvalho, M.L.S., Barbosa, C.J., Schnadelbach, A.S. (2021). Genetic diversity of *Passiflora setacea* in different regions of Bahia, Brazil, through SSR markers. *Comunicata scientiae*, 12:3654.
- Bashir, Mohamed & Ahmad, Zaim & Ghafoor, A. (2002) Cowpea aphid-borne mosaic potyvirus: A review. *International Journal of Pest Management - INT J PEST MANAGE*. 48. 155-168.
- Bellon, G. (2014) *Filogenia, variabilidade genética e caracterização de Passifloras silvestres, comerciais e híbridos interespecíficos como fontes de resistência a doenças*. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade de Brasília, Brasília, 169p.
- Bernacci, L.C., Nunes, T.S., Mezzonato, A.C., Milward-de-Azevedo, M.A., Imig, D.C., Cervi, A.C. (in memoriam). (2022) *Passiflora* in Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Bernardo, R. (2020) Reinventing quantitative genetics for plant breeding: something old, something new, something borrowed, something BLUE. *Heredity*, 125, 375–385.
- Bhattacharai, G., Shi, A., Kandel, D.R., Solís-Gracia, N., Silva, J.A., Avila, C.A. (2021) Genome-wide simple sequence repeats (SSR) markers discovered from whole-genome sequence comparisons of multiple spinach accessions. *Scientific Reports*, 11:9999.
- Borém, A., Miranda, G.V., Fritsche-Neto, R. (2021) *Melhoramento de plantas*. 8 ed. São Paulo, Oficina de textos, 384p.

- Borges, R.S., Scaranari, C., Nicoli, A.M., Coelho, R.R. (2008) Novas variedades: validação e transferência de tecnologia. In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. *Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético*. Ed.1. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 1: 634-635.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314-331.
- Brandão, A.S.P (2004) O polo de fruticultura irrigada no norte e noroeste fluminense. *Revista de Política Agrícola*. n. 2. 9p.
- Campbell, C.D., Madden, L.V. (1990) Introduction to Plant Disease Epidemiology. New York: Willey. Ed. 1, 532p.
- Carvalho, B.M., Viana, A.P., da Silva, F.A., Santos, P.H.D, Eiras, M., Azevedo, E.A. (2021) How segregating populations of passion fruit react to CABMV infection?. *European Journal of Plant Pathology*, 160:855–866.
- Case, F. (2022) Purple passion fruit. *Encyclopedia Britannica*, Disponível em: <<https://www.britannica.com/plant/purple-passion-fruit>>. Acessado em: 21 Julho 2023.
- Cavagnaro, P.F., Chung, S.M., Manin, S., Yildiz, M., Ali, A., Alessandro, M.S, Iorizzo, M., Senalik, D.A., Simon, P.W. (2011) Microsatellite isolation and marker development in carrot - genomic distribution, linkage mapping, genetic diversity analysis and marker transferability across Apiaceae. *BMC Genomics*, 12, 386.
- Cavalcante, N. R., Krause, W., Carvalho, J.F., Rocha, M.K.P., Palú, E.G., Silva, C.A. (2016) Productivity, Fruit Physicochemical Quality and Distinctiveness of Passion Fruit Populations. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38(4).
- Cavalcante, N.R. (2019) *Ganho genético em diferentes estratégias de obtenção de famílias de irmãos completos e estrutura populacional em maracujazeiro azedo*. Tese (doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 101p.

- Cavalcante, N.R., Viana A.P., Almeida Filho, J.E., Pereira, M.G., Ambrósio, M., Santos, E.A., Ribeiro, R.M., Rodrigues, D.L., Sousa, C.M.B. (2019) Novel selection strategy for half-sib families of sour passion fruit *Passiflora edulis* (Passifloraceae) under recurrent selection. *Genetics and molecular research*, 18(2): GMR18305.
- Cerqueira-Silva, C.B.M., Moreira, C.N., Figueira, A.R., Corrêa, R.X., Oliveira, A.C. (2008) Detection of a resistance gradient to Passion fruit woodiness virus and selection of “yellow” passion fruit plants under field conditions. *Genetics and molecular research*, 7(4)1209–1216.
- Cerqueira-Silva, C.B.M., Cardoso-Silva, C.B., Conceição, L.D.H.C.S., Nonato, J.V.A., Oliveira, A.C., Corrêa, R.X. (2009) Comparison of coefficients and distance measurements in passion fruit plants based on molecular markers and physicochemical descriptors. *Genetics and Molecular Research*, 8(3):870-879.
- Cerqueira-Silva, C.B.M., Conceição, L.D.H.C.S., Souza, A.P., Corrêa, R.X. (2014a) A history of passion fruit woodiness disease with emphasis on the current situation in Brazil and prospects for Brazilian passion fruit cultivation. *European Journal of Plant Pathology*, 139(2)261–270.
- Cerqueira-Silva, C.B.M., Jesus, O.N., Santos, E.S.L., Corrêa, R.X., Souza, A.P. (2014b) Genetic Breeding and Diversity of the Genus *Passiflora*: Progress and Perspectives in Molecular and Genetic Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(8)14122–14152.
- Cerqueira-Silva, C.B.M., Santos, E.S., Jesus, O.N., Vieira, J.G., Mori, G.M., Corrêa, R.X., Souza, A.P. (2014c) Molecular Genetic Variability of Commercial and Wild Accessions of Passion Fruit (*Passiflora* spp.) Targeting ex Situ Conservation and Breeding. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12)22933–22959.
- Cerqueira-Silva, C.B.M., Jesus, O.N., Oliveira, E.J., Santos, E.S.L., Souza, A.P. (2015) Characterization and selection of passion fruit (yellow and purple) accessions based on molecular markers and disease reactions for use in breeding programs. *Euphytica*, 202(3)345–359.

- Chavarría-Perez, L.M., Giordani, W., Dias K.O.G., Costa, Z.P., Ribeiro, C.A.M., Benedetti, A.R., Cauz-Santos, L.A., Pereira, G.S., Rosa, J.R.B.F., Garcia, A.A.F., Vieira, M.L.C. (2020) Improving yield and fruit quality traits in sweet passion fruit: Evidence for genotype by environment interaction and selection of promising genotypes. *PLoS ONE*, 15(5): e0232818.
- Cobra, S.S.O., Silva, C.A., Krause, W., Dias, D.C., Karsburg, I.V., Miranda, A.F. (2015) Características florais e polinizadores na qualidade de frutos de cultivares de maracujazeiro-azedo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 50:54–62.
- Conceição, L.D., Belo, G.O., Souza, M.M., Santos, S.F., Cerqueira-Silva, C.B., Corrêa, R.X. (2011) Confirmation of cross-fertilization using molecular markers in ornamental passion flower hybrids. *Genetics and Molecular Research*, 11;10(1):47-52.
- Costa, A.F.S., Costa, A.N., Ventura, J.A., Fanton, C.J., Lima, I.M., Caetano, L.C.S., Santana, E.N. (2008) *Recomendações técnicas para o cultivo do maracujazeiro*. Vitória Incaper, Incaper. Documentos 162, 55p.
- Costa, A.M., Tupinambá, D.D. (2005) O maracujá e suas propriedades medicinais - estado da arte. In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. (Eds). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina: Embrapa Cerrados. 474- 501p.
- Costa, Z.P., Munhoz, C.F., Vieira, M.L.C. (2017) Report on the development of putative functional SSR and SNP markers in passion fruits. *BMC Research Notes*, 10:445.
- Cruz, C.D. (1998) Programa GENES: Aplicativo Computacional em Estatística Aplicada à Genética (GENES - Software for Experimental Statistics in Genetics). *Genetics and Molecular Biology*, 21(1)135–138.
- Cruz, C.D., Ferreira, F.M., Pessoni, L.A. (2011) *Biometria Aplicada ao Estudo da Diversidade Genética*. 1 Ed. Viçosa. Produção Independente, 620p.
- Cruz, C.D., Regazzi, A.J., Carneiro, P.C.S. (2014) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 3.ed. Viçosa: UFV, v.2 668p.

- Cruz, D.P., Moraes, R., Gravina, L.M., Daher, R.F., Araújo, K.C., Vivas M., Silva, C.Q., Gomes, A.B.S., Oliveira, T.R.A., Gravina, G.A., Silva, V.B. (2018). Selection of progenies of snap beans using mixed models (REML/BLUP). *Genetics and Molecular Research*, 17(2).
- Delen, S.P., Xu, G., Velazquez-Perfecto, J., Yan, J. (2023) Estimating the genetic parameters of yield-related traits under different nitrogen conditions in maize, *Genetics*, 223:4.
- Duarte, I.A.E., Milenkovic, D., Borges, T.K., Oliveira, L.L., Costa, A.M. (2021) Brazilian passion fruit as a new healthy food: from its composition to health properties and mechanisms of action. *Food & Function*, 12(22)11106–11120.
- Duvick, D.N. (1967) Influence of morphology and sterility on breeding methodology. *In: Frey, K. J. (ed.) Plant breeding*. Iowa: Iowa States University Press, 85-138P.
- Elliott, M. (2015) Passion fruit woodiness virus (passionfruit woodiness disease). *CABI Compendium*, 39873.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14:2611-2620.
- Faria, P.N., Cecon, P.R., Silva, A.R., Finger, F.L., Silva F.F., Cruz, C.D., Sávio, F.L. (2012) Métodos de agrupamento em estudo de divergência genética de pimentas. *Horticultura Brasileira*, 30(3)428–432.
- Fonseca, K.G., Faleiro, F.G., Peixoto, J.R., Junqueira, N.T.V., Silva, M.S., Bellon, G., Junqueira, K.P., Vaz, C.F. (2009) Análise da recuperação do genitor recorrente em maracujazeiro-azedo por meio de marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31:145–153.
- Freitas, J.C.O., Viana, A.P., Santos, E.A., Silva, F.H.L., Paiva, C.L., Rodrigues, R., Souza, M.M., Eiras, M. (2015) Genetic basis of the resistance of a passion fruit segregant population to cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). *Tropical Plant Pathology*, 40:291-297.

- Freitas, J.C.O., Viana, A.P., Santos, E.A., Paiva, C.L., Silva, F.H.L., Souza, M.M. (2016) Sour passion fruit breeding: Strategy applied to individual selection in segregating population of *Passiflora* resistant to Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). *Scientia Horticulturae*, 211:241–247.
- Garcêz, R.M., Chaves, A.L.R., Eiras, M., Meletti, L.M.M., Filho, J.A.A., Silva, L.A., Colariccio, A. (2015) Survey of aphid population in a yellow passion fruit crop and its relationship on the spread Cowpea aphid-borne mosaic virus in a subtropical region of Brazil. *Springer Plus*, 4(1)537.
- Gonçalves, D.H. (2019) *Prospecção dentro de famílias de retrocruzamento em passiflora: implicações para o melhoramento visando resistência ao CABMV* Tese (doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 80p.
- Gonçalves, D.H., Viana, A.P., Santos, E.A., Preisigke, S.C., Vidal, R.F., Cavalcante, N.R. (2021) Prospecting on *Passiflora* backcross families: implications for breeding aiming at CABMV resistance. *Euphytica*, 217(4)63.
- Gonçalves-Vidigal, M.C., Rubiano, L.B. (2011). Development and application of microsatellites in plant breeding. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11(spe), 66–72.
- Gonçalves, Z.S., Lima, L.K.S., Soares, T.L., Abreu, E.F.M., Jesus Barbosa, C., Cerqueira-Silva, C.B.M., Jesus, O.N., Oliveira, E.J. (2018) Identification of *Passiflora* spp. Genotypes resistant to cowpea aphid-borne mosaic virus and leaf anatomical response under controlled conditions. *Scientia Horticulturae*, 231:166-178.
- Grover, A.; Sharma, P. C. (2016) Development and use of molecular markers: past and present. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2)290–302.
- Hasan, N., Choudhary, S., Naaz, N., Sharma, N., Laskar, R.A. (2021) Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1):128.

- He, X., Luan, F., Yang, Y., Wang, Z., Zhao, Z., Fang, J., Wang, M., Zuo, M., Li, Y. (2020) *Passiflora edulis*: An Insight into Current Researches on Phytochemistry and Pharmacology. *Frontiers in Pharmacology*, 11:617.
- Hospital, F. (2005) Selection in backcross programmes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1459)1503–1511.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2023) *Produção agropecuária - maracujá*. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/maracuja/br>>. Acesso em: 08 maio.
- Janick, J., Paull, R.E. (2008) The Encyclopedia of Fruit and Nuts. *CABI Publishing*, 586–588.
- Jiang, G.-L. (2013) Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants. *Plant Breeding from Laboratories to Fields*. InTech. doi:10.5772/52583.
- Jiao, Y., Jia, H-M., Li, X-W., Chai, M-L., Jia, H-J., Chen, Z., Wang, G-Y., Chai, C-Y., Weg, E.V., Gao, Z-S. (2012) Development of simple sequence repeat (SSR) markers from a genome survey of Chinese bayberry (*Myrica rubra*). *BMC Genomics*, 13:201.
- Konopiński, M.K. (2020) Shannon diversity index: a call to replace the original Shannon's formula with unbiased estimator in the population genetics studies. *PeerJ*, 8:e9391.
- Kotsubo, R.S., Santos, K.S., Fantin, L.H., Chaves, V.C.A., Casaroto Filho, J.V., Tissiano, V.F., Molina, R.O. (2021). Temporal and spatial progress of Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Australian Journal of Crop Science*, 15. 284-289.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K. (2008) Mega: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9:299- 306.
- Li, H., Zhou, P., Yang, Q., Shen, Y., Deng, J., Zhao, L. (2011) Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* 'edulis'

and *Passiflora edulis* 'flavicarpa'. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3)1085–1090.

Li, L., Fang, Z., Zhou, J., Chen, H., Hu, Z., Gao, L., Chen, L., Ren, S., Ma, H., Lu, L., Zhang, W., Peng, H. (2017) An accurate and efficient method for large-scale SSR genotyping and applications. *Nucleic Acids Research*, 45(10)88.

Mandal, G. (2017) Production Preference and importance of passion fruit (*Passiflora Edulis*): A review. *Journal of Agricultural Engineering and Food Technology*, 4:27–30.

Meletti, L. M. M. (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33:83–91.

Melo, R., Figueira, A.R., Charles, N.M, Antonio, C.O. (2015) Recent characterization of cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) in Bahia State, Brazil, suggests potential regional isolation. *African Journal of Biotechnology*, 14:735–744.

Mendes, D. S., Viana, A.P., Santos, E.A., Cavalcante, N.R., Rodrigues, C.A., Lima, J.A., VIDAL, R.F., Walter, F.H.B., Bezerra, L.B.S., Eiras, M., Santos, H.A. (2022) Genetic gains in *Passiflora* for resistance to cowpea aphid-borne mosaic virus using recurrent selection. *Euphytica*, 218(9)132.

Miah G., Rafii, M.Y., Ismail, M.R., Puteh, A.B., Rahim, H.A., Islam, Kh.N., Latif, M.A. (2013) A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11):22499-528.

Miyake, R.T.M., Furlaneto, F.P.B., Takata, W.H.S., Creste, J.E. (2018) Economic Analysis of the Production of Yellow Passion Fruit in an Area With Virose Incidence and Fertilized With NPK. *Journal of Agricultural Science*, 10:5.

Mojena, R. (1977) Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. *The Computer Journal*, 20(4)359–363.

Moreira F.F., Oliveira H.R., Volenec J.J., Rainey K.M., Brito L.F. (2020) Integrating High-Throughput Phenotyping and Statistical Genomic Methods to Genetically Improve Longitudinal Traits in Crops. *Frontiers in Plant Science*, 11:681.

- Moura, E.F., Pinto, J.E.B.P., Santos, J.D., Lameira, O.A. (2005) Genetic diversity in a jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf.) germplasm bank assessed by RAPD markers. *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*, Botucatu, 7(3)1-8.
- Nadeem, M. A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G., Baloch, F.S.. (2018) DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2)261–285.
- Nascimento, A.V.S., Santana, E.N., Braz, A.S.K., Alfenas, P.F., Pio-Ribeiro, G., Andrade, G.P., Carvalho, M.G., Zerbini, F.M. (2006) Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. *Archives of Virology*, 151(9)1797–1809.
- Nascimento, A.K.P., Santos, B.L.C., Oliveira Filho, A. A., Oliveira, H.M.B.F. (2020) *Passiflora edulis*: uma breve revisão dos efeitos antidiabéticos. *Archives Of Health Investigation*, 9:2.Novaes, Q.S., Rezende, J.A.M. (1999) Possível aplicação do DAS-ELISA indireto na seleção de maracujazeiro tolerante ao passion fruit woodiness virus. *Fitopatologia Brasileira*, 24: 76-79.
- Ocampo, J., Acosta-Barón, N., Hernández-Fernández, J. (2017) Variability and genetic structure of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) in Colombia using microsatellite DNA markers. *Agronomía Colombiana*, 35(2) 135–149.
- Oliveira, E.J., Soares, T.L., Barbosa, C.J., Santos-Filho, H.P., Jesus, O.N. (2013) Disease severity from passion fruit to identify sources of resistance in field conditions. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35:485–492.
- Olivoto, T., Nardino, M., Carvalho, I.R., Follmann, D.N., Ferrari, M., Szareski, V.J., Pelegrin, A.J., Souza, V.Q. (2017) REML/BLUP and sequential path analysis in estimating genotypic values and interrelationships among simple maize grain yield-related traits. *Genetics and Molecular Research*, 16:1.
- Oluoch, P., Nyaboga, E. N., Bargul, J. L. (2018) 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*, 16(4)367–375.
- Paiva, C., Viana, A.P., Santos, E.A., Freitas, J., Silva, R., Oliveira, E. (2014) Genetic variability assessment in the genus *Passiflora* by SSR marker. *Chilean journal of agricultural research*, 74:355–360.
- Peakall, R., Smouse, P.E. (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19)2537–2539.
- Pena, G.F., Mafra, G.S., do Amaral Júnior, A.T., Alfenas, R.F., Bhering, L.L., Santos, J.S., Kamphorst, S.H., de Lima, V.J., Santos T.O., Bispo, R.B., et al. (2022) Modelagem Mista no Estudo da Divergência Genética de Híbridos Elite Pipoca ( *Zea mays* var. *everta* ). *Agricultura*, 12(7):910.
- Pinto, P.H.T., Peixoto, J.R., Junqueira, N.T.V., Resende, R.O., Mattos, J.K.A., Melo, B. (2008) Reação de genótipo de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (cowpea aphid-borne mosaic vírus – CABMV). *Bioscience Journal*, 24(2):19-26.
- Preisigke, S.C. (2017) Retrocruzamento em maracujazeiro visando à resistência genética ao Cowpea aphid-borne mosaic virus assistida por técnicas clássicas e moleculares. Tese (doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 116p.
- Preisigke, S.C., Viana, A.P., Santos, E.A., Santos, P.R., Cavalcante, N.R., Ambrósio, M., Freitas, J.C.O., Rodrigues, R. (2021) Research Article Backcrossing in passion fruit: generation advance and selection of genotypes resistant to *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. *Genetics and Molecular Research*, 20(1).
- Preisigke, S.C., Viana, A.P., Santos, E.A., Santos, P.R., Santos, V.O., Ambrósio, M., Silva, F.A., Walter, F.H.B. (2020) Selection strategies in a segregating passion fruit population aided by classic and molecular techniques. *Bragantia*, (79)47–61.

- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000a) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2)945–959.
- Ramalho M.A.P, Santos J.B., Abreu A.F.B., Nunes J.A.R. (2012a) *Aplicações da Genética Quantitativa no Melhoramento de Plantas Autógamas*. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 522p.
- Rêgo, M.M, Rêgo, E.R. Bruckner, C.H., Finger, F., Otoni, W. (2011) In vitro induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107. 451-459.
- Resende, M.D.V. (2002) *Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes*. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, Colombo: Embrapa Florestas. 975p.
- Resende, M.D.V., Silva, F.F., Azevedo, C.F. (2014) Estatística matemática, biométrica e computacional: Modelos mistos, multivariados, categóricos e generalizados (REML/BLUP), inferência bayesiana, regressão aleatória, seleção genômica, QTL-GWAS, estatística espacial e temporal, competição, sobrevivência. Viçosa: Suprema, 881 p.
- Resende, M.D.V. (2016) Software Selegen-REML/BLUP: a useful tool for plantbreeding. *Crop Breed Appl Biotechnol*, 16:330-339.
- Ribeiro, R.M., Viana, A.P., Santos, E.A., Lima, D.R., Preisigke, S.C. (2019). Breeding passion fruit populations - review and perspectives. *Functional Plant Breeding Journal*. 1. 16-29.
- Rodrigues, L.K., Chaves, A.L.R., Damatto, E.R., Eiras, M. (2016) Epidemiological aspects of the transmission and management of cowpea aphid-borne mosaic virus in a passion fruit orchard. *Journal of Plant Pathology*, 531-539.
- Ruggiero, C., São José, A.R., Volpe, C.A., Oliveira, J.C., Durigan, J.F., Baumgartner, J.G., Silva, J.R., Nakamura, K., Ferreira, M.E., Kavati, R., Pereira, V.P. (1996) Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção. FRUPEX. Publicações Técnicas. Brasília: EMBRAPA-SPI. 64p.

- Sacoman, N.N., Viana, A.P., Carvalho, V.S., Santos, E.A., Rodrigues, R. (2018) Resistance to cowpea aphid-borne mosaic virus in in vitro germinated genotypes of *Passiflora setacea*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40:e-607.
- Saitou, N., Nei, M. (1987) The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406–425.
- Santos, A.A., Penha, H.A., Bellec, A., Munhoz, C.F., Pedrosa-Harand, A., Bergès, H., Vieira, M.L.C. (2014) Begin at the beginning: A BAC-end view of the passion fruit (*Passiflora*) genome. *BMC Genomics*, 5(1)816.
- Santos, E.A., Viana, A.P., Rodrigues, D.L., Tavares, R.F., Paiva, C.L., Souza, M.M. (2015a) Genotype selection by REML/BLUP methodology in a segregating population from an interspecific *Passiflora* spp. crossing. *Euphytica*, 204(1)1–11.
- Santos, E. A., Viana, A.P., Freitas, J.C.O., Silva, F.H.L., Rodrigues, R., Eiras, M. (2015b) Resistance to Cowpea aphid-borne mosaic virus in species and hybrids of *Passiflora*: advances for the control of the passion fruit woodiness disease in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 143(1)85–98.
- Santos, E.A., Viana, A.P., Walter, F.H.B., Freitas, J.C.O., Ramos, H.C.C., Boechat, M.S.B. (2019) First report of a genetic map and evidence of QTL for resistance to CABMV in a segregating population of *Passiflora*. *European Journal of Plant Pathology*, 155: 903–915.
- Santos, I. S., Lima, L.K.S., Sampaio, S.R., Soares, T.L., Jesus, O.N. (2021) Phenological precocity and resistance to CABMV in passion fruit progenies of the third generation backcross [(*P. edulis* × *P. cincinnata*) × *P. edulis*]. *Euphytica*, 217(6)112.
- ScienceDirect Topics. (2023) Passifloraceae – an overview. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/passifloraceae>>. Acesso em: 15 maio.

- Seidel, E. J.; Moreira Júnior, F. J.; Ansuji, A. P.; Noal, M. R. C. (2008) Comparação entre o método Ward e o método K-médias no agrupamento de produtores de leite. *Ciência e Natura*, 30 (1): 7- 15.
- Silva, F.H.L., Viana, A.P., Ferreira, R.T., Freitas, J.C.O., Santos, J.O., Rodrigues, D.L. (2014). Measurement of genetic diversity in progenies of sour passion fruit by ward-mlm methodology: a strategy for heterotic group formation. *Ciência e Agrotecnologia*, 38(3), 240–246.
- Silva, F.H.L., Muñoz, P.R., Vincent, C.I., Viana, A.P. (2016) Generating relevant information for breeding *Passiflora edulis*: genetic parameters and population structure. *Euphytica*, 208:609–619.
- Silveira, D.C., Machado, J.M., Motta, E.A.M., Barbosa, M.R., Simioni, C., Weiler, R.L., Mills, A., Sampaio, R., Brunet, A.P., Dall’Agnol, M. (2022) Genetic Parameters, Prediction of Gains and Intraspecific Hybrid Selection of *Paspalum notatum* Flüggé for Forage Using REML/BLUP. *Agronomy*, 12(7)1654.
- Souza, A.O., Viana, A.P., Silva, F.F., Azevedo, C.F., Silva, F.A., Silva, F.H.L. (2022) Row–Col and Bayesian approach seeking to improve the predictive capacity and selection of passion fruit. *Scientia Agricola*, 79(4)e20200361.
- Souza, E.O., Môro, G.V., Rodrigues, G.B., Schuster, I. (2022) Genetic similarity between donor and recurrent parents can reduce the number of backcross generation in marker-assisted backcross. *Euphytica*, 218:55.
- Sturm, A.B., Eckert, R.J., Méndez, J.G.M., González-Díaz, P., D. Voss, J.D. (2020) Population genetic structure of the great star coral, *Montastraea cavernosa*, across the Cuban archipelago with comparisons between microsatellite and SNP markers. *Scientific Reports*, 10(1)15432.
- Thokchom, R., Mandal, G. (2020) Production Preference and Importance of Passion Fruit (*Passiflora Edulis*): A Review. *Journal of Agricultural Engineering and Food Technology*, 4:27–30.
- Turchetto-Zolet, A.C. Turchetto, C., Zanella, C. M., Passaia, G. (2017) Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. *Sociedade Brasileira de Genética*, 180p.

- Viana, A.J.C., Souza, M.M., Araújo, I.S., Corrêa, R.X., Ahnert, D. (2010) Genetic diversity in *Passiflora* species determined by morphological and molecular characteristics. *Biologia Plantarum*, 54, 535–538.
- Viana, A.P., Pereira, T.N.S., Pereira, M.G., Souza, M.M., Maldonado, J.F.M., Amaral Júnior, A.T. (2003). 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*, 25(3)489–493.
- Viana, A.P., Silva, F.H.L., Gonçalves, G.M., Silva, M.G.M., Ferreira, R.T., Pereira, T.N.S., Pereira, M.G., Amaral Júnior, A.T., Carvalho, G.F. (2016) UENF Rio Dourado: a new passion fruit cultivar with high yield potential. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 16:250–253.
- Vidal, A.H., Lacorte, C., Sanches, M.M., Alves-Freitas, D.M.T., Abreu, E.F.M., Pinheiro-Lima, B., Rosa, R.C.C., Jesus, O.N., Campos, M.A., Felix, G.P., et al. (2023) Characterization of Cucurbit Aphid-Borne Yellow Virus (CABYV) from Passion Fruit in Brazil: Evidence of a Complex of Species within CABYV Isolates. *Viruses*, 15, 410.
- Vidal, R.F. (2021) *Avaliação da população RC<sub>2</sub> de Passiflora e seleção de genótipos para compor o ciclo de seleção recorrente visando resistência ao cowpea aphid-borne mosaic vírus*. Tese (doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 108p.
- Vidal, R.F., Viana, A.P., Preisigke, S.C., Cavalcante, N.R., Gonçalves Júnior, D.H., Mendes, D.S. (2021) Research Article Evaluation of resistance to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in passion fruit backcrosses for recurrent selection and development of resistant cultivars. *Genetics and Molecular Research*, 20(1).
- Vieira, M.L.C., Santini, L., Diniz, A.L., Munhoz, C.F. (2016) Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39(3)312–328.

- Walker, C.A., Pita, F., Campbell, K.G. (2011) Comparison of linear mixed models for multiple environment plant breeding trials. *Conference on Applied Statistics in Agriculture*. <https://doi.org/10.4148/2475-7772.1054>
- Wang, H., Yang, B., Wang, H., Xiao, H. (2021) Impact of different numbers of microsatellite markers on population genetic results using SLAF-seq data for *Rhododendron* species. *Scientific Reports*, 11(1)8597.
- Wang, M.L., Barkley, N.A., Tracie, M. (2009) Jenkins Microsatellite Markers in Plants and Insects. Part I: Applications of Biotechnology. *Genes Genomes and Genomics, Global Science Books*, 3:54-67.
- Wang, Y., Teng, Y., Zhang, J., Zhang, Z., Wang, C. , Wu, X., Long, X. (2023) Passion fruit plants alter the soil microbial community with continuous cropping and improve plant disease resistance by recruiting beneficial microorganisms. *PLOS ONE*, 18(2)e0281854.
- Whittaker, J.C., Harbord, R.M., Boxall, N., Mackay, I., Dawson, G., Silbly, R.M. (2003) Likelihood-based estimation of microsatellite mutation rates. *Genetics*, 164(2):781-7.
- Wright, S. (1923) The theory of path coefficients a reply to niles's criticism. *Genetics*. 8: 239-255
- Xia, Z., Huang, D., Zhang, S., Wang, W., Ma, F., Wu, B., Xu, Y., Xu, B., Chen, D., Zou, M., Xu, H., Zhou, X., Zhan, R., Song, S. (2021) Chromosome-scale genome assembly provides insights into the evolution and flavor synthesis of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Horticulture Research*, 8(1)1–14.
- Xu, M., Hu, T., Poethig, R.S. (2021) Low light intensity delays vegetative phase change. *Plant Physiology*, 187(3)1177–1188.
- Zanella, M. C.; Turchetto, C.; Palma-Silva, C.; Sperb-Ludwig, F. (2017) Microsatélites: Metodologias de identificação e análise, *In: Turchetto-Zolete, A. C.; Turchetto, C.; Zanella, C. M.; Passaia, G. Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 94-113p.

- Zhang, C., Jia, C., Liu, X., Zhao, H., Hou, L., H., Li, M., Cui, B., Li, Y. (2022) Genetic Diversity Study on Geographical Populations of the Multipurpose Species *Elsholtzia stauntonii* Using Transferable Microsatellite Markers. *Frontiers in Plant Science*, 13.
- Zhang, Y., Xu, Y., Xing, W.T., Wu, B., Huang, D.M., Ma, F.N., Zhan, R.I., Sun, P.G., Xu, Y.Y., Song, S. (2023) Identification of the passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) MYB family in fruit development and abiotic stress, and functional analysis of PeMYB87 in abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1124351.
- Zhao, C., Qiu, J., Agarwal, G., Wang, J., Ren, X., Xia, H., Guo, B., Ma, C., Wan, S., Bertioli, D.J., Varshney, R.K., Pandey, M.K., Wang, X. (2017) Genome-Wide Discovery of Microsatellite Markers from Diploid Progenitor Species, *Arachis duranensis* and *A. ipaensis*, and Their Application in Cultivated Peanut (*A. hypogaea*). *Frontiers in Plant Science*, 8:1209.